

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292453** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.11.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.10.26**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 38/22* (2006.01)  
*A61K 38/26* (2006.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*C07K 16/24* (2006.01)  
*C07K 14/575* (2006.01)  
*A61P 3/04* (2006.01)  
*A61P 3/06* (2006.01)  
*A61P 3/08* (2006.01)

---

(54) **ИММУНОГЛОБУЛИНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **62/413,586; 62/413,613**

(32) **2016.10.27**

(33) **US**

(62) **201991022; 2017.10.26**

(71) Заявитель:  
**ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)**

(72) Изобретатель:  
**Мэсилаг Марк, Патч Рэймонд Дж.,  
Чжан Жуй, Кейс Мартин А., Уолл  
Марк, Чжан Юэ-Мэй, Рангвала  
Шамина М., Леонард Джеймс Н.,  
Камачо Рауль К., Хантер Майкл  
Дж., Д'Акуино Катарин Э., Эдвардс  
Уилсон, Свенсон Рональд В., Цзянь  
Вэньин, Чи Эллен (US)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к платформе в виде моноклонального антитела, выполненной с возможностью связывания с терапевтическими пептидами для увеличения периода полужизни терапевтического пептида у пациента. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям и способам их применения.

---

**A1**

**202292453**

**202292453**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### ИММУНОГЛОБУЛИНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

#### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Настоящее изобретение относится по существу к новому антителу или его фрагментам и их применению в качестве носителей, связывающихся с терапевтическим пептидом для увеличения периода полужизни терапевтического пептида в условиях *in vivo*. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям и способам их применения.

#### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/413,613, поданной 27 октября 2016 г., и предварительной заявке на патент США № 62/413,586, поданной 27 октября 2016 г. Каждое описание полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

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 «PRD3459 Sequence Listing» и датой создания 23 октября 2017 г. и имеющий размер 20 кб. Перечень последовательностей, представленный с помощью EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки. В случае возникновения любого несоответствия в отношении структур для SEQ ID NO: 1-27 между информацией, описанной в настоящем документе, и перечнем последовательностей, представленным в электронном виде с помощью EFS Web с именем файла «PRD3459 Sequence Listing», приоритет будет иметь информация, приведенная в настоящем документе.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Терапевтические средства на основе пептида часто изучают и разрабатывают из-за их способности обеспечивать специфичность и селективность согласно подтверждениям многими одобренными вариантами лечения на основе пептидов, однако их относительно короткие периоды полужизни в условиях *in vivo*

накладывают ограничения на способы их применения. Оценено и используется множество стратегий продления периода полужизни терапевтических средств на основе пептида. Антитела или фрагменты антител использовали в качестве групп, продлевающих период полужизни фармакологически активных групп, для предотвращения или замедления быстрого разрушения фармакологически активных групп в условиях *in vivo*.

[0005] Существует потребность в усовершенствованном иммуноглобулине, который можно использовать в качестве фармакологически неактивной продлевающей период полужизни группы для фармакологически активной группы, предпочтительно в терапевтических средствах на основе пептида.

[0006] 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.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 и 21 соответственно.

[0008] В предпочтительном варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14. Выделенное моноклональное антитело изобретения более предпочтительно содержит тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и

легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15.

[0009] Изобретение также относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения; вектору, предпочтительно экспрессионному вектору, содержащему нуклеиновую кислоту; и клетке-хозяину, содержащей вектор. Кроме того, предложен способ получения выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изобретения, при этом способ содержит этапы, на которых: культивируют клетку-хозяина изобретения в условиях, позволяющих получать моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и восстанавливают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из клетки или культуры.

[0010] Варианты осуществления изобретения включают моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения, конъюгированный с по меньшей мере одной фармакологически активной группой, предпочтительно терапевтическим пептидом, напрямую или посредством линкера. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения может быть конъюгирован с любым терапевтическим пептидом. Примеры терапевтического пептида включают, без ограничений, оксинтомодулин, глюкагоноподобный пептид 1 (GLP1), пептид тирозин-тирозин (PYY), эксендин (эксенатид), амилин (прамлинтид), альфа-меланоцитстимулирующий гормон (MSH), кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт (CART), антагонисты рецептора Y1 нейропептида Y (NPY1), антагонисты рецептора Y5 нейропептида Y (NPY5), нейротензин S, нейропептид B, нейропептид W, грелин, бомбезиноподобный рецептор 3 (BRS3), галанин, холецистокинин (CCK), орексин, меланин-концентрирующий гормон (MCH), окситоцин и стресскопин.

