

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092547 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.09

(22) Дата подачи заявки
2019.04.24

(51) Int. Cl. C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(54) СВЯЗАННЫЕ СО СЛИТЫМ ПЕПТИДОМ, СОДЕРЖАЩИМ ГЛЮКАГОНПОДОБНЫЙ ПЕПТИД 1 (GLP-1), ЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ТИРОЗИНТИРОЗИНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/662,313; PCT/US2018/029284
(32) 2018.04.25
(33) US
(86) PCT/IB2019/053384
(87) WO 2019/207505 2019.10.31
(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Камачо Рауль, Кейс Мартин А., Чи
Эллен, Эдаветтал Сьюзан, Эдвардс
Уилсон, Норкуэй Лиза, Уолл Марк
Дж., Чжан Жуй, Чжэн Сунмао, Чжан
Юэ-Мэй (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение содержит конъюгаты, содержащие слитый пептид, содержащий глюкагонподобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом РУУ. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям и способам их применения. Эти новые конъюгаты используют для профилактики, лечения или облегчения заболеваний и расстройств, описанных в настоящем документе.

A1

202092547

202092547

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565171EA/020

СВЯЗАННЫЕ СО СЛИТЫМ ПЕПТИДОМ, СОДЕРЖАЩИМ ГЛЮКАГОН-ПОДОБНЫЙ ПЕПТИД 1 (GLP-1), ЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ТИРОЗИН-ТИРОЗИНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке РСТ № РСТ/US2018/029284, поданной 25 апреля 2018 г., и предварительной заявке на патент США № 62/662 313, поданной 25 апреля 2018 г. Каждое описание полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится по существу к новым связанным со слитыми пептидами, содержащими глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1), циклическим пептидным тирозин-тирозиновым (PYY) конъюгатам, которые являются модуляторами рецептора нейропептида Y2 и рецептора GLP-1. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям и способам их применения. Новые связанные со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, циклические PYY конъюгаты используют для профилактики, лечения или облегчения заболеваний и расстройств, таких как, среди прочих, ожирение, диабет 2 типа, метаболический синдром, резистентность к инсулину и дислипидемия.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0003] Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде с помощью EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла «PRD3465 Sequence Listing» и датой создания 2 апреля 2019 г. и имеющий размер 409 кб. Перечень последовательностей, представленный с помощью EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки. В случае любого несоответствия в отношении структур для SEQ ID NO: 225-262 между информацией, описанной в настоящем документе, и перечнем последовательностей, представленным в электронном виде с помощью EFS-Web с именем файла «PRD3465 Sequence Listing», приоритет будет иметь информация, приведенная в настоящем документе.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Рецепторы нейропептида Y (NPY) активируются близкородственной группой пептидных агонистов, называемой «семейством NPY», которые имеют разные аффинности для каждого подтипа рецептора. NPY, пептидный тирозин-тирозиновый (PYY) и панкреатический полипептид (PP), каждый из которых имеет длину 36 аминокислот, являются агонистами семейства рецепторов NPY. NPY представляет собой нейротрансмиттер, который синтезируется, совместно хранится и высвобождается совместно с норэпинефрином и эпинефрином. NPY является одним из наиболее часто

встречающихся и широко распространенных пептидов в центральной нервной системе (ЦНС) людей и грызунов, и он экспрессируется в областях головного мозга, связанных с питанием и стрессом. В периферической нервной системе нейроны, содержащие NPY, преимущественно являются симпатическими. PYY преимущественно синтезируется и высвобождается эндокринными клетками кишечника. Расщепление NPY и PYY эндотелиальной серин-протеазой, дипептидилпептидазой IV (DPP-IV) генерирует NPY₃₋₃₆ и PYY₃₋₃₆, которые являются селективными лигандами для подтипов Y2 и Y5 семейства рецепторов NPY. PP главным образом встречается в клетках панкреатических островков, отличных от содержащих инсулин, глюкагон или соматостатин.

[0005] На сегодняшний день установлено пять различных рецепторов NPY, четыре из которых, как известно, имеют отношение к физиологии человека. Рецепторы Y1, Y2 и Y5 предпочтительно связывают NPY и PYY, тогда как рецептор Y4 предпочтительно связывает PP. Рецепторы Y2 и Y5 также эффективно активируются с помощью NPY₃₋₃₆ и PYY₃₋₃₆. В основном, семейство лигандов NPY обладает переменной селективностью к каждой изоформе рецептора NPY, причем ранее сообщалось, что PYY₃₋₃₆ имеет селективность к изоформе Y2 от умеренной до сильной. Каждый из этих рецепторов сочетается с ингибированием аденилатциклазы посредством чувствительного к токсину коклюша G α_i .

[0006] PYY секретируется из эндокринных L-клеток в ответ на прием пищи, и в частности после приема жира. PYY₁₋₃₆ доминирует в состоянии натощак, причем PYY₃₋₃₆ является основной формой, обнаруживаемой после приема пищи у людей, при этом концентрации в плазме отрицательно коррелирует с количеством потребленных калорий. Показано, что PYY₃₋₃₆ снижает потребление пищи у людей, обезьян, крыс, кроликов и мышей (Batterham et al., Nature 418(6898):650-4 (2002); Batterham et al., N Engl J Med 349(10):941-8 (2003); Challis et al., Biochem Biophys Res Commun 311(4):915-9 (2003)). Считается, что анорексигенные эффекты PYY₃₋₃₆ являются Y2-опосредованными, основанными на предпочтительном связывании с этим рецептором и потерей эффективности питания у мышей с дефицитом Y2 (Batterham et al., Nature 418(6898): 650-4 (2002)). Внутривенная инъекция PYY₃₋₃₆ снижает потребление пищи у крыс и мышей (Batterham et al., Nature 418(6898):650-4 (2002)), что указывает на возможность опосредования этих эффектов за счет взаимодействия гипоталамических рецепторов Y2. Кроме того, показано, что острые эффекты в качестве отклика на питание обеспечивают дозозависимые эффекты в отношении массы тела у мышей линий ob/ob, мышей DIO и мышей Zucker fa/fa (Pittner et al., Int J Obes Relat Metab Disord 28(8):963-71(2004)). Кроме того, показано, что PYY₃₋₃₆ также улучшает опосредованное инсулином удаление глюкозы и чувствительность к инсулину у грызунов DIO (Vrang et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291(2): R367-75(2006)). Бариатрическая хирургия приводит к увеличению иммунореактивности по отношению к циркулирующему PYY (le Roux et al., Ann Surg 243(1):108-14(2006)), которая, по-видимому, играет роль в снижении веса после операции.

[0007] Учитывая его роль в контроле аппетита и потребления пищи, а также его

анти-секреторные эффекты и эффекты, стимулирующие всасывание, в желудочно-кишечном тракте у млекопитающих, PYY₃₋₃₆ может быть эффективен при лечении ожирения и связанных с ним состояний, а также при ряде желудочно-кишечных расстройств. Однако терапевтическая полезность самого PYY₃₋₃₆ в качестве лечебного агента ограничена его быстрым метаболизмом и результирующим коротким периодом полужизни в кровотоке (Torang et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 310:R866-R874 (2016)).

[0008] Инкретиновый гормон, GLP-1 и активация его рецептора (GLP1R) оказывают благоприятное воздействие на метаболизм глюкозы и энергетический баланс у людей, включая стимуляцию глюкозозависимой секреции инсулина (Kreymann et al., Lancet 2:1300-1304 (1987)), а также ингибирование секреции глюкагона (Gutniak et al., N Engl J Med 326:1316-1322 (1992)), опорожнение желудка (Wettergren et al. Digestive Diseases Sciences 38:665-673 (1993)), и потребление пищи (Flint et al., JCI 101:515-520 (1998)). Также было показано, что агонисты GLP1R существенно снижают риск развития сердечно-сосудистых и микрососудистых исходов (Marso et al., N Engl J Med 375(4):311-322 (2016)) и почечных заболеваний (Mann et al., N Engl J Med 377(9):839-848 (2017)) у пациентов с диабетом 2 типа. GLP-1 характеризуется коротким периодом полужизни, что делает применение GLP-1 непрактичным в качестве потенциального терапевтического средства. Период полужизни в кровотоке ограничен протеолитическими лабильностями дипептидилпептидазы IV (Zhu, L. et al., JBC 278:22418-22423 (2003)) и нейтральной эндопептидазой (Hupe-Sodmann et al., Regul Pept 58(3): 149-156 (1995)), а также почечной фильтрацией (Ruiz-Grande et al., Can J Physiol Pharmacol 68(12):1568-1573 (1990)).

[0009] Таким образом, желательным является получение аналога или производного PYY и/или аналога или производного GLP-1 с улучшенными метаболической стабильностью и фармакокинетическим профилем по сравнению с PYY₃₋₃₆ и/или GLP-1 соответственно. Такие производные с длительным периодом полужизни в условиях *in vivo* обеспечат модуляцию рецептора Y2 и/или GLP-1 с большей продолжительностью действия, что делает их приемлемыми для использования в качестве терапевтических агентов для пациентов, нуждающихся в такой модуляции.

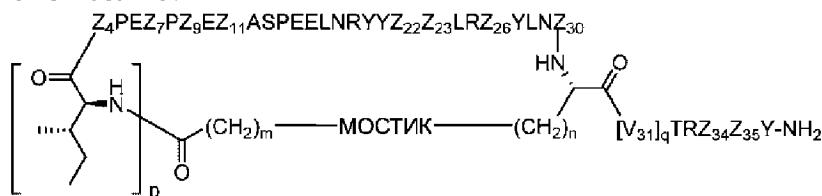
[0010] Приведенное выше описание представлено исключительно для лучшего понимания природы проблем, стоящих перед данной областью техники, и не должно толковаться каким-либо образом как признание предшествующего уровня техники; а также цитирование какой-либо ссылки в настоящем документе не должно толковаться как признание, что такая ссылка представляет собой «предшествующий уровень техники» в сравнении с настоящей заявкой.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] В одном общем аспекте изобретение относится к новым связанным со слитыми пептидами, содержащими глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1), циклическим пептидным тирозин-тирозиновым (PYY) конъюгатам, которые являются модуляторами рецептора нейропептида Y2 и рецептора GLP-1.

[0012] В настоящем документе предложены конъюгаты, содержащие слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит GLP-1 или вариант пептида GLP-1, первый линкерный пептид, пептид шарнирной Fc-области и второй линкерный пептид, причем первый линкер необязательно отсутствует.

[0013] В определенных вариантах осуществления циклический пептид PYY представлен соединением формулы **I**, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Formula I

Формула **I**,

где:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазолил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K;

Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K;

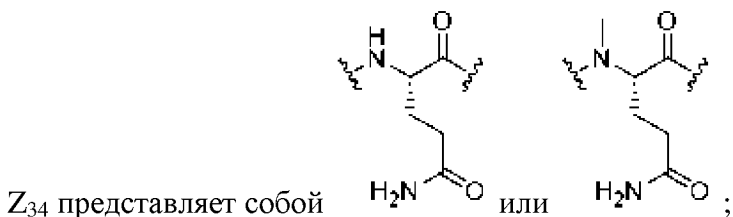
Z₂₂ представляет собой A или K;

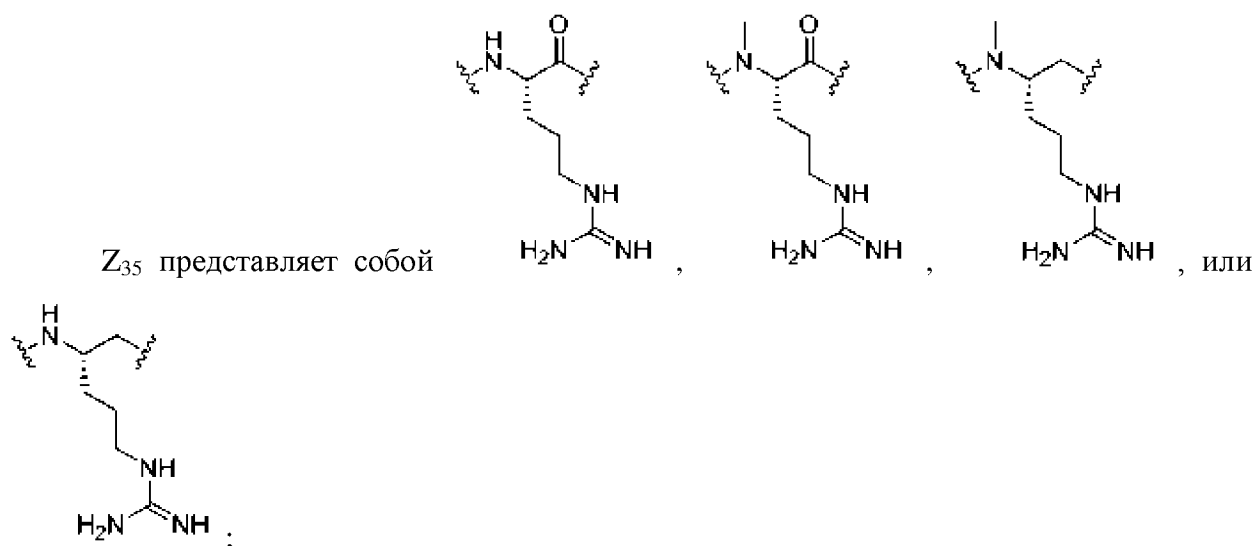
Z₂₃ представляет собой S или K;

Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L, W или отсутствует;

при условии, что Z₃₀ отсутствует, только если q равно 1;





причем производное представляет собой соединение формулы **I**, которое модифицировано с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из амидирования, ацилирования и пегилирования.

[0014] В определенных вариантах осуществления циклический пептид РУУ представлен соединением формулы **I**, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

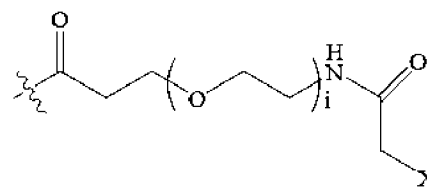
q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2-$,

$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой K, A, E, S или R;

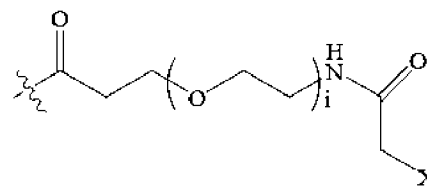
Z_7 представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



X , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X=\text{Br}$, I или Cl,

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

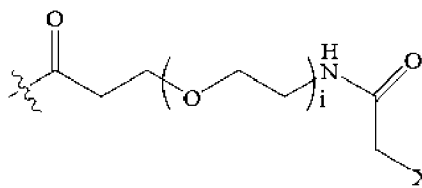
Z_9 представляет собой G или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



X , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

$$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}, -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I} \text{ или } -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl};$$

Z₁₁ представляет собой D или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена

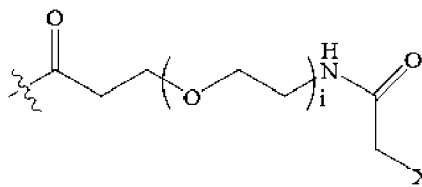


K_i , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

X=Br, I или Cl,

$$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}, -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I} \text{ или } -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl};$$

Z₂₂ представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К необязательно замещена

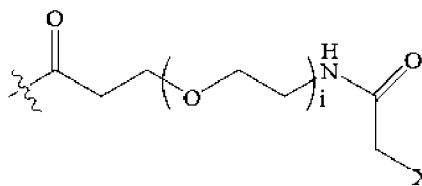


K_i , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

X=Br, I или Cl,

$$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}, -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I} \text{ или } -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl};$$

Z₂₃ представляет собой S или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



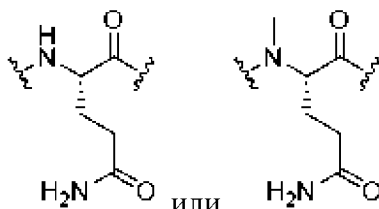
K_i , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

X=Br, I или Cl,

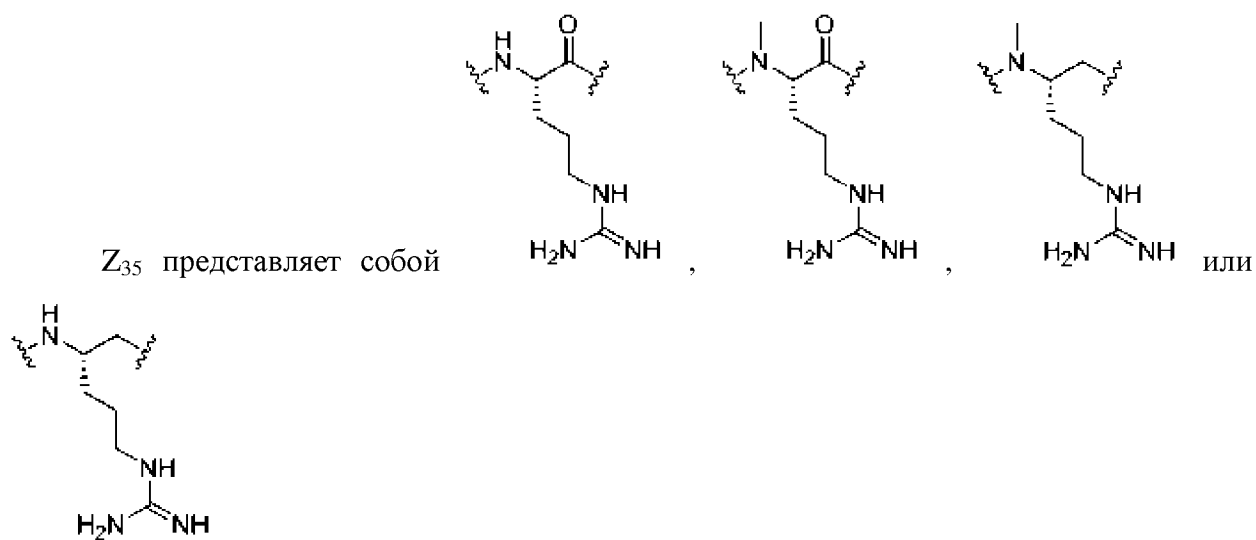
$$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}, -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I} \text{ или } -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl};$$

Z_{26} представляет собой А или Н;

Z_{30} представляет собой L ;



Z_{34} представляет собой $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})$ или $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})$; и



[0015] В определенных вариантах осуществления циклический пептид РУУ представлен соединением формулы **I**, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

n равно 1, 2 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q может быть равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой К, А, Е, S или R;

Z_7 представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_9 представляет собой G или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{11} представляет собой D или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{22} представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

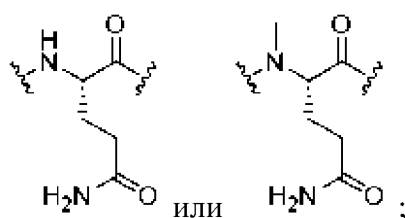
Z_{23} представляет собой S или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

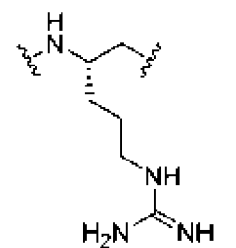
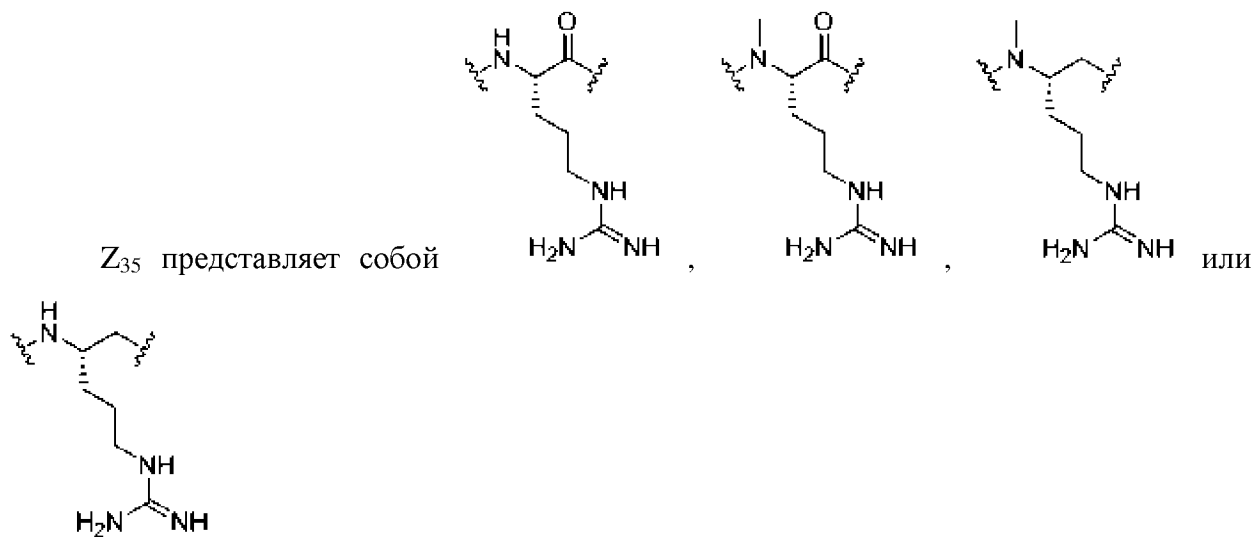
Z_{26} представляет собой А или H;

Z_{30} представляет собой L,

Z₃₄ представляет собой



Z₃₅ представляет собой



[0016] В определенных вариантах осуществления циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1-54 или ее фармацевтически приемлемой соли. В определенных вариантах осуществления циклический пептид PYY выбран из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 или 34.

[0017] В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1 ковалентно связан с циклическим пептидом PYY остатком лизина циклического пептида PYY. В определенных вариантах осуществления только один из Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ и Z₂₃ в формуле **I** представляет собой лизин, причем лизин ковалентно связан с цистеиновым остатком во втором линкерном пептиде слитого пептида, содержащего GLP-1.

[0018] В определенных вариантах осуществления пептид GLP-1 слитого пептида, содержащего GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-59. В определенных вариантах осуществления первый линкерный пептид слитого пептида, содержащего GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-83. В определенных вариантах осуществления пептид шарнирной Fc-области слитого пептида, содержащего GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84-90. В определенных вариантах осуществления второй линкерный пептид слитого пептида, содержащего GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 91-112. В определенных вариантах осуществления второй линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, 94, 95, 106 или 111.

[0019] Кроме того, предложены конъюгаты, содержащие слитый пептид,

содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113-224 и 267-274, и причем циклический пептид PYY содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 или 34. В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113 или SEQ ID NO: 136. В определенных вариантах осуществления цистеиновый остаток между аминокислотными остатками 287-289 SEQ ID NO: 113 или SEQ ID NO: 136, предпочтительно цистеиновый остаток 288 в SEQ ID NO: 113 или SEQ ID NO: 136, ковалентно связан с остатком лизина в остатке 7, 9, 11, 22 или 23 циклического пептида PYY, предпочтительно остатка 11 лизина циклического пептида PYY, напрямую или при помощи химического линкера.

[0020] Кроме того, предложены конъюгаты, содержащие слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем конъюгат содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 225-262 или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0021] Кроме того, предложены способы получения конъюгатов изобретения. Способы включают реакцию электрофильного соединения, предпочтительно бромацетамида или малеимида, введенного в боковую цепь циклического пептида PYY, предпочтительно в боковую цепь остатка лизина циклического пептида PYY, с сульфгидрильной группой цистеинового остатка второго линкерного пептида (например, карбоксиконцевого линкерного пептида) слитого пептида, содержащего GLP-1, с образованием, таким образом, ковалентной связи между циклическим пептидом PYY и моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0022] Кроме того, обеспечены фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0023] Кроме того, предложены способы лечения или профилактики заболевания или расстройства у пациента, причем указанное заболевание или расстройство представляет собой ожирение, диабет типа I или типа II, метаболический синдром, резистентность к инсулину, нарушение толерантности к глюкозе, гипергликемию, гиперинсулинемию, гипертриглицеридемию, гипогликемию, обусловленную врожденным гиперинсулинизмом (CHI), дислипидемию, атеросклероз, диабетическую нефропатию и другие факторы риска для сердечно-сосудистой системы, такие как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороз, воспаление, неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), болезнь почек и экзему. Способы включают введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции изобретения.

[0024] Кроме того, предложены способы уменьшения по меньшей мере одного из потребления пищи или массы тела у пациента. Способы включают введение пациенту

эффективного количества фармацевтической композиции изобретения.

[0025] Кроме того, предложены способы модуляции активности рецептора Y2 или активности рецептора GLP-1 у пациента. Способы включают введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции изобретения.

[0026] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят путем инъекции.

[0027] Кроме того, предложены наборы, содержащие соединения изобретения, предпочтительно дополнительно содержащие лираглутид и устройство для инъекции.

[0028] Кроме того, предложены способы получения фармацевтических композиций изобретения. Способы включают объединение конъюгата с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[0029] Дополнительные аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут более понятны после прочтения представленного ниже подробного описания изобретения и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0030] Приведенное выше краткое описание, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, будут более понятны при изучении вместе с приложенными рисунками. Однако необходимо понимать, что применение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0031] На Фиг. 1A-1B показана стабильность в плазме человека фрагментов слитого пептида, содержащего GLP-1, в условиях *ex vivo*. На Фиг. 1A показан график, демонстрирующий стабильность в плазме человека в условиях *ex vivo* слитых пептидов, содержащих GLP-1, GF32 (SEQ ID NO 144) (▲), GF36 (148) (Δ), GF33 (145) (▼), GF39 (151) (∇), GF34 (146) (⊙), GF35 (147) (●), GF37 (149) (○), GF40 (152) (□) и дулаглутидный контрольный образец (v), инкубированный в плазме человека при 37 °C в течение 7 дней. На Фиг. 1B показан график, демонстрирующий стабильность в плазме человека в условиях *ex vivo* GF40 (SEQ ID NO:152) (▲) и GF34 (SEQ ID NO:146) (●) и их соответствующих связанных со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, циклических пептидных РYY конъюгатов SEQ ID NO:248(Δ) и SEQ ID NO:262(○), и другого слитого пептида, содержащего GLP-1, GF41 (SEQ ID NO:153) (▼), инкубированного в человеческой плазме в условиях *ex vivo* при 37 °C в течение 7 дней вместе с дулаглутидным контрольным образцом (□).

[0032] На Фиг. 2A-2B показано потребление пищи и потеря массы тела у мышей DIO. На Фиг. 2A и 2B показаны графики потребления пищи (ФИГ. 2A) и потери массы тела в процентах (ФИГ. 2B) у мышей DIO, проходивших лечение дулаглутидом, соединением 1 (GF1 (SEQ ID NO: 113)) (0,3 нмоль/кг) и соединением 2 (SEQ ID NO: 225) (0,3 нмоль/кг). Мышам подкожно вводили базовый раствор (белые круги), дулаглутид (белые квадраты), соединение 1 (черные квадраты) или соединение 2 (черные круги) и регистрировали массу тела и потребление пищи в течение 3 дней.

[0033] На **Фиг. 3А-3В** показано потребление пищи и потеря массы тела у мышей DIO. На Фиг. 3А и 3В показаны графики потребления пищи (ФИГ. 3А) и потери массы тела в процентах (ФИГ. 3В) у мышей DIO, проходивших лечение дулаглутидом, соединением 3 (GF24 (SEQ ID NO: 136)) (0,3 нмоль/кг) и соединением 4 (SEQ ID NO: 229) (0,3 нмоль/кг). Мышам подкожно вводили базовый раствор (белые круги), дулаглутид (белые квадраты), соединение 3 (черные квадраты) или соединение 4 (черные круги) и регистрировали массу тела и потребление пищи в течение 3 дней.

[0034] На **Фиг. 4А-4В** показан ИПТТГ у мышей DIO. На Фиг. 4А показан график уровней глюкозы у мышей DIO, получавших лечение дулаглутидом, соединением 4 (SEQ ID NO: 229) и соединением 2 (SEQ ID NO: 225) в дозах 0,3 нмоль/кг и 1,0 нмоль/кг. На Фиг. 4В показан график NET AUC относительно исходного уровня у мышей DIO, получавших лечение дулаглутидом, соединением 4 (SEQ ID NO: 229) и соединением 2 (SEQ ID NO: 225) в дозах 0,3 нмоль/кг и 1,0 нмоль/кг. Мышам подкожно вводили базовый раствор (черные круги), дулаглутид (белые/черные квадраты), соединение 4 (белые/черные треугольники) или соединение 2 (белые/черные круги, пунктирная линия). Все соединения вводили в дозе 0,3 или 1,0 нмоль/кг. После 18 часового голодания мышам вводили 1 г/кг декстрозы для внутрибрюшинного теста на толерантность к глюкозе (IGPTT).

[0035] На **Фиг. 5А-5В** показано потребление пищи и потеря массы тела у мышей DIO. На Фиг. 5А и 5В показаны графики потребления пищи (Фиг. 5А) и потери массы тела в процентах (Фиг. 5В) у мышей DIO, проходивших лечение дулаглутидом, GF41 (SEQ ID NO: 153) (0,3 нмоль/кг) и GF40 (SEQ ID NO: 152) (0,3 нмоль/кг). Мышам подкожно вводили базовый раствор (белые круги), дулаглутид (белые квадраты), SEQ ID NO:153 (черные квадраты) или SEQ ID NO:152 (черные круги) и регистрировали массу тела и потребление пищи в течение 3 дней.

[0036] На **Фиг. 6А-6В** показано потребление пищи и потеря массы тела у мышей DIO. На Фиг. 6А и 6В показаны графики потребления пищи (Фиг. 6А) и потери массы тела в процентах (Фиг. 6В) у мышей DIO, проходивших лечение дулаглутидом и GF19 (SEQ ID NO: 131) (0,3 нмоль/кг). Мышам подкожно вводили базовый раствор (белые круги), дулаглутид (белые квадраты), или SEQ ID NO:131 (черные квадраты) и регистрировали массу тела и потребление пищи в течение 3 дней.

[0037] На **Фиг. 7А-7В** показан ИПТТГ у мышей DIO. На Фиг. 7А показан график уровней глюкозы у мышей DIO, получавших лечение дулаглутидом, соединением 4 (SEQ ID NO: 229) и соединением 3 (GF24 (SEQ ID NO: 136)) в дозе 0,3 нмоль/кг. На Фиг. 7В показан график NET AUC относительно исходного уровня у мышей DIO, получавших лечение дулаглутидом, соединением 4 (SEQ ID NO: 229) и соединением 3 (GF24 (SEQ ID NO: 136)) в дозе 0,3 нмоль/кг. Мышам подкожно вводили базовый раствор (черные круги), дулаглутид (белые квадраты), соединение 4 (белые круги) или соединение 3 (черные квадраты, пунктирная линия). Все соединения вводили в дозе 0,3 нмоль/кг. После 18 часового голодания мышам вводили 1 г/кг декстрозы для внутрибрюшинного теста на

толерантность к глюкозе (IGPTT).

[0038] На **Фиг. 8А-8В** показан анализ зависимости ответа на воздействие соединения 4 (SEQ ID NO: 229) или дулаглутида на изменение потребления пищи и массы тела мышей DIO после однократной дозы. На Фиг. 8А и 8В показаны графики процентного изменения потребления пищи (Фиг. 8А) и процентного изменения массы тела (Фиг. 8В). Незаштрихованные квадраты представляют собой наблюдаемые отдельные данные для дулаглутида. Заштрихованные квадраты представляют собой наблюдаемые отдельные данные для соединения 4. Изогнутые линии представляют кривые наилучшего соответствия на основании нелинейной регрессии ответа на воздействие для дулаглутида (серая кривая) и соединения 4 (черная кривая). Серая вертикальная линия представляет среднее значение дулаглутида ($\pm$ стандартное отклонение) на день 3 при концентрации HGE 0,3 нмоль/кг во всех проанализированных исследованиях: $\approx 0,32 (\pm 0,15)$ нМ.

[0039] На **Фиг. 9А-9В** показан анализ зависимости ответа на воздействие соединения 4 (черные символы) или дулаглутида (белые квадраты) на потребление калорий у яванских макаков с избыточным весом на день 9 (перед введением дозы) и день 12 (перед введением дозы) после многократного (4, Q3D) подкожного (SC) введения. Активные концентрации GLP-1 измеряли с помощью как анализа связывания с лигандом (LBA) (Фиг. 9А), так и анализа ЖХ-МС/МС (Фиг. 9В). Изогнутые линии представляют кривые наилучшего соответствия на основании нелинейной регрессии ответа на воздействие для дулаглутида (серая кривая) и соединения 4 (черная кривая). Данные для соединения 4, вводимого в дозе 0,0074 мг/кг, не включали в анализ зависимости ответа на воздействие, а включали только в график. % изменения ежедневного потребления калорий рассчитывали относительно исходного уровня, который определяли как среднее значение в дни с -2 по 0.

[0040] На **Фиг. 10А-10В** показано потребление пищи (ПП) в граммах (Фиг. 10А) и изменение массы тела (МТ) в % (Фиг. 10В) у мышей DIO, получавших лечение базовым раствором, дулаглутидом (0,3 нмоль/кг) или SEQ ID NO: 140 (0,3 нмоль/кг). За один день перед началом исследования мышей DIO взвешивали и разделяли на группы по массе тела. Мышам вводили подкожную инъекцию (2 мл/кг) базового раствора (белые круги), дулаглутида (белые квадраты) или SEQ ID NO 140 (черные квадраты), а МТ и ПП регистрировали в течение следующих 3 дней.

[0041] На **Фиг. 11А-11В** показано потребление пищи (ПП) в граммах (Фиг. 11А) и изменение массы тела (МТ) в % (Фиг. 11В) у мышей DIO, получавших лечение базовым раствором, дулаглутидом (0,3 нмоль/кг), SEQ ID NO:131 (0,3 нмоль/кг) или SEQ ID NO: 251 (0,3 нмоль/кг). За один день перед началом исследования мышей DIO взвешивали и разделяли на группы по массе тела. Мышам вводили подкожную инъекцию (2 мл/кг) базового раствора (белые круги), дулаглутида (белые квадраты), SEQ ID NO 131 (черные квадраты) или SEQ ID NO 251 (черные круги), а МТ и ПП регистрировали в течение следующих 3 дней.

[0042] На **Фиг. 12** показан график, демонстрирующий результаты первичного скринингового анализа GLP-1 R человека, сравнивающего пептид GLP-1 (SEQ ID NO: 58) с различными по длине первыми линкерными пептидами (N-концевые линкерные пептиды). SEQ ID NO: 171, содержащая самый длинный первый линкерный пептид (SEQ ID NO: 67) ($\square$), была наиболее активной, за которой следовали слитые пептиды, содержащие GLP-1, с более короткими первыми линкерными пептидами, т. е. SEQ ID NO: 169 с первым линкерным пептидом SEQ ID NO: 64 ($\blacktriangle$), и SEQ ID NO 168 с первым линкерным пептидом SEQ ID NO: 74 (∇). SEQ ID NO: 167, которая не имеет промежуточного первого линкерного пептида между пептидом GLP-1 и пептидом шарнирной Fc-области (λ), была наименее активной. Пептид GLP-1 (ν) был включен в качестве аналитического контроля.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0043] В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

[0044] Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании.

[0045] Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

[0046] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (мас/об) включает от 0,9% (мас/об) до 11% (мас/об). В контексте настоящего документа использование числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

[0047] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных

экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты указаны в изобретении.

[0048] Используемые в настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любая другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и являются не исключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явной форме не указано иное, союз «или» относится к включающему «или», а не к исключающему «или». Например, условие «А или В» выполняется в любой одной из следующих ситуаций: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или присутствует) и оба элемента А и В истинны (или присутствуют).

[0049] Следует также понимать, что термины «около», «приблизительно», «в основном», «главным образом» и подобные термины, используемые в настоящем документе при упоминании размера или характеристики компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанные размер/характеристика не являются строгой границей или параметром и не исключают незначительных отклонений от них, которые функционально одинаковы или сходны, как будет понятно обычному специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, содержащие числовой параметр, будут включать отклонения, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не изменят наименьшую значащую цифру.

[0050] Термины «идентичный» или процентная «идентичность» в контексте двух или большего числа нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, пептида GLP-1, линкерных пептидов, пептидов шарнирной Fc-области, циклических пептидных последовательностей PYY₃₋₃₆) относятся к двум или большему числу последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют указанную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, по результатам измерения с применением одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального контроля, с применением способов, известных в данной области техники, в свете настоящего описания.

[0051] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают испытываемую последовательность. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в

компьютер вводят испытуемую и эталонную последовательности, при необходимости определяют координаты подпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма последовательности. Впоследствии алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательности для испытуемой (-ых) последовательности (-ей) по отношению к эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

[0052] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Заявк. Math. 2:482 (1981), с использованием алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия по Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или путем визуального контроля (см. в основном Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие компаний Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (Дополнение, 1995) (Ausubel)).

[0053] Примерами алгоритмов, приемлемых для определения процентной идентичности последовательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в работе Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) and Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997) соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализов общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации.

[0054] Дополнительным показателем по существу идентичности двух нуклеотидных последовательностей или двух полипептидов, является иммунологическое перекрестное реагирование полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком по существу идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот является гибридизация этих двух молекул друг с другом в строгих условиях.

[0055] В настоящем документе термин «пациент» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Используемый в настоящем документе термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п. и более предпочтительно человека.

[0056] Термин «введение» применительно к способам изобретения означает способ терапевтической или профилактической профилактики, лечения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания, как описано в настоящем документе,

посредством применения конъюгата или соединения изобретения или его формы, композиции или лекарственного средства. Такие способы включают введение эффективного количества указанного конъюгата, соединения, формы, композиции или лекарственного средства в разное время в течение курса лечения или одновременно с другими конъюгатами в комбинированной форме. Способы изобретения следует понимать как включающие все известные терапевтические схемы лечения.

[0057] Термин «эффективное количество» означает такое количество активного конъюгата, соединения или фармацевтического средства, которое вызывает биологический или медицинский отклик системы тканей, животного или человека, к которому стремится исследователь, ветеринар, врач или иной специалист, который включает профилактику, лечение или облегчение синдрома, расстройства или заболевания, на которые направлено лечение, или симптомов синдрома, расстройства или заболевания, на которые направлено лечение.

[0058] Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин «композиция» охватывает продукт, содержащий установленные ингредиенты в установленных количествах, а также к любому продукту, который можно получать прямо или косвенно из комбинаций установленных ингредиентов в установленных количествах.

[0059] При использовании в настоящем документе термин «связанный» относится к объединению или соединению двух или более объектов друг с другом. Применительно к химическим или биологическим соединениям термин «связанный» может означать ковалентную связь между двумя или более химическими или биологическими соединениями. В качестве не имеющего ограничительного характера примера слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) изобретения может быть связан с интересующим циклическим пептидом PYY с образованием конъюгата циклического пептида PYY, связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1. В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1 изобретения, может быть ковалентно связан с циклическим пептидом PYY изобретения посредством по меньшей мере одного линкера. Конъюгат циклического пептида PYY, связанный со слитым пептидом, содержащим GLP-1, может быть образован путем проведения специфических химических реакций, предназначенных для конъюгирования слитого пептида, содержащего GLP-1, с циклическим пептидом PYY. В качестве примера, конъюгат слитого пептида, содержащего GLP-1, связанный с циклическим пептидом PYY, может быть образован путем проведения реакции конъюгации. Реакция конъюгации может, например, включать реакцию электрофильной группы (например, бромацетамида или малеимида) с сульфгидрильной группой цистеинового остатка на интересующем пептиде (например, слитом пептиде, содержащем GLP-1). Электрофильная группа может, например, быть введена в боковую цепь аминокислотного остатка циклического пептида PYY. Реакция электрофильной группы с сульфгидрильной группой приводит к образованию ковалентной тиоэфирной связи.

[0060] При использовании в настоящем документе термин «пептидный линкер»

или «линкерный пептид» относится к химическому модулю, содержащему одну или более аминокислот, который связывает пептид GLP-1 с пептидом шарнирной Fc-области или который связывает пептид шарнирной Fc-области с циклическим пептидом PYY с образованием конъюгата слитого пептида, содержащего GLP-1, связанного с циклическим пептидом PYY. Слитый пептид, содержащий GLP-1, может, например, содержать первый линкерный пептид и второй линкерный пептид.

[0061] В настоящем документе термин «химический линкер» относится к химическому модулю, не содержащему какой-либо аминокислоты, которая связывает циклический пептид PYY со слитым пептидом, содержащим GLP-1. В определенных вариантах осуществления циклический пептид PYY содержит химический линкер. Химический линкер может, например, включать, без ограничений, углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (PEG) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер, линкер, содержащий ацильную группу, гибридный линкер, состоящий из PEG и внедренного гетероцикла, или углеводородную цепь. Химический линкер может быть, например, сначала ковалентно соединен с циклическим пептидом PYY, затем ковалентно соединен со слитым пептидом, содержащим GLP-1, предпочтительно со вторым линкерным пептидом слитого пептида, содержащего GLP-1.

[0062] В контексте настоящего документа термин «конъюгат» относится к пептиду (например, слитому пептиду, содержащему GLP-1), ковалентно связанному с другой фармацевтически активной функциональной группой (например, циклическому пептиду PYY). Термин «конъюгированный с» относится к пептиду изобретения, ковалентно связанному или ковалентно соединенному с фармацевтически активной функциональной группой, предпочтительно терапевтическим пептидом, напрямую или посредством линкера. В качестве не имеющего ограничительного характера примера пептид может представлять собой слитый пептид, содержащий GLP-1, изобретения, а фармацевтически активная функциональная группа может представлять собой терапевтический пептид, такой как интересующий циклический пептид PYY.

[0063] Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, написаны в соответствии с обычной процедурой, где N-концевая область пептида находится слева, а С-концевая область расположена справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, они представляют собой L-форму представленной аминокислоты, если явно не указано иное.

[0064] Слитые пептиды, содержащие глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1)

[0065] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к слитому пептиду, содержащему глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1). Слитые пептиды, содержащие GLP-1, содержат GLP-1 или вариант пептида GLP-1, первый линкерный пептид (например, аминоконцевой линкер), пептид шарнирной Fc-области и второй линкерный пептид (например, карбокси- (С)-концевой линкер).