[0011] Кроме того, предложен способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изобретения, конъюгированного с терапевтическим пептидом, включающий реагирование электрофила, предпочтительно бромацетамида или малеимида, введенного в боковую цепь

терапевтического пептида, с сульфгидрильной группой, предпочтительно сульфгидрильной группой цистеинового остатка SEQ ID NO: 18, моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, с образованием таким образом ковалентной связи между терапевтическим пептидом и моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0012] Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения, конъюгированный с по меньшей мере одной фармакологически активной группой, предпочтительно терапевтическим пептидом, напрямую или посредством линкера, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0013] Другой общий аспект изобретения относится к способу увеличения периода полужизни терапевтического пептида у субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: происходит конъюгация терапевтического пептида с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 и 21 соответственно, причем терапевтический пептид конъюгирован с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в сульфгидрильной группе, предпочтительно сульфгидрильной группе цистеинового остатка SEQ ID NO: 18.

[0014] Дополнительные аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут более понятны после прочтения представленного ниже подробного описания изобретения и формулы изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0015] 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.

[0016] На **фиг. 1** показана общая стратегия конъюгации пептида с mAb в соответствии с вариантом осуществления изобретения. **X** представляет собой электрофил, введенный в боковую цепь терапевтического пептида, такой как бромацетамид или малеимид, который сайт-специфически реагирует с сульфгидрильной группой цистеинового остатка, искусственно внедренного в CDR увеличивающего период полужизни mAb, с образованием ковалентной связи между терапевтическим пептидом и mAb.

[0017] На **фиг. 2** показано краткое представление остатков CDR, выбранных для замены в RH9H5\_VH (SEQ ID NO: 4) и в RH9L3\_VL (SEQ ID NO: 3). Остатки, замещенные цистеином, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

[0018] На **фиг. 3** показана структура соединения 1 (SEQ ID NO: 2).

[0019] На **фиг. 4** показана фармакокинетика соединения 1 у мышей DIO.

[0020] На **фиг. 5** показана фармакокинетика соединения 1 у яванских макаков.

[0021] На **фиг. 6** представлено потребление пищи мышами DIO, получавшими лечение соединением 1: острое дозирование.

[0022] На **фиг. 7** показана потеря веса у мышей DIO, получавших лечение соединением 1: острое дозирование.

[0023] На **фиг. 8** представлено потребление пищи мышами DIO, получавшими лечение соединением 1: хроническое дозирование.

[0024] На **фиг. 9** показана потеря веса у мышей DIO, получавших лечение соединением 1: хроническое дозирование.

[0025] На **фиг. 10** показана схема реакции для получения соединения моноклонального антитела с оксинтомодулином (mAb-OXM) в соответствии с вариантом осуществления изобретения. Верхняя реакция представляет собой восстановление дисульфида в Cys102 mAb (например, MSCB97). Нижняя реакция представляет собой конъюгирование восстановленного mAb с вариантом пептида OXM. R представляет собой цистеин или глутатион. Cys102 в тяжелой цепи MSCB97 показан вместе с фланкирующими аминокислотами в виде однобуквенных кодов. OXM относится к аминокислотной части

варианта пептида. Показаны Aib2, Lys30 и спейсер в виде бромацетилированного дискретного полиэтиленгликоля (dPEG) 12. His1 mAb показан в виде однобуквенного кода.

[0026] На **фиг. 11** показана структура соединения 2 (SEQ ID NO: 27).

[0027] На **фиг. 12** показан график, демонстрирующий функциональную стабильность соединения 2 в плазме человека в течение 168 часов. Процентные доли, нормализованные к нулевой временной отметке ( $t=0$ ), соединения 2, представляющего собой конъюгат аналога пептида OXM с mAb▲, контроля 1, который, как ранее было показано, стабилен в плазме человека в условиях *ex vivo*, контроля 2, который, как ранее было показано, нестабилен в плазме  $\lambda$  и  $\square$  человека в условиях *ex vivo*, и соединения 3 (mAb, конъюгированное с H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRARDFVEWLLNK-(COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>NHCOCH<sub>2</sub>Br)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 25)) и соединения 4 (mAb, конъюгированное с H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRARDFVEWLLNTK-(COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>NHCOCH<sub>2</sub>Br)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 26))▼, представляющих собой конъюгаты дополнительного аналога пептида OXM с mAb, в зависимости от времени в часах (ч) по оси X.