[0066] Глюкагон-подобный пептид-1 или вариант пептида GLP-1

[0067] Глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1) представляет собой стимулятор секреции инсулина, синтезированный в кишечнике и высвобожденный в ответ на потребление пищи. Он секретируется преимущественно в двух формах: GLP-1-(7-37) и GLP-1-(7-36)NH₂, обе из которых связываются со специфическим рецептором GLP-1 (GLP-1R) на панкреатических бета-клетках и усиливают стимулированную глюкозой секрецию инсулина.

[0068] Известно множество аналогов и производных GLP-1, которые в настоящем документе могут называться «вариантами GLP-1». Эти варианты пептидов GLP-1 могут включать в себя эксендины, которые являются пептидами, встречающимися в яде ящерицы *Gila monster*. Эти эксендины имеют гомологию последовательности с нативным GLP-1 и могут связывать рецептор GLP-1 и инициировать каскад передачи сигналов в ответ на активности, связанные с GLP-1(7-37).

[0069] Было показано, что GLP-1 и варианты пептидов GLP-1 действуют различными способами, которые могут включать, без ограничений, стимуляцию высвобождения инсулина, снижение секреции глюкагона, подавление опорожнения желудка и усиление использования глюкозы.

[0070] GLP-1R относится к семейству 7-трансмембранных рецепторов класса B, связанных с G-белком, и экспрессируется в широком диапазоне тканей, включая, без ограничений, α -, β -, и δ -клетки панкреатических островков, сердца, почек, желудка, кишечника, нейронов нижнего ганглия блуждающего нерва и нескольких областей центральной нервной системы (ЦНС), включая гипоталамус и мозговой ствол. GLP-1R может связываться с $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, и $G\alpha_o$ (Montrose-Rafizadeh et al., *Endocrinology* 140:1132-40 (1999); Hallbrink et al., *Biochim Biophys Acta* 1546:79-86 (2001)), приводя к внутриклеточной мобилизации кальция, сигнальной трансдукции кальция, аденилатциклазы и фосфолипазы C, а также к активации путей передачи сигналов PKA, PKC, PI-3K, Epac2, и MAPK (Drucker et al., *PNAS* 84:3434-8 (1987); Wheeler et al., *Endocrinology* 133:57-62 (1993); и Holz et al., *JBC* 270:17749-57 (1995)).

[0071] В настоящем документе предложены слитые пептиды, содержащие GLP-1, которые содержат первый компонент, причем первый компонент представляет собой GLP-1 или вариант пептида GLP-1. В настоящем документе термины «пептид GLP-1», «вариант пептида GLP-1», «пептидный вариант GLP-1» и «GLP-1 или вариант пептида GLP-1» используются как взаимозаменяемые. GLP-1 или вариант пептида GLP-1 могут содержать одну из последовательностей, представленных в таблице 1. Последовательность GLP-1 или варианта пептида GLP-1 может быть выбрана на основании по меньшей мере одного из следующих критериев: (i) выход экспрессии, (ii) стабильность в условиях *in vitro*, (iii) активность в условиях *in vitro*, (iv) сохранение активности в условиях *in vitro* после химической конъюгации с циклическим пептидом RYY, (v) отсутствие ксилозилирования серина или потенциального ксилозилирования серина, и (vi) свойства конъюгата слитого пептида, содержащего GLP-1, связанного с циклическим пептидом RYY (например, стабильность в условиях *in vivo* и активность в

условиях *in vivo* (т. е. способны ли GLP-1 или вариант пептида GLP-1 и циклический пептид PYY обладать агонистической активностью в отношении рецепторов GLP-1 и Y2 соответственно)).

[0072] Предполагается, что GLP-1 или варианты пептидов GLP-1, которые составляют первый компонент слитого пептида GLP-1, охватывают пептиды, которые имеют достаточную гомологию и функциональность для нативного GLP-1. GLP-1 или варианты пептидов GLP-1 разработаны с возможностью связываться с рецептором GLP-1 на β -клетках поджелудочной железы, что приводит к тому же сигнальному пути и проявлению той же или подобной инсулинотропной активности, что и в случае, когда нативный GLP-1 связывает рецептор GLP-1 на β -клетках поджелудочной железы.

[0073] Таблица 1. Глюкагоноподобный пептид-1 и его варианты

GLP-1 или вариант пептида GLP-1	Пептидная последовательность	SEQ ID NO:
(A8S, A30E) GLP-1(7-36)	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGR	56
(A8G, G22E, R36G) GLP-1 (7-37)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG	57
Эксендин 4 (1-39)	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSG APPPS	58
Эксендин 4 (1-28)	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKN	59

[0074] Первый линкерный пептид: Аминоконцевой линкер (N-концевой линкер)

[0075] В настоящем документе предложены слитые пептиды, содержащие GLP-1, которые содержат второй компонент, причем второй компонент представляет собой первый линкерный пептид (т. е. аминоконцевой линкерный пептид). Первый линкерный может содержать одну из последовательностей, представленных в таблице 2. Последовательность первого линкерного пептида может быть выбрана на основании по меньшей мере одного из следующих критериев: (i) выход экспрессии, (ii) активность в условиях *in vitro*, (iii) стабильность в условиях *in vitro*, (iv) отсутствие ксидозирования серина или потенциального ксидозирования серина, и (v) свойства конъюгата слитого пептида, содержащего GLP-1, связанного с циклическим пептидом PYY (например, стабильность в условиях *in vivo* и активность в условиях *in vivo* (т. е. способны ли GLP-1 или вариант пептида GLP-1 и циклический пептид PYY обладать агонистической активностью в отношении рецепторов GLP-1 и Y2 соответственно)).

[0076] В определенных вариантах осуществления слитые пептиды, содержащие GLP-1, не содержат второго компонента, причем второй компонент представляет собой первый линкерный пептид.

[0077] Таблица 2. Первые линкерные пептиды (N-концевой линкерный пептид)

Линкер 1	Пептидная последовательность	SEQ ID
----------	------------------------------	--------

		NO
1-1	GGGGAGGGGAGGGGAA	60
1-2	GGGGGGGGGGGGGGGGA	61
1-3	APAPAPAPAPAPAPAPAPA	62
1-4	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPA	63
1-5	APAPAP	64
1-6	ASAPAPAPAPAPGS	65
1-7	ASAPAPAPAPAPAPAPAPGS	66
1-8	ASGGGSGGGGS	67
1-9	ASGGGSGGGGS	68
1-10	ASGGGSGGGGS	69
1-11	GGGGAGGGGAGGGGA	70
1-12	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	71
1-13	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAA	72
1-14	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAA	73
1-15	GGGGGG	74
1-16	GGGGHGGGGHGGGGHA	75
1-17	GGGGHGGGGHGGGGHGGGGHA	76
1-18	GGGGHGGGGHGGGGHGGGGHGGGGHA	77
1-19	GGGGPGGGPGGGGPA	78
1-20	GGGGPGGGPGGGPGGGGPA	79
1-21	GGGGPGGGPGGGPGGGPGGGGPA	80
1-22	GGGSGGGSGGGGSA	81
1-23	PAPAPAPAPAPAPAPAPAP	82
1-24	PAPAPAPAPAPAPAPAPAPA	83

[0078] Пептид шарнирной Fc-области

[0079] В определенных вариантах осуществления слитые пептиды, содержащие GLP-1, содержат третий компонент, причем третий компонент представляет собой пептид шарнирной Fc-области. Пептид шарнирной Fc-области может обеспечивать больший период полужизни в кровотоке терапевтических пептидов посредством увеличения молекулярной массы и уменьшения гломерулярной фильтрации в дополнение к рециркуляции рецептора FcRn. В определенных вариантах осуществления пептид шарнирной Fc-области может быть получен из Fc-области человеческого IgG4. Fc-область человеческого IgG4 обладает пониженной способностью к связыванию с FcγR и

факторами комплемента по сравнению с IgG других подтипов. Fc-область предпочтительно содержит Fc-область человеческого IgG4, имеющую замены, которые исключают эффекторную функцию. Таким образом, слитый пептид, содержащий GLP-1, дополнительно содержит Fc-область, имеющую модифицированную Fc-область человеческого IgG4, содержащую одну или более из следующих замен: замену пролина на глутамат в положении 233, аланина или валина на фенилаланин в положении 234 и аланина или глутамата на лейцин в положении 235 (нумерация ЕС, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, Md., NIH Publication no. 91-3242(1991)). Удаление участка N-связанного гликозилирования в Fc-области IgG4 путем замены аланина на аспарагин в положении 297 (нумерация ЕС) является еще одним способом устранения остаточной эффекторной активности.

[0080] В определенных вариантах осуществления слитые пептиды, содержащие GLP-1 изобретения существуют в виде мономера или димера. В предпочтительных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, существует в виде димера. В определенных вариантах осуществления, в которых слитый пептид, содержащий GLP-1, существует в виде димера, димер представляет собой гомодимер, т.е. димер содержит два слитых пептида, содержащих GLP-1, имеющих одинаковую последовательность. В определенных вариантах осуществления, в которых слитый пептид, содержащий GLP-1, существует в виде димера, димер представляет собой гетеродимер, т.е. димер содержит два слитых пептида, содержащих GLP-1, имеющих разные последовательности.

[0081] Слитый пептид, содержащий GLP-1, изобретения предпочтительно существует в виде димеров, соединенных вместе дисульфидными мостиками и различными нековалентными взаимодействиями. Таким образом, Fc-участок, используемый для антитела изобретения, может представлять собой Fc-область человеческого IgG4, содержащую замену, такую как замена серина на пролин в положении 228 (нумерация ЕС), которая стабилизирует образование димера тяжелой цепи и предотвращает образование половинных Fc-цепей IgG4. В определенных вариантах осуществления может быть включена нативная последовательность аминокислот, N-концевая по отношению к шарнирным дисульфидам. Рентгеновская кристаллическая структура человеческого IgG4 позволяет предположить, что эти аминокислоты могут образовывать структуру, которая осуществляет предварительное позиционирование вышележащих структур в противоположные положения в пространстве. Такое предварительное позиционирование является преимущественным при поддержании пространственного разделения вышележащих элементов, таких как слитые пептиды, содержащие GLP-1. В других вариантах осуществления могут быть опущены нативные аминокислоты, N-концевые по отношению к шарнирным дисульфидам.

[0082] В определенных вариантах осуществления для изучения влияния на активность и стабильность слитого пептида, содержащего GLP-1, использовали гибридный шарнир человеческого IgG2a, слитый с человеческим PAA Fc.

[0083] В другом варианте осуществления удален С-концевой остаток лизина в тяжелой цепи, что часто наблюдается в полученных путем рекомбинации моноклональных антителах.

[0084] Пептиды шарнирной Fc-области могут содержать одну из последовательностей, представленных в таблице 3. Последовательность пептида шарнирной Fc-области может быть выбрана на основании по меньшей мере одного из следующих критериев: (i) стабильность в условиях *in vitro*, (ii) активность в условиях *in vitro* и (iii) свойства конъюгата слитого пептида, содержащего GLP-1, связанного с циклическим пептидом PYY (например, стабильность в условиях *in vivo* и активность в условиях *in vivo* (т. е. способны ли GLP-1 или вариант пептида GLP-1 и циклический пептид PYY обладать агонистической активностью в отношении рецепторов GLP-1 и Y2 соответственно)).

[0085] Таблица 3. Пептиды шарнирной Fc-области

Шарнирная Fc-область	Пептидная последовательность	SEQ ID NO
Шарнирная Fc-область-1	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	84
Шарнирная Fc-область-2	GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	85
Шарнирная Fc-область-3	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	86
Шарнирная Fc-область-4	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE	87

	PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	
Шарнирная Fc-область-5	GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	88
Шарнирная Fc-область-6	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	89
Шарнирная Fc-область-7	ERKCCVECPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	90

[0086] Кроме того, в настоящем документе представлены пептиды платформы шарнирной Fc-области, причем пептиды платформы шарнирной Fc-области содержат пептид шарнирной Fc-области и по меньшей мере один из первого линкерного пептида, соединенного с аминоконцевой областью пептида шарнирной Fc-области, и второго линкерного пептида, соединенного с карбоксиконцевой областью пептида шарнирной Fc-области. Пептид шарнирной Fc-области может, например, представлять собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84-90; первый линкерный пептид может, например, представлять собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-83; а второй линкерный пептид может, например, представлять собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 91-112. В определенных вариантах осуществления пептид шарнирной Fc-области содержит SEQ ID NO: 84, а первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 60. В определенных вариантах осуществления пептид шарнирной Fc-области содержит SEQ ID NO: 84, а второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 93, 94, 95, 106 или 111. В определенных вариантах осуществления пептид шарнирной Fc-области содержит SEQ ID NO: 84;

первый линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 60; а второй линкерный пептид содержит SEQ ID NO: 93, 94, 95, 106 или 111.

[0087] Второй линкерный пептид: Карбоксиконцевой линкер (С-концевой линкер)

[0088] В настоящем документе предложены слитые пептиды, содержащие GLP-1, которые содержат четвертый компонент, причем четвертый компонент представляет собой второй линкерный пептид (т. е. карбоксиконцевой линкерный пептид). Второй линкерный может содержать одну из последовательностей, представленных в таблице 4. Последовательность второго линкерного пептида может быть выбрана на основании по меньшей мере одного из следующих критериев: (i) выход экспрессии, (ii) активность в условиях *in vitro*, (iii) стабильность в условиях *in vitro*, (iv) отсутствие ксилозилирования серина или потенциального ксилозилирования серина, (v) выход конъюгации, и (vi) свойства конъюгата слитого пептида, содержащего GLP-1, связанного с циклическим пептидом PYY (например, стабильность в условиях *in vivo* и активность в условиях *in vivo* (т. е. способны ли GLP-1 или вариант пептида GLP-1 и циклический пептид PYY обладать агонистической активностью в отношении рецепторов GLP-1 и Y2 соответственно)).

[0089] Кроме того, вторая последовательность линкерного пептида может быть выбрана на основании ее способности подвергаться специфической эффективной конъюгации с циклическим пептидом PYY. В данном контексте специфичностью называется предпочтительная конъюгация в внедренных цистеиновых остатках в С-концевой области второго линкера по сравнению с конъюгацией в любой другой части гибридного белка. Примеры стратегий обеспечения максимума специфичности включают (i) введение аминокислот, смежных с внедренными цистеиновыми остатками, для повышения нуклеофильности сульфгидрильной боковой цепи и повышения их реакционной способности, (ii) включение внедренных цистеиновых остатков в аминокислотную последовательность, которая ранее продемонстрировала повышенную селективность в тиол-электрофильных конъюгациях, и (iii) включение аминокислот с анионными или катионными боковыми цепями, которые соответственно, электростатически притягивают катионные или анионные дисульфидные восстанавливающие агенты для специфического высвобождения реакционноспособных тиолов для конъюгации. Примеры стратегий обеспечения максимума эффективности конъюгации включают (i) введение подобных зарядов, как анионных, так и катионных, в любую часть второго линкерного пептида, чтобы вызвать взаимное электростатическое отталкивание вторых линкерных пептидов и, таким образом, уменьшить образование дисульфида между внедренными цистеиновыми остатками, (ii) включение аминокислот, которые повышают жесткость линкера, (iii) включение аминокислот, которые повышают гибкость линкера, и (iv) включение аминокислот с анионными или катионными боковыми цепями, которые электростатически осуществляют предварительное позиционирование циклического пептида PYY для эффективной конъюгации.

[0090] Таблица 4. Второй линкерный пептид (С-концевой линкерный пептид)

Линкер 2	Пептидная последовательность	SEQ
----------	------------------------------	-----

		ID NO
2-1	ASGSAPAPAPEEEPCA	91
2-2	GGGAPAPAPEEEPCA	92
2-3	APAPAPAPAPAPCPEEP	93
2-4	APAPAPAPAPAPCP	94
2-5	GGGGAGGGGAGGGGACA	95
2-6	GGGGAYCAKYDGCYGELDFWCQ	96
2-7	GGGGAYSAYKYDGCYGELDFWGQ	97
2-8	AAACPTEE	98
2-9	AAAEPCA	99
2-10	APAPAPAPCAPRRR	100
2-11	APAPEEPCA	101
2-12	ASGSAPAPAPAPCEEE	102
2-13	ASGSAPAPAPAPCPEEP	103
2-14	ASGSGGGSGGGSCA	104
2-15	GGGGGGGGGGGGGGGGGCA	105
2-16	GGGGSGGGGSCA	106
2-17	ASGSPPPPPPEPEPCA	107
2-18	ASGSAPAPAPAPCPEPE	108
2-19	ASGSGGGGSGGGGSCA	109
2-20	ASGSAPAPAPAPAEEEPCA	110
2-21	GGGGSGGGGSGGGGSCA	111
2-22	ASGSGGGGSGGGGSEEEACA	112

[0091] Слитые пептиды, содержащие GLP-1

[0092] В настоящем документе предложены слитые пептиды, содержащие GLP-1, которые содержат первый, второй, третий и четвертый компоненты, как описано ранее, причем второй компонент может необязательно отсутствовать. Первый компонент представляет собой пептид GLP-1 или вариант пептида GLP-1, второй компонент представляет собой первый линкерный пептид, третий компонент представляет собой пептид шарнирной Fc-области, а четвертый компонент представляет собой второй линкерный пептид. Слитый пептид GLP-1 может содержать одну из последовательностей, представленных в таблице 5. Последовательность слитого пептида, содержащего GLP-1, может быть выбрана на основании по меньшей мере одного из следующих критериев: (i) выход экспрессии, (ii) активность в условиях *in vitro*, (iii) стабильность в условиях *in vitro*, (iv) отсутствие ксизилирования серина, (v) выход конъюгации, и (vi) свойства конъюгата слитого пептида, содержащего GLP-1, связанного с циклическим пептидом

РYY (например, стабильность в условиях *in vivo* и активность в условиях *in vivo* (т. е. способны ли GLP-1 или вариант пептида GLP-1 и циклический пептид РYY обладать агонистической активностью в отношении рецептора GLP-1 и рецептора Y2 соответственно)).

[0093] Таблица 5. Слитые пептиды, содержащие GLP-1

Слитый пептид, содержащий GLP-1 (GF)	Пептидная последовательность	SEQ ID NO:
GF1	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGG AGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CP	113
GF2	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGG GGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CP	114
GF3	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAP APCPGF	115
GF4	HGEGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGG GGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCP	116
GF5	HGEGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGGGGGGGGGGG GGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCP	117
GF6	HGEGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP	118

	APAPAPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPC P	
GF7	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPC P	119
GF8	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGG AGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAG GGGACA	120
GF9	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGGGGGG GGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAG GGGACA	121
GF10	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGG AGGGGACA	122
GF11	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGG GGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGGGGA CA	123
GF12	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGGGGGGGGG GGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE	124

	WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGGGGA CA	
GF13	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGG GGACA	125
GF14	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGG GGACA	126
GF15	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYCAKYD GCYGELDFWCQ	127
GF16	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYCAKYDG CYGELDFWCQ	128
GF17	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYSAYKD GCYGELDFWGQ	129
GF18	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYSAYKD GCYGELDFWGQ	130

GF19	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAPAPAPEEE PCA	131
GF20	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAPAPAPEEE PCA	132
GF21	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGG GGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P EVTCTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAPAPAPEEEPCA	133
GF22	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAP APAPEEEPCA	134
GF23	HGEGTFTSDLSKQMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GGGGGGGGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAP APAPEEEPCA	135
GF24	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CPEEP	136
GF25	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD	137

	IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAP CPEEP	
GF26	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAP APCPEEP	138
GF27	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAP APCPEEP	139
GF28	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGG GGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPEEP	140
GF29	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGGGGGGGGG GGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPEEP	141
GF30	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPC PEEP	142
GF31	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPC PEEP	143
GF32	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGG SCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT	144

	VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAEPEEEPCA	
GF33	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASAPAPAPAPAP GSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAEPEEEPCA	145
GF34	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAEPEEEPCA	146
GF35	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASA PAPAPAPAGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAEPEEEPCA	147
GF36	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGG SGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAEPEEEPCA	148
GF37	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAEPEEP CA	149
GF38	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAEPEEP CA	150
GF39	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASAPAPAPAPAP APAPAPAPAGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS	151

	KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEPC A	
GF40	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGASGGGGSGGG GSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEPCA	152
GF41	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGASGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEPC A	153
GF42	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPEPEPEPCA	154
GF43	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASA PAPAPAPAGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPEPEPEPCA	155
GF44	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGASGGGGSGGG GSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPEPEPEPCA	156
GF45	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAPCEEE	157
GF46	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASA PAPAPAPAGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE	158

	WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPAPCEEE	
GF47	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSGPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPAPC EEE	159
GF48	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGASGGGGSGGG GSCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPAPCEEE	160
GF49	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSGSCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPAPCPEE P	161
GF50	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASA PAPAPAPAGSCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPAPCPEE P	162
GF51	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSGPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPAPC PEEP	163
GF52	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGASGGGGSGGG GSCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPAPCPEEP	164
GF53	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGASAPAPAPAP APGSCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE	165

	PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGKASGSAPAPAPEEEPCA	
GF54	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFIAWLVKGGGASAPAPAPAP APAPAPAPAPGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKASGSAPAPAPEE EPCA	166
GF55	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGLGKASGSAPAPAPEEEPCA	167
GF56	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GGGCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGKASGSAPAPAPEEEPCA	168
GF57	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPA PAPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLGLGKASGSAPAPAPEEEPCA	169
GF58	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKAPAPEEPCA	170
GF59	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKAAAEPCA	171
GF60	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN	172

	VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKAPAPAPAPCAPRRR	
GF61	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKAAACPEEE	173
GF62	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSGGGGSGGGGSC A	174
GF63	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPA PEEEPCA	175
GF64	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPA PAPAPAPAPAPAPAPAPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKAS GSAPAPAPEEEPCA	176
GF65	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPAPAPAPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAPAPAPEE EPCA	177
GF66	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKASGSAP APAPEEEPCA	178
GF67	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA	179

	KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKASGSAPAPAPEEEPCA	
GF68	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAPAPAPEEE PCA	180
GF69	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAPAPEEPCA	181
GF70	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGG AGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAPAPEEPCA	182
GF71	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GGGGGGGGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAPAP EEPCA	183
GF72	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GAGGGGAGGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAPAP EEPCA	184
GF73	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGSGGGGS GGGGSAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPC P	185
GF74	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGG AGGGGGAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE	186

	EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAP CP	
GF75	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAGGGGAGGGGAAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAP APAPAPCP	187
GF76	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGPGGGGP GGGGPGGGGPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPA PAPCP	188
GF77	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGHGGGG HGGGGHGGGGHAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPA PAPAPCP	189
GF78	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPA PAPAPCP	190
GF79	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGASGGGGSGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLGLGKASGSAPAPAPEEEPCA	191
GF80	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASG GGGSGGGGSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKGGGGSGGGGSCA	192

GF81	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKGGGAPAPAPEE EPCA	193
GF82	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPE EPCA	194
GF83	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPE EPCA	195
GF84	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKGGGAPAPAPEE EPCA	196
GF85	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGPGGGGP GGGGPAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPC P	197
GF86	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGG HGGGGHAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CP	198
GF87	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGPGGGGP GGGGPGGGGPAGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL	199

	PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCP	
GF88	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGGHGGGGHGGGGHGGGGHAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCP	200
GF89	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGSGGGGS GGGSAAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCPEEP	201
GF90	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGPGGGGP GGGSAAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCPEEP	202
GF91	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGGHGGGGHGAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCPEEP	203
GF92	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGGAGGGGAERKCCVECPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCPEEP	204
GF93	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGPGGGGP GGGSPPGGGGPGGGGPAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCPEEP	205

GF94	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGG HGGGGHGGGGHGGGGHAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAP APAPAPCPEEP	206
GF95	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGG AGGGGAGGGGAGGGGAAGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAP APAPAPCPEEP	207
GF96	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGPGGGGP GGGGPGGGGPAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPA PAPAPCPEEP	208
GF97	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGG HGGGGHGGGGHAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPA PAPAPCPEEP	209
GF98	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGG AGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPA PAPAPCPEEP	210
GF99	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPA PCP	211
GF100	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGPAPAPAPAPAP APAPAPAPAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI	212

	EKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPA PCPEEP	
GF101	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGPAPAPAPAPAP APAPAPAPAPESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPA PCPEEP	213
GF102	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAPAP APEEEPCA	214
GF103	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAPAPAPEEPC A	215
GF104	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKGGGAPAPAPEEPC A	216
GF105	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAPAPAPEEPC A	217
GF106	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGGGGG CA	218
GF107	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE	219

	VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGGGGA CA	
GF108	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCP	220
GF109	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPAPCPPEEP	221
GF110	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGG GGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKGGGAPAPAPEEEPCAC	222
GF111	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGG GGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGGGGGG CA	223
GF112	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGG GGGGCA	224
GF113	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGSC A	267

GF114	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGG GGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGSCA	268
GF115	HGEGTFTSDVSSYLEEQA AKEFI AWLVKGGGGGGGAGGGG AGGGGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGSG GGGGSCA	269
GF116	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGG GGAAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGSGGGGG SCA	270
GF117	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGSCA	271
GF118	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMIS RTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSG GGGSCA	272
GF119	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGG GSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGSGGGGS CA	273
GF120	HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGG GSGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMIS RTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV	274

	DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGGSG GGGSGGGGSCA	
--	---	--

[0094] Циклические пептиды PYY

[0095] PYY₃₋₃₆ представляет собой эндогенный гормон, секретируемый L клетками в дистальном отделе кишечника, который выступает в качестве агониста рецептора Y2 для ингибирования потребления пищи. Учитывая его роль в контроле аппетита и потреблении пищи, а также его анти-секреторные эффекты и эффекты, стимулирующие всасывание в желудочно-кишечном тракте у млекопитающих, PYY₃₋₃₆ может быть эффективен при лечении ожирения и связанных с ним состояний, а также в случае ряда желудочно-кишечных расстройств. Однако терапевтическая полезность самого PYY₃₋₃₆ в качестве лечебного агента ограничена его быстрым метаболизмом и коротким периодом полужизни в кровотоке. Таким образом, настоящее изобретение по существу относится к модифицированным конъюгатам PYY₃₋₃₆, которые увеличивают период полужизни пептида PYY₃₋₃₆ и снижают метаболизм пептида в условиях *in vivo*.

[0096] В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированные пептиды PYY₃₋₃₆ представляют собой циклические пептиды PYY. Термины «циклический пептид PYY», «циклический аналог PYY₃₋₃₆» и «циклический аналог пептида PYY₃₋₃₆» можно использовать взаимозаменяемо. Примеры циклических пептидов PYY, которые можно использовать в конъюгатах настоящего изобретения, описаны в заявке на патент США № 15/794,231, поданной 26 октября 2017 г., и заявке на патент США № 15/794,171, поданной 26 октября 2017 г., содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[0097] В контексте настоящего документа, термин «NTSC-PYY» предназначен для описания циклических аналогов PYY между N-концом и боковой цепью.

[0098] Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, написаны в соответствии с обычной процедурой, где N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область расположена справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, они представляют собой L-форму представленной аминокислоты, если явно не указано иное. Для удобства описания молекул настоящего изобретения используются традиционные и нетрадиционные аббревиатуры различных аминокислот (включающие кодировку как одной, так и тремя буквами) и функциональных фрагментов. Эти сокращения хорошо известны специалистам в данной области техники, но для ясности они перечислены следующим образом: A=Ala=аланин; R=Arg=аргинин; N=Asn=аспарагин; D=Asp=аспарагиновая кислота; βA=βAla=бета-аланин; C=Cys=цистеин; hC=hCys=гомоцистеин; E=Glu=глутаминовая кислота; Q=Gln=глутамин; G=Gly=глицин; H=His=гистидин; I=Ile=изолейцин; L=Leu=лейцин; K=Lys=лизин; Nle=норлейцин; F=Phe=фенилаланин; P=Pro=пролин; S=Ser=серин; T=Thr=треонин; W=Trp=триптофан; Y=Tyр=тирозин и V=Val=валин.

[0099] Для удобства, порядок нумерации аминокислотных остатков, используемый для наименования пептидов NTSC-PYY, составляющих предмет настоящего изобретения,

соответствует порядку нумерации hPYY₃₋₃₆. Специфические замены аминокислот, которые были введены в пептиды NTSC-PYY, по отношению к нативным остаткам в соответствующих положениях в hPYY₃₋₃₆, обозначены соответствующим кодом аминокислоты, за которым следует положение замещения. Таким образом, «S4» в пептиде NTSC-PYY относится к пептиду, в котором соответствующий нативный остаток lys4 hPYY₃₋₃₆ заменили серином. Аналогичным образом «hC31» в пептиде NTSC-PYY относится к пептиду, в котором соответствующий нативный остаток val31 hPYY₃₋₃₆ заменили гомоцистеином. Дополнительные замены аминокислот, имеющие место в пептидах NTSC-PYY, описаны в соответствии с данным порядком и будут признаны специалистами в данной области техники как таковые.

[0100] Кроме того, для удобства порядок наименования, используемый для пептидов NTSC-PYY настоящего изобретения, включает аминокислотные остатки, включенные в цикл вместе со связующей группой (-ами) между ними, в направлении слева направо, начиная с N-концевого остатка, включенного в цикл. Во всех случаях N-концевой аминокислотный остаток цикла связан посредством своей α-аминовой функциональной группы со связующей группой, которая, в свою очередь, соединяется с остатком боковой цепи аминокислоты в положении 31 пептида NTSC-PYY. Таким образом, термин «цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31)» используют для описания цикла пептида NTSC-PYY, в котором α-аминовая функциональная группа Ile3 ацилирована с остатком *мета*-толуоловой кислоты, чья метильная группа дополнительно связана посредством тиоэфирной связи с боковой цепью остатка hCys31. Аналогичным образом термин «цикло-(K4-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31)» используют для описания цикла пептида NTSC-PYY, в котором удален нативный остаток Ile3 и чья (теперь N-концевая) α-аминовая функциональная группа lys4 ацилирована 3-ацетамидопропаноильной группой, в которой ацетамидо-метиленовый атом углерода присоединен к боковой цепи остатка hCys31 посредством тиоэфирной связи.

[0101] Остатки лизина могут быть введены в различные положения последовательности hPYY₃₋₃₆ для обеспечения удобной функциональной подцепи для дополнительной дериватизации. Лизиновые остатки можно модифицировать для непрямого связывания со слитым пептидом, содержащим GLP-1. В непрямом связывании со слитым пептидом, содержащим GLP-1, лизиновый остаток можно модифицировать таким образом, чтобы он содержал химический линкер, который позволит связать циклический пептид PYY со слитым пептидом, содержащим GLP-1. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в качестве таковых можно также эффективно использовать соответствующие ортологи, рассмотренные в настоящем документе.

[0102] Термин «K(PEG24-AcBr)» означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована N-бромацетил-75-амино-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-тетракозаоксапентагептантаминовой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

[0103] Термин «K(PEG12-AcBr)» означает лизинильный остаток ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована N-бромацетил-39-амино-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-додекаоксанотатриактановой кислотой посредством ее 1-карбокислотной функциональной группы.

[0104] Термин «K(PEG6-AcBr)» означает лизинильный остаток ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована N-бромацетил-3-[(17-амино-3,6,9,12,15-пентаоксагептадец-1-ил)окси]-пропановой кислотой посредством ее 1-карбокислотной функциональной группы.

[0105] Термин «K(PEG8-триазилил-CH₂CH₂CO-PEG4-AcBr)» означает лизинильный остаток, ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована 27-[4-[2-[3-[2-[2-[3-(N-бромацетиламино)пропокси]этокси]этокси]пропиламинокарбонил]этил]тетразол-1-ил]-4,7,10,13,16,19,22,25-октагептакозановой кислотой посредством ее 1-карбокислотной функциональной группы.

[0106] Многие из соединений/конъюгатов настоящего изобретения, включают восстановленную амидную связь между C-концевым остатком последовательности, Y36 и смежным с ним остатком R35. Эта восстановленная амидная связь представлена термином «psi-(R35, Y36)».

[0107] Различные аминокислотные остатки, содержащие определенные последовательности, составляющие предмет настоящего изобретения, содержат метилированные α -аминогруппы. Таким образом, термины «N-Me-Q34» или «N-Me-R35» означают α -N-метилированный глутамин в положении 34 последовательности, и α -N-метилированный аргинин в положении 35 последовательности соответственно.

[0108] Термин «N-Me-Q34, psi-(R35, Y36)» в описании последовательности относится к последовательности, содержащей как α -метилглутаминовый остаток в положении 34, так и восстановленную амидную связь между остатками R35 и Y36.

[0109] Аналогичным образом термин «N-Me-R35, psi-(R35, Y36)» в описании последовательности, содержащей как α -метиларгининовый остаток в положении 35, так и восстановленную амидную связь между этим остатком и Y36.

[0110] Примеры циклических пептидов PYY представлены в таблице 6.

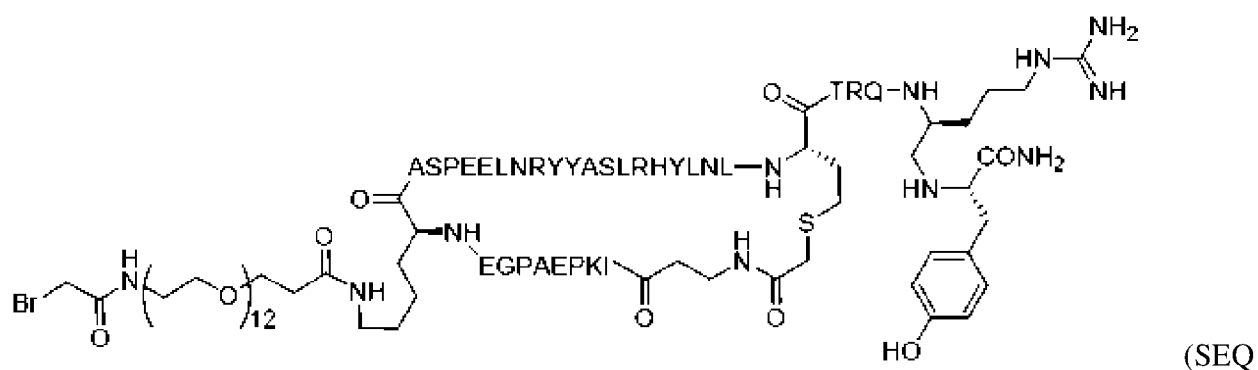
[0111] Таблица 6. Циклические пептиды PYY

SEQ ID NO:	Название циклического пептида PYY
1	[цикло-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(35R,36Y)]-PYY2-36
2	[цикло-(I3-CO(CH ₂) ₂ триазилил-Nle31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY3-36
3	[цикло-(I3-CO(CH ₂) ₂ триазилил-Nle31), K(AcBr)11, psi-(R35Y36)]-PYY3-36
4	[цикло-(G2-E31), S4, K(AcBr)11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36
5	[цикло-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG6-AcBr)11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36
6	[цикло-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

7	[цикло-(I3-COCH ₂ -C31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
8	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, (N-Me)Q34, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
9	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35, psi-(R35,36Y)]-PYY2-36
10	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), R4, K(PEG12-AcBr)11, W30, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
11	[цикло-(I3-COCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCOCH ₂ -C31), R4, K(PEG12-AcBr)11, W30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
12	[цикло-(K4-OEG-COCH ₂ -C31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36
13	[цикло-(I3-COCH ₂ CH ₂ триазилил-Nle31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
14	[цикло-(I3-m-CO-бензил-hC31), K(PEG8-триазилил-CH ₂ CH ₂ CO-PEG4-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
15	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)23, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
16	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)22, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
17	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)7, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
18	[цикло-(G2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
19	[цикло-(G2-COCH ₂ -C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
20	[цикло-(βA2-COCH ₂ -C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
21	[цикло-(G2-COCH ₂ -hC30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
22	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
23	[цикло-(G2-COCH ₂ -hC30), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
24	[цикло-(G2-E30), S4, K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
25	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG24-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
26	[цикло-(G2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, psi-(R35-Y36)]-PYY2-36
27	[цикло-(G2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
28	[цикло-(βA2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
29	[цикло-(βA2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
30	[цикло-(G2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
31	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
32	[цикло-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
33	[цикло-(G2-E30), S4, K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
34	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36

35	[цикло-(I3-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY3-36
36	[цикло-(I3-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
37	[цикло-(I3-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY3-36
38	[цикло-(I3-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
39	[цикло-(I3-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
40	[цикло-(G2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
41	[цикло-(G2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
42	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
43	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
44	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
45	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
46	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
47	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
48	[цикло-(δAva2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
49	[цикло-(δAva2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
50	[цикло-(δAva2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
51	[цикло-(δAva2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
52	[цикло-(βA2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
53	[цикло-(βA2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
54	[цикло-(γAba2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

[0112] Кроме того, в настоящем документе представлены циклические аналоги РYY с N-концом, присоединенным к боковой цепи, демонстрирующие по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности по отношению к человеческому РYY₃₋₃₆ (hРYY₃₋₃₆). В качестве примера способа определения идентичности последовательности между двумя аналогами совмещены два пептида





ID NO:1) и hPYY₃₋₃₆

(SEQ

ID NO:55). Идентичность последовательности аналога по отношению к hPYY₃₋₃₆ выражается общим числом выравненных остатков за вычетом числа отличных остатков (т. е. числом выравненных идентичных остатков), поделенным на общее число остатков в hPYY₃₋₃₆. В данном примере отличными остатками являются D11, которые заменили на замещенный K11, затем на V31, который заменили на hC31, и, наконец, R35 декарбонилировали. Соответственно, в указанном примере идентичность последовательности составляет $(34-3) / 34 \times 100$.

[0113] Конъюгаты

[0114] В другом общем аспекте изобретение относится к конъюгату, содержащему слитый пептид, содержащий GLP-1, изобретения, ковалентно конъюгированный с циклическим пептидом PYY сайт-специфическим образом так, что слитый пептид, содержащий GLP-1, связанный с циклическим пептидом PYY, имеет продолженный/увеличенный период полужизни по сравнению с GLP-1 или вариантом пептида GLP-1 или отдельно с циклическим пептидом PYY. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям и способам их применения. Конъюгаты используют для профилактики, лечения или облегчения симптомов заболеваний или нарушений, например, среди прочих, ожирения, диабета 2 типа, метаболического синдрома (т. е. синдрома X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной врожденным гиперинсулинизмом (ЧИ), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечно-сосудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и экземы.

[0115] В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, изобретения содержит по меньшей мере один цистеиновый остаток, который может конъюгироваться с циклическим пептидом PYY. В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113-224 и 267-274. В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113 или 136. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один цистеиновый остаток содержится во втором

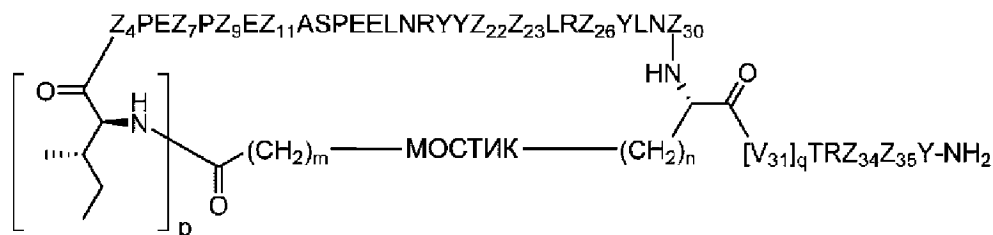
линкерном пептиде слитого пептида, содержащего GLP-1. В определенных вариантах осуществления цистеиновый остаток расположен между остатками 287 и 289 слитого пептида, содержащего GLP-1, с SEQ ID NO: 113 или SEQ ID NO: 136, предпочтительно цистеиновый остаток расположен в остатке 288 слитого пептида, содержащего GLP-1. В некоторых вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, ковалентно связан с лизиновым остатком в остатке 7, 9, 11, 22 или 23 циклического пептида PYY, предпочтительно лизинового остатка 11. В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, ковалентно связан напрямую с циклическим пептидом PYY или непрямо с циклическим пептидом PYY при помощи химического линкера на циклическом пептиде PYY.

[0116] В определенных вариантах осуществления циклический пептид PYY может содержать химический линкер. Химический линкер может быть модифицирован химически (e.g., к линкеру можно добавить электрофильную группу), чтобы обеспечить конъюгацию слитного пептида GLP-1 с циклическим химическим линкером PYY. Химический линкер может, например, включать, без ограничений, пептидный линкер, углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (PEG) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер, линкер, содержащий ацильную группу, гибридный линкер, состоящий из PEG и внедренного гетероцикла, или углеводородную цепь. ПЭГ-линкеры могут, например, содержать 2-24 ПЭГ-звеньев.

[0117] Способы конъюгирования слитного пептида GLP-1 изобретения с циклическими пептидами PYY изобретения известны в данной области. Вкратце, слитые пептиды, содержащие GLP-1, изобретения могут быть восстановлены с помощью восстанавливающего агента (например, 1,3,5-триаза-7-фосфаадамантан (PTA)), очищены (например, с помощью обессоливающей хроматографии) и конъюгированы с циклическим пептидом PYY (например, посредством обеспечения восстановленного слитого пептида, содержащего GLP-1, в условиях, которые обеспечивают конъюгацию). В ходе реакции конъюгации электрофильная уходящая группа циклического пептида PYY замещается, и между слитым пептидом, содержащим GLP-1, и циклическим пептидом PYY образуется ковалентная связь с образованием связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклического пептидного PYY конъюгата. После реакции конъюгации конъюгат может быть очищен с помощью ионообменной хроматографии или гидрофобной хроматографии (HIC) с последующим выполнением конечной стадии очистки путем абсорбции на белке А. В определенных вариантах осуществления слитный пептид GLP-1 изобретения может быть очищен перед восстановлением с использованием способов HIC. Более подробное описание способов конъюгации смотрите, например, в примере 2.

[0118] В настоящем документе предложены конъюгаты, содержащие слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит пептид GLP-1, первый линкерный пептид, пептид шарнирной Fc-области и второй линкерный пептид, причем первый линкерный пептид необязательно отсутствует.

[0119] В определенных вариантах осуществления циклический пептид РYY представлен соединением формулы **I**, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула **I**,

где:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K;

Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K;

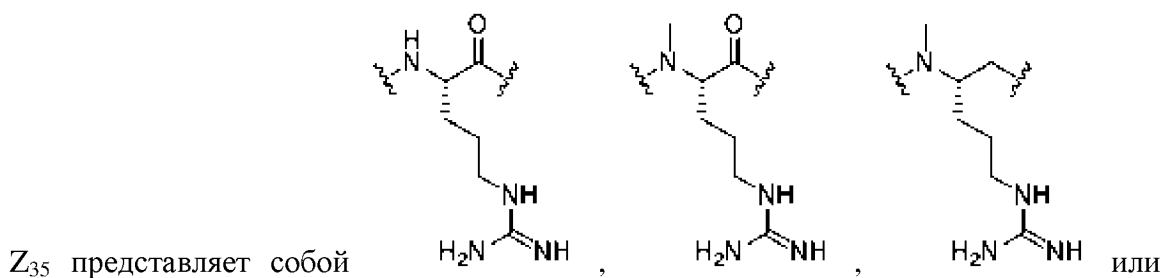
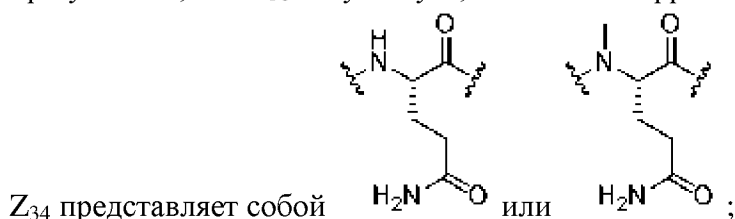
Z₂₂ представляет собой A или K;

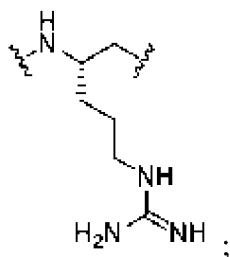
Z₂₃ представляет собой S или K;

Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L, W или отсутствует;

при условии, что Z₃₀ отсутствует, только если q равно 1;





причем производное представляет собой соединение формулы **I**, которое модифицировано с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из амидирования, ацилирования и пегилирования.

[0120] В определенных вариантах осуществления циклический пептид РУУ представлен соединением формулы **I**, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

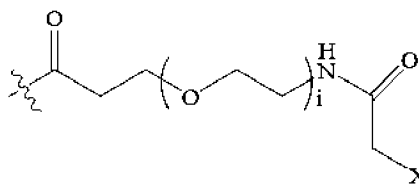
q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$,

$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой K, A, E, S или R;

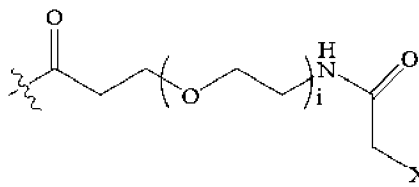
Z_7 представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



$X = \text{Br}$, I или Cl,

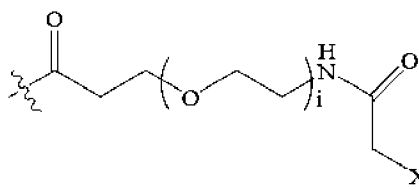
$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_9 представляет собой G или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



$X = \text{Br}$, I или Cl, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

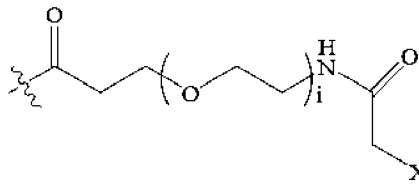
Z_{11} представляет собой D или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



$X = \text{Br}, \text{I}$ или Cl ,

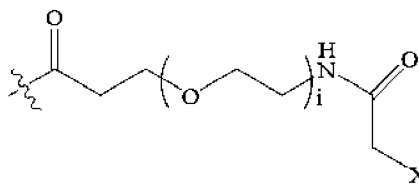
$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}, -\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$;

Z_{22} представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



$X = \text{Br}, \text{I}$ или Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

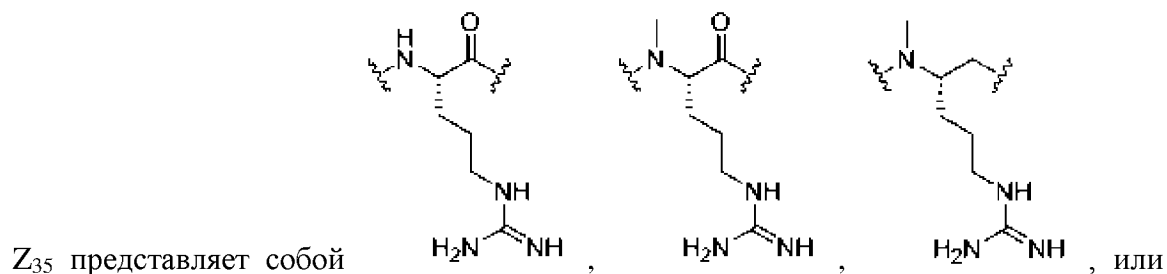
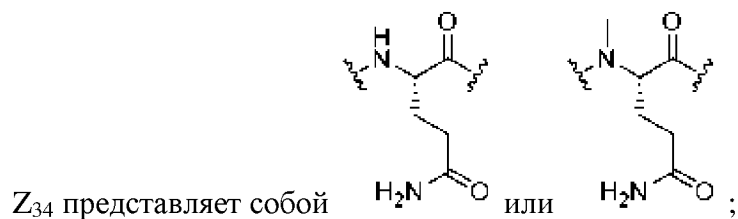
Z_{23} представляет собой S или K; причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена

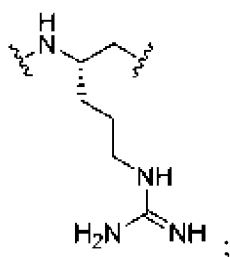


$X = \text{Br}, \text{I}$ или Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{26} представляет собой A или H;

Z_{30} представляет собой L, W или отсутствует, при условии, что Z_{30} отсутствует, только если q равно 1;





где X представляет собой электрофильную группу, а Br, Cl или I электрофильной группы X замещают в реакции конъюгации с образованием связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклического пептидного РYУ конъюгата.

[0121] В определенных вариантах осуществления циклический пептид РYУ представлен соединением формулы **I**, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

n равно 1, 2 или 4;

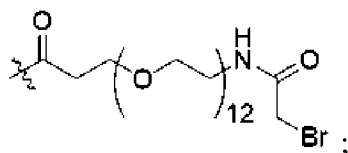
q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

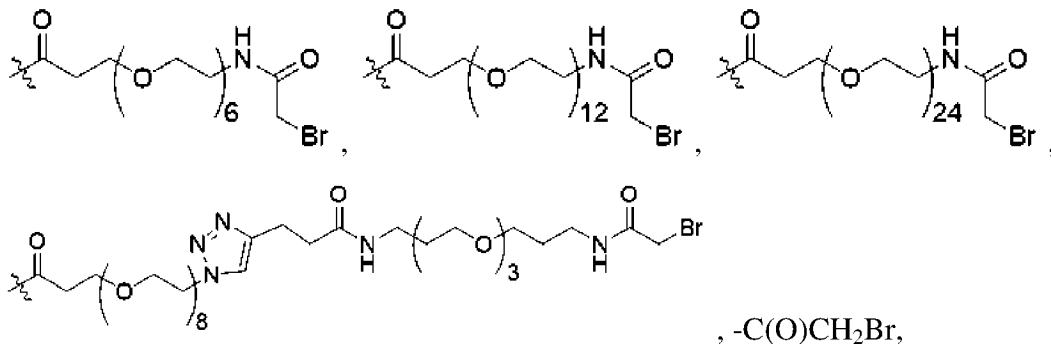
Z_4 представляет собой K, A, E, S или R;

Z_7 представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена



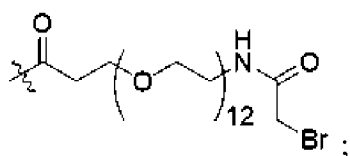
Z_9 представляет собой G или K;

Z_{11} представляет собой D или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена

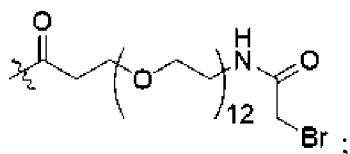


или

Z_{22} представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена

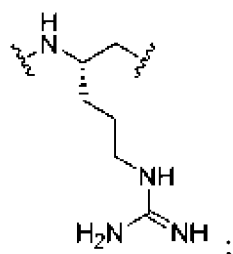
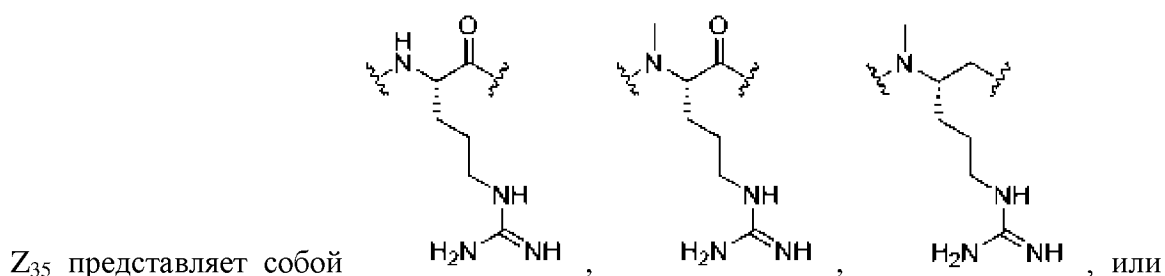
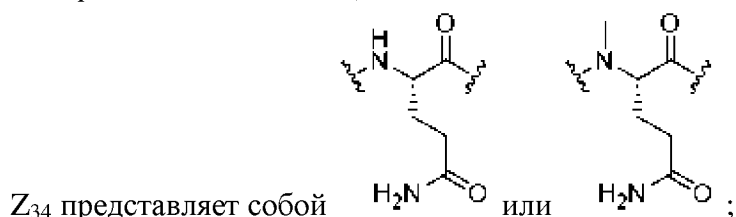


Z₂₃ представляет собой S или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена



Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L;



причем Br замещают в реакции конъюгации с образованием связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклического пептидного PYY конъюгата.

[0122] В определенных вариантах осуществления конъюгат содержит слитый пептид, содержащий GLP-1, конъюгированный с циклическим пептидом PYY, причем циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-54. В предпочтительном варианте осуществления конъюгат содержит слитый пептид, содержащий GLP-1, конъюгированный с циклическим пептидом PYY, причем циклический пептид PYY выбран из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 или 34.

[0123] В определенных вариантах осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, ковалентно связан с циклическим пептидом PYY на остатке лизина циклического пептида PYY при помощи химического линкера на остатке лизина. Химический линкер может, например, включать в себя линкер, выбранный из C(O)CH₂, полиэтиленгликоль

(PEG)₈-триазилил-CH₂CH₂CO-PEG₄, цепи PEG из 2-24 PEG звеньев, линкера, содержащего ацильную группу, или алкильной цепи, содержащей 2-10 атомов углерода.

[0124] Слитый пептид, содержащий GLP-1, в соответствии с вариантом осуществления изобретения может быть конъюгирован с циклическим пептидом PYY в одном или более положений аминокислот циклического пептида PYY, таких как аминокислотный остаток 4, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 30 или 31 циклического пептида PYY, с применением способов, известных в данной области техники. Нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации hPYY₃₋₃₆. В определенных вариантах осуществления только один из Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ и Z₂₃ в формуле I представляет собой лизин, причем лизин ковалентно связан с цистеиновым остатком во втором линкерном пептиде слитого пептида, содержащего GLP-1. В предпочтительном варианте осуществления слитый пептид, содержащий GLP-1, в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения конъюгирован с циклическим пептидом PYY на остатке 11 циклического пептида PYY, причем остаток 11 представляет собой лизин. В другом предпочтительном варианте осуществления электрофильное соединение, такое как бромацетамид или малеимид, вводят в боковую цепь циклического пептида PYY, например в аминную боковую цепь лизина в остатке 11 циклического пептида PYY, при этом электрофильное соединение вступает в реакцию сайт-специфически с сульфгидрильной группой цистеинового остатка второго линкерного пептида слитого пептида, содержащего GLP-1, предпочтительно второй линкерный пептид слитого пептида, содержащего GLP-1, представляет собой SEQ ID NO: 93, 94, 95, 106 или 111, таким образом создавая ковалентную связь между циклическим пептидом PYY и слитым пептидом, содержащим GLP-1. Более предпочтительно циклический пептид PYY выбран из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 или 34. В одном варианте осуществления электрофильное соединение вводят непосредственно в боковую цепь циклического PYY. В другом варианте осуществления электрофильное соединение вводят в боковую цепь циклического PYY напрямую при помощи химического линкера.

[0125] В определенных вариантах осуществления цистеиновый остаток второго линкерного пептида слитого пептида, содержащего GLP-1, восстанавливают посредством приведения слитого пептида, содержащего GLP-1, в контакт с избытком азафосфинового восстанавливающего агента, посредством чего восстановленный цистеиновый остаток приводят в реакцию с электрофильным соединением. Азафосфиновый восстанавливающий агент представляет собой 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3.3.1.1] декан (РТА) или его производное.

[0126] Кроме того, обеспечены фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты изобретения и дополнительно содержащие фармацевтически приемлемый носитель.

[0127] Не имеющие ограничительного характера примеры связанных со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, циклическими пептидными PYY конъюгатов, представлены в таблице 7.

[0128] Таблица 7. Связанные со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, циклические пептидные PYY конъюгаты.

Слитый пептид, содержащий GLP-1 (GF)	Слитый пептид, содержащий GLP-1, SEQ ID NO:	Циклический пептид PYY	Связанный со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклический пептидный PYY конъюгат SEQ ID NO:
GF1	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 225
GF1	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 226
GF1	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 227
GF1	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 228
GF24	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 229
GF24	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 230
GF24	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 231
GF24	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 232
GF70	SEQ ID NO: 182	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 233
GF11	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 234
GF28	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 235
GF67	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 236
GF27	SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 237
GF23	SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 238
GF54	SEQ ID NO: 166	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 239
GF63	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 240
GF64	SEQ ID NO: 176	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 241
GF22	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 242
GF49	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 243
GF34	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 244
GF35	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 245
GF65	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 246

GF45	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 247
GF40	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 248
GF40	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 249
GF40	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 250
GF19	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 251
GF8	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 252
GF34	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 253
GF42	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 254
GF59	SEQ ID NO: 171	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 255
GF60	SEQ ID NO: 172	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 256
GF61	SEQ ID NO: 173	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 257
GF63	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 258
GF63	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 259
GF40	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 260
GF40	SEQ ID NO: 152 (мономер)	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 261
GF34	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 262

[0129] Фрагменты, продлевающие период полужизни

[0130] В дополнение к слитому пептиду, содержащему GLP-1, конъюгаты изобретения могут включать одну или более других групп для увеличения периода полужизни фармацевтически активной группы (например, циклический пептид PYY), например, посредством ковалентного взаимодействия. Примеры других продлевающих период полужизни групп включают, без ограничений, альбумин, варианты альбумина, альбумин-связывающие белки и/или домены, трансферрин и их фрагменты и аналоги. Дополнительные увеличивающие период полужизни группы, которые можно вводить в конъюгаты изобретения, включают, например, молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20000 и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго-или полисахариды) для получения требуемых свойств. Данные фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с кодирующими белковый каркас последовательностями, и их можно получать с помощью стандартных методик клонирования и экспрессии. В альтернативном варианте осуществления для присоединения групп к полученным путем рекомбинации или химической модификации

конъюгатам изобретения можно использовать хорошо известные способы химического связывания.

[0131] К молекулам пептида изобретения можно добавлять, например, пегильный фрагмент путем добавления цистеинового остатка к С-концу молекулы и присоединения пегильной группы к цистеину с помощью хорошо известных способов.

[0132] Пептидные молекулы изобретения, включающие дополнительные группы, можно сравнивать по функциональности с помощью нескольких известных анализов. Например, биологическую или фармакокинетическую активность интересующего неконъюгированного или конъюгированного в соответствии с изобретением терапевтического пептида можно анализировать с применением известных анализов в условиях *in vitro* или *in vivo* и сравнивать.

[0133] Фармацевтические композиции

[0134] В еще одном общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгаты, и соединения изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтическая композиция» в контексте настоящего документа означает продукт, содержащий конъюгат изобретения, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Конъюгаты и соединения изобретения и содержащие их композиции также используют при производстве лекарственного средства для терапевтических целей, упомянутых в настоящем документе.

[0135] В контексте настоящего документа термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в свете настоящего описания в настоящем изобретении можно применять любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для применения в фармацевтической композиции конъюгированного пептида.

[0136] Фармацевтически приемлемые кислые/анионные соли включают, без ограничений, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдисилат, эстолат, эзилат, фумарат, глицептат, глюконат, глутамат, гликолиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, памоат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат,

салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат и триэтиодид. Органические или неорганические кислоты также включают, без ограничений, йодистоводородную, перхлорную, серную, фосфорную, пропионовую, гликолевую, метансульфоновую, гидроксиэтансульфоновую, щавелевую, 2-нафталинсульфоновую, п-толуолсульфоновую, циклогексансульфаминовую, сахариную или трифторуксусную кислоты.

[0137] Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают, без ограничений, соли алюминия, 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол (также известен как трис(гидроксиметил)аминометан, трометан или «ТРИС»), соли аммония, бензатин, трет-бутиламин, соли кальция, хлоропрокаин, холин, циклогексиламин, диэтаноламин, этилендиамин, соли лития, L-лизин, соли магния, меглумин, N-метил-D-глюкамин, пиперидин, соли калия, прокаин, хинин, соли натрия, триэтиноламин или соли цинка.

[0138] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены фармацевтические составы, содержащие конъюгаты изобретения в количестве от около 0,001 мг/мл до около 100 мг/мл, от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл или от около 0,1 мг/мл до около 25 мг/мл. Фармацевтические составы могут иметь pH от около 3,0 до около 10, например от около 3 до около 7 или от около 5 до около 9. Состав может дополнительно содержать по меньшей мере один ингредиент, выбранный из буферной системы, консерванта (-ов), агента (-ов), регулирующего (-их) тоничность, хелатирующего (-их) агента (-ов), стабилизатора (-ов) и поверхностно-активного (-ых) вещества (веществ).

[0139] Состав, содержащий фармацевтически активные ингредиенты с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области техники, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, издание 21 (2005) и любые последующие издания). Не имеющие ограничительного характера примеры дополнительных ингредиентов включают буферные растворы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей можно применять при составлении фармацевтических композиций изобретения.

[0140] В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т. е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т. п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды, или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

[0141] В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию можно готовить в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, посредством инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекция может быть, например, доставлена подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутривенно.

[0142] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция

представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно применять в состоянии как есть или к которой врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или таблетки, покрытые оболочкой, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может также быть в форме, например, пакетов саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для растворения.

[0143] Лекарственные формы могут представлять собой формы с немедленным высвобождением, причем в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут быть с отсроченным высвобождением, с замедленным высвобождением или с модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте.

[0144] В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, внутрибрюшинно или сублингвально.

[0145] Значение pH в водном составе может находиться в диапазоне от pH 3 до pH 10. В одном варианте осуществления изобретения pH состава равен от около 7,0 до около 9,5. В другом варианте осуществления изобретения pH состава равен от около 3,0 до около 7,0.

[0146] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буферный раствор. Не имеющие ограничительного характера примеры буферных растворов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бичин, цитрат, двузамещенный гидрофосфат натрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)-аминометан и их смеси. Буферный раствор может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических буферных растворов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0147] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Не имеющие ограничительного характера примеры консервантов включают хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил-4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтанол, пропил 4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомерсал и их смеси. Консервант может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических консервантов, представляют

собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0148] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит изотонический агент. Неограничивающие примеры изотонического агента включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновую кислоту, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол, пропиленгликоль, 1,3-пропандиол, 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического агента включает сахар. Не имеющие ограничительного характера примеры сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-ГПЦД, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического агента является сахарный спирт, причем термин «сахарный спирт» определяют как C(4-8) углеводород, имеющий по меньшей мере одну гидроксильную группу. Не имеющие ограничительного характера примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Изотонический агент может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических изотонических агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0149] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Не имеющие ограничительного характера примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических хелатирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0150] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Не имеющие ограничительного характера примеры стабилизаторов включают один или более ингибиторов агрегации, один или более ингибиторов окисления, одно или более поверхностно-активных веществ и/или один или более ингибиторов протеазы.

[0151] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, причем указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как ГПЦ, ГПЦ-SL, ГПЦ-L и ГПМЦ), циклодекстрины, 2-метилтиозанол, полиэтиленгликоль (такой как PEG 3350), поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия),

серосодержащие соединения, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевую кислоту. Стабилизатор может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0152] В дополнительных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ, предпочтительно одно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин «поверхностно-активное вещество» относится к любым молекулам или ионам, которые образованы из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0153] В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или более ингибиторов протеазы, таких как, например, ЭДТА и/или гидрохлорид бензамидина (HCl). Ингибитор протеазы может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеазы, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0154] Фармацевтическая композиция изобретения может содержать некоторое количество аминокислотного основания, достаточное для уменьшения образования агрегатов полипептида во время хранения композиции. Термин «аминокислотное основание» относится к одной или более аминокислотам (таких как метионин, гистидин, имидазол, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан, треонин) или их аналогам. Любая аминокислота может присутствовать либо в форме свободного основания, либо в форме соли. Может присутствовать любой стереоизомер (т. е. L, D или их смесь) аминокислотного основания. Аминокислотное основание может присутствовать отдельно или в комбинации с другими аминокислотными основаниями в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих специфических аминокислотных оснований, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[0155] Фармацевтически приемлемые соли конъюгатов изобретения включают традиционные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли, образованные из неорганических или органических кислот или оснований. Примеры таких кислотно-

аддитивных солей включают ацетат, адипат, бензоат, бензолсульфонат, цитрат, камфорат, додецилсульфат, гидрохлорид, гидробромид, лактат, малеат, метансульфонат, нитрат, оксалат, пивалат, пропионат, сукцинат, сульфат и тартрат. Основные соли включают соли аммония, соли щелочных металлов, таких как натрий и калий, соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли органических оснований, такие как дициклогексаминовые соли, а также соли аминокислот, таких как аргинин. Кроме того, основные азотсодержащие группы могут переводиться в четвертичное состояние с помощью, например, алкилгалогенидов.

[0156] Фармацевтические композиции изобретения можно вводить любыми способами, подходящими для намеченной цели. Примеры включают парентеральное, подкожное, внутривенное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное, трансдермальное, буккальное введение или закапывание в глаза. Введение можно осуществлять пероральным путем. Приемлемые растворимые составы для парентерального введения включают водные растворы активных конъюгатов в водорастворимой форме, например водорастворимые соли, кислые растворы, щелочные растворы, растворы в воде с добавлением декстрозы, изотонические углеводные растворы и комплексы включения с циклодекстрином. В определенных вариантах осуществления конъюгаты изобретения вводят периферически.

[0157] Настоящее изобретение также охватывает способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание фармацевтически приемлемого носителя с любым из конъюгатов настоящего изобретения. Настоящее изобретение дополнительно включает фармацевтические композиции, полученные путем смешивания одного или более фармацевтически приемлемых носителей с любым из конъюгатов настоящего изобретения.

[0158] Более того, конъюгаты настоящего изобретения могут существовать в одной или более полиморфных или аморфных кристаллических формах, и подразумевается, что они входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, конъюгаты могут образовывать сольваты, например, с водой (т. е. гидраты) или обычными органическими растворителями. В настоящем документе термин «сольват» означает физическую связь конъюгатов настоящего изобретения с одной или более молекулами растворителя. Такое физическое связывание включает разные степени ионной и ковалентной связи, включая водородную связь. В определенных случаях сольват можно выделить, например, если одна или более молекул растворителя включены в кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. Под подразумевается, что термин «сольват» охватывает как сольваты в фазе раствора, так и сольваты со способностью к выделению. Не имеющие ограничительного характера примеры приемлемых сольватов включают этанолаты, метанолаты и т. п.

[0159] Подразумевается, что в объем настоящего изобретения включены полиморфы и сольваты конъюгатов настоящего изобретения. Таким образом, в способах лечения изобретения термин «введение» охватывает средства лечения, облегчения или

профилактики синдрома, расстройства или заболевания, описанного в настоящем документе, с помощью конъюгатов изобретения или их полиморфа или сольвата, очевидно включенного в объем изобретения, хотя и не описанного конкретно.

[0160] В другом варианте осуществления изобретение относится к конъюгатам изобретения для применения в качестве лекарственного средства.

[0161] В объем настоящего изобретения включены пролекарства конъюгатов настоящего изобретения. В целом такие пролекарства представляют собой функциональные производные конъюгатов, которые в условиях *in vivo* легко превращаются в требуемый конъюгат. Таким образом, в способах лечения настоящего изобретения термин «введение» охватывает лечение различных описанных расстройств с использованием конкретного описанного конъюгата или с использованием конъюгата, который не был конкретно описан, но который превращается в установленный конъюгат в условиях *in vivo* после введения пациенту. Традиционные процедуры выбора и получения приемлемых производных пролекарств описаны, например, в публикации «Design of Prodrugs», Ed. Bundgaard, Elsevier, 1985.

[0162] Более того, предполагается, что в объеме изобретения любой элемент, конкретно упоминаемый применительно к конъюгатам изобретения, будет включать все изотопы и смеси изотопов указанного элемента природного происхождения или синтетического происхождения, с природной распространенностью или в обогащенной изотопами форме. Например, ссылка на водород также охватывает ^1H , ^2H (D) и ^3H (T). Аналогично ссылки на углерод и кислород охватывают ^{12}C , ^{13}C , и ^{14}C , и ^{16}O , и ^{18}O соответственно. Изотопы могут быть радиоактивными или нерадиоактивными. Содержащие радиоактивную метку конъюгаты изобретения могут содержать радиоактивный изотоп, выбранный из группы ^3H , ^{11}C , ^{18}F , ^{122}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br и ^{82}Br . Радиоактивный изотоп предпочтительно выбран из группы, состоящей из ^3H , ^{11}C и ^{18}F .

[0163] Некоторые конъюгаты настоящего изобретения могут существовать в виде атропоизомеров. Атропоизомеры представляют собой стереоизомеры, полученные путем затрудненного поворота вокруг одинарных связей, причем барьер стерической деформации при повороте достаточно высок, чтобы позволять выделять конформеры. Следует понимать, что все такие конформеры и их смеси входят в объем настоящего изобретения.

[0164] Когда конъюгаты в соответствии с настоящим изобретением имеют по меньшей мере один стереоцентр, они могут соответственно существовать в виде энантиомеров или диастереомеров. Следует понимать, что все такие изомеры и их смеси входят в объем настоящего изобретения.

[0165] Если в ходе способов получения конъюгатов в соответствии с изобретением образуются смеси стереоизомеров, эти стереоизомеры можно выделять с помощью традиционных методик, таких как препаративная хроматография. Конъюгаты можно получать в рацемической форме, или отдельные энантиомеры можно получать в

результате энантиоспецифического синтеза или посредством разделения. Конъюгаты можно, например, разделять на составляющие их энантиомеры с помощью стандартных методик, таких как формирование диастереомерных пар посредством формирования соли с оптически активной кислотой, такой как (-)-ди-п-толуоил-D-винная кислота и/или (+)-ди-п-толуоил-L-винная кислота, с последующей фракционной кристаллизацией и регенерацией свободного основания. Конъюгаты можно также разделять посредством образования диастереомерных сложных эфиров или амидов с последующим хроматографическим разделением и удалением хирального вспомогательного соединения. В альтернативном варианте осуществления конъюгаты могут быть разделены с применением хиральной колонки посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или СФХ. В некоторых случаях могут существовать ротамеры конъюгатов, наблюдаемые на ¹H ЯМР, приводящие к появлению сложных мультиплетов и объединению пиков на спектре ¹H ЯМР.

[0166] В ходе любого из способов получения конъюгатов настоящего изобретения может возникать необходимость и/или желание защитить чувствительные или реакционноспособные группы на любой из рассматриваемых молекул. Для данных целей можно использовать стандартные защитные группы, такие как группы, описанные в публикациях *Protective Groups in Organic Chemistry*», ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; и T.W. Greene & P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 1991, каждая из которых полностью включена в текст настоящего документа посредством ссылки для всех целей. Защитные группы можно впоследствии удалять на удобной для этого стадии с помощью способов, известных в данной области.

[0167] Способы применения

[0168] Настоящее изобретение относится к способу профилактики, лечения или облегчения синдрома, обусловленного рецептором Y2, и/или синдрома обусловленного рецептором GLP-1, расстройства или заболевания у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения.

[0169] В настоящем изобретении также предложен способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения расстройства, заболевания или состояния или любого одного или более симптомов указанного расстройства, заболевания или состояния у пациента, содержащий этапы, на которых вводят пациенту эффективное количество конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения.

[0170] В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние выбрано из ожирения, диабета типа I или II, метаболического синдрома (т. е. синдрома X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной врожденным гиперинсулинизмом (СНІ), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечно-сосудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-

сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и/или экземы.

[0171] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которого достаточно для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) провоцирование регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости пациента с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (xi) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (-их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

[0172] Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

[0173] В контексте настоящего документа термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, связанного с заболеванием, расстройством или состоянием, который не обязательно очевиден у пациента, но может быть видимым у пациента. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению продолжительности

одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или состоянием. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у пациента.

[0174] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения ожирения или любого одного или более симптомов ожирения у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения.

[0175] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ снижения массы тела у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения.

[0176] В некоторых вариантах осуществления масса тела пациента уменьшается, например, в диапазоне от около 0,01% до около 0,1%, в диапазоне от около 0,1% до около 0,5%, в диапазоне от около 0,5% до около 1%, в диапазоне от около 1% до около 5%, в диапазоне от около 2% до около 3%, в диапазоне от около 5% до около 10%, в диапазоне от около 10% до около 15%, в диапазоне от около 15% до около 20%, в диапазоне от около 20% до около 25%, в диапазоне от около 25% до около 30%, в диапазоне от около 30% до около 35%, в диапазоне от около 35% до около 40%, в диапазоне от около 40% до около 45% или в диапазоне от около 45% до около 50% по отношению к массе тела пациента до введения любого из конъюгатов, соединений, фармацевтических композиций, форм или лекарственных средств изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

[0177] В некоторых вариантах осуществления снижение массы тела сохранено в течение, например, около 1 недели, в течение около 2 недель, в течение около 3 недель, в течение около 1 месяца, в течение около 2 месяцев, в течение около 3 месяцев, в течение около 4 месяцев, в течение около 5 месяцев, в течение около 6 месяцев, в течение около 7 месяцев, в течение около 8 месяцев, в течение около 9 месяцев, в течение около 10 месяцев, в течение около 11 месяцев, в течение около 1 года, в течение около 1,5 лет, в течение около 2 лет, в течение около 2,5 лет, в течение около 3 лет, в течение около 3,5 лет, в течение около 4 лет, в течение около 4,5 лет, в течение около 5 лет, в течение около 6 лет, в течение около 7 лет, в течение около 8 лет, в течение около 9 лет, в течение около 10 лет, в течение около 15 лет или в течение около 20 лет.

[0178] В настоящем изобретении предложен способ профилактики, лечения,

задержки возникновения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания или любого одного или более симптомов указанного синдрома, расстройства или заболевания у пациента, причем упомянутый синдром, расстройство или заболевание выбраны из ожирения, диабетов типа I или типа II, метаболического синдрома (т. е., синдром X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной наследственным гиперинсулинизмом (СНІ), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечно-сосудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофией печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и экземы, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения.

[0179] В контексте настоящего документа метаболический синдром относится к пациенту, имеющему любое одно или более из следующего: высокий уровень сахара в крови (например, высокий уровень сахара в крови в состоянии натошак), высокое кровяное давление, аномальный уровень холестерина (например, низкие уровни HDL), аномальные уровни триглицеридов (например, высокие уровни триглицеридов), большая талия (т. е. окружность талии), повышенное отложение жира в абдоминальной области, резистентность к инсулину, непереносимость глюкозы, повышенные уровни С-реакционноспособного белка (т. е. провоспалительное состояние) и повышенные уровни ингибитора-1 активатора плазминогена плазмы и фибриногена (т. е. протромботическое состояние).

[0180] В настоящем изобретении предложен способ снижения потребления пищи у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения. В некоторых вариантах осуществления потребление пищи пациентом уменьшено, например, в диапазоне от около 0,01% до около 0,1%, в диапазоне от около 0,1% до около 0,5%, в диапазоне от около 0,5% до около 1%, в диапазоне от около 1% до около 5%, в диапазоне от около 2% до около 3%, в диапазоне от около 5% до около 10%, в диапазоне от около 10% до около 15%, в диапазоне от около 15% до около 20%, в диапазоне от около 20% до около 25%, в диапазоне от около 25% до около 30%, в диапазоне от около 30% до около 35%, в диапазоне от около 35% до около 40%, в диапазоне от около 40% до около 45% или в диапазоне от около 45% до около 50% по отношению к потреблению пищи пациентом до введения любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

[0181] В некоторых вариантах осуществления уменьшение потребления пищи сохранено, например, в течение около 1 недели, в течение около 2 недель, в течение около 3 недель, в течение около 1 месяца, в течение около 2 месяцев, в течение около 3 месяцев, в течение около 4 месяцев, в течение около 5 месяцев, в течение около 6 месяцев, в течение около 7 месяцев, в течение около 8 месяцев, в течение около 9 месяцев, в течение около 10 месяцев, в течение около 11 месяцев, в течение около 1 года, в течение около 1,5 лет, в течение около 2 лет, в течение около 2,5 лет, в течение около 3 лет, в течение около 3,5 лет, в течение около 4 лет, в течение около 4,5 лет, в течение около 5 лет, в течение около 6 лет, в течение около 7 лет, в течение около 8 лет, в течение около 9 лет, в течение около 10 лет, в течение около 15 лет или в течение около 20 лет.

[0182] В настоящем изобретении предложен способ снижения гликированного гемоглобина (A1C) у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения. В некоторых вариантах осуществления A1C пациента снижен, например, в диапазоне от около 0,001% до около 0,01%, в диапазоне от около 0,01% до около 0,1%, в диапазоне от около 0,1% до около 0,2%, в диапазоне от около 0,2% до около 0,3%, в диапазоне от около 0,3% до около 0,4%, в диапазоне от около 0,4% до около 0,5%, в диапазоне от около 0,5% до около 1%, в диапазоне от около 1% до около 1,5%, в диапазоне от около 1,5% до около 2%, в диапазоне от около 2% до около 2,5%, в диапазоне от около 2,5% до около 3%, в диапазоне от около 3% до около 4%, в диапазоне от около 4% до около 5%, в диапазоне от около 5% до около 6%, в диапазоне от около 6% до около 7%, в диапазоне от около 7% до около 8%, в диапазоне от около 8% до около 9% или в диапазоне от около 9% до около 10% по отношению к A1C пациента до введения любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

[0183] В других вариантах осуществления предложены способы снижения уровней глюкозы в крови натощак у пациента, при этом способы содержат этапы на которых вводят пациенту эффективное количество конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения. Уровни глюкозы в крови в состоянии натощак могут быть снижены до менее от около 140 до около 150 мг/дл, менее от около 140 до около 130 мг/дл, менее от около 130 до около 120 мг/дл, менее от около 120 до около 110 мг/дл, менее от около 110 до около 100 мг/дл, менее от около 100 до около 90 мг/дл или менее от около 90 до около 80 мг/дл по отношению к уровням глюкозы в крови в состоянии натощак у пациента до введения любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

[0184] В настоящем изобретении предложен способ модуляции активности рецептора Y2 и активности рецептора GLP-1 у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения. В контексте настоящего документа термин «модулирование» относится к увеличению или уменьшению активности рецептора.

[0185] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата или соединения изобретения или его формы, композиции или лекарственного средства вводят пациенту один раз в день, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день, пять раз в день, шесть раз в день, семь раз в день или восемь раз в день. В других вариантах осуществления эффективное количество конъюгата или соединения изобретения или его формы, композиции или лекарственного средства вводят пациенту один раз в два дня, один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, два раза в месяц, три раза в месяц или четыре раза в месяц.

[0186] Другой вариант осуществления изобретения включает способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения заболевания, расстройства или синдрома, или одного или более симптомов любого из указанных заболеваний, расстройств или синдромов у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения в виде комбинированной терапии. В определенных вариантах осуществления комбинированная терапия представляет собой второй терапевтический агент. В определенных вариантах осуществления комбинированная терапия представляет собой хирургическую терапию.

[0187] Используемый в настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии.

[0188] При использовании в настоящем документе термин «комбинированная терапия» относится к введению пациенту одного или более дополнительных терапевтических агентов или проведению для пациента одной или более хирургических терапий одновременно с введением эффективного количества конъюгата или соединения изобретения или его формы, композиции или лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления введение одного или более дополнительных терапевтических агентов или проведение одной или более хирургических терапий можно осуществлять в тот же день, что и введение эффективного количества конъюгата изобретения, а в других вариантах осуществления введение одного или более дополнительных терапевтических агентов или проведение одной или более хирургических терапий можно осуществлять в ту же неделю или в тот же месяц, что и введение эффективного количества конъюгата или соединения изобретения.

[0189] Настоящее изобретение также предусматривает профилактику, лечение, задержку возникновения или облегчение любого из заболеваний, расстройств, синдромов или симптомов, описанных в настоящем документе, у пациента с помощью

комбинированной терапии, которая включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения в комбинации с одним или более из следующих терапевтических агентов: ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4) (например, ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, алоглиптин и т. д.); агонист рецептора GLP-1 (например, агонисты GLP-1 непродолжительного действия, такие как эксенатид и ликсисенатид; агонисты рецептора GLP-1 средней продолжительности действия, такие как лираглутид; агонисты рецептора GLP-1 с замедленным высвобождением, такие как эксенатид с замедленным высвобождением, альбиглутид, дулаглутид); ингибиторы котранспортера-2 натрия глюконата (SGLT-2) (например, канаглифозин, дапаглифозин, эмпаглифозин и т. д.); секвестранты желчных кислот (например, колесевелам и т. д.); агонисты дофамина рецептора (например, бромпираптин быстрого высвобождения); бигуаниды (например, метформин и т. д.); инсулин; оксинтомодулин; сульфонилмочевины (например, хлорпропамид, глимепирид, глипизид, глибурид, глибенкламид, глиборнурид, глизоксепид, гликопирамид, толазамид, толбутамид, ацетогексамид, карбутамид и т. д.); и тиазолидиндионы (например, пиоглитазон, розиглитазон, лобеглитазон, циглитазон, дарглитазон, энглитазон, нетоглитазон, ривоглитазон, троглитазон и т. д.). В некоторых вариантах осуществления дозу дополнительного (-ых) терапевтического (-их) агента (-ов) уменьшают при введении в комбинации с конъюгатом или соединением изобретения. В некоторых вариантах осуществления при использовании в комбинации с конъюгатом или соединением изобретения, дополнительный (-ые) терапевтический (-ие) агент (-ы) можно применять в более низких дозах по сравнению с использованием каждого по отдельности.

[0190] Настоящее изобретение предусматривает профилактику, лечение, отсрочку возникновения или облегчение любого из заболеваний, расстройств, синдромов или симптомов, описанных в настоящем документе, у пациента с помощью комбинированной терапии, которая включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения в комбинации с хирургической терапией. В определенных вариантах осуществления хирургическая терапия может представлять собой бариатрическую хирургию (например, операция шунтирования желудка, такая как шунтирование желудка с гастроеюноанастомозом по Ру; рукавную гастрэктомию; регулируемое бандажирование желудка; билиопанкреатическое шунтирование с исключением двенадцатиперстной кишки; внутрижелудочный баллон; пликацию желудка; и их комбинации).

[0191] В вариантах осуществления, в которых один или более дополнительных терапевтических агентов или хирургических терапевтических средств вводят в тот же день, что и эффективное количество конъюгата или соединения изобретения, конъюгат или соединение изобретения можно вводить перед или одновременно с дополнительным терапевтическим агентом или после него. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения лекарственных средств субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию)

можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства пациенту или одновременно с таким введением.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0192] В изобретении также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

[0193] Вариант осуществления 1 представляет собой конъюгат, содержащий слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит пептид GLP-1, первый линкерный пептид, пептид шарнирной Fc-области и второй линкерный пептид, причем первый линкерный пептид необязательно отсутствует.

[0194] Вариант осуществления 2 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 1, в котором циклический пептид PYY представлен соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула I,

где:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K;

Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K;

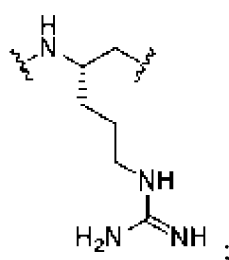
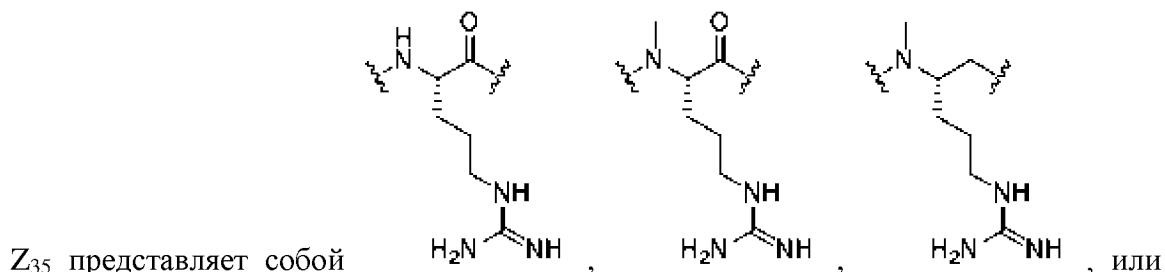
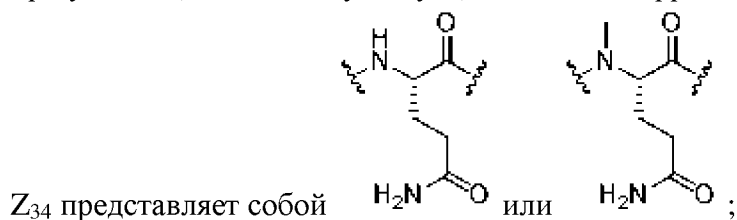
Z₂₂ представляет собой A или K;

Z₂₃ представляет собой S или K;

Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L, W или отсутствует,

при условии, что Z_{30} отсутствует, только если q равно 1;



причем производное представляет собой соединение формулы **I**, которое модифицировано с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из амидирования, ацилирования и пегилирования.