[0028] На **фиг. 13** показан график, демонстрирующий функциональную стабильность соединения 2 в плазме обезьяны в течение 168 часов. Процентные доли, нормализованные к нулевой временной отметке ( $t=0$ ), соединения 2 ▲, контроля 1, который, как ранее было показано, стабилен в плазме человека в условиях *ex vivo*, контроля 2, который, как ранее было показано, нестабилен в плазме  $\lambda$  и  $\square$  человека в условиях *ex vivo* соединения 3 и соединения 4 ▼, представляющих собой конъюгаты дополнительного аналога пептида OXM с mAb, в зависимости от времени в часах (ч) по оси X.

[0029] На **фиг. 14** показан график, демонстрирующий изменение потребления пищи яванскими макаками, получавших лечение соединением 2.

[0030] На **фиг. 15** показан график, демонстрирующий изменение массы тела яванских макаков, получавших лечение соединением 2.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0031] 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 настоящего 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.

[0032] 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.

[0033] 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.

[0034] 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.

[0035] 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.

**[0036]** 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).

**[0037]** 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.

[0038] Термины «идентичный» или процентная «идентичность» в контексте двух или большего числа нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, циклических полипептидных последовательностей РУУ<sub>3-36</sub>) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании, обеспечивающих максимальное соответствие, по результатам измерения с применением одного из алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального контроля с помощью способов, известных в данной области техники, относящихся к настоящему описанию.

[0039] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают испытуемую 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.

[0040] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Appl. 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)).

**[0041]** Примерами алгоритмов, приемлемых для определения процентной идентичности последовательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в работе Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализов общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации.

**[0042]** 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, как описано ниже.

**[0043]** В настоящем документе термин «субъект» 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.

**[0044]** Термин «введение» применительно к способам изобретения означает способ терапевтического или профилактического предотвращения, лечения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания, как описано в настоящем документе, посредством применения конъюгата изобретения или его

формы, композиции или лекарственного средства. Такие способы включают введение эффективного количества указанного конъюгата, формы конъюгата, 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.

[0045] Термин «эффективное количество» означает такое количество активного конъюгата 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 предотвращение, лечение или облегчение синдрома, расстройства или заболевания, на которые направлено лечение, или симптомов синдрома, расстройства или заболевания, на которые направлено лечение.

[0046] 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.

[0047] 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 антитело изобретения может быть связано с интересующим пептидом с образованием связанного с антителом пептида. Связанный с антителом пептид может быть образован путем проведения специфических химических реакций, предназначенных для конъюгирования антитела с пептидом. В определенных вариантах осуществления антитело изобретения может быть ковалентно связано с пептидом изобретения посредством линкера. Линкер может быть, например, сначала ковалентно

соединен с антителом или пептидом, а впоследствии ковалентно соединен с пептидом или антителом.

**[0048]** При использовании в настоящем документе термин «линкер» относится к химическому модулю, содержащему ковалентную или атомарную цепь, которая ковалентно соединяет пептид с антителом. Линкер может, например, включать, без ограничений, пептидный линкер, углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (PEG) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер, гибридный линкер, состоящий из PEG и внедренного гетероцикла, и углеводородную цепь. ПЭГ-линкеры могут, например, содержать 2–24 ПЭГ-звеньев.

**[0049]** При использовании в настоящем документе термин «конъюгат» относится к антителу или его фрагменту, ковалентно связанному с фармацевтически активной группой. Термин «конъюгированный с» относится к антителу или его фрагменту изобретения, ковалентно связанному или ковалентно соединенному с фармацевтически активной группой, предпочтительно терапевтическим пептидом, напрямую или посредством линкера. В качестве не имеющего ограничительного характера примера антитело может представлять собой моноклональное антитело изобретения, а фармацевтически активная группа может представлять собой терапевтический пептид, такой как циклический РУУ, пептид оксинтомодулин или любой другой интересующий терапевтический пептид. Фармацевтически активная группа может также представлять собой непептидную органическую группу (т. е. «малую молекулу»). В настоящем описании в отношении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с вариантом осуществления изобретения фраза «конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтически активная группа (или терапевтический пептид), конъюгированная с ним», используется взаимозаменяемо с фразой «антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с фармацевтически активной группой (или терапевтическим пептидом)».