[0195] Вариант осуществления 3 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 2, в котором циклический пептид РУУ представлен соединением формулы **I**, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

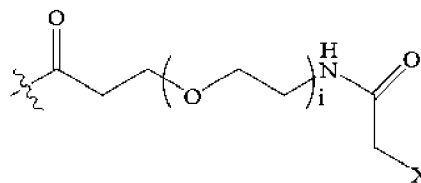
q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2-$,

$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой K, A, E, S или R;

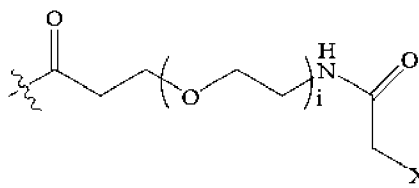
Z_7 представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



X , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X=\text{Br}$, I или Cl,

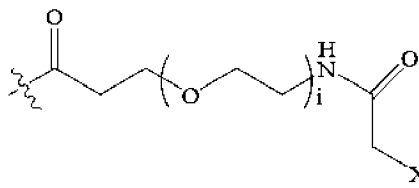
$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z₉ представляет собой G или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



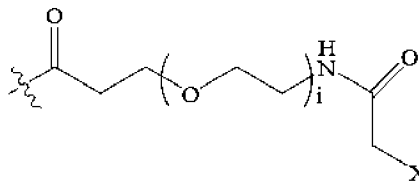
X=Br, I или Cl,
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₁₁ представляет собой D или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



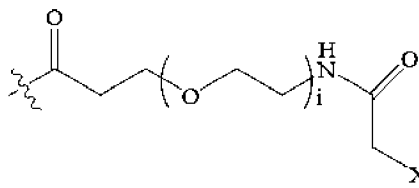
X=Br, I или Cl,
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₂₂ представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



X=Br, I или Cl,
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₂₃ представляет собой S или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена

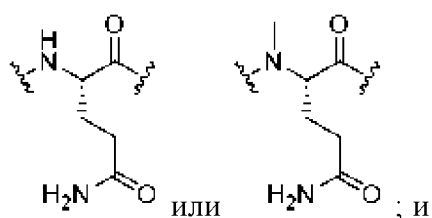


X=Br, I или Cl,
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

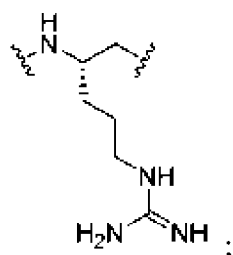
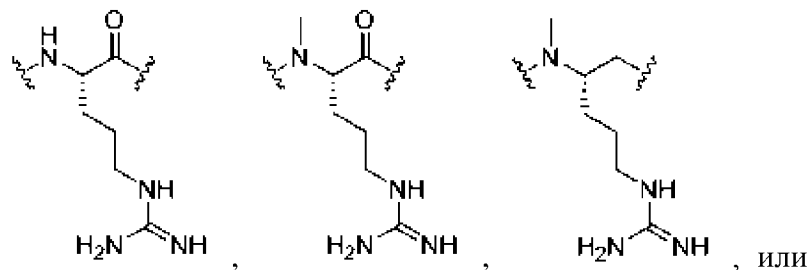
Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L;

Z₃₄ представляет собой



Z₃₅ представляет собой



где X представляет собой электрофильную группу, а Br, Cl или I электрофильной группы X замещают в реакции конъюгации с образованием связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклического пептидного PYY конъюгата.

[0196] Вариант осуществления 4 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 2, в котором циклический пептид PYY представлен соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

n равно 1, 2 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q может быть равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-,

-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена

-C(O)CH₂Br,

Z₉ представляет собой G или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена

-C(O)CH₂Br,

Z₁₁ представляет собой D или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{22} представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

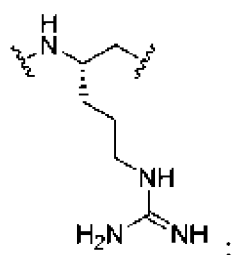
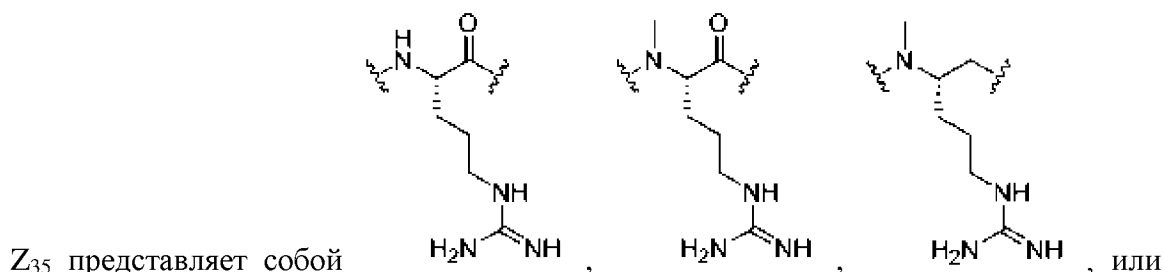
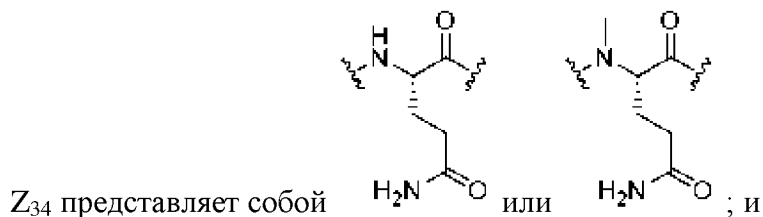
$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{23} представляет собой S или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{26} представляет собой А или Н;

Z_{30} представляет собой L;



причем Br замещают в реакции конъюгации с образованием связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклического пептидного PYY конъюгата.

[0197] Вариант осуществления 5 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 1 или 2, в котором циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из соединений с SEQ ID NO: 1-54, или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0198] Вариант осуществления 6 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 5, в котором циклический пептид PYY выбран из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33, или 34, или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0199] Вариант осуществления 7 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-6, в котором слитый пептид, содержащий GLP-1, ковалентно связан с циклическим пептидом PYY на остатке лизина циклического пептида PYY.

[0200] Вариант осуществления 8 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 7, в котором циклический пептид PYY содержит химический линкер.

[0201] Вариант осуществления 9 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 8, в котором химический линкер включает в себя линкер, выбранный из $C(O)CH_2$, полиэтиленгликоль (PEG)₈-триазолил- CH_2CH_2CO -PEG₄, цепи PEG из 2-24 PEG звеньев, линкера, содержащего ацильную группу, или алкильной цепи, содержащей 2-10 атомов углерода.

[0202] Вариант осуществления 10 представляет собой конъюгат по одному из вариантов осуществления 7-9, в котором только один из Z_7 , Z_9 , Z_{11} , Z_{22} и Z_{23} в формуле **I** представляет собой лизин, причем лизин ковалентно связан с цистеиновым остатком второго линкерного пептида слитого пептида, содержащего GLP-1.

[0203] Вариант осуществления 11 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 10, в котором Z_{11} в формуле **I** представляет собой лизин.

[0204] Вариант осуществления 12 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-11, в котором пептид GLP-1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-59.

[0205] Вариант осуществления 13 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 12, в котором пептид GLP-1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

[0206] Вариант осуществления 14 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-13, в котором первый линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-83.

[0207] Вариант осуществления 15 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 14, в котором первый линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

[0208] Вариант осуществления 16 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-15, в котором пептид шарнирной Fc-области содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84-90.

[0209] Вариант осуществления 17 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 16, в котором пептид шарнирной Fc-области содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84 или SEQ ID NO: 85.

[0210] Вариант осуществления 18 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-17, в котором второй линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 93-112.

[0211] Вариант осуществления 19 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 18, в котором второй линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, 94, 95, 106 или 111.

[0212] Вариант осуществления 20 представляет собой конъюгат, содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем

слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113-224 и 267-274, и причем циклический пептид PYY содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 или 34.

[0213] Вариант осуществления 21 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 20, в котором слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.

[0214] Вариант осуществления 22 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 20, в котором слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136.

[0215] Вариант осуществления 23 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 21 или 22, в котором цистеиновый остаток между остатками 287-289 слитого пептида, содержащего GLP-1, ковалентно связан с остатком лизина в остатке 7, 9, 11, 22 или 23 циклического пептида PYY.

[0216] Вариант осуществления 24 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 23, в котором цистеиновый остаток расположен в остатке 288 слитого пептида, содержащего GLP-1.

[0217] Вариант осуществления 25 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 20-24, в котором остаток лизина расположен в остатке 11 циклического пептида PYY.

[0218] Вариант осуществления 26 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 20-25, в котором слитый пептид, содержащий GLP-1, ковалентно связан с циклическим пептидом PYY при помощи химического линкера на циклическом пептиде PYY.

[0219] Вариант осуществления 27 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 26, в котором химический линкер выбран из группы, состоящей из $C(O)CH_2$, полиэтиленгликоль (PEG)₈-триазилил- CH_2CH_2CO -PEG₄, цепи PEG из 2-24 PEG звеньев, линкера, содержащего ацильную группу, или алкильной цепи, содержащей 2-10 атомов углерода.

[0220] Вариант осуществления 28 представляет собой конъюгат, содержащий слитый пептид, содержащий глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем конъюгат содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 225-262 или его фармацевтически приемлемой соли.

[0221] Вариант осуществления 29 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-28, в котором слитый пептид, содержащий GLP-1, представляет собой мономер.

[0222] Вариант осуществления 30 представляет собой конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-28, в котором слитый пептид, содержащий GLP-1, представляет собой димер.

[0223] Вариант осуществления 31 представляет собой способ получения конъюгата

по любому одному из вариантов осуществления 1-30, включающий реакцию электрофильного соединения, предпочтительно бромацетамида или малеимида, введенного в боковую цепь циклического пептида PYY, предпочтительно в аминную боковую цепь остатка лизина циклического пептида PYY, с сульфгидрильной группой цистеинового остатка второго линкерного пептида слитого пептида, содержащего GLP-1, с образованием, таким образом, ковалентной связи между циклическим пептидом PYY и пептидом, содержащим GLP-1.

[0224] Вариант осуществления 32 представляет собой способ по варианту осуществления 31, в котором цистеиновый остаток второго линкерного пептида слитого пептида, содержащего GLP-1, восстанавливают посредством приведения слитого пептида, содержащего GLP-1, в контакт с избытком азафосфинового восстанавливающего агента, посредством чего восстановленный цистеиновый остаток приводят в реакцию с электрофильным соединением.

[0225] Вариант осуществления 33 представляет собой способ по варианту осуществления 32, в котором азафосфиновый восстанавливающий агент представляет собой 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3.3.1.1] декан (РТА) или его производное.

[0226] Вариант осуществления 34 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-30 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0227] Вариант осуществления 35 представляет собой способ лечения или профилактики ожирения у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 34.

[0228] Вариант осуществления 36 представляет собой способ по варианту осуществления 35, в котором введение эффективного количества фармацевтической композиции пациенту приводит к уменьшению массы тела на от приблизительно 5% до приблизительно 10%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, от приблизительно 15% до приблизительно 20% или от приблизительно 20% до приблизительно 25% по сравнению с массой тела пациента до введения фармацевтической композиции.

[0229] Вариант осуществления 37 представляет собой способ лечения или профилактики заболевания или расстройства у пациента, причем указанное заболевание или расстройство представляет собой ожирение, диабет типа I или типа II, метаболический синдром, резистентность к инсулину, нарушение толерантности к глюкозе, гипергликемию, гиперинсулинемию, гипертриглицеридемию, гипогликемию, обусловленную врожденным гиперинсулинизмом (ЧИ), дислипидемию, атеросклероз, диабетическую нефропатию и другие факторы риска для сердечно-сосудистой системы, такие как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороз, воспаление, неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), болезнь почек и экзему, причем способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции варианта осуществления 34.

[0230] Вариант осуществления 38 представляет собой способ по варианту осуществления 37, в котором указанное заболевание или расстройство представляет собой ожирение.

[0231] Вариант осуществления 39 представляет собой способ по варианту осуществления 37, в котором указанное заболевание или расстройство представляет собой диабет I типа.

[0232] Вариант осуществления 40 представляет собой способ по варианту осуществления 37, в котором указанное заболевание или расстройство представляет собой диабет II типа.

[0233] Вариант осуществления 41 представляет собой способ по варианту осуществления 37, в котором указанное заболевание или расстройство представляет собой метаболический синдром.

[0234] Вариант осуществления 42 представляет собой способ по варианту осуществления 37, в котором указанное заболевание или расстройство представляет собой заболевание почек.

[0235] Вариант осуществления 43 представляет собой способ по варианту осуществления 37, в котором указанное заболевание или расстройство представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

[0236] Вариант осуществления 44 представляет собой способ по варианту осуществления 37, в котором указанное заболевание или расстройство представляет собой неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFLD).

[0237] Вариант осуществления 45 представляет собой способ снижения по меньшей мере одного из потребления пищи или массы тела у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 34.

[0238] Вариант осуществления 46 представляет собой способ по варианту осуществления 45, в котором введение эффективного количества фармацевтической композиции пациенту приводит к снижению потребления пищи на величину от приблизительно 5% до приблизительно 10%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, от приблизительно 15% до приблизительно 20%, от приблизительно 20% до приблизительно 25%, от приблизительно 25% до приблизительно 30%, от приблизительно 30% до приблизительно 35%, от приблизительно 35% до приблизительно 40%, от приблизительно 40% до приблизительно 45%, от приблизительно 45% до приблизительно 50%, по сравнению с потреблением пищи у пациента до введения фармацевтической композиции.

[0239] Вариант осуществления 47 представляет собой способ модуляции активности рецептора Y2 и/или активности рецептора GLP-1 у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 34.

[0240] Вариант осуществления 48 представляет собой способ по любому одному из

вариантов осуществления 35-47, в котором фармацевтическую композицию вводят путем инъекции.

[0241] Вариант осуществления 49 представляет собой способ по варианту осуществления 48, в котором инъекцию делают подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутривенно.

[0242] Вариант осуществления 50 представляет собой способ по любому одному из вариантов осуществления 35-49, в котором фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

[0243] Вариант осуществления 51 представляет собой способ по любому одному из вариантов осуществления 35-50, причем фармацевтическую композицию вводят пациенту ежедневно, еженедельно или ежемесячно.

[0244] Вариант осуществления 52 представляет собой способ по варианту осуществления 51, в котором фармацевтическую композицию вводят один, два, три, четыре, пять или шесть раз в сутки.

[0245] Вариант осуществления 53 представляет собой способ по варианту осуществления 51, в котором фармацевтическую композицию вводят один, два, три, четыре, пять или шесть раз в неделю.

[0246] Вариант осуществления 54 представляет собой способ по варианту осуществления 51, в котором фармацевтическую композицию вводят один, два, три или четыре раза в месяц.

[0247] Вариант осуществления 55 представляет собой набор, содержащий конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-30 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 34, предпочтительно набор дополнительно содержит инъекционное устройство.

[0248] Вариант осуществления 56 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 1-30, включающий объединение конъюгата с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[0249] Вариант осуществления 57 представляет собой выделенный пептид платформы шарнирной Fc-области, в котором пептид платформы шарнирной Fc-области содержит пептид шарнирной Fc-области, который предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84-90, первый линкерный пептид, который предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-83, причем первый линкерный пептид необязательно отсутствует, и второй линкерный пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 91-112, в котором первый линкерный пептид соединен с аминоконцевой областью пептида шарнирной Fc-области, причем второй линкерный пептид соединен с карбоксиконцевой областью пептида шарнирной Fc-области.

[0250] Вариант осуществления 58 представляет собой выделенный пептид

платформы шарнирной Fc-области по варианту осуществления 57, в котором пептид шарнирной Fc-области содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

[0251] Вариант осуществления 59 представляет собой выделенный пептид платформы шарнирной Fc-области по варианту осуществления 57 или 58, в котором первый линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

[0252] Вариант осуществления 60 представляет собой выделенный пептид платформы шарнирной Fc-области по любому одному варианту осуществления 57-59, в котором второй линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, 94, 95, 106, или 111.

[0253] Вариант осуществления 61 представляет собой конъюгат, содержащий пептид платформы шарнирной Fc-области, ковалентно связанный с целевым пептидом во втором линкерном пептиде.

[0254] Вариант осуществления 62 представляет собой конъюгат по варианту осуществления 61, в котором целевой пептид представляет собой циклический пептид RYY, представленный соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула I,

где:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K;

Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K;

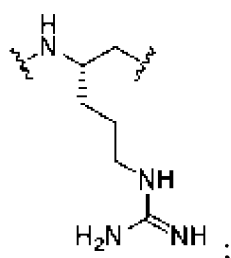
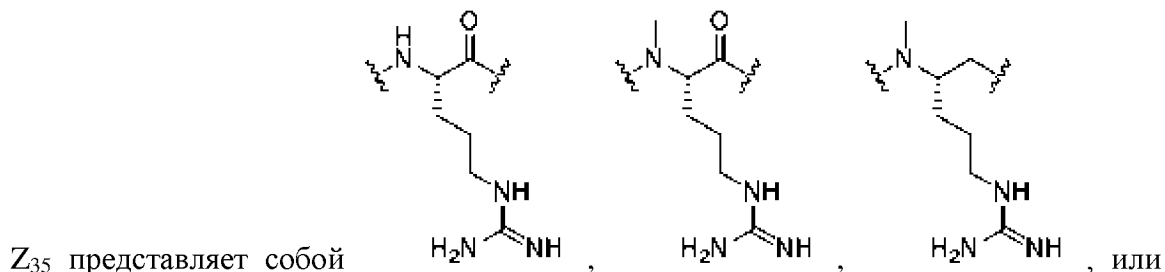
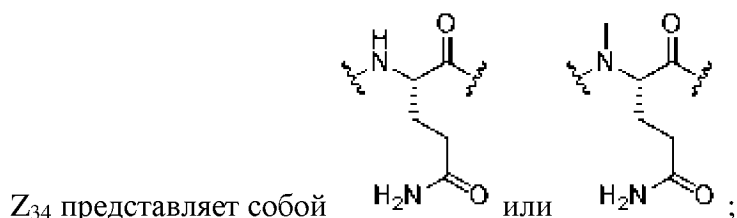
Z₂₂ представляет собой A или K;

Z₂₃ представляет собой S или K;

Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L, W или отсутствует,

при условии, что Z₃₀ отсутствует, только если q равно 1;



причем производное представляет собой соединение формулы **I**, которое модифицировано с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из амидирования, ацилирования и пегилирования.

[0255] Вариант осуществления 63 представляет собой способ получения конъюгата пептида платформы шарнирной Fc-области с целевым пептидом, включающий образование ковалентной связи между вторым линкерным пептидом и целевым пептидом.

ПРИМЕРЫ

[0256] СИНТЕЗ

[0257] Соединения или конъюгаты настоящего изобретения можно синтезировать в соответствии с общими способами синтеза, известными специалистам в данной области. Приведенное ниже описание синтеза приводится в качестве примера и никоим образом не направлено на ограничение изобретения.

[0254] Аналоги или производные NTSC циклического PYY (NTSC-PYY) данного изобретения можно синтезировать с помощью различных известных стандартных методик образования последовательных пептидных связей между аминокислотами, и это предпочтительно осуществляют посредством твердофазного пептидного синтеза (SPPS), как по существу описано в работе Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)), с использованием автоматизированного синтезатора пептидов, традиционного лабораторного синтеза или комбинации обоих подходов. Традиционные методики пептидного синтеза включают конденсацию свободной аминогруппы одного аминокислотного остатка, другие реакционно-способные функциональные группы которой надлежащим образом защищены, и свободной карбоксильной группы другой аминокислоты, реакционно-способные функциональные группы которой также

надлежащим образом защищены. К примерам конденсационных агентов, обычно используемых для формирования пептидной связи, относятся диизопропилкарбодиимид (DIC) с 1-гидроксibenзилтриазолом (HOBt) или без него, или этилциано(гидроксиимино)ацетат (Oxyma Pure), гексафторфосфат 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (HBTU), гексафторфосфат 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (HATU), гексафторфосфат 2-(6-хлор-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (HCTU), гексафторфосфат 1-циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси-трис-пирролидино-фосфония (PyOxim), тетрафторборат 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (TBTU), гексафторфосфат бром-трис-пирролидино-фосфония (PyBrop) и т. п.

[0255] Методологию автоматизированного синтеза пептидов можно осуществлять при комнатной температуре (кт) или при повышенных температурах, предпочтительно путем применения микроволнового нагрева, как описано в Yu (J. Org. Chem., 57:4781-4784 (1992)) и позднее усовершенствовано в Palasek (J. Pept. Sci., 13:143-148 (2007)).

[0256] Соединения настоящего изобретения (С-концевые амиды) можно удобно получать с применением методологии защиты аминокислот с помощью N- α -FMOC (9-фторенилметеооксикарбонил), при которой карбокси-конец соответствующим образом N- α -FMOC-защищенной аминокислоты подвергают связыванию с обычной твердофазной смолой с применением подходящего агента связывания. Подходящие традиционные коммерчески доступные твердофазные смолы включают амидную MBHA-смолу Ринка, амидную AM-смолу Ринка, смолу Tentagel S RAM, смолу FMOC-PAL-PEG PS, амидную смолу Ринка SpheriTide, смолу Ринка ChemMatrix, амидную смолу Зиберы TG, смолу Зиберы TG и т. п. Затем можно снимать защиту со связанной со смолой FMOC-аминокислоты посредством воздействия 20%-го пиперидина либо в N, N-диметилформамиде (DMF), либо в 1-метил-2-пирролидоне (NMP), за счет обработки которым избирательно удаляют защитную группу FMOC. Дополнительные FMOC-защищенные аминокислоты затем последовательно подвергают связыванию и последовательно снимают с них защиту, таким образом генерируя желаемый защищенный пептид, связанный с смолой. В определенных случаях может быть необходимо использовать ортогонально реакционноспособную защитную группу для другого амина в пептидной последовательности, которая будет выдерживать условия снятия защиты FMOC. Защитные группы, такие как 4-метилтретил (Mtt) или 4-метокситретил (Mmt), каждую из которых можно удалять посредством обработки 1%-й трифторуксусной кислотой (ТФУ) / дихлорметаном (ДХМ), или предпочтительно аллоксикарбонил (alloc; который удаляют посредством обработки комбинацией $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (тетракис(трифенилфосфин)палладий(0))/PhSiH₃ (фенилсилан)), 1-(4,4-диметил-2,6-диоксиклогекс-1-илиден)этил (Dde; который удаляют посредством обработки 2-3%-ым гидразином/DMF) и 1-(4,4-диметил-2,6-диоксиклогекс-1-илиден)-3-метилбутил (ivDde; который удаляют посредством обработки 2-3%-ым гидразином/DMF), можно эффективно применять в таких случаях.

[0257] В традиционных методологиях синтеза пептидов реакционноспособные боковые цепи альфа-аминокислот по существу защищены в течение всего процесса синтеза с помощью подходящих защитных групп для обеспечения их инертностью по отношению к протоколам связывания и снятия защиты. Хотя в данной области известно множество защитных групп для боковых цепей аминокислот, наиболее предпочтительны следующие защитные группы: трет-бутил (t-Bu) для серина, треонина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и тирозина; тритил (Trt) для аспарагина, глутамина, цистеина, гомоцистеина и гистидина; *трет*-бутоксикарбонил (Boc) для триптофана и ϵ -аминогруппы лизина; и 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf) для аргинина. Эти защитные группы удаляют после обработки сильной кислотой, например с помощью высоких концентраций трифторуксусной кислоты (ТФУ).

[0258] После завершения SPPS со связанного со смолой пептида с защищенной боковой цепью снимают защиту и одновременно отщепляют от смолы с помощью смеси для расщепления, которая состоит преимущественно из (ТФУ) вместе с различными комбинациями поглотителей карбокатионов, таких как триизопропилсилан (ТИПС), вода, фенол и анизол. Неочищенный твердый пептид затем выделяют путем осаждения фильтрата пептида/смеси холодным эфиром. В частном случае связанных со смолой Зиберы защищенных пептидов отщепление защищенного пептида от смолы может быть эффективно реализовано после многократной обработки 1-2%-й ТФУ в ДХМ без нарушения защиты боковой цепи. После выделения можно проводить дополнительные манипуляции с защищенным пептидом посредством реакций в растворе. Наконец, с защищенного пептида можно снимать общую защиту с помощью отдельной обработки смесью для расщепления и осаждать его, как описано выше. Полученный таким образом неочищенный пептид затем растворяют до низкой концентрации (приблизительно < 4 мг/мл) в преимущественно водной (водн.) системе растворителей, содержащей органический соразтворитель, такой как ацетонитрил или этанол. После повышения pH раствора до > 5 пептид затем подвергают реакции внутримолекулярной циклизации с образованием соответствующего неочищенного аналога NTSC РУУ настоящего изобретения. Образованные таким образом аналоги NTSC РУУ можно очищать с помощью методик очистки, общеизвестных в данной области техники. Предпочтительным способом очистки пептида, применяемым в настоящем документе, является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Впоследствии выполняют анализ очищенных пептидов с помощью метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХМС).

[0259] Общие схемы и способы получения циклических пептидов РУУ изобретения описаны в заявке на патент США № 15/794,231, поданной 26 октября 2017 г., и заявке на патент США № 15/794,171, поданной 26 октября 2017 г. Содержание обеих цитируемых публикаций полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[0260] Предполагается, что следующие примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, приведены только в иллюстративных целях и что

различные изменения и модификации в них будут понятны специалистам в данной области техники и подлежат включению в объем и сферу действия данной заявки и в объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в настоящем документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[0261] Пример 1. Экспрессия и очистка слитых пептидов, содержащих глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), из временно трансфицированных клеток млекопитающих

[0262] ДНК конструкторы для слитых пептидов, содержащих GLP-1, получали путем клонирования синтезированных фрагментов генов в вектор экспрессии в клетках млекопитающих pCDNA3.1, с помощью различных сконструированных эндонуклеазных рестрикционных ферментов. Синтезированные фрагменты генов создавали таким образом, чтобы они содержали последовательности ДНК, кодирующие один или все из следующих компонентов гибридного белка (от N-конца к С-концу): пептид GLP-1 или вариант пептида GLP-1, первый линкерный пептид, пептид шарнирной Fc-области и второй линкерный пептид, который содержит Cys для конъюгации с циклическим пептидом PYY.

[0263] Гибридные белки, содержащие GLP-1, экспрессировали в клетках ExpiCHO-STM (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, кат. № A29127) путем временной трансфекции клеток очищенной плазмидной ДНК экспрессионного конструктора гибридного белка в соответствии с рекомендациями производителя. Другими словами, клетки ExpiCHO-STM поддерживали в суспензии в экспрессионной среде ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, кат. № A29100) в инкубаторе с функцией встряхивания при 37 °C, 8% CO₂ и 125 об/мин. Клетки пересеивали и разводили до концентрации 6,0×10⁶ клеток на мл, поддерживая жизнеспособность клеток на уровне 98% или выше. Временные трансфекции проводили с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO (ThermoFisher Scientific, кат. № A29131). На каждый мл разведенных клеток, подлежащих трансфекции, использовали один микрограмм плазмидной ДНК, который разбавляли в комплексообразующей среде OptiPRO™ SFM. Реагент ExpiFectamine™ CHO использовали в соотношении 1:3 (об./об., ДНК:реагент), а также разбавляли в OptiPRO™. Разведенную ДНК и трансфекционный реагент объединяли на одну минуту, позволяя сформироваться комплексу ДНК/липид, а затем добавляли к клеткам. После инкубации в течение ночи к клеткам добавляли питательную среду ExpiCHO™ и усилитель ExpiFectamine™ CHO. Клетки культивировали при встряхивании и температуре 37 °C в течение пяти дней перед сбором супернатантов культуры.

[0264] Супернатанты культуры из временно трансфицированных клеток ExpiCHO STM собирали путем осветления посредством центрифугирования (30 мин, 6000 об/мин) с последующей фильтрацией (мембрана PES 0,2 мкм, Corning; г. Корнинг, штат Нью-Йорк, США). Трансфекции большого объема (от 5 до 20 литров) сначала концентрировали в 10 раз, используя систему тангенциальной проточной фильтрации Pall Centramate. К DPBS в

концентрации 10х, pH 7,2 добавляли супернатант до достижения конечной концентрации 1X перед помещением полученного раствора на уравновешенную (DPBS, pH 7,2) колонку HiTrap MabSelect Sure с белком A(GE Healthcare; г. Литл Чалфонт, Великобритания) в относительной концентрации ~ 20 мг белка на мл смолы, используя хроматографическую систему AKTA FPLC. После загрузки колонку последовательно промывали 10 объемами колонки DPBS, pH 7,2. В некоторых случаях использовали дополнительные промывания 20 объемами колонки 100 mM трис, 2,5M NaCl, 50 mM каприлата натрия, pH 9 и 10 объемами колонки DPBS, pH 7,2. Белок элюировали 10 объемами колонки 0,1 M ацетата натрия (Na), pH 3. Фракции белка немедленно нейтрализовали путем элюирования в пробирки, содержащие 2,0 M трис, pH 7, при объеме элюируемой фракции 20%. Пиковые фракции объединяли и при необходимости доводили pH до ~ 7 с помощью дополнительного объема трис. Очищенный белок фильтровали (0,2 мкм) и определяли концентрацию по поглощению на длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра BioTek Synergy™ HTM. Качество очищенных белков оценивали методами SDS-PAGE и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Dionex™). Концентрации эндотоксина измеряли с помощью турбидиметрического LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod; г. Фалмут, штат Массачусетс, США).

[0265] В качестве альтернативы, гибридные белки, содержащие GLP-1, экспрессировали в клетках Expi293F (ThermoFisher Scientific, кат. № A14527) путем временной трансфекции клеток очищенной плазмидной ДНК экспрессионного конструкта гибридного белка в соответствии с рекомендациями производителя. Другими словами, клетки Expi293F поддерживали в суспензии в экспрессионной среде Expi293™ (ThermoFisher Scientific, кат. № A1435101) в инкубаторе с функцией встряхивания при 37 °C, 8% CO₂ и 125 об/мин. Клетки пересеивали и разводили до концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток на мл, поддерживая жизнеспособность клеток на уровне 95% или выше. Временные трансфекции проводили с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ 293 (ThermoFisher Scientific, кат. № A14525). На каждый мл разведенных клеток, подлежащих трансфекции, использовали один микрограмм плазмидной ДНК, который разбавляли в комплексообразующей среде OptiMEM™ SFM. Реагент ExpiFectamine™ 293 применяли в соотношении 1:2,6 (об./об., ДНК:реагент), разводили в OptiMEM™ и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Разведенную ДНК и трансфекционный реагент объединяли на двадцать минут, позволяя сформироваться комплексу ДНК/липид, а затем добавляли к клеткам. После инкубации в течение ночи к клеткам добавляли питательную среду Expi293™ и усилитель ExpiFectamine™ 293. Клетки культивировали при встряхивании и температуре 37 °C в течение четырех дней перед сбором супернатантов культуры.

[0266] Супернатанты культуры из временно трансфицированных клеток Expi293F собирали путем осветления посредством центрифугирования (30 мин, 6000 об/мин) с последующей фильтрацией (мембрана PES 0,2 мкм, Corning). К DPBS в концентрации 10х, pH 7,2 добавляли супернатант до достижения конечной концентрации 1X перед

помещением полученного раствора на уравновешенную (DPBS, pH 7,2) колонку HiTrap MabSelect Sure с белком A(GE Healthcare) в относительной концентрации ~ 20 мг белка на мл смолы, используя хроматографическую систему АКТА FPLC. После загрузки колонку промывали 10 объемами колонки DPBS, pH 7,2. Белок элюировали 10 объемами колонки 0,1 М ацетата Na, pH 3. Фракции белка немедленно нейтрализовали путем элюирования в пробирки, содержащие 2,0 М трис, pH 7, при объеме элюируемой фракции 20%. Пиковые фракции объединяли и при необходимости доводили pH до ~ 5,5 с помощью дополнительного объема трис. Очищенный белок фильтровали (0,2 мкм) и определяли концентрацию по поглощению на длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра BioTek Synergy™ HTM. Качество очищенных белков оценивали методами SDS-PAGE и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Dionex™). Концентрации эндотоксина измеряли с помощью турбидиметрического LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

[0267] Гибридные белки, содержащие GLP-1, с первым линкерным пептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, которая представляет собой полиглициновый линкер, экспрессируемый на низком уровне и имеющий низкие выходы для очистки. Таким образом, применение полиглицина для первых линкерных пептидов было неблагоприятным в данном эксперименте при конструировании гибридных белков, содержащих GLP-1.

[0268] Гибридные белки, содержащие GLP-1, со вторым линкерным пептидом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, укоротили и определили, что они не имеют ожидаемой молекулярной массы при анализе с помощью масс-спектрометрии. Таким образом, применение второго линкерного пептида SEQ ID NO: 100 было неблагоприятным в данном эксперименте при конструировании гибридных белков, содержащих GLP-1.

[0269] Кроме того, при получении конструкторов слитого пептида, содержащего GLP-1, карбоксиконцевой лизин пептида шарнирной Fc-области (т. е. человеческого IgG4) удаляли из конечного конструктора, чтобы избежать потенциальной протеолитической лабильности.

[0270] Пример 2. Получение связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных РУУ конъюгатов

[0271] Восстановление гибридных белков, содержащих GLP-1

[0272] Способ А

[0273] Очищенные гибридные белки, содержащие GLP-1, представляют собой смесь рекомбинантных белков с внедренными вторыми линкерными пептидами, содержащими по меньшей мере один цистеиновый остаток в каждом линкере, из которых каждый либо внутримолекулярно дисульфидно связан с другим цистеином, либо с занесенными цистеиновыми остатками в цитозоле или среде для выращивания. К такому гетерогенному раствору гибридного белка, содержащего GLP-1, (5-12 мг/мл в TrisOAc, pH 5,4-6,4) добавляли избыточное количество фосфин-восстанавливающего реагента 1,3,5-

триаза-7-фосфаадаматана (РТА, 15-40 экв.) с последующим добавлением 100 мМ ЭДТА (конечная концентрация 1-2 мМ). Полученную реакционную смесь осторожно перемешивали при комнатной температуре до завершения восстановления целевых цистеиновых остатков (4-16 ч). Высвобожденные цистеины и оставшиеся РТА удаляли с помощью обессоливающей хроматографии.

[0274] Способ В

[0275] К гетерогенному раствору гибридного белка, содержащего GLP-1, (5-15 мг/мл в TrisOAc, pH 5,0-6,5) добавляли избыточное количество фосфин-восстанавливающего реагента трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР, 4-25 экв.) с последующим добавлением 100 мМ ЭДТА (конечная концентрация 1 мМ). Полученную реакционную смесь осторожно перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и затем наносили на обессоливающую колонку, уравновешенную TrisOAc (pH 7,0). Полностью восстановленный гибридный белок, содержащий GLP-1, (разорванные шарнирные дисульфидные мостики) обрабатывали дегидроаскорбиновой кислотой (ДНАА, 10 экв.) в течение 2 часов, после чего восстановленный слитый пептид, содержащий GLP-1, окисляли с получением полного слитого пептида, содержащего GLP-1, с внедренными цистеинами на , полностью незамещенном втором линкерном пептиде.

[0276] Получение связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных РУУ конъюгатов

[0277] Раствор восстановленных слитых пептидов, содержащих GLP-1, в TrisOAc (3-10 мг/мл, pH 5,5) добавляли к раствору циклического пептида РУУ (2,6-3,0 экв. 10-15 мг/мл) в деионизированной воде. Для защиты реакционноспособных тиолов от катализируемого металлом окисления к реакционной смеси добавляли 100 мМ раствора ЭДТА до тех пор, пока концентрация ЭДТА не достигала 1 мМ. pH реакционного раствора повышали до pH 8,0-8,2 путем добавления по каплям трис-буфера (1 М, pH 9,1). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 3-7 часов, а затем в течение 18 часов при 5 °С. ЖХМС показала, что конъюгация была завершена и образование конъюгата циклического пептида РУУ с пептидом, содержащим GLP-1, составляло более 95%. Реакцию непосредственно подвергали очистке белка А для удаления избытка циклических пептидов РУУ или гасили путем добавления 5 эквивалентов цистеинов (для замещения оставшихся реакционноспособных циклических пептидов РУУ). Полученный неочищенный конъюгат очищали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (НВС) сразу же после чего осуществляли адсорбцию на белке А. Элюирование конъюгата (ацетата натрия, pH 3,5) и последующая нейтрализация трис-буфером до pH 7-7,5 позволила получить конечный продукт. В альтернативном варианте осуществления очищенный НВС конъюгат может быть заменен на требуемый буфер на колонке PD-10 без дополнительной заключительной очистки белка А, если это было сделано до очистки НВС.

[0278] Реакцию конъюгации также можно проводить при низкой температуре (5 °С) и контролировать с помощью ЖХМС (~48 ч).

[0279] В некоторых случаях реакционноспособные цистеины во вторых линкерных пептидах слитых пептидов, содержащих GLP-1, замещают бромацетамидами с образованием стабильных тиоэфирных связей. Эти модифицированные ацетамидом гибридные белки, содержащие GLP-1, получали следующим образом: К раствору гибридного белка, содержащего GLP-1, (5-12 мг/мл в TrisOAc, pH 5,4-6,4) добавляли избыточное количество фосфин-восстанавливающего реагента 1,3,5-триаза-7-фосфаадамантана (РТА, 15-20 экв.) с последующим добавлением 100 мМ ЭДТА (конечная концентрация 1-2 мМ). Полученную реакционную смесь осторожно перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. К раствору слитого пептида, содержащего GLP-1, добавляли 15-20 экв. бромацетамидов, а значение pH реакционной смеси доводили до pH 7,5-8,1 трис-буфером (1 М, pH 9,1). Через 2 часов реакционную смесь очищали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), сразу же после чего осуществляли заключительную очистку белка А.

[0280] В таблице 8 приведены выделенные выходы выбранных связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных РYУ конъюгатов. Было отмечено, что когда первый линкерный пептид представлял собой линкер AP, как в слитом пептиде 64 (GF64), содержащем GLP-1, а второй линкерный пептид представлял собой линкер G₄A, как в слитом пептиде 8 (GF8), содержащем GLP-1, выделенные выходы конъюгатов циклических пептидов РYУ, связанных с GLP-1, были небольшими.

[0281] Таблица 8. Выделенные выходы выбранных связанных с GLP-1 циклических пептидных РYУ конъюгатов

SEQ ID NO	Слитый пептид, содержащий GLP-1	Выделенный выход
241	GF64	8%
238	GF23	11%
234	GF70	9%
229	GF24	35%
225	GF1	30%
248	GF40	17%
252	GF8	7%
246	GF65	9%
254	GF42	10%
235	GF28	8%
251	GF19	5%

[0282] Пример 3. Определение характеристик связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклического пептидного РYУ конъюгата

[0283] Аналитическое определение характеристик связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных РYУ конъюгатов проводили с использованием (i) гидрофобной хроматографии (HIC), (ii) измерения интактной массы с

помощью ЖХ ИЭР/МС, (iii) эксклюзионной хроматографии размеров (SEC). Результаты аналитического определения характеристик связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных РУУ конъюгатов и способ конъюгации показаны в таблице 9.

[0284] Таблица 9. Аналитические данные для связанных с GLP-1 циклических пептидных РУУ конъюгатов.

SEQ ID NO:	Способ восстановлени я	MS (Да)		aHIC, чистота, %	aSEC, чистота, %
		Расчетн.	Измеренна я		
SEQ ID NO: 229	Способ А	74002	74000	100	100
SEQ ID NO: 225	Способ А	73292	73291	100	100
SEQ ID NO: 227	Способ А	73261	73261	100	100
SEQ ID NO: 228	Способ А	73233	73231	99,5	98,4
SEQ ID NO: 252	Способ А	73014	73012	99,3	100
SEQ ID NO: 235	Способ А	73964	73068	100	100
SEQ ID NO: 251	Способ А	73541	73547	100	100
SEQ ID NO: 228	Способ В	73233	73231	100	97,2
SEQ ID NO: 232	Способ А	73942	73962	100	100
SEQ ID NO: 244	Способ А	73926	73926	100	100
SEQ ID NO: 253	Способ А	74010	74010	100	100
SEQ ID NO: 249	Способ А	71978	71983	95	95

SEQ ID NO: 239	Способ А	74571	74573	100	100
SEQ ID NO: 238	Способ А	75203	75205	90	96
SEQ ID NO: 242	Способ А	75287	75290	95	100
SEQ ID NO: 236	Способ А	74117	74119	95	97
SEQ ID NO: 252	Способ А	73016	73013	97	100
SEQ ID NO: 234	Способ А	72978	72974	100	90
SEQ ID NO: 226	Способ А	73319	73327	100	100
SEQ ID NO: 248	Способ В	72180	72182	100	100
SEQ ID NO: 260	Способ В	72034	72038	100	100
SEQ ID NO: 247	Способ А	73926	73927	100	100
SEQ ID NO: 254	Способ А	73978	73978	100	96
SEQ ID NO: 258	Способ А	75656	75656	98	100
SEQ ID NO: 241	Способ А	77374	77376	100	100
SEQ ID NO: 246	Способ А	75590	75594	92	100
SEQ ID NO: 234	Способ А	72860	72866	100	100
SEQ ID NO: 230	Способ А	74044	74042	100	100
SEQ ID NO: 245	Способ А	74636	74625	96	100

SEQ ID NO: 244	Способ А	76212	76201	86	98
SEQ ID NO: 243	Способ А	74057	74049	Н/п	Н/п
SEQ ID NO: 259	Способ А	75600	75604	100	100
SEQ ID NO: 240	Способ А	75627	75630	100	100
SEQ ID NO: 261 (мономер)	Способ В	67976	67976	80	Н/п

[0285] Пример 4. Анализы *in vitro*

[0286] Конъюгаты подвергали скринингу на функциональную активность и активность в условиях *in vitro* в клеточных анализах, измеряющих внутриклеточный cAMP, с использованием конкурентного иммуноанализатора cAMP Lance (Perkin Elmer, г. Уолтем, штат Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями набора. В анализах применяли клональные клетки HEK293, стабильно экспрессирующие мышинные или человеческие рецепторы GLP-1R или NPY2 (Y2R). Клетки, экспрессирующие GLP1R, размораживали и суспендировали в HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, 0,5 mM IBMX. Клетки смешивали с набором анти-cAMP антител и добавляли к конъюгатам, последовательно разведенным HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA в 384-луночных белых оптических планшетах. После инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут добавляли иммуноаналитическую детекционную смесь. Планшет для анализа считывали как анализ TR-FRET на планшетном спектрофотометре Envision (возбуждение 320 нм, эмиссия 615 нм и 665 нм), и данные использовали для расчета значений EC₅₀ соединения с использованием статистического программного обеспечения Prism (GraphPad Software, г. Сан-Диего, США).

[0287] Для определения активности соединения в отношении рецептора Y2R, клетки HEK293, экспрессирующие Y2R, культивировали в среде DMEM-High Glucose (Cellgro), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 1% пирувата натрия, 1% пенициллина/стрептомицина и 600 мкг/мл G418, и высевали в течение ночи в 384-луночные планшеты в среде без G418. В день анализа клеточную среду для выращивания удаляли из клеток и добавляли 6 мкл конъюгата (2X) в 5 mM HEPES, 500 мкМ IBMX и 0,1% BSA в HBSS. К клеткам добавляли следующие 6 мкл буферного раствора для стимуляции, содержащего форсколин (2X, конечная концентрация 5 мкМ) и антитело к cAMP LANCE (1:100). После инкубации в течение 25 минут при комнатной температуре добавляли 12 мкл детекционной смеси и количественно определяли концентрации cAMP в иммуноанализаторе cAMP LANCE.

[0288] Анализ данных

[0289] Данные, полученные с помощью планшетного спектрофотометра Envision, выражали в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ), рассчитанных как (615 нм/665 нм) x 10 000. Все образцы анализировали трижды. Неизвестные концентрации сАМР в каждой лунке интерполировали по стандартным образцам известных концентраций сАМР, включенным в каждый планшет. Параметры, такие как EC_{50} , $\text{Log}(EC_{50})$, наклон кривой Хилла (nH), верх и низ определяли путем откладывания значений концентрации сАМР от логарифма концентрации соединений, осуществляя подгонку с помощью модели 4-Р с применением нелинейного приложения взвешенных наименьших квадратов.

[0290] Таблица 10. Данные в условиях *in vitro* для связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных РУУ конъюгатов.

Конъюгат		Человеческий GLP1R	Человеческий Y2R
Соединение 4 (SEQ ID NO:229)	Среднее значение EC_{50}	0,069	0,014
	SEM	0,007	0,001
	95% CL от среднего значения	(0,051, 0,087)	(0,010, 0,017)
Соединение 2 (SEQ ID NO: 225)	Среднее значение EC_{50}	0,078	0,009
	SEM	0,009	0,001
	95% CL от среднего значения	(0,054, 0,102)	(0,006, 0,012)
Дулаглутид	Среднее значение EC_{50}	0,035	--
	SEM	0,003	
	95% CL от среднего значения	(0,028, 0,042)	
GLP 7-36	Среднее значение EC_{50}	0,013	--
	SEM	0,001	
	95% CL от среднего значения	(0,012, 0,014)	

Эксендин 4	Среднее значение EC ₅₀	0,008	--
	SEM	0,001	
	95% CL от среднего значения	(0,007, 0,009)	
PYY3-36	Среднее значение EC ₅₀	--	0,021
	SEM		0,001
	95% CL от среднего значения		(0,017, 0,024)

[0291] Таблица 11. Активность GLP-1R и NPYR2 в условиях *in vitro* для слитых пептидов, содержащих GLP-1, и связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных PYY конъюгатов

SEQ ID NO	Человеческий GLP1R EC ₅₀ (нМ)	Человеческий Y2R EC ₅₀ (нМ)
113	0,062	н/д
120	0,066	н/д
123	0,167	н/д
131	0,050	н/д
131	0,106	н/д
134	0,076	н/д
134	0,142	н/д
135	0,079	н/д
135	0,138	н/д
136	0,068	н/д
136	0,126	н/д
139	0,054	н/д
140	0,144	н/д
140	0,202	н/д
146	0,130	н/д
152	0,207	н/д
153	0,049	н/д

166	0,035	н/д
166	0,053	н/д
175	0,042	н/д
176	0,052	н/д
176	0,069	н/д
177	0,051	н/д
177	0,054	н/д
179	0,171	н/д
179	0,301	н/д
225	0,078	0,009
226	0,064	0,014
227	0,061	0,005
228	0,051	0,004
229	0,069	0,014
230	0,043	0,023
232	0,058	0,065
233	0,103	0,010
234	0,140	0,009
235	0,193	0,010
236	0,229	0,009
238	0,523	0,019
239	0,042	0,006
240	0,036	0,007
241	0,121	0,006
242	0,285	0,011
262	0,985	0,012
246	0,078	0,003
247	0,350	0,040
248	0,264	0,018
249	0,148	0,143
250	0,213	0,010
251	0,062	0,015
252	0,080	0,009
253	0,567	0,077

254	0,39	0,022
258	0,036	0,007
259	0,059	0,004
Эксендин4	0,008	н/д
GLP-1 7-36	0,013	н/д
Дулаглутид	0,035	н/д
PYY3-36	н/д	0,021

[0292] Сравнение активности GLP-1R SEQ ID NO 135, 134, 146 и 176 с SEQ ID NO 238, 242, 262, 253 и 241 показало, что слитые пептиды, содержащие GLP-1, с эксендином 4 (1-39) (SEQ ID NO: 58) утрачивали активность GLP-1R после конъюгации с пептидами PYY. На основании этих результатов взаимодействие со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, с эксендином 4 (1-39) (SEQ ID NO: 58) было неблагоприятным в данном эксперименте.

[0293] Первичный скрининговый анализ NPY2R человека. Способ, применяемый для скрининга активности NPY2R связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклическими пептидными PYY конъюгатами в условиях *in vitro*, представлял собой клеточный анализ, разработанный для измерения ингибирования cAMP, индуцированного форсколином, производимого аденилатциклазой посредством модуляции связанного рецептора NPY2R Gi-белка человека. Продуцирование cAMP, индуцированное форсколином, в трансфицированных NPY2R CHO-K1 клетках (DiscoverX) человека снижали путем активации NPY2R с помощью аналогов PYY и контрольных образцов дозо-зависимым образом, и измеряли в основанном на FRET конкурентном иммуноанализаторе cAMP.

[0294] Клетки извлекали из криоконсервации и размораживали при 37 °C на водяной бане, добавляли к 40 мл 1 x DPBS, pH 7,2 (Gibco) и фильтровали через клеточный фильтр. Клетки центрифугировали при 450 x g в течение 5 минут, а супернатанты аспирировали. Клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM с высокой концентрацией глюкозы, 10% HIFBS, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% L-глутамин, 1% пирувата натрия с плотностью $0,125 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки наносили по 40 мкл/лунка на белый покрытый коллагеном планшет 384-луночный планшет до конечной концентрации 5000 клеток/лунка и инкубировали при 37 °C, 5% CO₂, в течение от 16 до 24 часов. Клетки в планшете для анализа дважды промывали путем добавления 80 мкл /лунка 1 x DPBS и декантировали супернатант. Разведенные образцы и контрольные образцы готовили в 1x HBSS, 5 mM HEPES, 0,002 mM форсколина, 0,1% BSA, 0,5 mM 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) и 20 мкл/лунка каждого образца добавляли в определенные лунки и инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем в каждый планшет для анализа добавляли по 20 мкл /лунка смеси реагента для обнаружения cAMP и инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течение от 2 до 24 часов. Планшеты считывали на планшетном спектрофотометре. Все

образцы анализировали в четырех параллельных анализах. Данные анализировали путем откладывания необработанных значений cAMP LANCE в зависимости от логарифма концентраций соединений, осуществляя подгонку с помощью модели 4-Р, с применением нелинейного приложения взвешенных наименьших квадратов в среде R.

[0295] Первичный скрининговый анализ GLP-1R человека: Способ, применяемый для скрининга активности GLP-1R связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, и гибридным белком, содержащим GLP-1, циклическими пептидными PYY конъюгатами в условиях *in vitro*, представлял собой клеточный анализ, разработанный для измерения продуцирования cAMP посредством модуляции связанного рецептора GLP-1R Gs-белка человека. После зависящей от концентрации активации GLP-1R слитыми пептидами, содержащими GLP-1, и связанными со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклическими пептидными PYY конъюгатами накопление cAMP в трансфицированных GLP-1R HEK клетках человека измеряли на FRET конкурентном анализаторе cAMP.

[0296] Трансфицированные GLP-1R HEK клетки человека размораживали в день анализа, ресуспендировали в 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA и 1 mM IBMX в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, и в каждую лунку 384-луночного планшета (5000 клеток/лунку) добавляли по 10 мкл. Образцы разводили в 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, добавляли по 10 мкл/лунка планшета для анализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Реагент для обнаружения cAMP добавляли в количестве 20 мкл/лунка. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем считывали на планшетном спектрофотометре. Все образцы анализировали в четырех параллельных анализах. Данные анализировали путем откладывания необработанных значений cAMP LANCE в зависимости от логарифма концентраций соединений, осуществляя подгонку с помощью модели 4-Р, с применением нелинейного приложения взвешенных наименьших квадратов в среде R.

[0297] Пример 5. Анализ ксилоты на слитых пептидах, содержащих GLP-1, и циклических PYY конъюгатах, связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1

[0298] Подготовка образцов Для получения образцов для пептидного картирования каждую молекулу белка (1 мг/мл): связанный со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклический пептидный PYY конъюгат (SEQ ID NO: 244), GF40 (SEQ ID NO: 152) и GF34 (SEQ ID NO: 146) разводили 1:4 в 8 M гуанидина/HCl, буферизованного при pH 8,0. К этим образцам добавляли аликвоту 1 M DTT (Sigma 43816-10ML, BioUltra) до достижения конечной концентрации 25 mM; затем образцы инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Алкилирование проводили с использованием либо йодацетамида (Sigma, A3221-10VL), либо N-метилmaleимида (NEM) (Sigma, E3876). Добавляли свежеприготовленный 1 M алкилирующего агента до достижения приблизительно 50 mM и инкубировали образцы в темноте в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем реакцию алкилирования гасили путем добавления 15 мкл 1 M DTT на каждые 400 мкл реакционной смеси (Sigma 43816-10ML, BioUltra). Образец обессоливали с использованием обессоливающих колонок Zeba Spin (Thermo, кат. № 89833) в соответствии с протоколом производителя в

50 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH=8,0. Образцы расщепляли трипсином (степень чистоты реактива Promega, V511A) в течение 4 часов при 37 °C после добавления 1 мкл 1 мкг/мкл трипсина, разведенного в 50 mM уксусной кислоты (поставляется с лиофилизированным трипсином). Расщепление трипсином гасили путем добавления 0,6 мкл 100% TFA к аликвоте 60 мкл расщепленного белка. Образцы ресуспендировали в микрофлаконах и помещали в автоматический пробоотборник с температурой 4 °C для анализа методом ЖХ/МС.

[0299] Жидкостная хроматография с масс-спектрометрией: 2 мкг (~10 мкл) расщепленного белка вводили в колонку Agilent AdvanceBio Peptide Map Micro Bore Rapid Resolution для разделения (1×150 мм, 2,7 мкм, номер по каталогу: 863600-911) с применением системы Agilent Infinity 1290 UHPLC (Agilent Technologies, номер по каталогу: G1330B, G4226A, G4220A, G4212A) при скорости потока 0,1 мл/мин. Температуру колонки поддерживали на уровне 65 °C. Растворители для ВЭЖХ масс-спектрометрии (0,1% муравьиной кислоты и В: 100% ACN в 0,1% муравьиной кислоте) были приобретены в компании VWR (номер по каталогу: LC 452-1, LC 441-1). Протеолитические пептиды элюировали из колонки с использованием 50-минутного градиента от 2-40% ACN в 0,1% FA. Эффлюент колонки вводили в масс-спектрометр Orbitrap Q-Exactive (ThermoFisher Scientific) с помощью нагретого зонда для ионизации электрораспылением (HESI) с использованием положительного напряжения распыления 3,5 кВ, защитного газа 20 (внесистемные единицы), вспомогательного газа 7 (внесистемные единицы), ионообменной трубки при 299 °C и испарителя при 100 °C. Зависимое от данных накопление выполняли путем последовательной диссоциации 5 лучших наиболее распространенных ионов пептидов, наблюдаемых при полном МС сканировании. Масс-спектрометрический анализ выполняли с помощью сканирования предшественника, установленного на обнаружение Orbitrap, разрешающая способность 70000, диапазон масс 150-2000 m/z, целевое значение автоматической регулировки усиления (AGC) 1,0e6, максимальное время ввода пробы 50 миллисекунд. 1 спектр микросканирования получали в профильном режиме. Критериями принятия решений по предшественникам были пептиды выбора моноизотопных предшественников, зарядовое состояние: 2-7, динамическое исключение: 6,0 секунд и порог интенсивности предшественника 5e4. Пептиды-предшественники выделяли с помощью квадруполя с окном для выделения 1,6 m/z и отправляли в столкновительную ячейку. Для высокоэнергетической коллизионной диссоциации (HCD) ионов пептидов использовали нормализованную энергию столкновения 28 (внесистемные единицы). Ионы продукта переносили на орбитальную ионную ловушку для масс-спектрометрического анализа, причем орбитальная ионная ловушка имела настройки: разрешающая способность 17500, диапазон 200-2000 m/z, целевое значение AGC 5e5, максимальное время ввода пробы 100 миллисекунд, 1 спектр микросканирования, полученный в центроидном режиме.

[0300] Анализ данных: Необработанные данные ЖХ-МС/МС были подвергнуты поиску в базе данных с использованием программного обеспечения Byonic (версия 2.15.7)

(Параметры белков). Для поиска данных использовали следующие параметры: допуск по массе ионов-предшественников, 8 ч/млн; допуск по массе ионного продукта, 20 ч/млн для спектра HCD; вариабельная модификация включает карбамидо-метилование цистеина, или N-метилмалеимид (NEM), образование аддукта цистеина DTT, конъюгаты цистеинового пептида YY (PYY), если они присутствуют, деамидирование аспарагина, серин ксилозу, и серин и треонин O-гликозилирование гликанов 78 O-связанных гликанов млекопитающих из *Byonic glycan library*. Для всех поисков был выбран поиск полностью триптической специфичности с максимум двумя пропущенными отщеплениями. Ожидаемую долю ложных отклонений (FDR) белков установили на уровне 1%. В базе данных белков содержалась аминокислотная последовательность каждого белка. Все результаты поиска *Byonic* обрабатывали с помощью программного обеспечения *Bylogic* (версия 2.15.296) (параметры белков), пептиды фильтровали с минимальной оценкой *Byonic* 15, оценкой прогона *Max alt*/оценкой *Primary rank* 0,99, с максимальной ошибкой предшественника *m/z* 8 ч/млн и окном площади XIC 2 минуты. Уровень ксилозилирования серина регистрировали путем учета всех площадей XIC пиков изоформ пептида, составляющих область линкера. Затем рассчитывали ксилозилирование в каждом сериновом остатке в виде суммы фракций общей площади пика XIC. Также проводили поиск в базе данных с использованием модуля поиска *Andromeda* в программном обеспечении *MaxQuant* версии 1.6.1 (*MaxPlanck Institute*) для получения вероятностей сайт-локализации PTM. Массы, соответствующие полностью циклизированным структурам PYY и расщепленному трипсином PYY, получали с помощью программного обеспечения *BIOVIA draw*. Данные показаны в таблице 12.

[0301] Таблица 12. Модификация ксилозой

Модификация ксилозой в линкерных серинах: сайт-идентификация и уровни						
Положение серина в молекуле**	Сайт-локализация посредством MS/MS			% ксилозилирования		
	NO: 244	NO: 146	NO: 152	NO: 244	NO: 146	NO: 152
41 (33)	ДА	ДА	ДА	9	5*	0,12
46 (38)	ДА	ДА	Н/О	7,4*	5*	НОК
51 (43)	ДА	ДА	Н/О	7,4*	5*	НОК

модификации

Н/о=не обнаружено с помощью MS/MS; Н/о=не определено количественно; NA=положение линкерного серина не применимо для молекулы; ** NO: SEQ ID NO: В скобках показана нумерация сайтов SEQ ID NO: 152.

[0302] В таблице 12 приведена сводная информация о сайт-специфическом ксилозилировании, идентифицированном и количественном определении с помощью интегрирования пиков в *Bylogic*, где %XIC на основании представляющего интерес пика/пиков (предполагаемые модификации, т. е. ксилозилирование серина)

нормализовали к сумме всех видов, участвующих в сайт-специфическом ксилозилировании, в соответствии со следующим уравнением:

$$\%XIC \text{ модификации} = (XIC \text{ модифицированного пептида} / \sum XIC \text{ аналогов пептидов}) \times 100$$

Все три исследуемые молекулы состоят из того же первого линкерного пептида AS(G₄S)₂, соединяющего пептид GLP-1 с пептидом шарнирной Fc-области. Однако из-за различий в слитом пептиде, содержащем GLP-1, обнаруживаемом в SEQ ID NO: 152 (GF40), и в слитом пептиде, содержащем GLP-1, обнаруживаемом в SEQ ID NO: 244 и 146 (GF34), положение трех сериновых остатков в SEQ ID NO: 152 отличается от SEQ ID NO: 244 и 146, как показано в таблице 12. Анализ пептидов показал три события сайт-специфического ксилозилирования сериновых остатков в Ser-41, Ser-46, Ser-51 в SEQ ID NO: 244 и 146 и событие ксилозилирования сериновых остатков в Ser-33 в SEQ ID NO: 152. Количественная оценка сайт-специфического ксилозилирования была осуществима лишь в ограниченной степени, поскольку большинство видов ксилозилированных пептидов совместно элюировались во время жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Например, в SEQ ID NO: 244 Ser-41 составлял ~ 9%, тогда как Ser-46 и Ser-51 составлял ~ 7%. Аналогичным образом, все три сайта SEQ ID NO: 146 были ксилозилированы на ~ 5%. Было обнаружено, что ксилозилирование SEQ ID NO: 152 происходит в меньшей степени ~ 0,1%.

[0303] Было показано, что области линкеров G₄S терапевтических белков подвержены ксилозилированию с уровнями ксилозилирования, варьирующимися в зависимости от длины линкера (Wen et al., “The propensity for xylosylation in (G₄S)_n linkers occurs when n > 2,” Anal. Chem. 85:4805-12 (2013); Sphar et al., Protein Sci. 22:1739-53 (2013), Sphar et al., mAbs 6:904-14 (2014)). Первый линкерный пептид, линкер AS(G₄S)₂, обнаруженный во всех трех молекулах, демонстрирует ксилозилирование во всех или некоторых сериновых остатках, и на основании этих данных применение серин-содержащих первых линкерных пептидов было неблагоприятным в данном эксперименте при получении конструкторов слитых пептидов, содержащих GLP-1.

[0304] Пример 6. Стабильность в плазме человека ex vivo слитого пептида, содержащего GLP-1

[0305] Свежую цельную кровь, полученную от 4 нормальных человеческих доноров с антикоагулянтом гепарином натрия, получили в день подготовки образцов для исследования стабильности. Свежую цельную кровь обрабатывали для получения плазмы путем центрифугирования при 3500 об/мин в течение 15 минут, а затем выделяли плазму. Плазму от всех четырех доноров объединяли, фильтровали через фильтр 0,2 мк и нагревали до 37 °C. В образцы добавляли слитые пептиды, содержащие GLP-1, и связанные со слитым пептидом, содержащим GLP-1, аналоги циклического PYY конъюгата с двойным агонистом (DA) в концентрации 20 нМ, при этом образец с нулевым моментом времени немедленно собирали и хранили при -80 °C до анализа. Образцы инкубировали при 37 °C, собирали в обозначенные моменты времени и хранили при -80

°C до анализа. В день анализа образцы с нулевым и последующими моментами времени размораживали и анализировали вместе с помощью функционального клеточного биологического анализа.

[0306] Способ, применяемый для обнаружения и количественного определения уровней биоактивного слитого пептида, содержащего GLP-1, и связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических PYY аналогов DA конъюгата в образцах человеческой плазмы, представлял собой клеточный биологический анализ, разработанный для измерения продуцирования cAMP посредством модуляции связанного рецептора GLP-1R G-белка человека. После зависящей от концентрации активации GLP-1R гибридными белками, содержащими GLP-1, и связанными со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклическими пептидными PYY конъюгатами накопление cAMP в трансфицированных GLP-1R HEK клетках человека измеряли на TFRET конкурентном анализаторе cAMP. Трансфицированные GLP-1R HEK клетки человека размораживали в день анализа, ресуспендировали в 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA и 1 mM IBMX в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, и в каждую лунку 384-луночного планшета (5000 клеток/лунку) добавляли по 10 мкл. Образцы для исследования стабильности размораживали и разводили до 20% плазмы в аналитическом буфере, состоящем из 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, 5 mM ЭДТА, ингибитора протеазы и последующих разведений проводили в аналитическом буфере с 20% нормальной человеческой плазмы. Получали эталонные стандарты известных концентраций каждого соединения в аналитическом буфере с 20% нормальной человеческой плазмы. Стандарты и образцы добавляли по 10 мкл/лунка в каждый планшет для анализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Реагент для обнаружения cAMP добавляли в количестве 20 мкл/лунка. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем считывали на планшетном спектрофотометре.

[0307] Все образцы анализировали в четырех параллельных анализах. Эталонные калибровочные кривые соединений получали с помощью логарифмического преобразования концентрации, нелинейной аппроксимации, с помощью логарифма V-ответа (переменный наклон), а также определили значения EC₁₀ и EC₉₀ для верхнего и нижнего пределов количественного анализа. Концентрации образцов для исследования стабильности для каждого соединения экстраполировали из соответствующей эталонной калибровочной кривой. Процентную оставшуюся биологическую активность каждого образца для исследования стабильности определяли по отношению к соответствующему образцу с нулевым моментом временем и регистрировали в виде % от исходной концентрации в плазме на графике по времени за 168 часов. % исходной концентрации в плазме = [средн. стабильность образца для исследования] / [средн. нулевой момент времени] x 100.

[0308] Результаты. Слитые пептиды, содержащие GLP-1, с SEQ ID NO: 144 (GF32), 148 (GF36), 145 (GF33), 151 (GF39), 146 (GF34), 147 (GF35), 149 (GF37), 152 (GF40) и дулаглутидный контрольный образец инкубировали в человеческой плазме ex vivo при 37

°C в течение 7 дней и измеряли функциональную стабильность в функциональном анализе GLP-1R cAMP в условиях *in vitro* (Фиг. 1A). Гибридные белки, содержащие GLP-1, с пептидом GLP-1 SEQ ID NO:58 (эксендин 4 (1-39)) показали наибольшую стабильность, за которыми следовала SEQ ID NO:57 ((A8G, G22E, R36G) GLP-1 (7-37)) и дулаглутидный контрольный образец, причем SEQ ID NO:56 ((A8S, A30E) GLP-1 (7-36)) была наименее стабильной. На основании этих результатов взаимодействие с гибридными белками Fc с пептидом GLP-1 SEQ ID NO: 56 было неблагоприятным в данном эксперименте.

[0309] Слитые пептиды, содержащие GLP-1, SEQ ID NO: 152 (GF40) и 146 (GF34), а также их соответствующие связанные со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклические пептидные PYY конъюгаты SEQ ID NO: 248 и 262, и другой слитый пептид, содержащий GLP-1, SEQ ID NO: 153 (GF41) инкубировали в человеческой плазме *ex vivo* при 37 °C в течение 7 дней вместе с дулаглутидным контрольным образцом. Функциональную стабильность измеряли в функциональном анализе GLP-1R cAMP в условиях *in vitro* (Фиг. 1B). Стабильность связанных со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклических пептидных PYY конъюгатов была сопоставима с соответствующими неконъюгированными гибридными белками, что свидетельствует о том, что конъюгация пептида PYY не влияла на стабильность пептида GLP-1. Слитый пептид, содержащий GLP-1, SEQ ID NO:146 (GF34) и связанный со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклический пептидный PYY конъюгат SEQ ID NO: 262 имели наибольшую стабильность, а SEQ ID NO: 152 (GF40), 248 и 153 (GF41) имели стабильность, сходную со стабильностью дулаглутидного контрольного образца.

[0310] Пример 7. Анализ стабильности на мышах в условиях *in vivo*

[0311] Способы

[0312] Метод ЖХМС Образцы плазмы обрабатывали методом иммуноаффинного захвата с использованием антитела к человеческому Fc с последующим расщеплением трипсином и анализировали обращенно-фазовым методом ЖХ-МС/МС на трехквadrupольном масс-спектрометре. Пептид на N-конце GLP-1, а именно HGE (HGE GTFTSDVSSYLEEQA AK (SEQ ID NO: 263) для GLPD30 и HGE GTFTSDLSK (SEQ ID NO: 264) для GLPD31) отслеживали как заменитель молекул, содержащих активный GLP1. Пептид, расположенный на Fc, а именно VVS (VVS VLT V L H Q D W L N G K (SEQ ID NO: 265)), отслеживали как заменитель общего уровня Fc. Пептид, расположенный на циклическом пептиде YYA (YYASLR (SEQ ID NO: 266)), отслеживали как заменитель уровня PYY. Калибровочная стандартная кривая и образцы для контроля качества получали путем добавления эталонного стандарта в плазму и обработки с применением той же процедуры и в то же время, что и опытные образцы.

[0313] Результаты

[0314] Уровни плазменного воздействия интактного N-конца фрагмента слитого пептида, содержащего GLP-1, через 72 часов после введения мышам измеряли с помощью анализа ЖХМС и фиксировали в виде процентной доли концентрации уровня последовательности фрагмента слитого пептида, содержащего GLP-1, с N-концом HGE

относительно уровня Fc (HGE% Fc). Результаты, представленные в таблице 13, показывают, что первый линкерный пептид SEQ ID NO:62 и 66, содержащий повтор AP, был менее стабильным, чем первый линкерный пептид SEQ ID NO: 60, содержащий повтор G₄A. На основании этих результатов взаимодействие со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, с первыми линкерными пептидами, содержащими повторы AP, было неблагоприятным в данном эксперименте.

[0315] Таблица 13. Стабильность у мышей слитых пептидов, содержащих GLP-1, и слитых пептидов, содержащих GLP-1, связанных с циклическими пептидами PYY в условиях *in vivo*

SEQ ID NO	SEQ ID NO GLP-1 или варианта пептида GLP-1	SEQ ID NO первого линкерного пептида	SEQ ID NO шарнирной Fc-области	HGE% Fc у мышей в течение 72 часов в условиях <i>in vivo</i>
135	58	60	84	36
134	58	60	84	36
176	58	62	89	14
241	58	62	89	17
140	59	60	84	60,56
177	59	62	89	9
246	59	62	89	7
233	57	60	89	6
131	57	60	84	12,12,14
136	57	60	84	12,12
120	57	60	84	9
113	57	60	84	10,9
259	57	62	89	3
258	57	62	89	3
175	57	62	89	3
240	57	62	89	Н КП
166	57	66	86	4
239	57	66	86	Н КП

Н КП=ниже количественных пределов

[0316] Исследования острой и субхронической фармакодинамики у мышей DIO

[0317] Всех грызунов, использованных в этих исследованиях, содержали в соответствии с протоколами, утвержденными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) по Janssen R&D, г. Спринг-Хаус, штат

Пенсильвания, США. Животных содержали с 12-часовым циклом (день/ночь) в стандартных условиях температуры и влажности, с неограниченным доступом к корму и воде (если не указано иное). Использовали двадцатинедельных самцов DIO (на диете с высоким содержанием жиров 60% ккал в течение 15 недель) мышей C57BL/6T (Taconic Laboratory), которых содержали по отдельности. Животных рандомизировали в группы на основании массы тела. Для внутрибрюшинных (IP) тестов на толерантность к глюкозе (ИПТТГ) мышам вводили базовый раствор, дулаглутид (Eli Lilly; приобретенные у компании Myoderm, г. Норристоун, штат Пенсильвания, США) или соединения 1-4 (SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 229 соответственно) (n=8/группа). Через двадцать четыре часа (после голодания в течение ночи) мышам вводили IP декстрозу (1 г/кг). Уровень глюкозы в крови измеряли в указанные моменты времени с помощью глюкометра One Touch Ultra glucometer (LifeScan), а уровень инсулина в плазме (Meso Scale Discovery) измеряли через 0 и 10 минут. Для исследований острого потребления пищи (ПП) и снижения веса (WL) отдельно содержащимся мышам DIO вводили базовый раствор, дулаглутид или соединения и измеряли массу тела в течение 3 дней (n=8/группа). Данные показаны на Фиг. 2А-2В, 3А-3В, и 4А-4В. Данные, показанные на Фиг. 2А-2В, 3А-3В, и 4А-4В демонстрируют, что слитые пептиды, содержащие GLP-1, обладают желаемой эффективностью GLP-1R и обладают повышенной эффективностью при конъюгировании с циклическим пептидом PYY SEQ ID NO: 27. На основании данных, показанных на Фиг. 5А-5В и 6А-6В, было определено, что верхний шарнир слитого пептида, содержащего GLP-1, участвует в активности GLP-1R.

[0318] Пример 8. Исследования на яванских макаках в условиях *in vivo*

[0319] Способы

[0320] Исследование эффективности

[0321] Обезьян отбирали и рандомизировали в группы для лечения соединением на основании их исходного показателя (среднее значение за 3 дня до 0 дня) потребления пищи (при первичном взвешивании 80%) и массы тела (при повторном взвешивании 20%), измеренных во время подготовки и введения базового раствора. Исследование длилось 9 недель, 2 недель акклиматизации/тренировки, 3 недели введения базового раствора каждые 3 дня (Q3D) и измерения исходного показателя потребления пищи, 12 дней введения (5 доз, Q3D) и 2 недели вымывания. Животным вводили 7 раз базовый раствор и 5 раз один из испытуемых образцов (в объеме дозирования 0,5 мл/кг) один раз в 3 дня приблизительно в 8 часов утра. Дозы каждой группы были следующими: дулаглутид (0,0125 мг/кг, n=11), соединение 4 (высокая доза; 0,0148 мг/кг, n=11), соединение 4 (низкая доза; 0,0074 мг/кг, n=6). Прием калорий контролировали ежедневно, а массу тела измеряли Q3D.

[0322] Анализ зависимости ответа на воздействие

[0323] Два аналитических способа использовали для измерения концентраций соединения 4 и дулаглутида из образцов плазмы яванской макаки в условиях *in vivo*.

[0324] Анализ воздействия соединения 4 на связывание с лигандом (LBA) и

дулаглутида у яванской макаки проводили подходящим методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ECLIA) с использованием прибора Meso Scale Discovery (MSD) Sector Imager S600 (Meso Scale Diagnostics, г. Роквилл, штат Мэриленд, США). Формат измерения активного GLP-1 как для соединения 4, так и для дулаглутида описан следующим образом: аналит захватывали с помощью mAb, специфического к N-концу (7-17) GLP-1 (биотини-анти-GLP1 (7-37, 7-36, амид, свободный NT)), и обнаруживали с помощью специфического к человеческому mAb Fc (SulfoTag-R10). Регрессию исходных данных выполняли в программном обеспечении Watson LIMS™ (Thermo Fischer Scientific, г. Уолтем, штат Массачусетс, США) с использованием логистической подгонки по 5 параметрам с использованием взвешивания стандартной кривой 1/F2.

[0325] Анализ методом ЖХ-МС/МС соединения 4 и дулаглутида у яванской макаки также проводили методом анализа трипсина снизу вверх для количественного определения отдельных частей молекул. Для анализа трипсина аналит очищали из образцов плазмы путем иммуноаффинного захвата с использованием антитела к человеческому Fc с последующим расщеплением трипсина и анализом обращенно-фазовым методом ЖХ-МС/МС на SCIEX Triple Quad™ 5500 LC-MS/MS System (CIEX, Конкорд, Онтарио, Канада). Меченный стабильным изотопом [¹³C6, ¹⁵N4-аргинин] и [¹³C6, ¹⁵N2- лизин] человеческий IgG4 (Sigma, номер по каталогу MSQC7) использовали в качестве внутреннего стандарта и добавляли в начале этапа иммуноаффинного захвата. Пептид на N-конце GLP-1, а именно HGE (HGE⁺TF⁺TS⁺DS⁺VSSYLEEQA⁺AK) (SEQ ID NO: 263) отслеживали как заменитель молекул, содержащих активный GLP-1, поскольку пептид HGE необходим для его активности.

[0326] Результаты

[0327] Двойные агонисты в соответствии с вариантами осуществления заявки содержат слитый пептид, содержащий GLP-1 (GF), ковалентно связанный с циклическим пептидом PYY. Двойные агонисты состоят из рекомбинантного пептида глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1) или варианта пептида GLP-1, слитого с шарнирной Fc-областью посредством первого линкерного пептида (N-концевого линкерного пептида), и циклического пептида PYY, химически конъюгированного с цистеином-мишенью, содержащимся внутри второго линкерного пептида (C-концевого линкерного пептида) рекомбинантного слитого пептида GLP-1 (GF). Каждый компонент двойного агониста был выбран эмпирически на основании нескольких ключевых параметров, которые включали в себя, без ограничений, активность каждого рецептора, стабильность, посттрансляционные модификации, выход продукции конъюгации и биофизические свойства.

[0328] Вариант пептида GLP-1 с SEQ ID NO: 57 был выбран в качестве варианта пептида GLP-1. Вариант пептида-1 GLP-1 SEQ ID NO: 56 был менее активным в условиях *in vivo* и менее стабильным в исследованиях стабильности человеческой плазмы в условиях *ex vivo* (Фиг. 1A), таким образом, был неблагоприятным в данном эксперименте.

Вариант пептида GLP-1 SEQ ID NO: 58 неожиданно потерял активность GLP-1R при конъюгировании с циклическими пептидами PYY (таблица 11), см., например, активности GLP-1R SEQ ID NO: 135, 134, 146 и 176 с SEQ ID NO: 238, 242, 262, 253 и 241 показали, что слитые пептиды, содержащие GLP-1, с эксендином 4 (1-39) (SEQ ID NO: 58) теряли или существенно снижали активность GLP-1R после конъюгации с некоторыми пептидами PYY. На основании этих результатов взаимодействие со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, с эксендином 4 (1-39) (SEQ ID NO: 58) было неблагоприятным в данном эксперименте. Вариант пептида GLP-1 с SEQ ID NO: 58 дополнительно содержит мотив подверженности NG деамидированию. SEQ ID NO: 59 образовывала мотив подверженности NG деамидированию на границе раздела пептид GLP-1/первый линкерный пептид, когда глицин был первой аминокислотой в первом линкерном пептиде. Кроме того, GF28 (SEQ ID NO: 140), содержащий пептид GLP-1 SEQ ID NO: 59, имел меньшую активность, чем дулаглутид как при изменении потребления пищи (ПП), так и при % изменения массы тела (МТ) (Фиг. 10А и Фиг. 10В соответственно).

[0329] В качестве первого линкерного пептида (N-концевого линкерного пептида) выбрали SEQ ID NO: 60. Гибридные белки, содержащие GLP-1, содержащие первый пептидный линкер, SEQ ID NO: 61, имели низкую экспрессию и выход очистки и были неблагоприятными в данном эксперименте по получению требуемого количества конъюгата циклического пептида PYY, связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1. Первые линкерные пептиды, содержащие повторы AP, имели низкий выход, если второй концевой пептид представлял собой повтор G₄A (см., например, пример 2 и таблицу 8), и были менее стабильными в условиях *in vivo* по сравнению с SEQ ID NO: 60 (см., например, таблицу 13). На основании данных результатов взаимодействие с линкерами на основе повтора AP было неблагоприятным в данном эксперименте. Более короткие линкеры приводили к снижению активности (см., например, SEQ ID NO: 152 на Фиг. 5, SEQ ID NO: 140 на Фиг. 10А-10В и Фиг. 12, где сравнивают активности слитых пептидов, содержащих GLP-1, содержащих один и тот же пептид GLP-1 (SEQ ID NO: 58) с разными длинами первых линкерных пептидов). Таким образом, взаимодействие с более короткими линкерами на основании данных результатов было неблагоприятным. Применение серин содержащих линкеров в данном эксперименте было неблагоприятным, основываясь на склонности остатков серина к ксилозилированию (см., например, таблицу 12).

[0330] Слитый пептид, содержащий GLP-1, GF19 (SEQ ID NO: 131), который содержал вариант пептида GLP-1, SEQ ID NO: 57, первый линкерный пептид, SEQ ID NO: 60 и пептид шарнирной Fc-области, SEQ ID NO: 84, продемонстрировал эффективность, сопоставимую с дулаглутидом как в отношении изменения потребления пищи (ПП), так и в % изменения массы тела (МТ) (см. Фиг. 6А и Фиг. 6В соответственно).

[0331] Все слитые пептиды, содержащие GLP-1, GF1 (SEQ ID NO: 113, соединение 1), GF19 (SEQ ID NO: 131) и GF24 (SEQ ID NO: 136, соединение 3) продемонстрировали сопоставимую эффективность с дулаглутидом в отношении потребления пищи и %

изменения массы тела (см., например, Фиг. 2А-2 В, Фиг. 6А-6В и Фиг. 3А-3В соответственно). GF1 (SEQ ID NO: 113, соединение 1) и GF24 (SEQ ID NO: 136, соединение 3) также продемонстрировали эффективность, сравнимую с дулаглутидом в отношении толерантности к глюкозе (Фиг. 4А-4В и Фиг. 7А-7В).

[0332] Однако при получении конъюгата циклического пептида PYY, связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, SEQ ID NO: 251, путем конъюгации циклического пептида PYY (SEQ ID NO: 27) со вторым линкерным пептидом SEQ ID NO: 92, GF19 (SEQ ID NO: 131), не наблюдалось дополнительных фармакологических изменений потребления пищи или % изменения массы тела по сравнению с дулаглутидом (Фиг. 11А и Фиг. 11В соответственно). Были протестированы дополнительные вторые линкерные пептиды, но они были неблагоприятными в данном эксперименте по меньшей мере по следующим причинам: (а) Последовательность SEQ ID NO: 95 имела низкие выходы продукции, когда первый линкерный пептид представлял собой повтор AP, (b) последовательность SEQ ID NO: 100 была усечена во время рекомбинантной экспрессии, (с) пептиды шарнирной Fc-области без второго линкерного пептида, которые содержат цистеин-мишень для конъюгации пептида PYY на С-конце пептида шарнирной Fc-области, были усечены во время экспрессии белка, что указывает на то, что для получения интактного белка, поддающегося конъюгации с пептидом PYY необходим второй линкерный пептид, (d) содержащие серин вторые линкерные пептиды имели потенциал для ксилозилирования и (е) более короткие вторые линкерные пептиды менее эффективно конъюгировали с более низкой чистотой.

[0333] В то время как связанный со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклический пептидный PYY конъюгат, SEQ ID NO: 225 (соединение 2) со вторым линкерным пептидом, SEQ ID NO: 94, демонстрировал значительно большую активность, чем дулаглутид как для ПП так и для % изменения МТ (см., например, Фиг. 2А и 2В соответственно), он неожиданно продемонстрировал значительную потерю белка при хранении в течение 2 недель при 4 °С в высококонцентрированном жидком составе. Сопоставимый связанный со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклический пептидный PYY конъюгат, SEQ ID NO: 229, со вторым линкерным пептидом SEQ ID NO: 93, был стабильным и сохранял уровни белка в жидком составе высокой концентрации в течение двух недель хранения при 4 °С и 40 °С (таблица 14). Вторым линкерным пептидом был единственным отличием между этими двумя молекулами, и, таким образом, в данном эксперименте в качестве второго линкерного пептида выбирали SEQ ID NO: 93.

[0334] Таблица 14. Стабильность белка в жидком составе высокой концентрации при хранении в течение двух недель при 4 °С и 40 °С

SEQ ID NO:	Время конечной концентрации=0 при 4 °С	Время конечной концентрации=2 недели при 4 °С	Время конечной концентрации=2 недели при 40 °С
225	52,6 мг/мл	14,0 мг/мл	52,8 мг/мл

229	51,4 мг/мл	48,5 мг/мл	52,9 мг/мл
-----	------------	------------	------------

[0335] Для обеспечения стабильности в условиях *in vivo*, необходимой для агента с увеличенным периодом полужизни, и для обеспечения связи со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, с сохранением при этом активности требуется несколько модификаций для функциональной активности циклического пептида PYY. Использовали химический состав синтетических пептидов для получения циклических пептидов PYY, которые включают эти модификации, и циклических пептидов PYY, где они химически конъюгированы со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, с получением связанных со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, циклическими пептидными PYY конъюгатами.

[0336] Циклические пептиды PYY выбирали для конъюгации со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, для изучения и сравнения модификаций для активности и стабильности пептида PYY. Пептид PYY циклизовали для стабилизации множества сайтов протеолиза вдоль пептидной структуры.