**[0050]** 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.

### **Антитела**

[0051] В одном общем аспекте изобретение относится к новому антителу, которое было сконструировано как ненацеленное и содержащее цистеиновый остаток, имеющий возможность применения для химической конъюгации (т. е. связывания) с фармацевтически активной группой, такой как терапевтический пептид (например, циклический пептид RYY, оксинтомодулин или вариант пептида и т. п.), сайт-специфическим образом так, что связанный с антителом пептид имеет удлиненный/увеличенный период полужизни по сравнению с неконъюгированным пептидом. При использовании в настоящем документе термин «ненацеленный» в контексте антитела относится к антителу, которое специфически не связывается с какой-либо мишенью в условиях *in vivo*. При использовании в настоящем документе антитело, которое «специфически связывается с мишенью» означает антитело, которое связывается с целевым антигеном с KD, равной  $1 \times 10^{-7}$  или менее, предпочтительно  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно  $5 \times 10^{-9}$  М или менее,  $1 \times 10^{-9}$  М или менее,  $5 \times 10^{-10}$  М или менее, или  $1 \times 10^{-10}$  М или менее. Термин KD означает константу диссоциации, которая представляет собой отношение Kd к Ka (т. е. Kd/Ka) и выражается в молярной концентрации (М). Значения KD для антител можно определять, используя способы данной области техники, относящиеся к настоящему описанию. Например, KD антитела может быть определена с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с помощью системы биодатчиков, например системы Biacore®, или с использованием технологии интерферометрии биослоев, например системы Octet RED96. Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с целевым антигеном.

[0052] Моноклональные антитела (полные или их фрагменты) можно использовать в качестве группы, увеличивающей период полужизни. Моноклональные антитела представляют собой хорошо изученные белки, которые используются и описаны для использования в условиях *in vivo*, и поэтому механизмы, которые

обеспечивают их длительный период полужизни в условиях *in vivo*, и механизмы их разрушения в условиях *in vivo*, хорошо известны. Кроме того, пространственное разделение и представление двух «плеч» моноклонального антитела может быть преимущественным для эффективного двухвалентного представления терапевтической группы (т. е. терапевтического пептида). Разработаны терапевтические средства, в которых токсины или другие низкомолекулярные лекарственные средства химически связаны с моноклональным антителом, но в них, как правило, использовано моноклональное антитело, которое связывается со специфическим антигеном и нацеливает конъюгат лекарственного средства с антителом на интересующую ткань/клетку, которая предпочтительно экспрессирует антиген, и, как правило, лекарственное средство/малая молекула присоединены к антителу способом, который не влияет на связывание антигена с антителом.

[0053] Для терапевтических конъюгатов пептид-mAb антиген-специфическое связывание моноклональным антителом, увеличившим период полужизни, является нежелательным. В связи с этим пара переменных (V) доменов тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), которые не должны специфически связываться с какой-либо мишенью, использованы для получения способного связываться, ненацеленного моноклонального антитела изобретения. Для получения способного связываться, ненацеленного моноклонального антитела цистеиновый остаток встраивают в одну из определяющих комплементарность областей (CDR) выбранного ненацеленного антитела. Фармацевтически активная группа (например, терапевтический пептид/соединение) может содержать подходящую химическую группу для обеспечения конъюгации фармацевтически активной группы со встроенным цистеиновым остатком ненацеленного моноклонального антитела. Общая стратегия конъюгации пептида с моноклональным антителом в соответствии с вариантом осуществления изобретения показана на Фиг. 1.

[0054] Термин «антитела» в настоящем документе используется в широком смысле и включает нечеловеческие (например, мышьиные, крысиные), человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты

антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также одноцепочечные антитела.

[0055] Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ). Соответственно, антитела изобретения могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела изобретения включают константные области тяжелой и/или легкой цепи, например, мышинных или человеческих антител. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т. е. определяющие комплементарность области 1-3; (CDR1, CDR2 и CDR3)). Домены варибельной области легкой цепи альтернативно называются LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

[0056] Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgG является наиболее стабильным из пяти типов иммуноглобулинов. причем период полужизни в сыворотке у людей составляет около 23 дней. IgA и IgG дополнительно классифицируют как изоформы IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Каждый из четырех подклассов IgG имеет различные биологические функции, известные как эффекторные функции. Эти эффекторные функции, как правило, опосредованы через взаимодействие с Fc-рецептором (FcγR) или путем связывания C1q и фиксации комплемента. Связывание с FcγR может приводить к антителозависимому клеточно-опосредованному цитолизу, тогда как связывание с факторами комплемента может приводить к комплемент-опосредованному лизису клеток. Антитело изобретения, используемое в связи с его способностью увеличивать период полужизни терапевтического пептида, не обладает или обладает минимальной эффекторной функцией, но сохраняет

способность связываться с FcRn, связывание с которым может быть основным способом, с помощью которого антитела увеличивают период полужизни в условиях *in vivo*.

**[0057]** В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область легкой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, и переменную область тяжелой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, за исключением HCDR3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически не связывается с каким-либо человеческим антигеном в условиях *in vivo*. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область легкой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, и переменную область тяжелой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, за исключением HCDR3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически не связывается с каким-либо человеческим антигеном в условиях *in vivo*, причем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связан с фармацевтически активной группой (например, циклическим пептидом PYY, пептидом оксинто модулином и/или терапевтическим пептидом изобретения).

**[0058]** При использовании в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело,

двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и сегмент Fd (т. е. участок тяжелой цепи, который включен в Fab-фрагмент). В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

[0059] При использовании в настоящем документе термин «одноцепочечное антитело» относится к стандартному для данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом размером от около 15 до около 20 аминокислот. При использовании в настоящем документе термин «однодоменное антитело» относится к стандартному для данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

[0060] Словосочетание «выделенное антитело или фрагмент антитела» означает антитело или фрагмент антитела, по существу свободный от других антител, имеющих отличающиеся антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с целевым антигеном, по существу свободно от антител, которые специфически не связываются с целевым антигеном). Более того, выделенное антитело или фрагмент антитела может быть по существу свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0061] Переменная область антитела состоит из «каркасной» области, разделенной тремя «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов: (i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), на основании переменности последовательностей (Wu and Kabat, J

Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) «гипервариабельные участки», HVR или HV – три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3) – обозначают участки переменных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk Mol Biol 196:901-17, 1987). Другие термины включают «IMGT-CDR» (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) и «использование остатков, определяющих специфичность» (SDRU) (Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.mgt.org>) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

**[0062]** Термины «каркас» или «каркасные последовательности» представляют собой остаточные последовательности переменной области, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Так как антигенсвязывающие сайты, как описано выше, могут определяться различными терминами, точная аминокислотная последовательность каркаса зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

**[0063]** В одном варианте осуществления изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21 соответственно, и переменную область тяжелой цепи, имеющую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно.

**[0064]** В другом варианте осуществления выделенное антитело дополнительно содержит Fc-область, полученную 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, выделенное антитело 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, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, Md., NIH Publication no. 91-3242). 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.

**[0065]** Антитело 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.

**[0066]** В другом варианте осуществления удален C-концевой остаток лизина в тяжелой цепи, что часто наблюдается в полученных путем рекомбинации моноклональных антителах.

**[0067]** Термин «антитело человека» относится к антителу, имеющему переменные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

**[0068]** Человеческое антитело содержит переменные области тяжелой или легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если переменные области антитела получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулина. Такие системы включают

библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши, несущих локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. Антитело человека может содержать аминокислотные отличия по сравнению с зародышевой линией человека или перестроенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, соматическими мутациями природного происхождения или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, антитело человека по меньшей мере на около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческой зародышевой линии или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях человеческое антитело может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000, или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO2009/085462). Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

[0069] Выделенные антитела в соответствии с вариантом осуществления изобретения могут быть синтетическими. Антитела, хотя и полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека, могут быть созданы с применением таких систем, как фаговый дисплей, включая синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антител, что приводит к получению антител, которые в естественных условиях не входят в репертуар антител человека зародышевой линии в условиях *in vivo*.

[0070] Термин «рекомбинантное антитело» в настоящем документе включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, например

антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или из полученной из него гибридомы, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые включают сплайсинг генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* с помощью обмена плеч Fab.