[0337] Циклические пептиды PYY выбирали для конъюгации со слитыми пептидами, содержащими GLP-1, для изучения расстояния и размера связи N-С-конец циклических пептидов PYY и влияния на активность и стабильность. Эти циклические пептиды PYY содержали вариации числа атомов углерода в цикле и изменяли положения цистеина и гомецистеинов, используемых для избирательного соединения N-конца с С-концом. Смотрите, например:

- a) β A2, связанный с hCys31 SEQ ID NO: 25
- b) β A2, связанный с Cys30 SEQ ID NO: 28 и 29
- c) G2, связанный с Cys30 SEQ ID NO: 27 и 30
- d) γ Aba2, связанный с hCys31 SEQ ID NO: 34

N-Me аргинин, замещенный в положении 35 (N-MeR35) (SEQ ID NO: 27, 28, 33 и 34) и восстановленную амидную связь между положениями 35 и 36 (ψ 35,36) (SEQ ID NO: 24, 25, 29 и 30) сравнивали по способности стабилизировать амидированный С-концевой тирозин в положении 36 в циклическом пептиде PYY и сохранять активность (см., например, публикацию патента США № 2018/0117170, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки). В определенных случаях модификация N-Me35 приводила к снижению активности по сравнению с модификацией ψ 35,36 (см., например, публикацию патента США № 2018/0117170), в таблице 3, где показано, что SEQ ID NO: 102 с модификацией ψ 35, 36 была приблизительно в 12 раз более активной в отношении человеческого рецептора Y2, чем SEQ ID NO: 122 с модификацией N-Me35).

[0338] Непредсказуемо, активность модификации N-MeR35 в связанном со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклическим пептидным PYY конъюгате, SEQ ID 229, которая содержит циклический пептид PYY, SEQ ID 27, была равна или больше по сравнению с модификацией ψ 35,36 в SEQ ID NO: 232, которая содержит циклический пептид PYY, SEQ ID NO: 30 (таблица 11).

[0339] Циклический пептид PYY, SEQ ID NO: 27, был выбран в качестве пептида

PYY в этом эксперименте на основании активности и стабильности, вместе с определением того, что комбинация компонентов приводила к снижению стоимости товаров и облегчения поставки реагентов. Природная аминокислота глицин на N-конце, связанная с цистеином в положении 30 вблизи C-конца, имела активность и стабильность, которые были сопоставимы с самыми высокими уровнями активности и стабильности, достигаемыми для любого циклического пептида PYY, протестированного при конъюгации циклического пептида PYY со слитым пептидом, содержащим GLP-1. Цистеин в положении 30 был выбран над гомоцистеином в положении 31, поскольку циклический пептид PYY SEQ ID NO: 27 имел достаточную активность и стабильность. Поэтому в данном эксперименте не требуются более дорогие и менее легкодоступные искусственные аминокислоты. N-MeR35, применяемый для стабилизации C-концевого амидированного тирозина в положении 36, является менее дорогостоящим и легкодоступным реагентом, чем дорогостоящая модификация psi35,36. Это устраняет необходимость в специализированном компоненте и обеспечивает такую же стабильность и активность.

[0340] Кроме того, было определено, что PEG спейсер не требуется для активности, и, также неожиданно, PEG спейсер не требуется для стабильности PYY в условиях *in vivo*. Это было неожиданно, поскольку было установлено, что конъюгаты mAb с циклическим пептидом PYY с PEG спейсером имели повышенную стабильность в условиях *in vivo* (см., например, публикацию патента США № 2018/0117170, таблица 4, в которой показана процентная доля оставшегося интактного соединения по отношению к количеству общих уровней человеческих mAb в образцах крови мышей, собранных через 48 часов после введения. Соединение 1, содержащее 12xPEG спейсер, оставалось на уровне 90,8% через 48 часов; соединение 2, содержащее спейсер 6xPEG, оставалось на уровне 65,6% через 48 часов; и соединение 3 без PEG спейсера, оставалось на уровне только 51% через 48 часов). Этот результат устранял необходимость в PEG-компоненте, который привел бы к повышению стоимости производства товаров.

[0341] SEQ ID NO: 229, которая содержала слитый пептид, содержащий GLP-1, SEQ ID NO: 136 с добавлением двух стабильных циклических пептидов PYY, SEQ ID NO: 27, были выбраны в качестве связанного со слитым пептидом, содержащим GLP-1, циклического пептидного PYY конъюгата в данном эксперименте. SEQ ID NO: 229 проявляла дополнительную фармакодинамическую эффективность в связи с взаимодействием Y2R по сравнению с SEQ ID NO: 136 (только при взаимодействии GLP1R) как для ПП так и для МТ (Фиг. 3А-3В), проявляя активность GLP1R, сравнимую с дулаглутидом и SEQ ID NO: 136, на толерантность к глюкозе (Фиг. 4А-4В и 7А-7В).

[0342] Влияние дулаглутида и SEQ ID NO: 229 (соединение 4) на ПП и МТ сравнивали у мышей DIO. На основании интегрированного нелинейного регрессионного анализа зависимости ответа от воздействия доступных исследований (6 исследований для соединения 4 и 7 исследований для дулаглутида; дозы 0,03-1,0 нмоль/кг) в дозе, приводящей к клинически значимым активным воздействиям GLP-1 (HGE) в день 3

(однократная подкожная доза 0,3 нмоль/кг), соединение 4 продемонстрировало дополнительные фармакологические изменения по сравнению с дулаглутидом посредством взаимодействия Y2R с циклическими пептидами PYY конъюгата, в снижении ПП и МТ (Фиг. 8А-8В) при совпадающих активных уровнях воздействия GLP1 (HGE). При совпадающих концентрациях HGE дулаглутид при 0,3 нмоль/кг (однократная подкожная доза) на основании нелинейной регрессии зависимости ответа от воздействия соединения 4 (SEQ ID NO: 229) рассчитанные ПП и % изменения МТ были приблизительно в 2,1 и 1,5 раз больше, чем у дулаглутиды соответственно.

[0343] У яванских макаков с избыточным весом отдельные ФК и потребление калорий на основе анализа ответа на воздействие (Фиг. 9А-9В), предложенный при клинически значимых уровнях воздействия дулаглутиды (1-2 нМ, ограничивающих C_{trough} и C_{max} в равновесном состоянии после подкожного введения один раз в неделю дозы 1,5 мг пациентам с T2DM (сахарным диабетом второго типа) [Geiser et al., Clin Pharmacokinet 55(5): (2016)]), соединение 4 давало от ~1,7 до 2 раз (95% доверительный интервал: 1,3-3,3, ФК на основании анализа связывания с лигандом [LBA], Фиг. 9А), или от ~1,5 до 1,6 раз (доверительный интервал 95%: 1,0-2,8, ФК на основании ЖХ-МС/МС НЕ, Фиг. 9В) большее процентное снижение потребления калорий по сравнению с дулаглутидом при одинаковых активных уровнях воздействия GLP-1, что демонстрирует дополнительные фармакологические изменения от циклических пептидов PYY соединения 4.

[0344] Специалистам в данной области следует понимать, что в варианты осуществления, описанные выше, можно вносить изменения без отступления от общей концепции, обладающей признаками изобретения, представленной в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения, определяемых настоящим описанием.

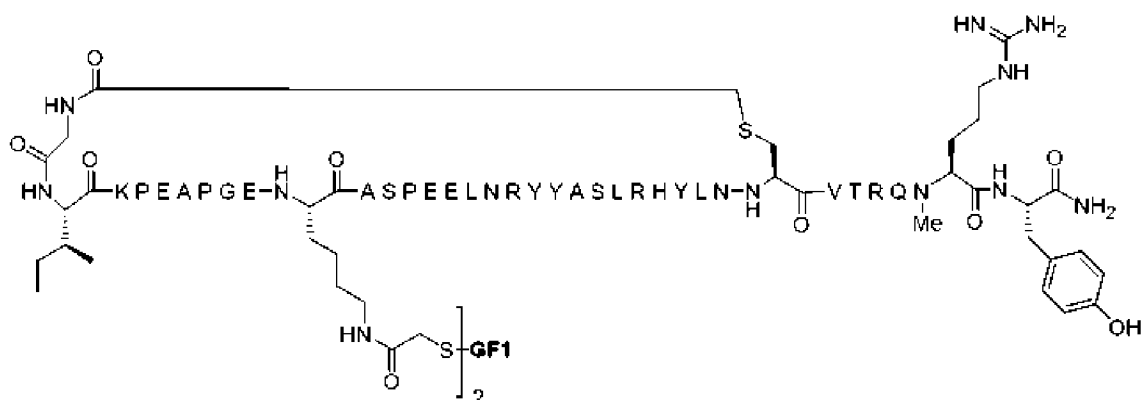
[0345] Все процитированные здесь документы включены путем ссылки.

[0346] Примеры их конъюгатов слитого пептида, содержащего GLP-1, с циклическим пептидом PYY настоящего изобретения включают:

SEQ ID NO: 225

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(As)11, N-Me-R35] гомодимерный конъюгат с PYY2-36

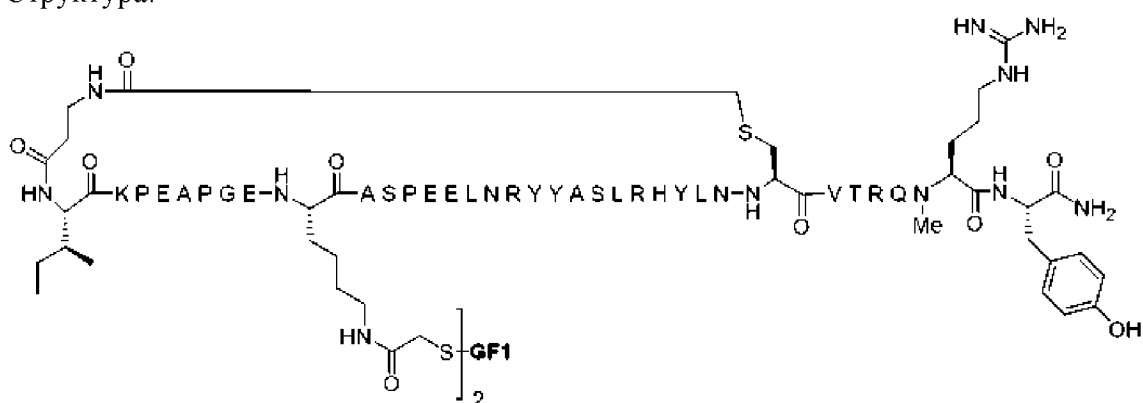
Структура:



SEQ ID NO: 226

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(β A2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

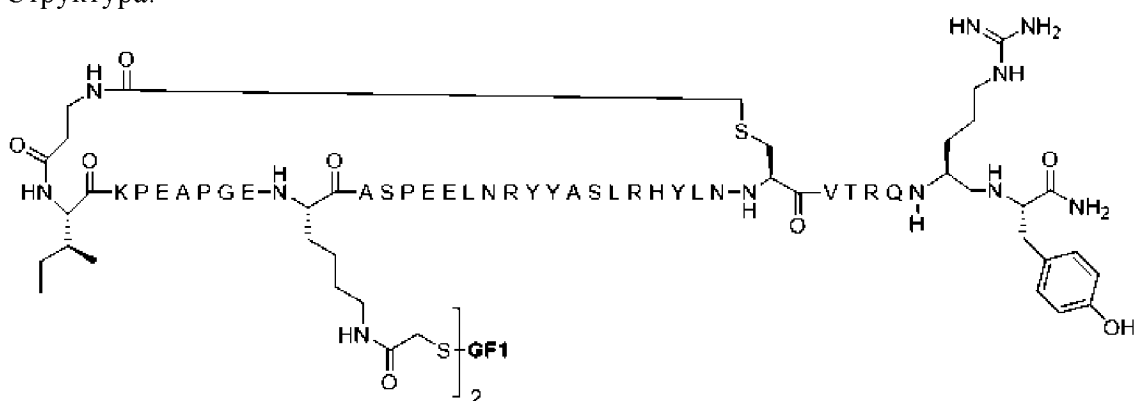
Структура:



SEQ ID NO: 227

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(β A2-COCH₂-C30), K(Ac)11, psi-(R35,Y36)] гомодимерный конюгат с PYY2-36

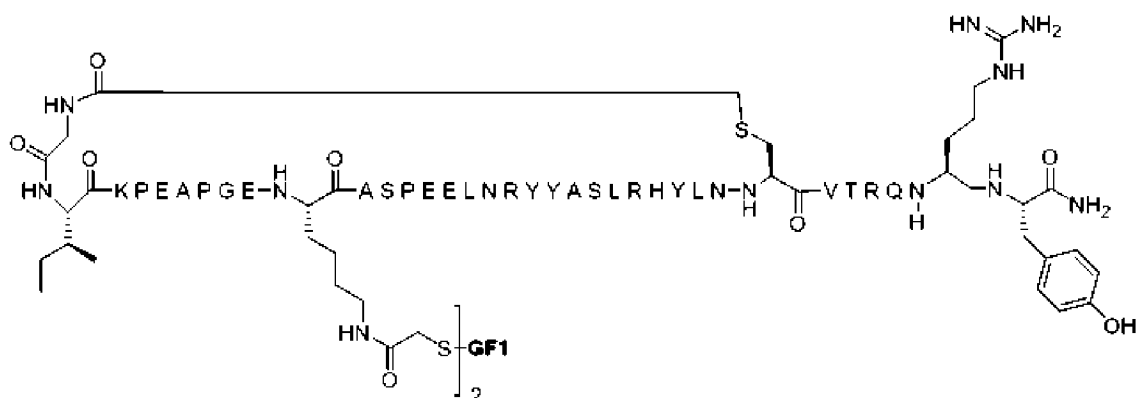
Структура:



SEQ ID NO: 228

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, psi-(R35,Y36)] гомодимерный конюгат с PYY2-36

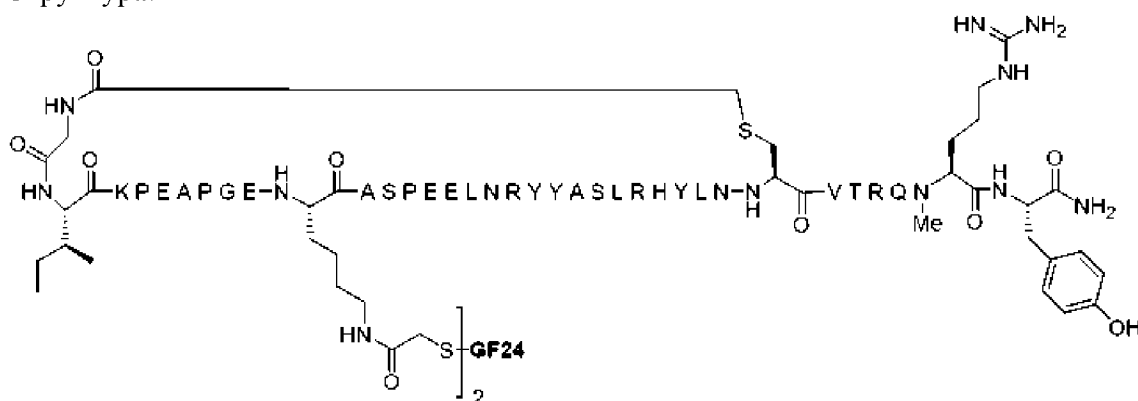
Структура:



SEQ ID NO: 229

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

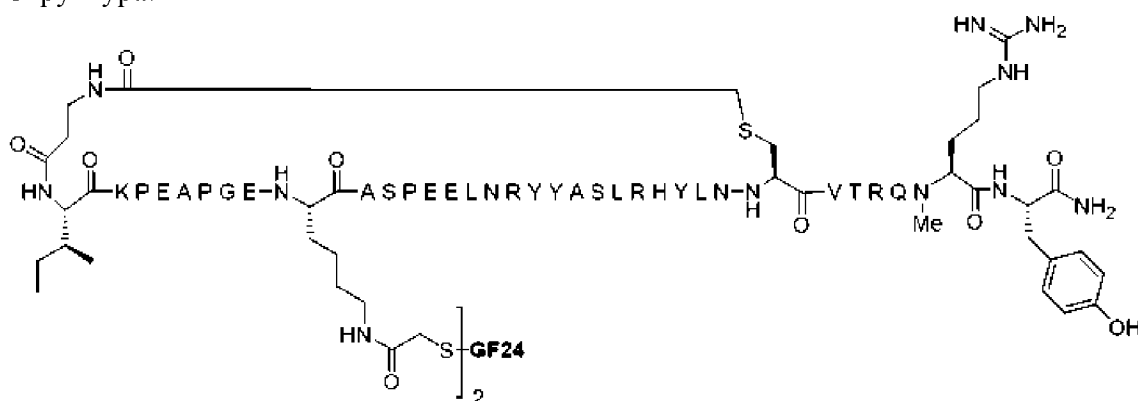
Структура:



SEQ ID NO: 230

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

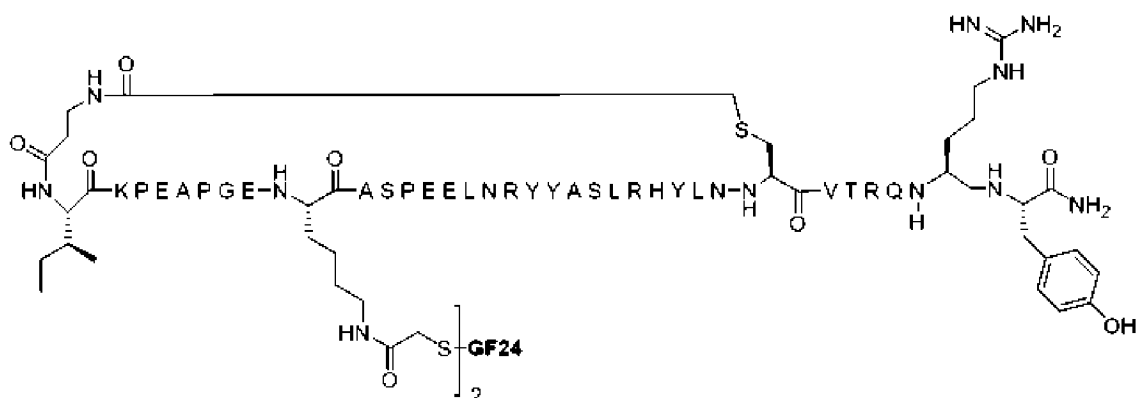
Структура:



SEQ ID NO: 231

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, psi-(R35,Y36)] гомодимерный конюгат с PYY2-36

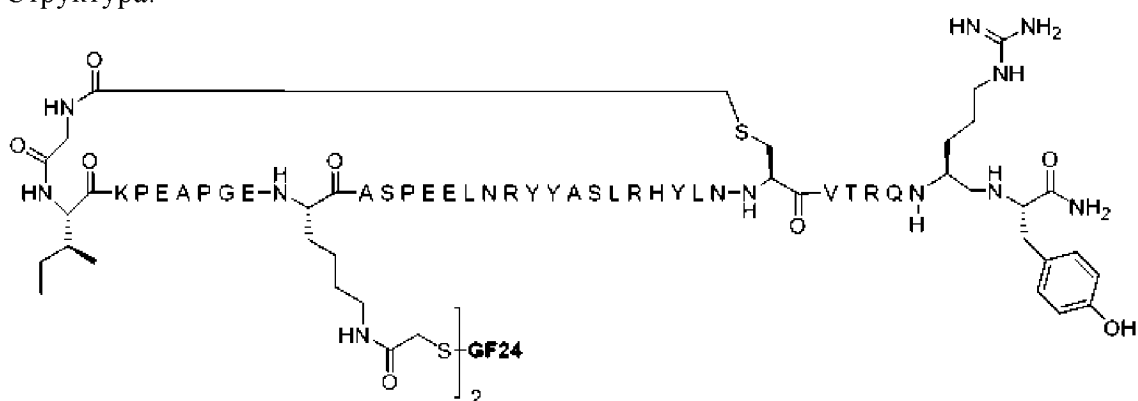
Структура:



SEQ ID NO: 232

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, psi-(R35,Y36)] гомодимерный конюгат с PYY2-36

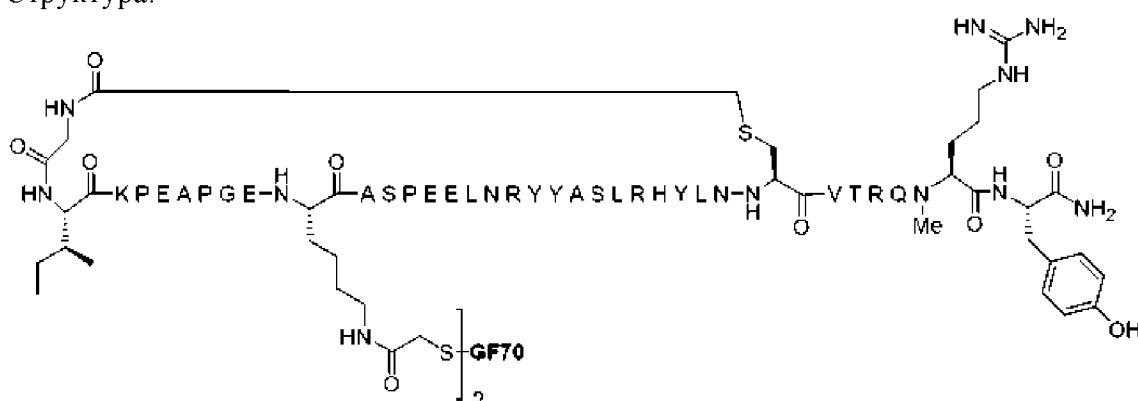
Структура:



SEQ ID NO: 233

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

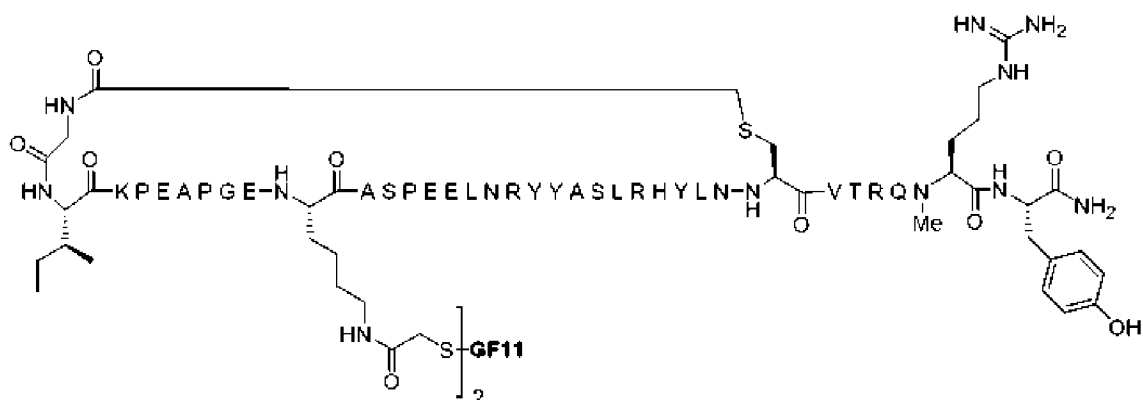
Структура:



SEQ ID NO: 234

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

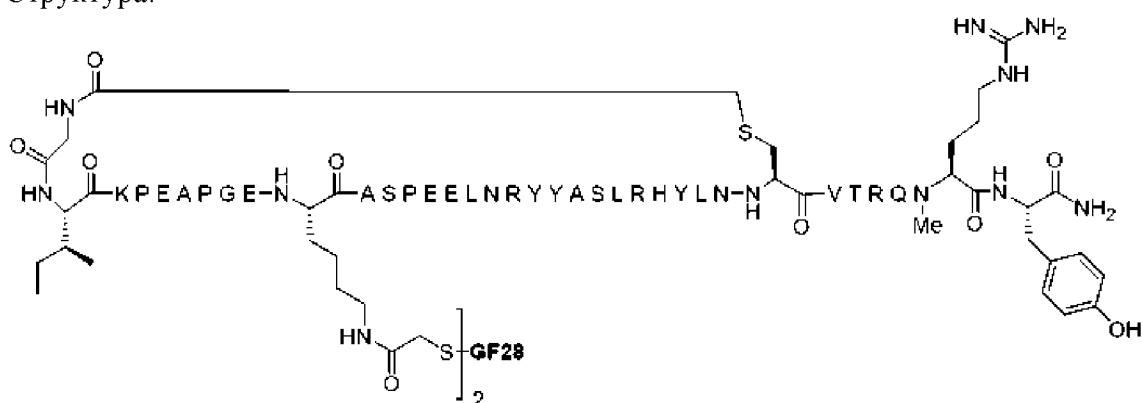
Структура:



SEQ ID NO: 235

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

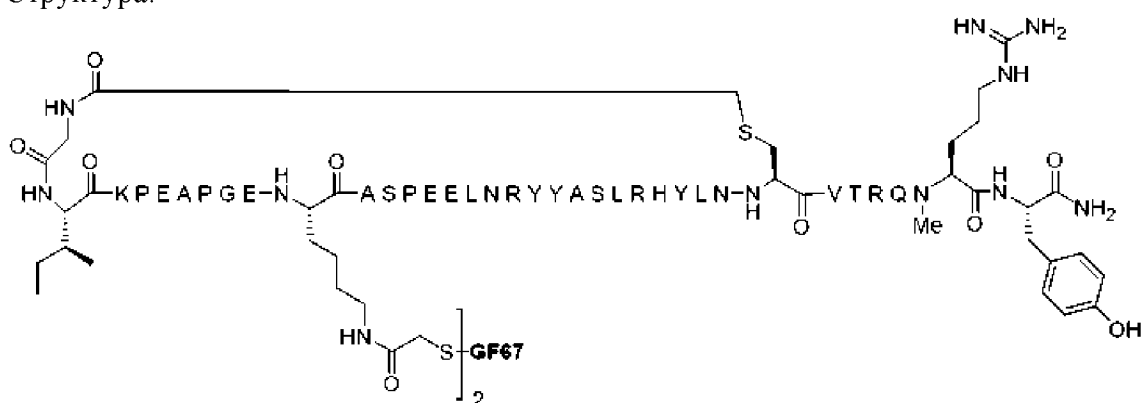
Структура:



SEQ ID NO: 236

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

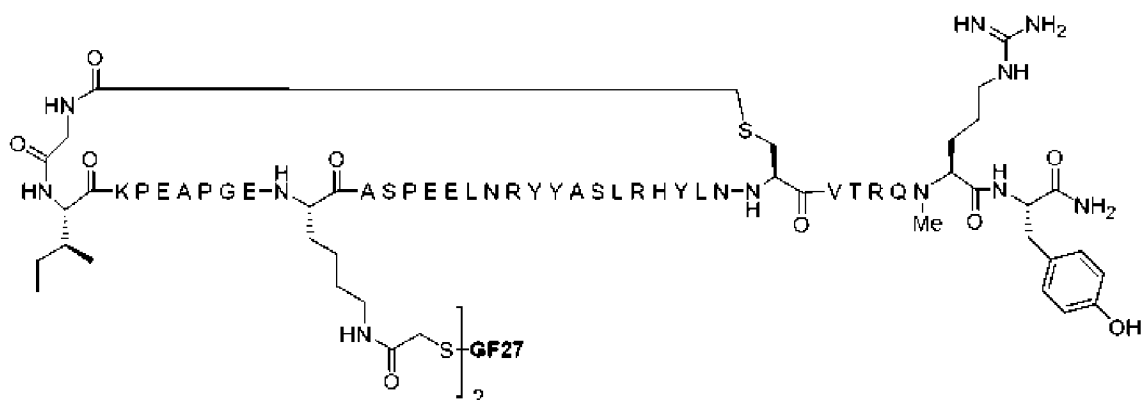
Структура:



SEQ ID NO: 237

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

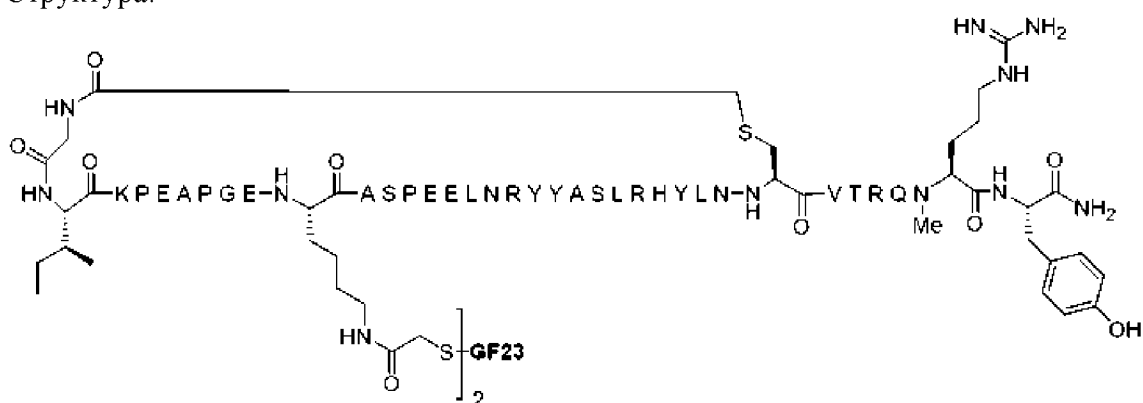
Структура:



SEQ ID NO: 238

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

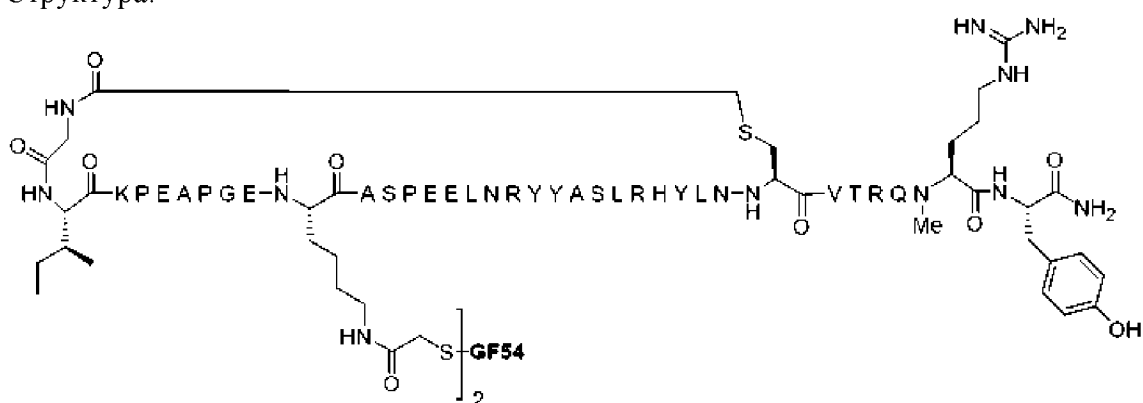
Структура:



SEQ ID NO: 239

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

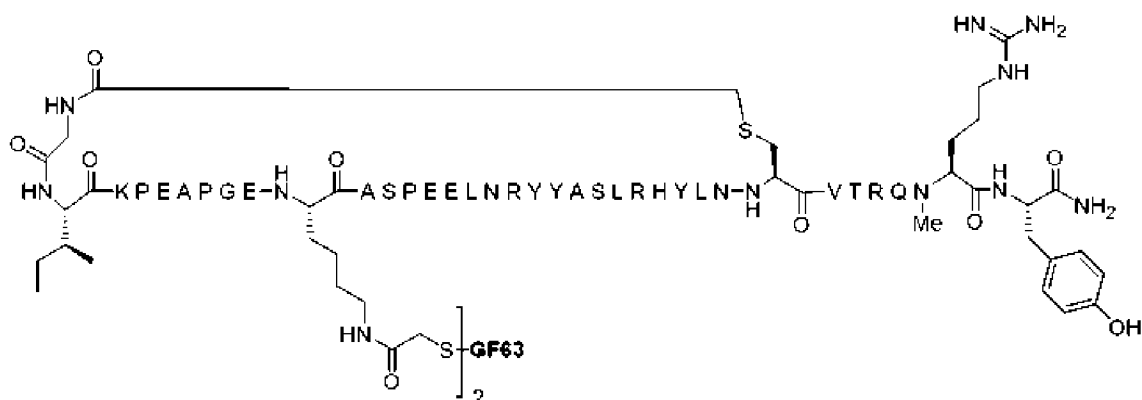
Структура:



SEQ ID NO: 240

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

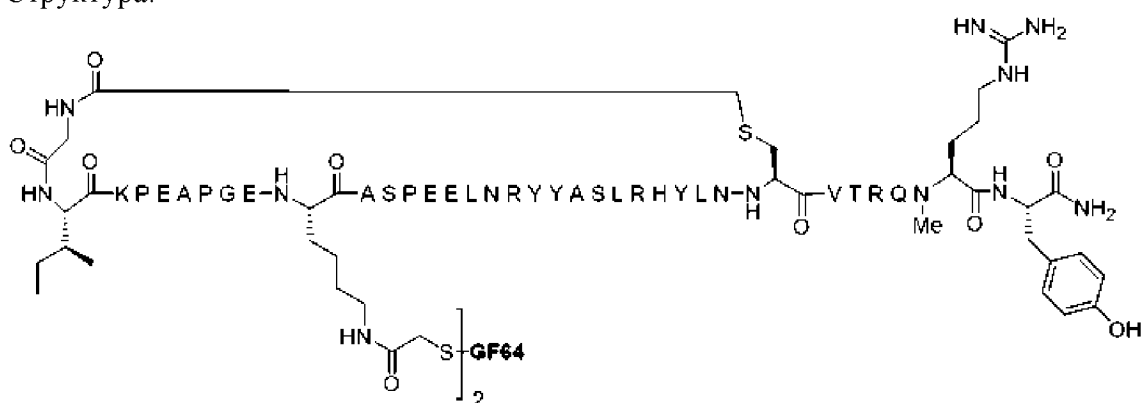
Структура:



SEQ ID NO: 241

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

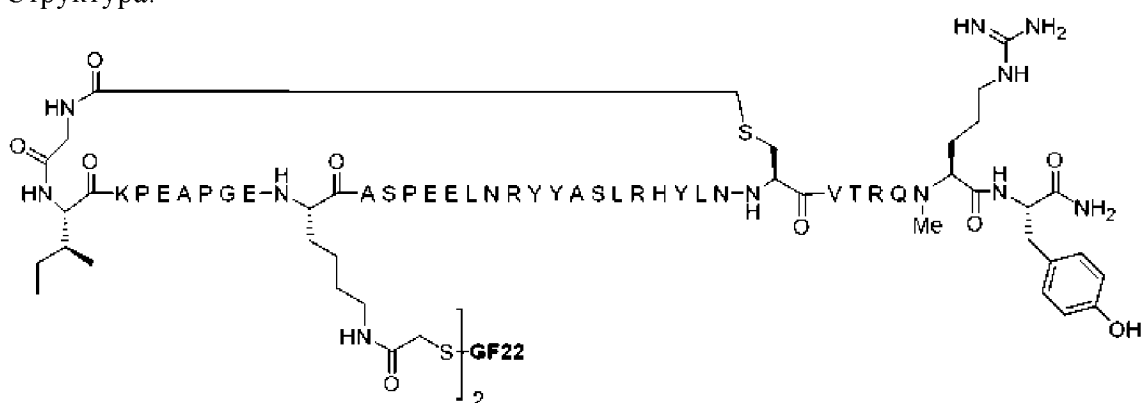
Структура:



SEQ ID NO: 242

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

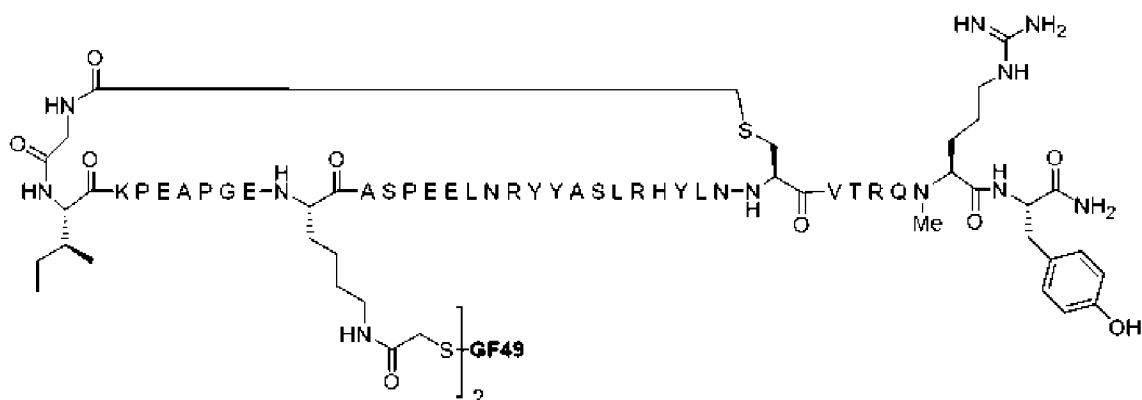
Структура:



SEQ ID NO: 243

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

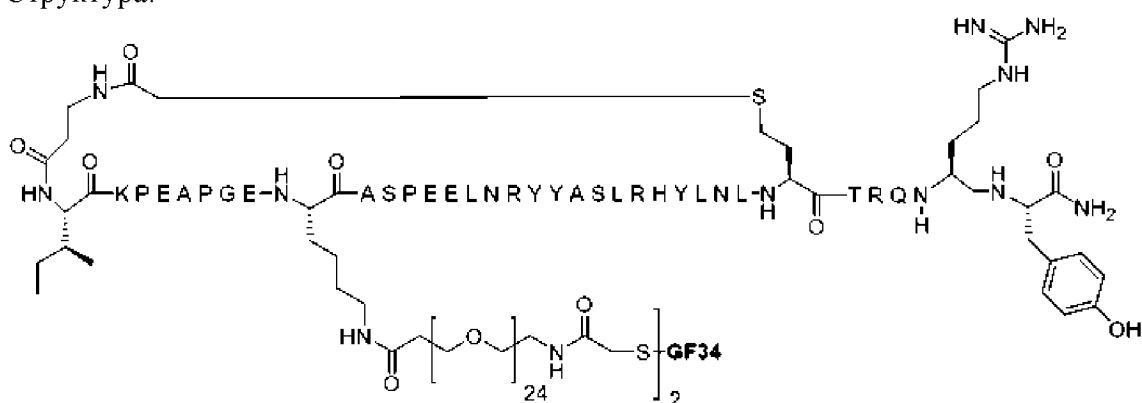
Структура:



SEQ ID NO: 244

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-hC31), K(PEG24Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

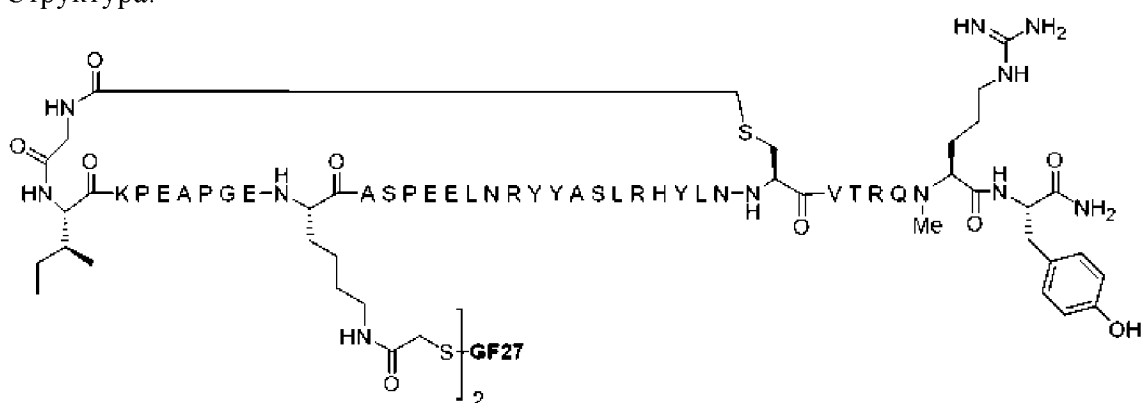
Структура:



SEQ ID NO: 245

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

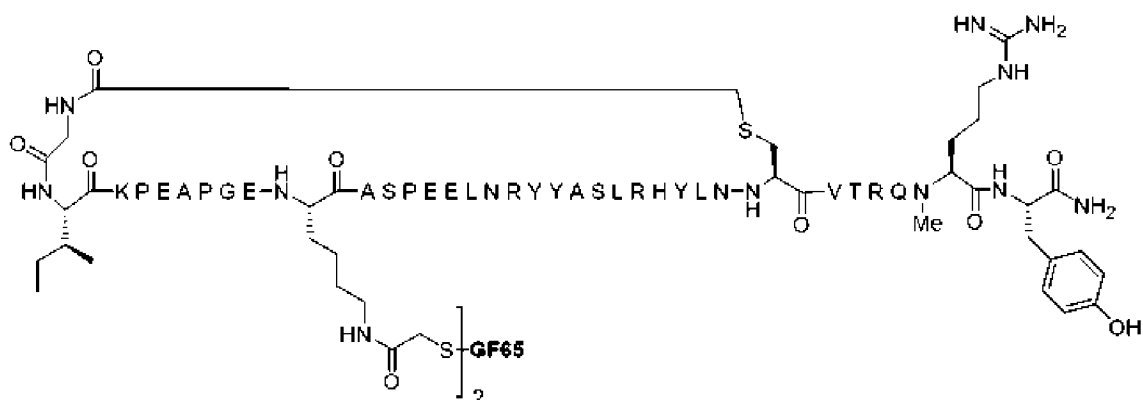
Структура:



SEQ ID NO: 246

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

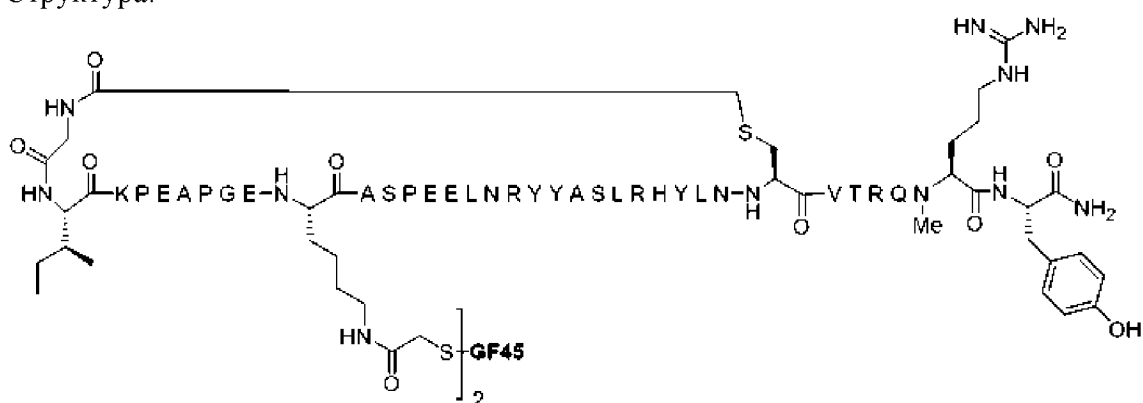
Структура:



SEQ ID NO: 247

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

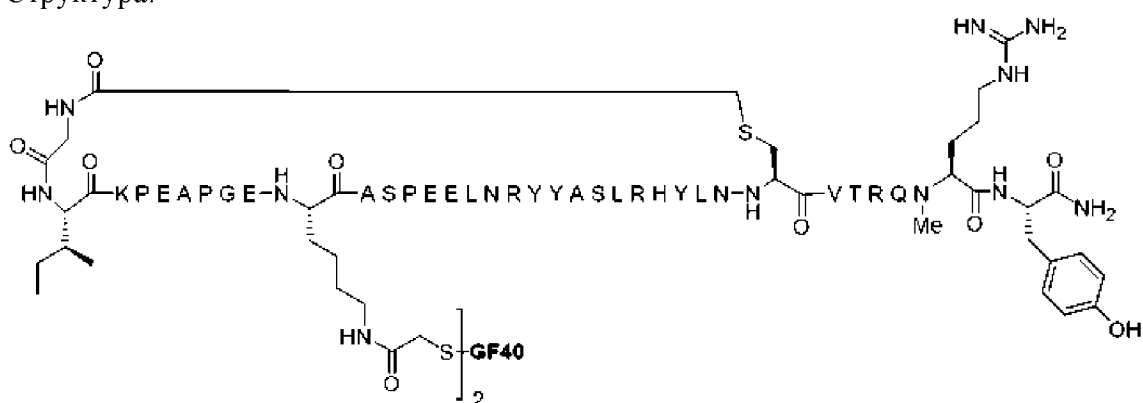
Структура:



SEQ ID NO: 248

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

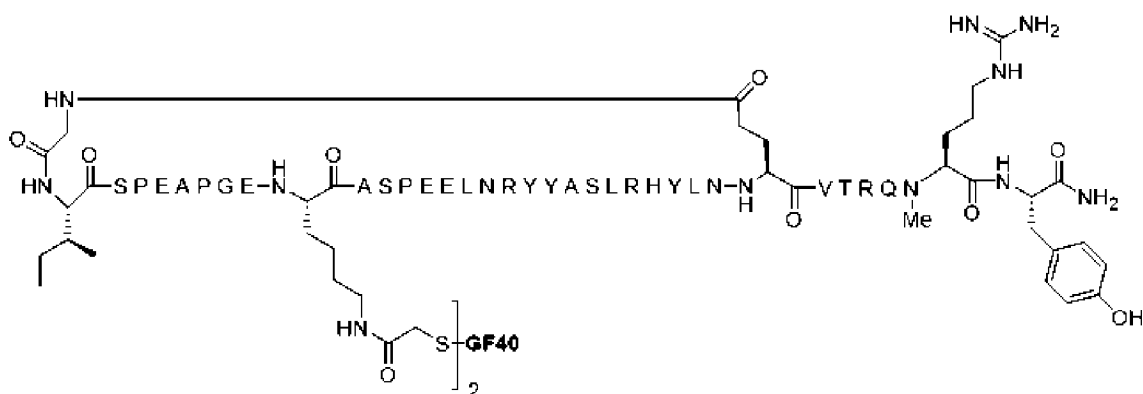
Структура:



SEQ ID NO: 249

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-E30), S4, K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

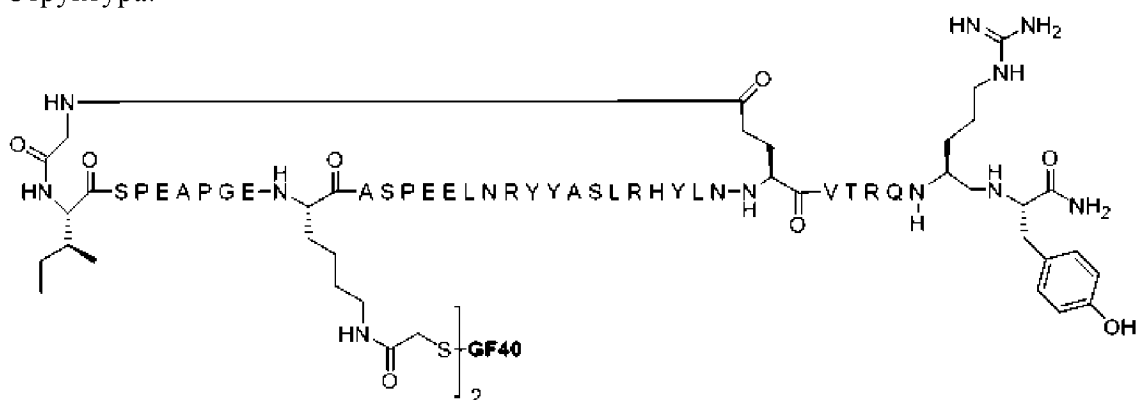
Структура:



SEQ ID NO: 250

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-E30), S4, K(Ac)11, psi-(R35, Y36)] гомодимерный конюгат с PYY2-36

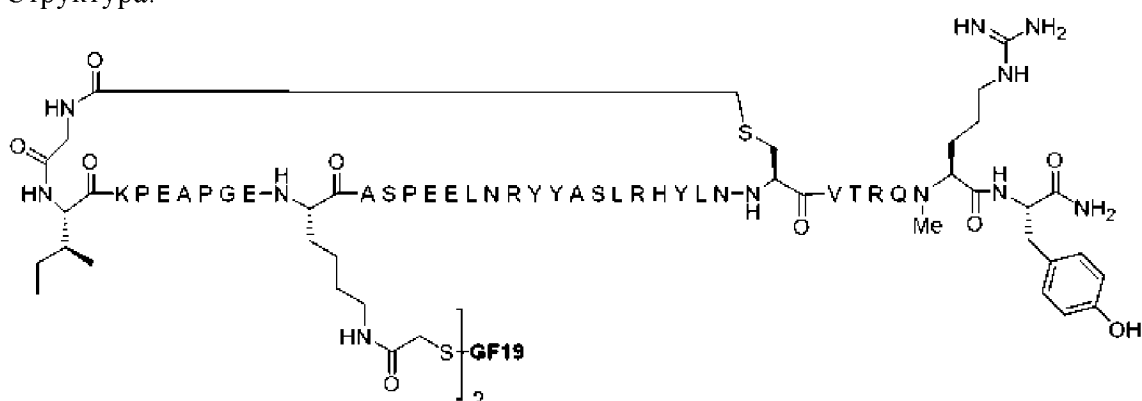
Структура:



SEQ ID NO: 251

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

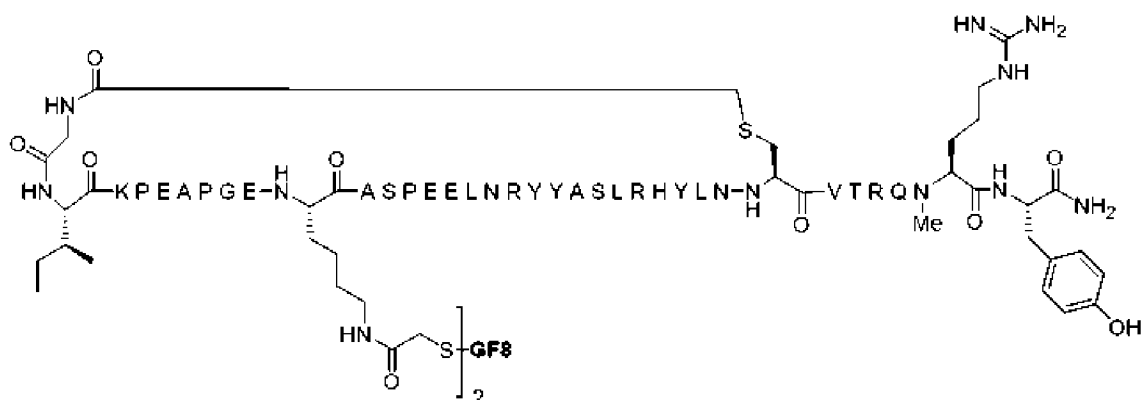
Структура:



SEQ ID NO: 252

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

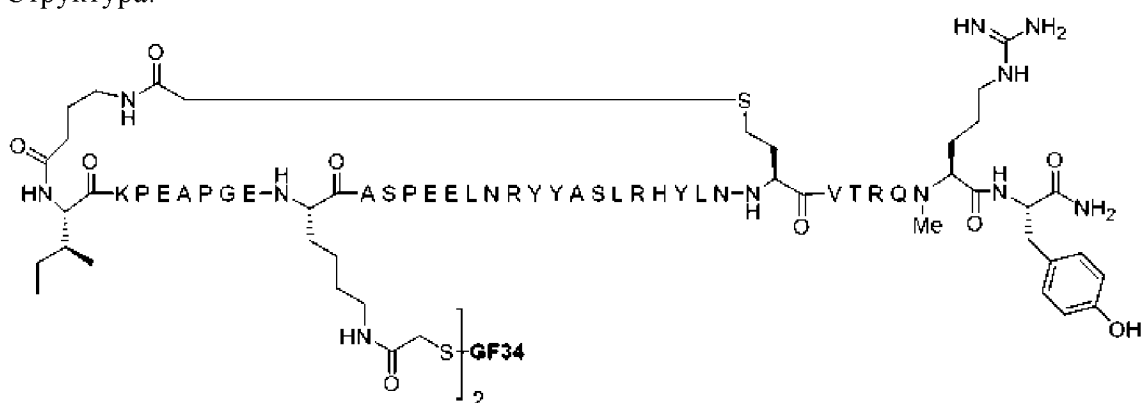
Структура:



SEQ ID NO: 253

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(gAba2-COCH₂-hC30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

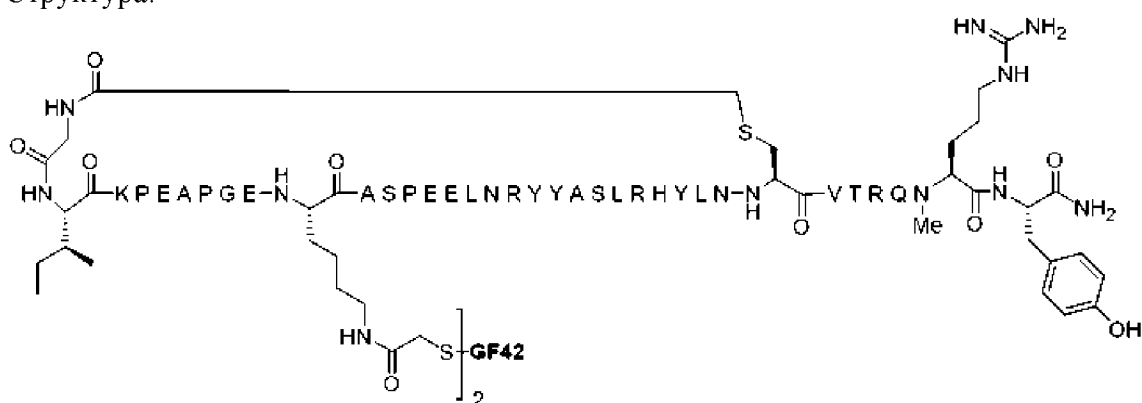
Структура:



SEQ ID NO: 254

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

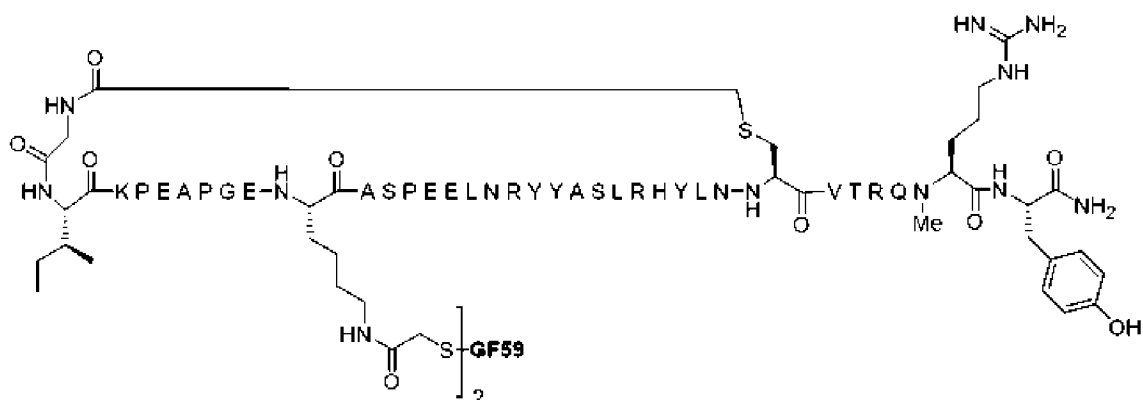
Структура:



SEQ ID NO: 255

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

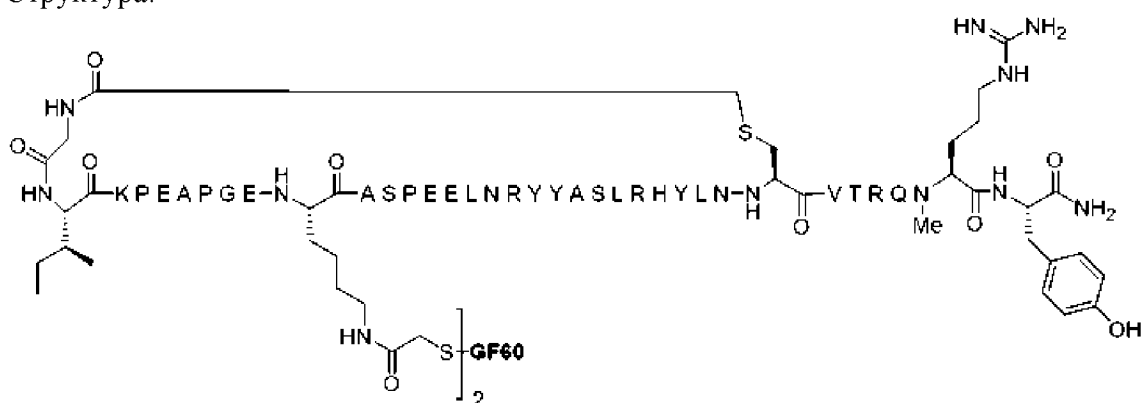
Структура:



SEQ ID NO: 256

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

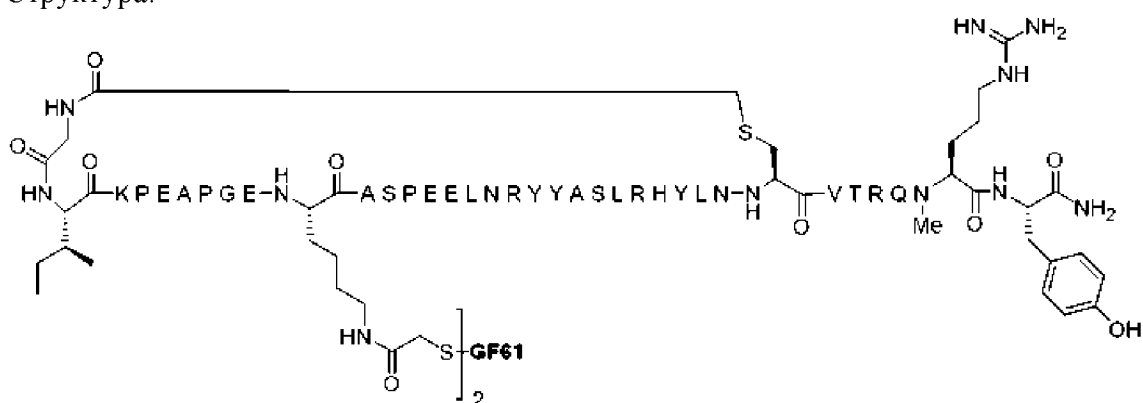
Структура:



SEQ ID NO: 257

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

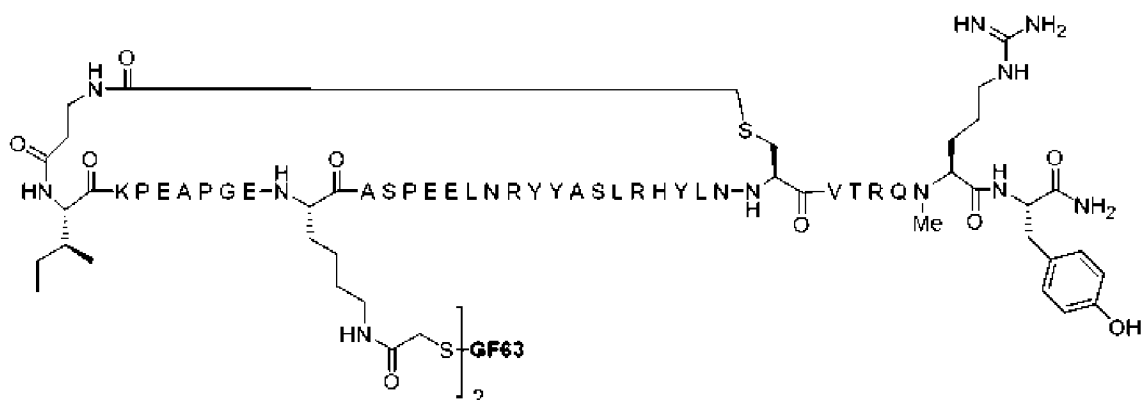
Структура:



SEQ ID NO: 258

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

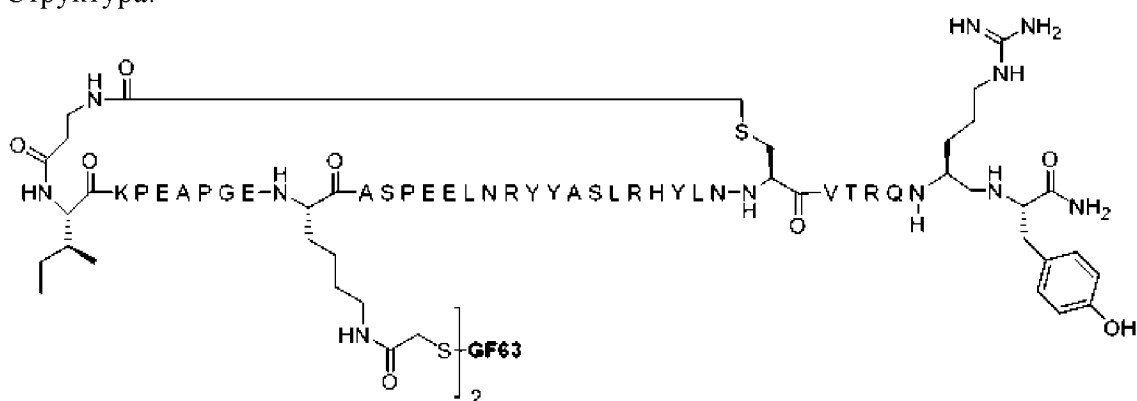
Структура:



SEQ ID NO: 259

Название: Гибридный конъюгат GLP-1-[цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат

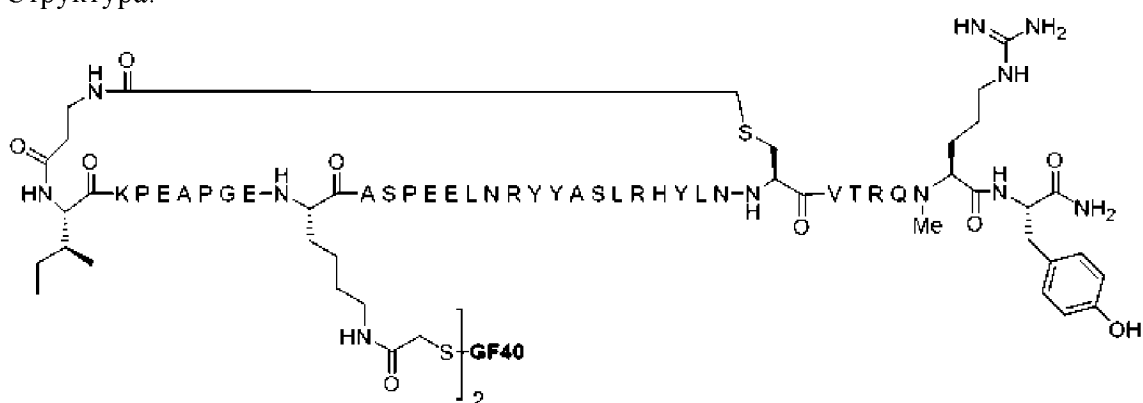
Структура:



SEQ ID NO: 260

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конъюгат с PYY2-36

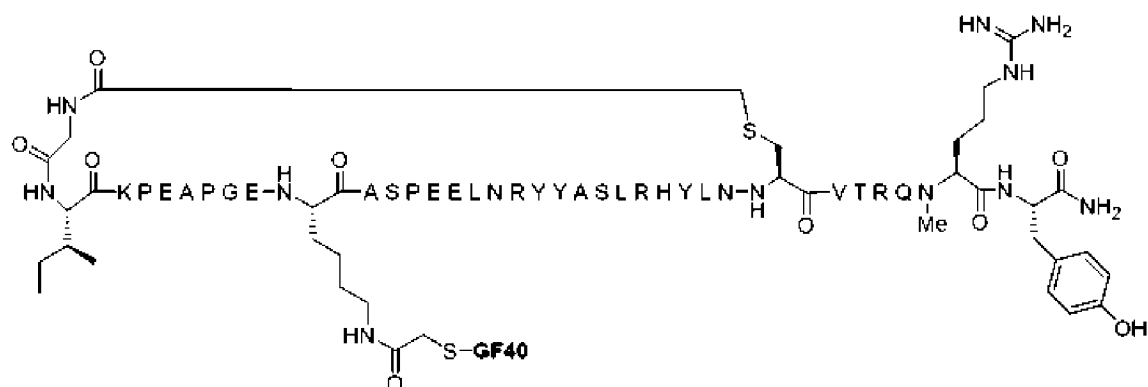
Структура:



SEQ ID NO: 261

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] мономерный конъюгат с PYY2-36

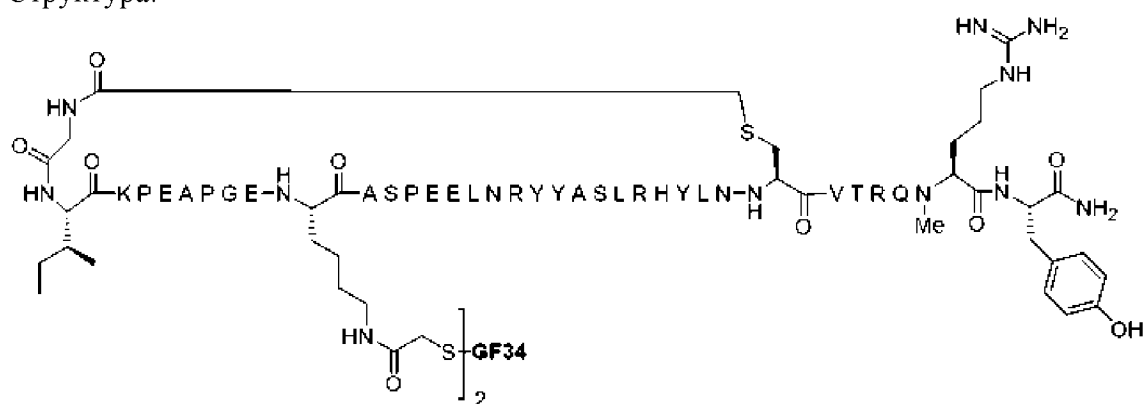
Структура:



SEQ ID NO: 262

Название: Слитый пептид, содержащий GLP-1-[цикло-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35] гомодимерный конюгат с PYY2-36

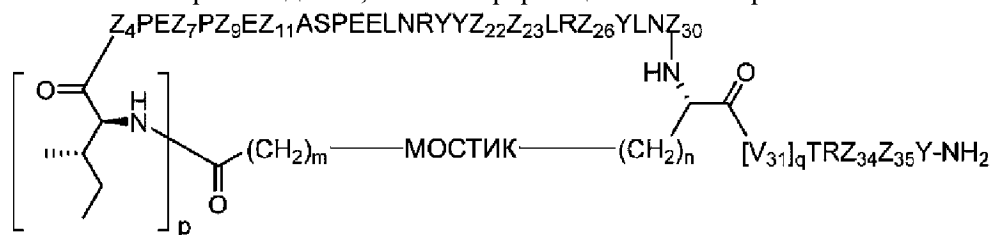
Структура:



ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, содержащий слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит пептид GLP-1, первый линкерный пептид, пептид шарнирной Fc-области и второй линкерный пептид, причем первый линкерный пептид необязательно отсутствует.

2. Конъюгат по п. 1, в котором циклический пептид PYY представлен соединением формулы I или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула I,

где:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K;

Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K;

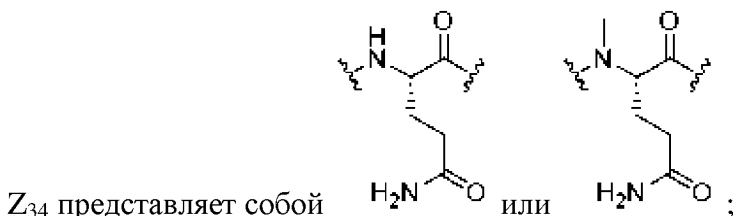
Z₂₂ представляет собой A или K;

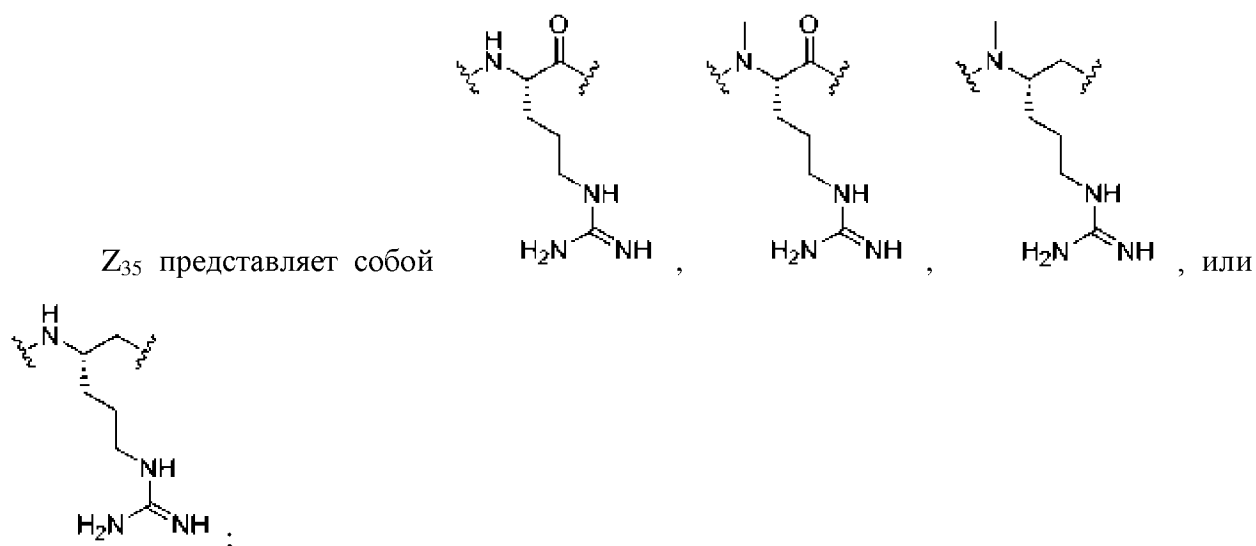
Z₂₃ представляет собой S или K;

Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L, W или отсутствует,

при условии, что Z₃₀ отсутствует, только если q равно 1;





причем производное представляет собой соединение формулы **I**, которое модифицировано с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из амидирования, ацилирования и пегилирования.

3. Конъюгат по п. 2, в котором циклический пептид РУУ представлен соединением формулы **I** или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

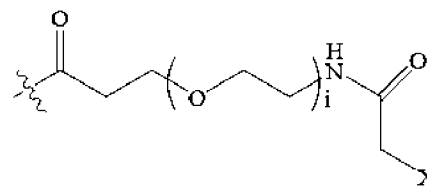
q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2-$,

$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой К, А, Е, S или R;

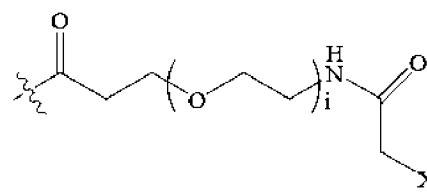
Z_7 представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К необязательно замещена



X , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X=\text{Br}$, I или Cl,

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_9 представляет собой G или К, причем боковая аминная цепь указанного К необязательно замещена

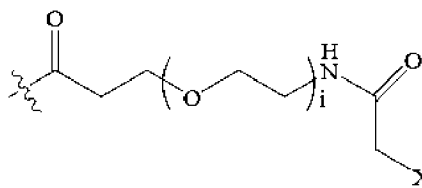


X , где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

X=Br, I или Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₁₁ представляет собой D или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена

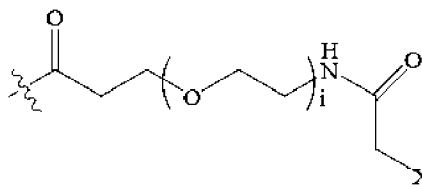


, где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

X=Br, I или Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₂₂ представляет собой A или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена

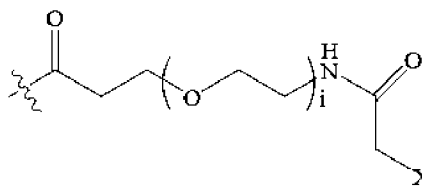


, где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

X=Br, I или Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₂₃ представляет собой S или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



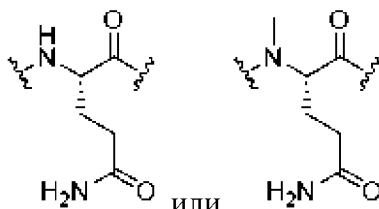
, где i представляет собой целое число от 0 до 24, а

X=Br, I или Cl,

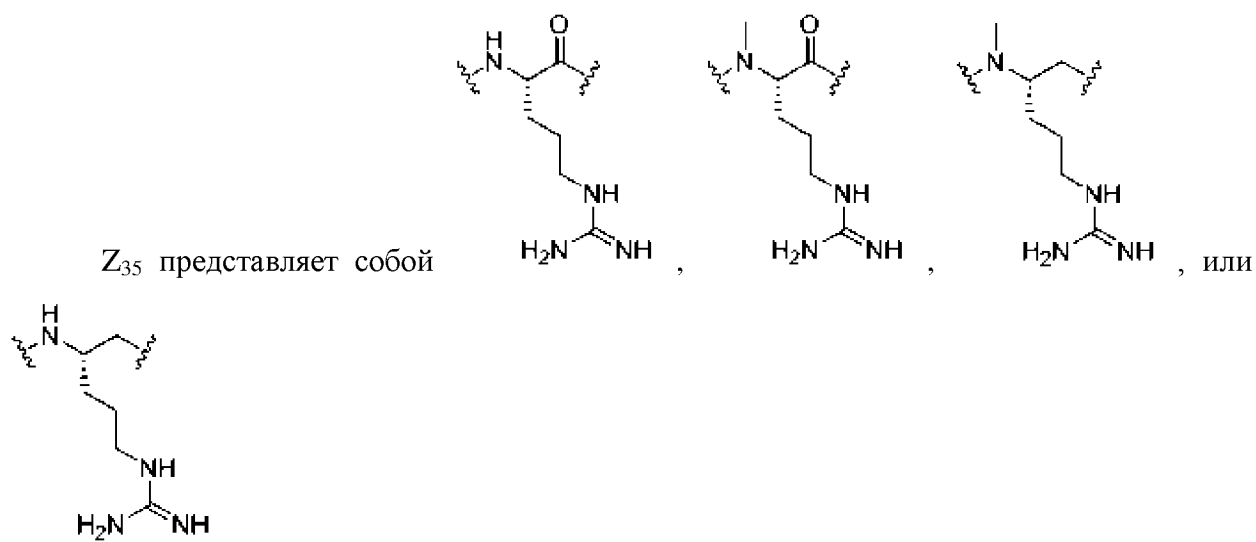
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₂₆ представляет собой A или H;

Z₃₀ представляет собой L;



Z₃₄ представляет собой H₂N-C(=O)-CH₂-CH₂-C(=O)-NH- или H₂N-C(=O)-CH₂-CH₂-C(=O)-N- ; и



4. Конъюгат по п. 2, в котором циклический пептид РУУ представлен соединением формулы **I** или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

n равно 1, 2 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q может быть равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой К, А, Е, S или R;

Z_7 представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_9 представляет собой G или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{11} представляет собой D или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{22} представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

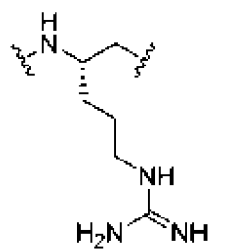
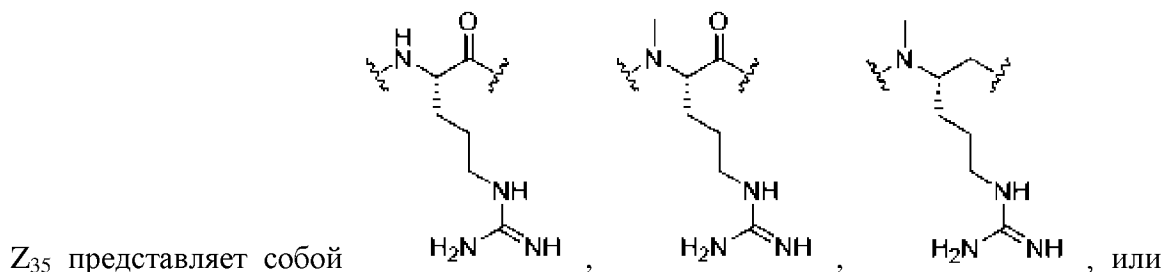
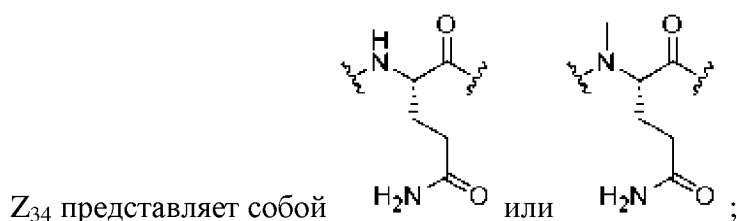
$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{23} представляет собой S или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{26} представляет собой А или H;

Z_{30} представляет собой L;



5. Конъюгат по п. 2, в котором циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из соединений с SEQ ID NO: 1-54, или ее фармацевтически приемлемой соли.

6. Конъюгат по п. 5, в котором циклический пептид PYY выбран из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 или 34 или ее фармацевтически приемлемой соли.

7. Конъюгат по любому одному из пп. 1-6, в котором слитый пептид, содержащий GLP-1, ковалентно связан с циклическим пептидом PYY на остатке лизина циклического пептида PYY.

8. Конъюгат по п. 7, в котором только один из Z_7 , Z_9 , Z_{11} , Z_{22} и Z_{23} в формуле I представляет собой лизин, причем лизин ковалентно связан с цистеиновым остатком во втором линкерном пептиде слитого пептида, содержащего GLP-1.

9. Конъюгат по п. 8, в котором Z_{11} в формуле I представляет собой лизин.

10. Конъюгат по любому одному из пп. 1-9, в котором пептид GLP-1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-59.

11. Конъюгат по любому одному из пп. 1-10, в котором присутствует первый линкерный пептид и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-83.

12. Конъюгат по любому одному из пп. 1-11, в котором пептид шарнирной Fc-области содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84-90.

13. Конъюгат по любому одному из пп. 1-12, в котором второй линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 93-112.

14. Конъюгат по любому одному из пп. 1-12, в котором второй линкерный пептид содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 93, 94, 95, 106, или 111.

15. Конъюгат, содержащий слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем слитый пептид, содержащий GLP-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113-224 и 267-274, и причем циклический пептид PYY содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 или 34, или ее фармацевтически приемлемой соли.

16. Конъюгат по п. 15, в котором цистеиновый остаток между аминокислотными остатками 287-289, предпочтительно цистеиновый остаток 288, слитого пептида, содержащего GLP-1, ковалентно связан с остатком лизина в остатке 7, 9, 11, 22 или 23 циклического пептида PYY, предпочтительно остатка 11 лизина циклического пептида PYY, при помощи химического линкера.

17. Конъюгат, содержащий слитый пептид, содержащий глюкагон-подобный пептид 1 (GLP-1), связанный с циклическим пептидом PYY, причем конъюгат содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 225-262 или ее фармацевтически приемлемой соли.

18. Способ получения конъюгата по любому одному из пп. 1-17, включающий реакцию электрофильного соединения, предпочтительно бромацетамида или малеимида, введенного в боковую цепь циклического пептида PYY, предпочтительно в боковую цепь остатка лизина циклического пептида PYY, с сульфгидрильной группой цистеинового остатка второго линкерного пептида слитого пептида, содержащего GLP-1, с образованием, таким образом, ковалентной связи между циклическим пептидом PYY и пептидом, содержащим GLP-1.

19. Способ по п. 18, в котором цистеиновый остаток второго линкерного пептида слитого пептида, содержащего GLP-1, восстанавливают посредством приведения слитого пептида, содержащего GLP-1, в контакт с избытком азафосфинового восстанавливающего агента, при этом восстановленный цистеиновый остаток приводят в реакцию с электрофильным соединением.

20. Способ по п. 19, в котором азафосфиновый восстанавливающий агент представляет собой 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3.3.1.1] декан (РТА) или его производное.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому одному из пп. 1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

22. Способ лечения или профилактики заболевания или расстройства у пациента, причем указанное заболевание или расстройство представляет собой ожирение, диабет типа I или типа II, метаболический синдром, резистентность к инсулину, нарушение толерантности к глюкозе, гипергликемию, гиперинсулинемию, гипертриглицеридемию, гипогликемию, обусловленную врожденным гиперинсулинизмом (СНП), дислипидемию, атеросклероз, диабетическую нефропатию и другие факторы риска для сердечно-

сосудистой системы, такие как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороз, воспаление, неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), болезнь почек и/или экзему, причем способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 21.

23. Способ снижения по меньшей мере одного из потребления пищи или массы тела у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 21.

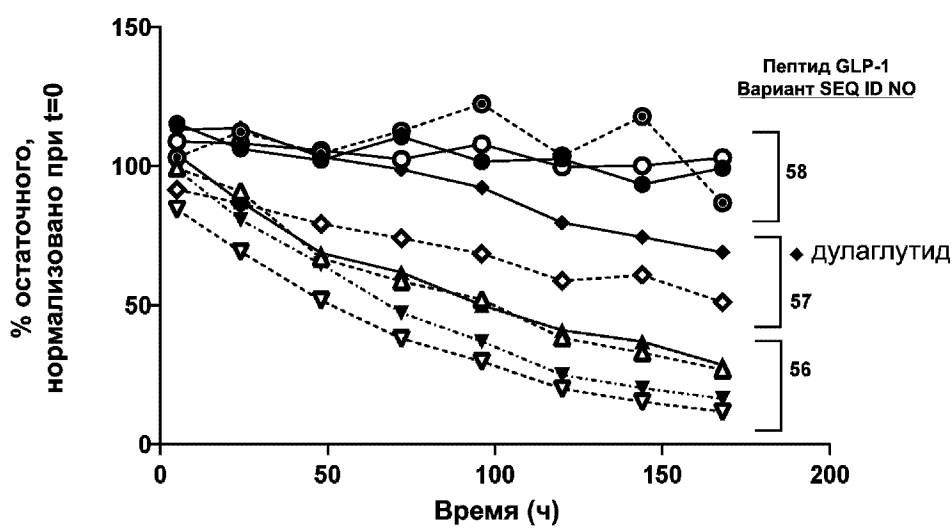
24. Способ модуляции активности рецептора Y2 и/или активности рецептора GLP-1 у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 21.

25. Способ по любому одному из пп. 22-24, в котором фармацевтическую композицию вводят путем инъекции.

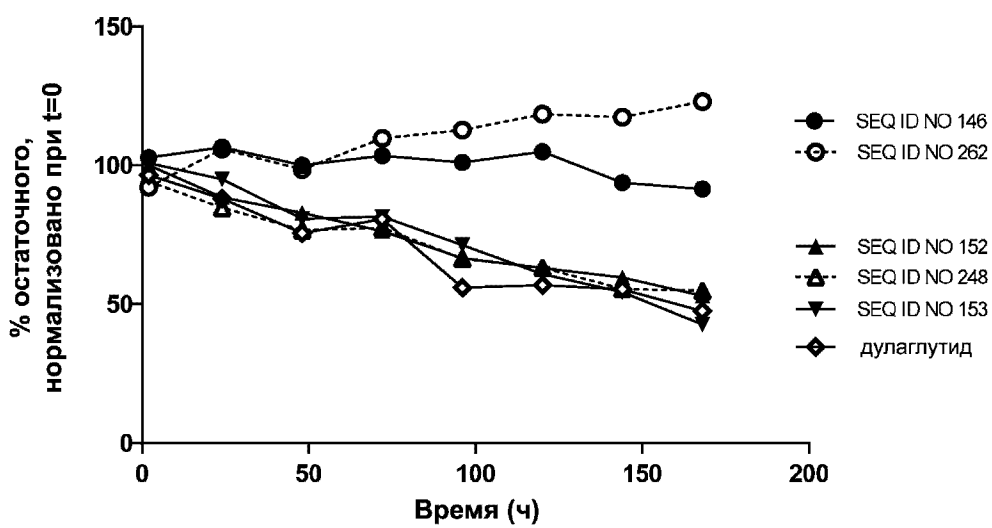
26. Набор, содержащий конъюгат по любому из пп. 1-17, предпочтительно дополнительно содержащий устройство для инъекции.

27. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по любому одному из пп. 1-17, включающий объединение конъюгата с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

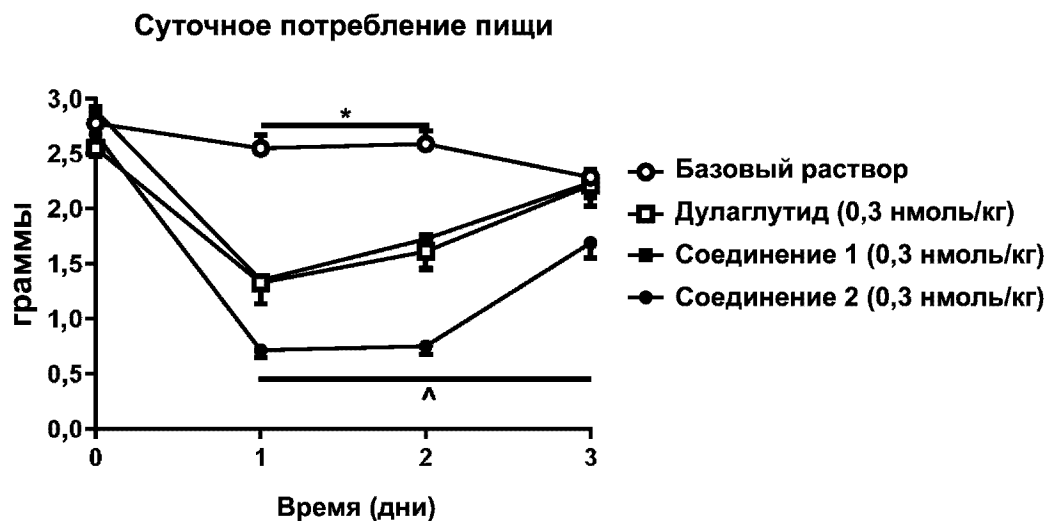
По доверенности



ФИГ. 1А

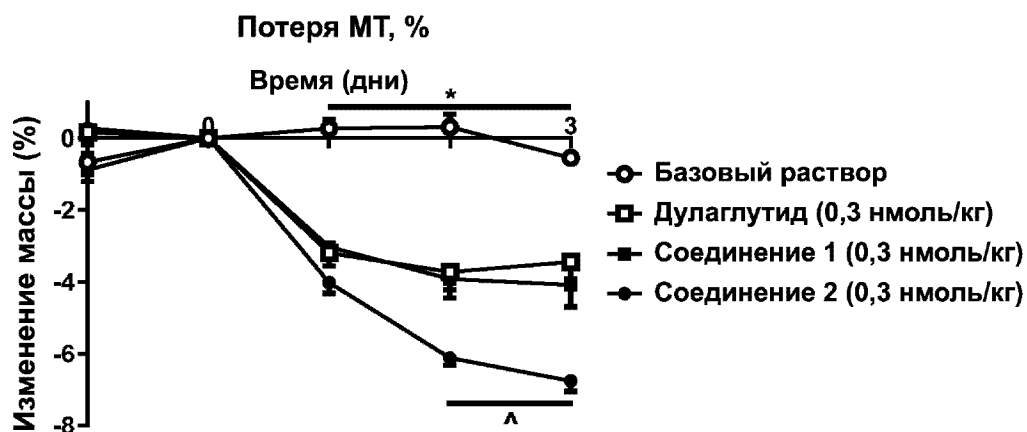


ФИГ. 1В



* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению со всеми группами,
 $\wedge p < 0,05$, соединение 2 по сравнению со всеми группами,
 Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

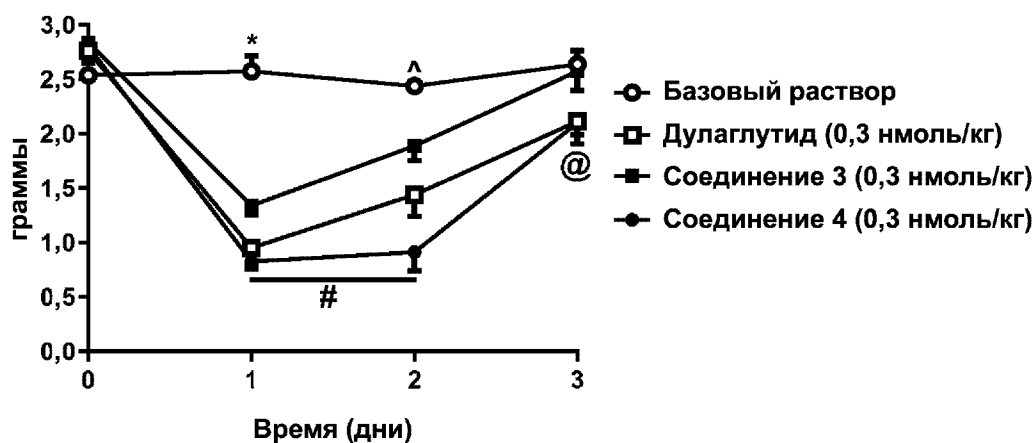
ФИГ. 2А



* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению со всеми группами,
 $\wedge p < 0,05$, соединение 2 по сравнению со всеми группами,
 Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 2В

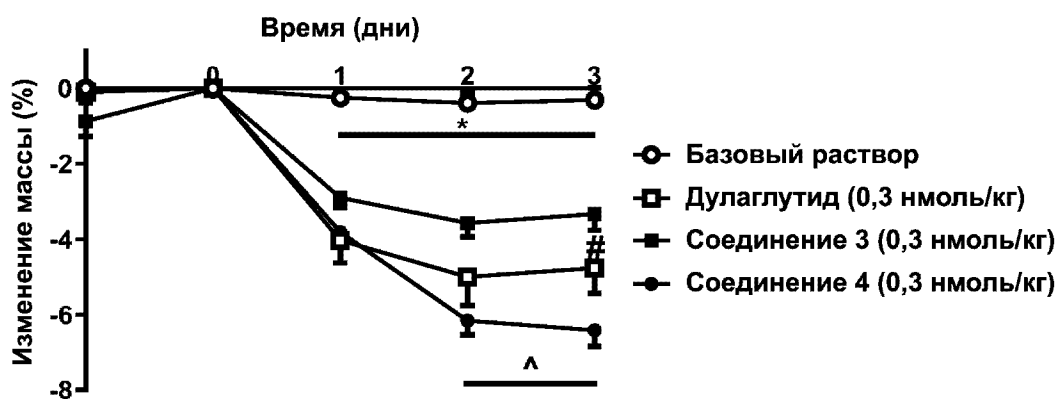
Суточное потребление пищи



* $p < 0,05$, по сравнению со всеми группами,
 $^{\wedge}p < 0,05$, базовый раствор по сравнению с дулаглутидом,
соединениями 3 и 4,
 $\#p < 0,05$, соединение 4 по сравнению с соединением 3,
 $@p < 0,05$, соединение 4 по сравнению с базовым раствором,
Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными
измерениями, критерий Тьюки

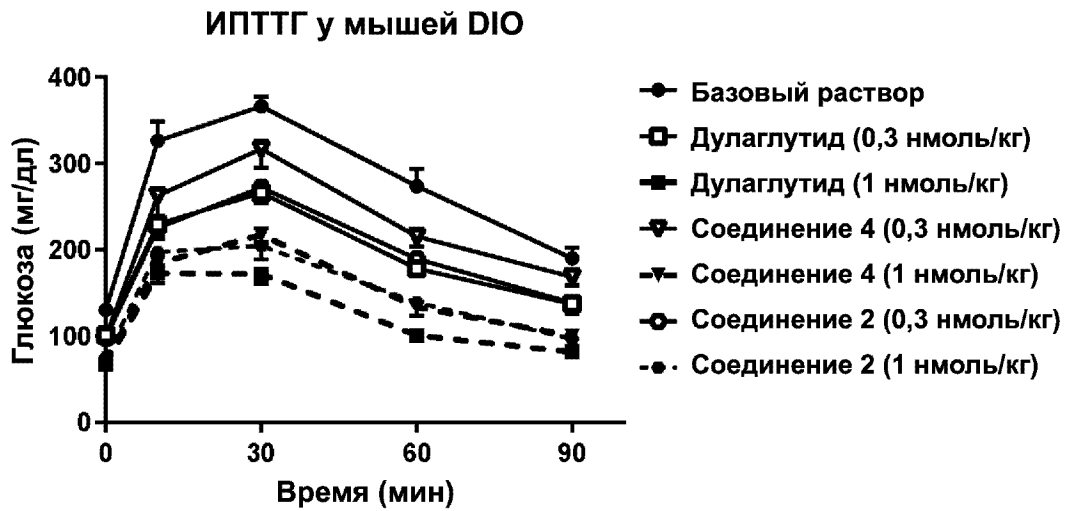
ФИГ. 3А

Потеря МТ, %

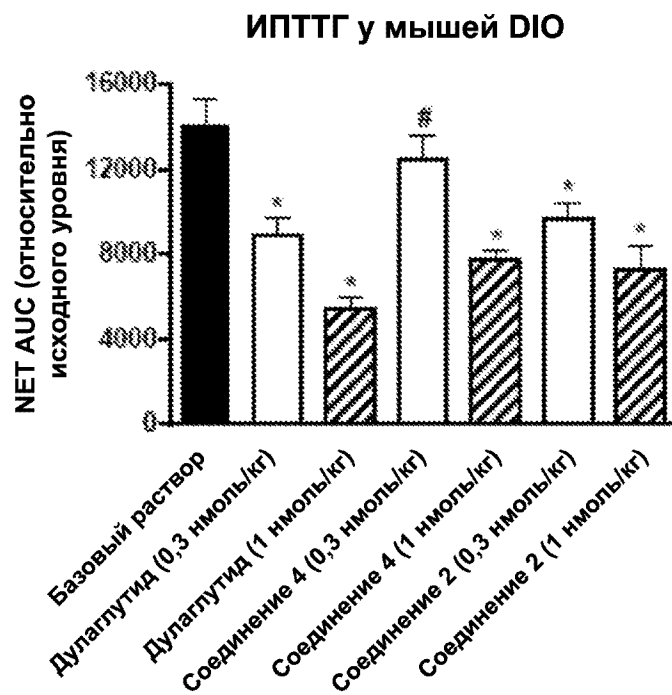


* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению со всеми группами,
 $^{\wedge}p < 0,05$, соединение 4 по сравнению с соединением 3,
 $\#p < 0,05$ дулаглутид по сравнению с соединениями 3 и 4,
Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными
измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 3В



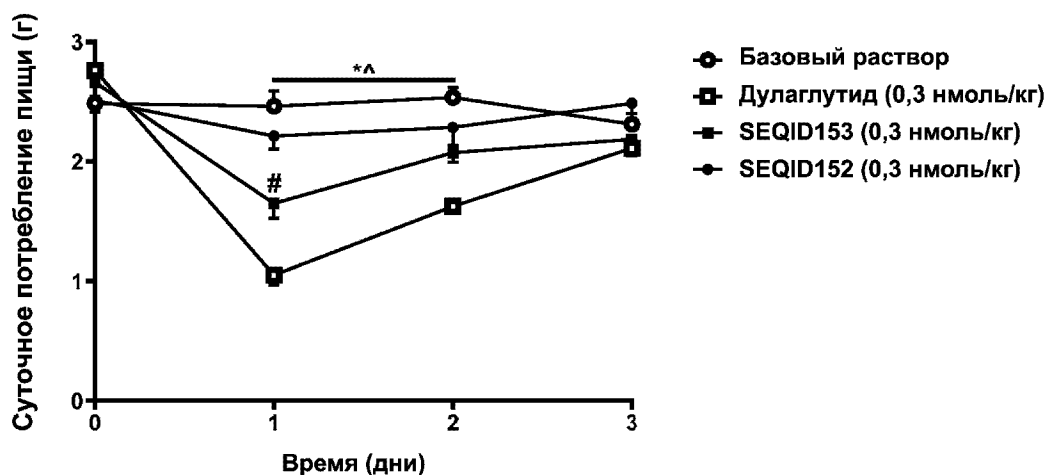
ФИГ. 4А



* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению с
 # $p < 0,05$ по сравнению с JNJ2649 (1 нмоль/кг),
 Однофакторный дисперсионный анализ с
 повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 4В

Суточное потребление пищи



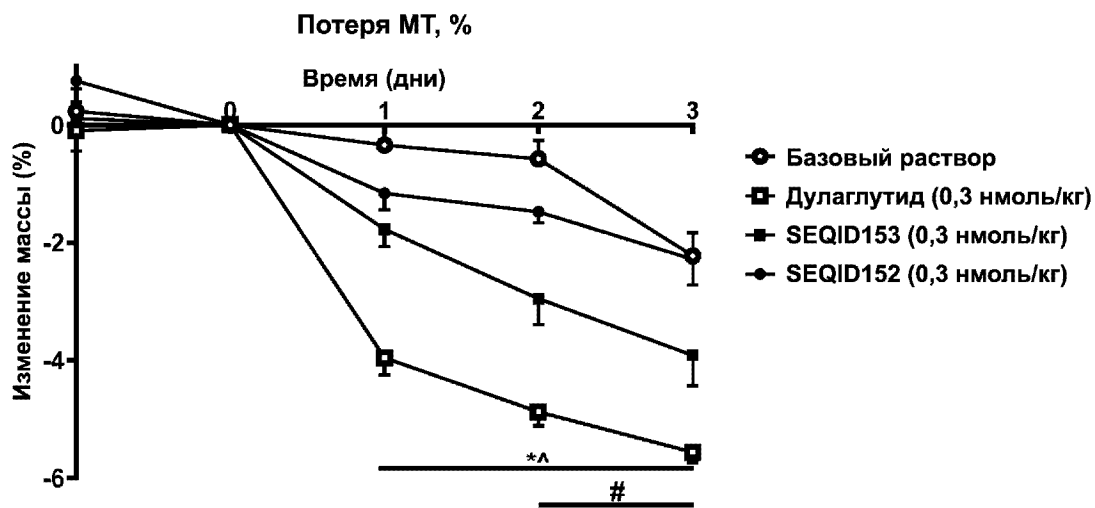
* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению с SEQID153

^ $p < 0,05$, дулаглутид по сравнению со всеми группами,

$p < 0,05$, SEQID152 по сравнению с SEQID153

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 5А



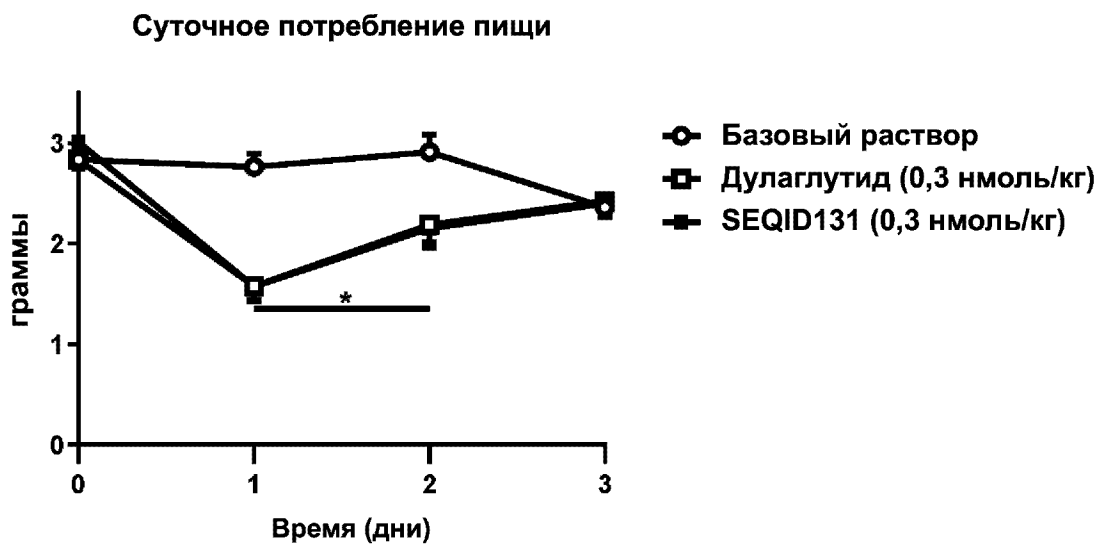
* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению с SEQID153

^ $p < 0,05$, дулаглутид по сравнению со всеми группами,

$p < 0,05$, SEQID152 по сравнению с SEQID153,

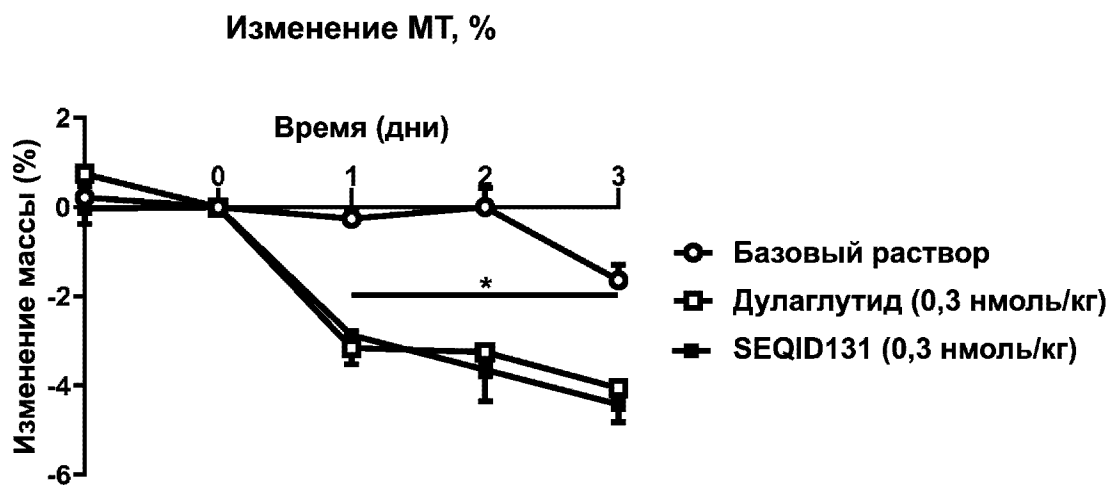
Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 5В



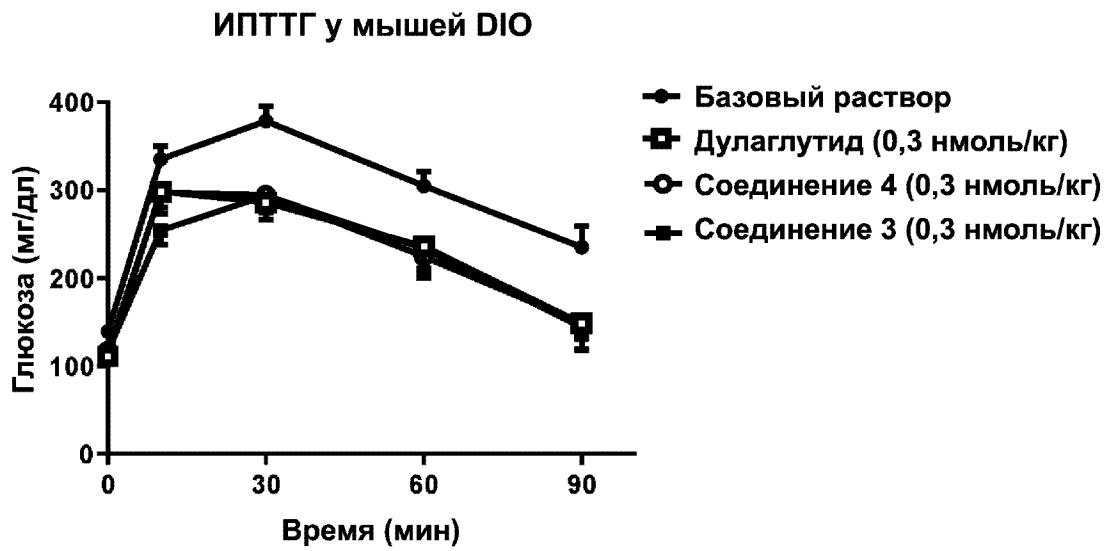
* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению со всеми группами,
Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 6А

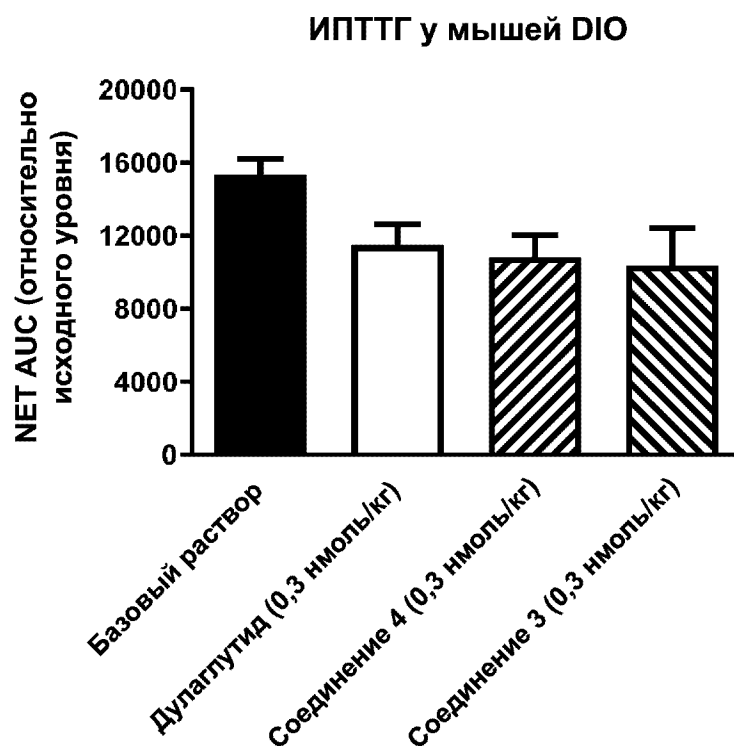


* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению со всеми группами,
Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

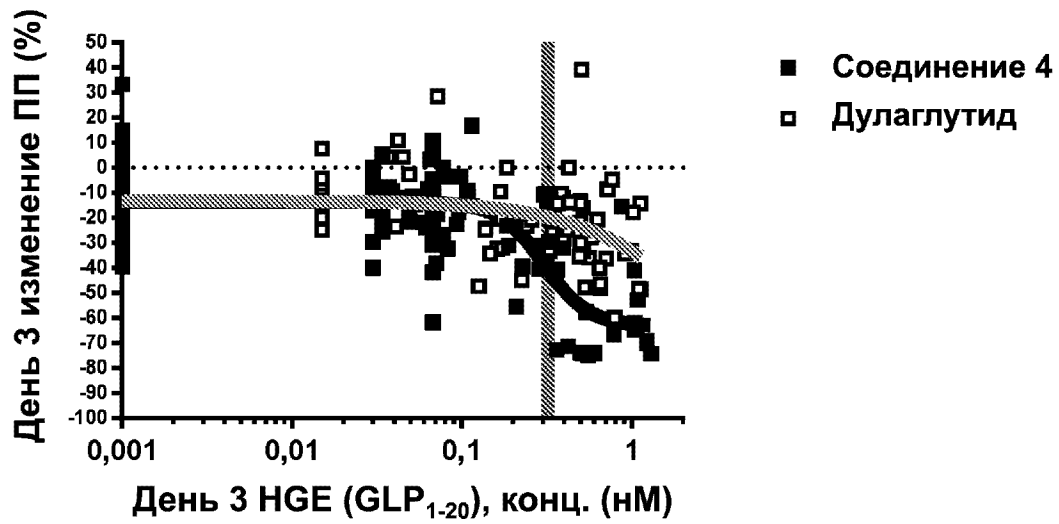
ФИГ. 6В



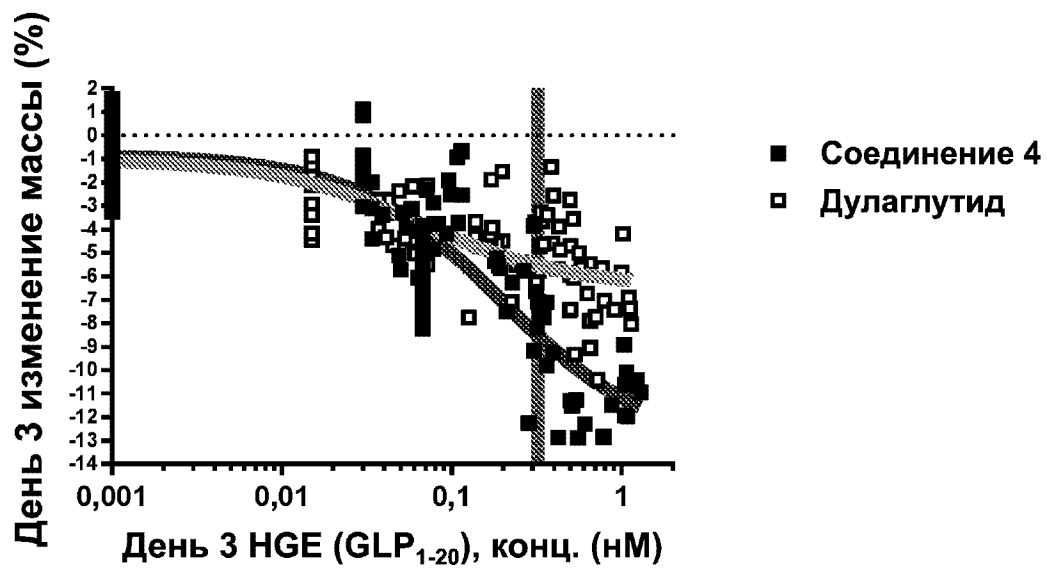
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

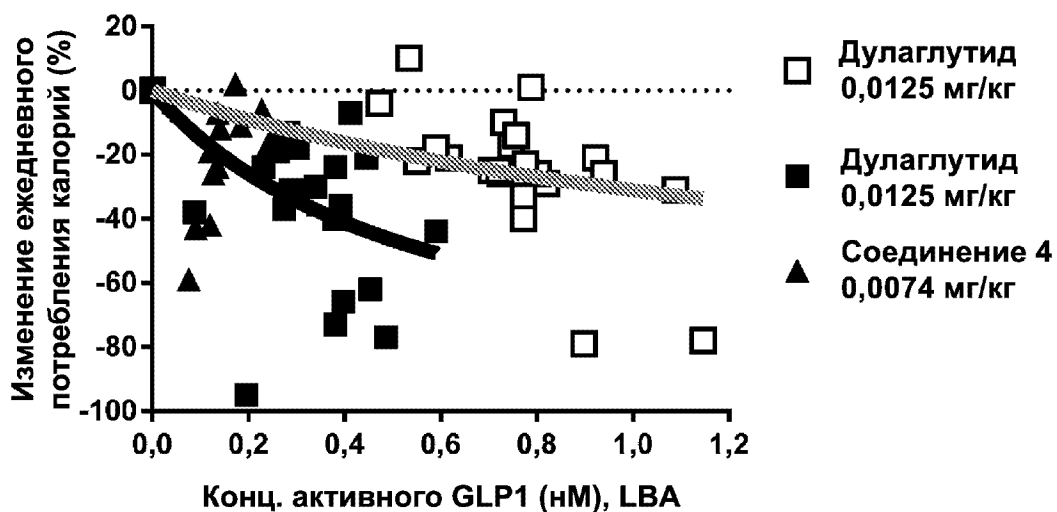


ФИГ. 8А



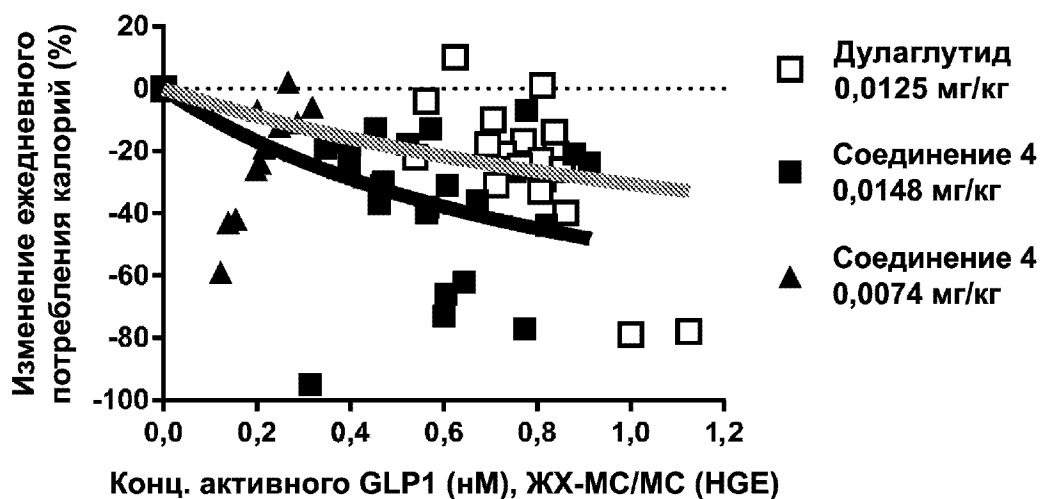
ФИГ. 8В

День 9 (перед введением дозы препарата) и
день 12 (перед введением дозы препарата), LBA

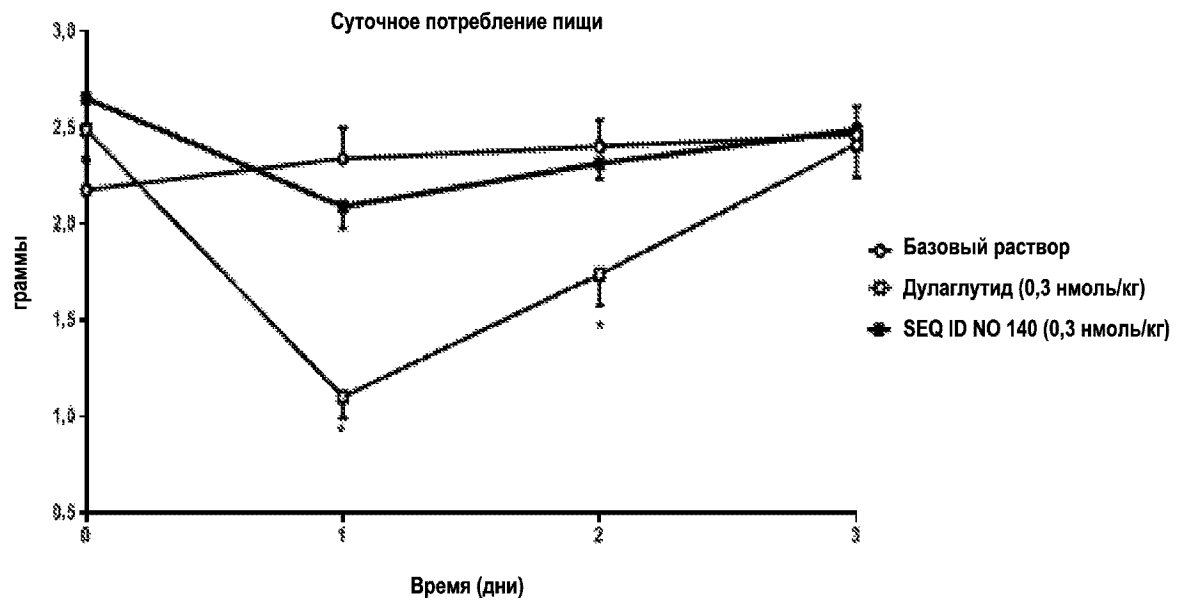


ФИГ. 9А

День 9 (перед введением дозы препарата) и день 12
(перед введением дозы препарата), ЖХ-МС/МС (HGE)

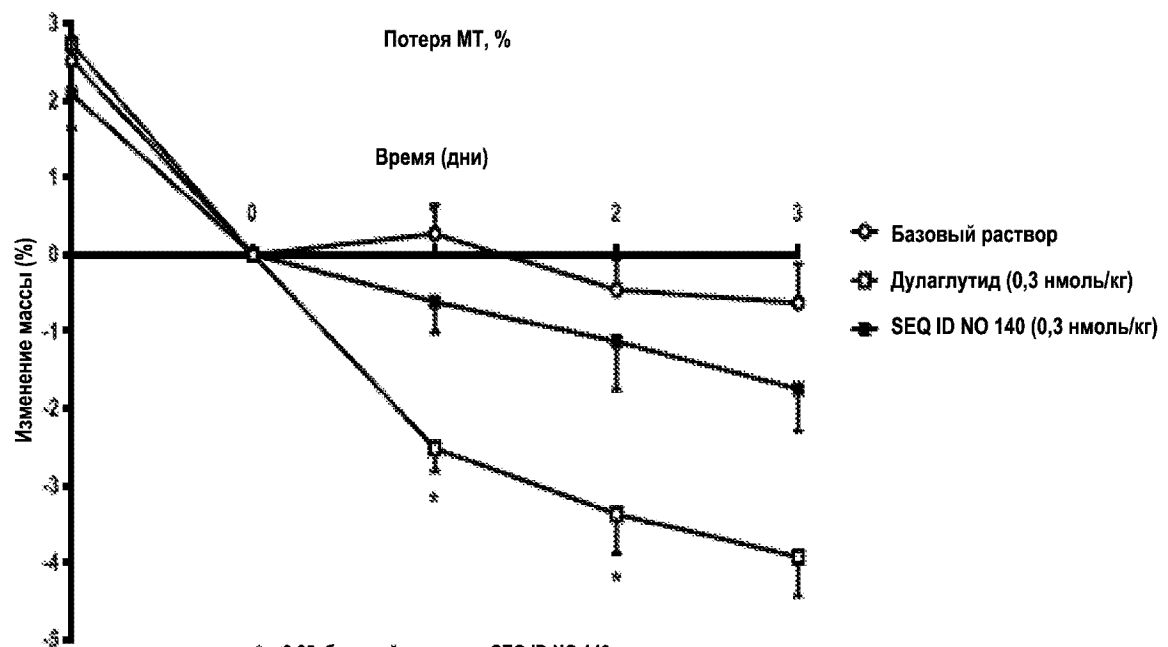


ФИГ. 9В



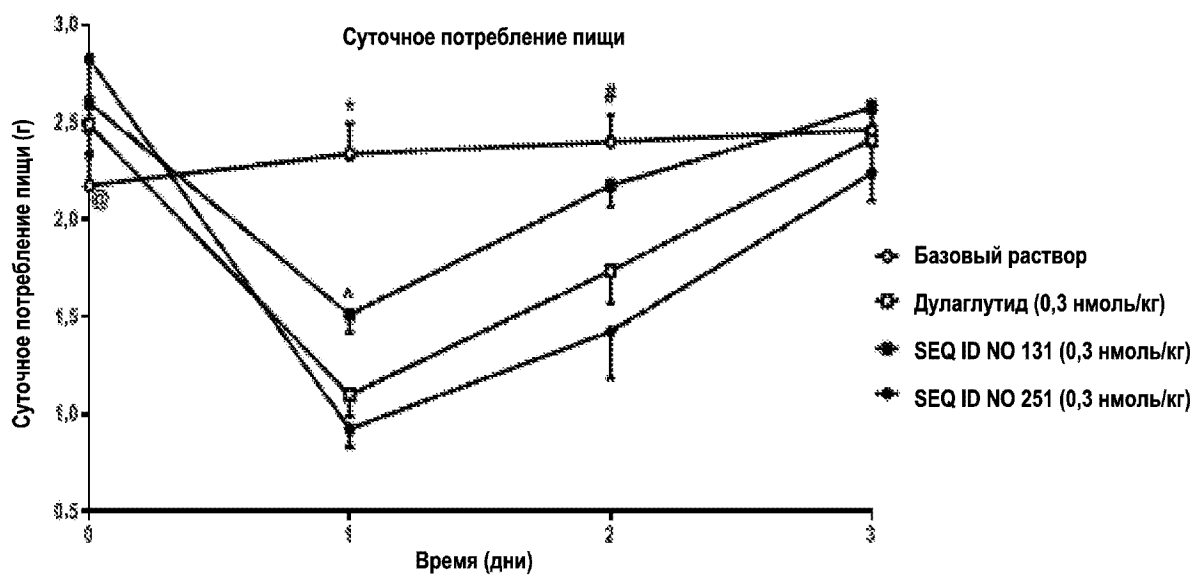
* $p < 0,05$, базовый раствор и SEQ ID NO 140
 Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 10А



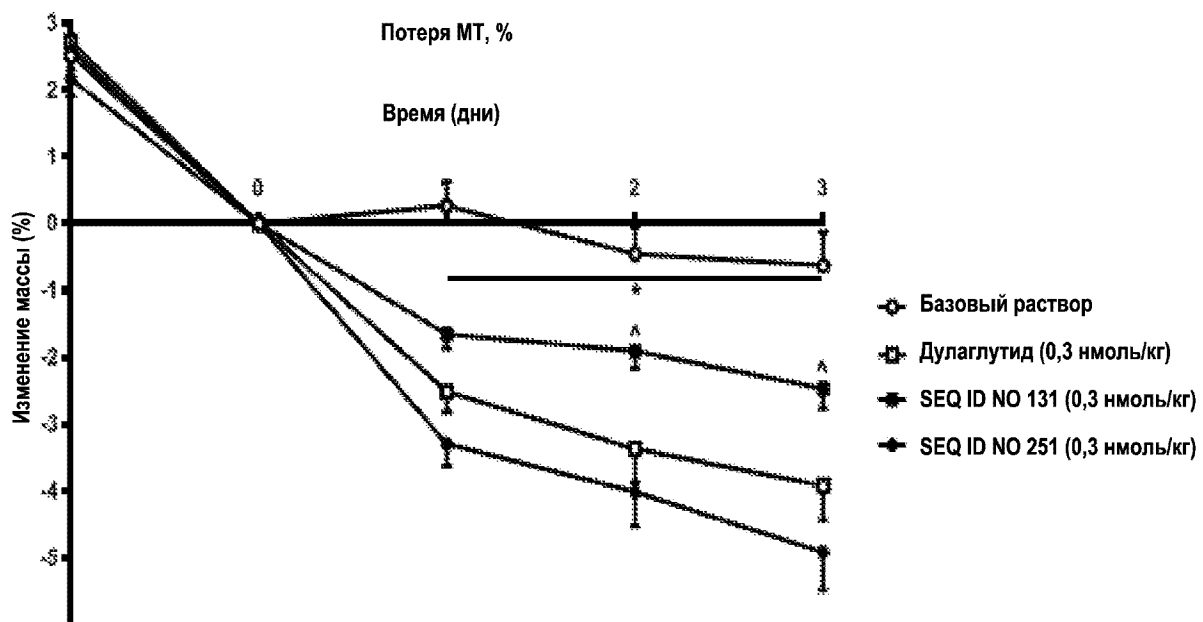
* $p < 0,05$, базовый раствор и SEQ ID NO 140,
 Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 10В



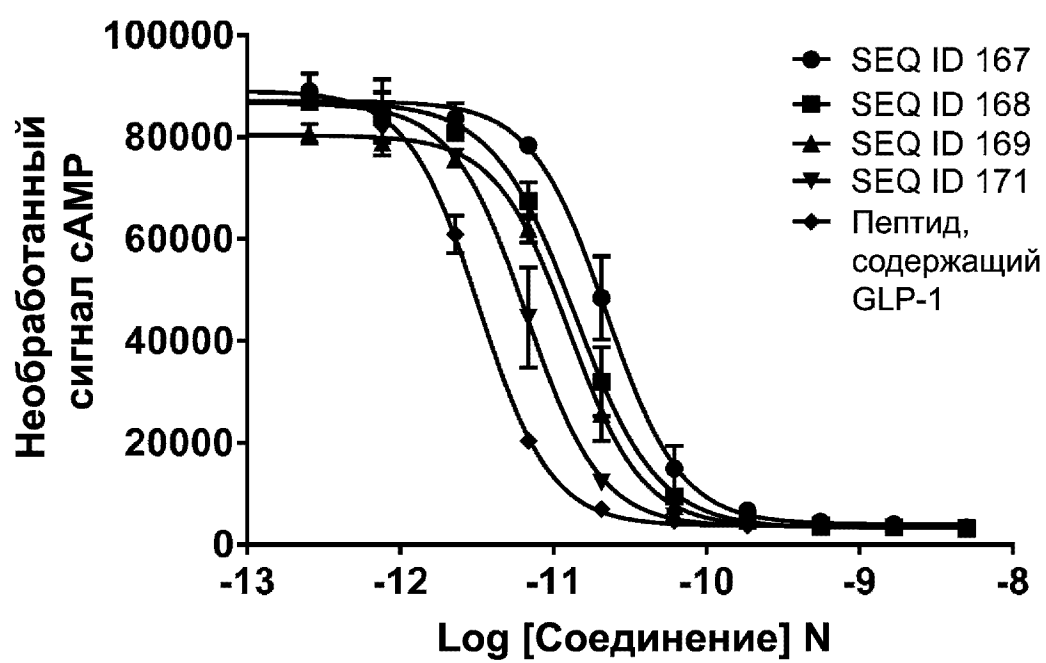
* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению со всеми группами,
 $\wedge p < 0,05$, SEQ ID NO 131 по сравнению с SEQ ID NO 251
 $\# p < 0,05$ базовый раствор по сравнению с дулаглутидом и SEQ ID NO 251,
 $@ p < 0,05$, базовый раствор по сравнению с SEQ ID NO 251
 Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 11А



* $p < 0,05$, базовый раствор по сравнению со всеми группами,
 $\wedge p < 0,05$, SEQ ID NO 131 по сравнению с дулаглутидом и SEQ ID NO 251
 Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

ФИГ. 11В



ФИГ. 12