**[0071]** Термин «моноклональное антитело» в настоящем документе относится к препарату молекул антитела одномолекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела отображает одинарную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или в случае биспецифического моноклонального антитела двойную специфичность связывания к двум отдельным эпитопам. Моноклональные антитела изобретения можно получать с использованием гибридного способа, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов одиночных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

**[0072]** В определенных вариантах осуществления термин mAb относится к моноклональному антителу. В одном варианте осуществления mAb имеет последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 12, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 14. В определенных вариантах осуществления mAb представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело, имеющее последовательность тяжелой цепи (HC), содержащую SEQ ID NO: 13, и последовательность легкой цепи (LC), содержащую SEQ ID NO: 15. В определенных вариантах осуществления остаток лизина в положении 446 в SEQ ID NO: 13 необязательно

отсутствует.

[0073] При использовании в настоящем документе термин «хиимерное антитело» относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Варибельная область легкой и тяжелой цепей часто соответствует варибельной области антитела, полученного из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), имеющего желаемые специфичность, аффинность и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного из другого вида млекопитающего (например, человека), для предотвращения возникновения иммунного ответа у данного вида.

[0074] При использовании в настоящем документе термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит множество последовательностей варибельного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность варибельного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания к первому эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, а вторая последовательность варибельного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и при этом первый и/или второй варибельные домены иммуноглобулина необязательно включают конъюгированную фармацевтически активную группу (например, терапевтический пептид). В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй варибельные домены иммуноглобулина включают

одну и ту же конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления первый и второй переменные домены иммуноглобулина включают различные фармацевтически активные группы. В варианте осуществления только первый переменный домен иммуноглобулина включает конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления только второй переменный домен иммуноглобулина включает конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, триспецифического антитела или тетраспецифического антитела.

**[0075]** При использовании в настоящем документе термин «биспецифическое антитело» относится к мультиспецифическому антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов и/или содержит две конъюгированные фармацевтически активные группы (например, одинаковые или различные фармацевтически активные группы). Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания к первому эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и при этом первый и/или второй переменные домены иммуноглобулина необязательно включают конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных

субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй переменные домены иммуноглобулина включают одну и ту же конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления первый и второй переменные домены иммуноглобулина включают различные фармацевтически активные группы. В варианте осуществления только первые переменные домены иммуноглобулина включают конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления только второй переменный домен иммуноглобулина включает конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления биспецифическое антитело содержит первую последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания к первому эпитопу или содержат последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и вторую последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания ко второму эпитопу или содержат последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и при этом первый и/или второй переменные домены тяжелой цепи необязательно включают конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления первый и второй переменные домены тяжелой цепи включают одну и ту же конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления первый и второй переменные домены тяжелой цепи включают различные конъюгированные фармацевтически активные группы. В варианте осуществления только первый переменный домен тяжелой цепи включает конъюгированную фармацевтически активную группу. В варианте осуществления только второй переменный домен тяжелой цепи включает конъюгированную фармацевтически активную группу.

**[0076]** Термин «полноразмерное антитело» в настоящем документе означает антитело, имеющее две полноразмерные тяжелые цепи антитела и две полноразмерные легкие цепи антитела. Тяжелая цепь (HC) полноразмерного антитела состоит из переменной

области (VH) и константных доменов (CH1, CH2 и CH3) тяжелой цепи. Легкая цепь полноразмерного антитела (LC) состоит из переменной области (VL) и константного домена (CL) легкой цепи. Полноразмерное антитело может не содержать C-концевого лизина (K) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях.

[0077] Термин «Fab-плечо» или «полумолекула» означает одну пару «тяжелая цепь – легкая цепь».

[0078] Полноразмерные биспецифические антитела можно получать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, посредством введения в CH3-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замен, способствующих образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации CH3-доменов. Восстановлены дисульфидные мостики тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидный мостик тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно происходит высвобождение CH3-доменов исходных антител и переформирование путем диссоциации-ассоциации. CH3-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждая из которых могут связываться с отдельным эпитопом.

[0079] Термин «гомодимеризация» в настоящем документе применительно к антителам обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности CH3. При использовании в настоящем документе термин «гомодимер» по отношению к антителам означает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями CH3.

[0080] При использовании в настоящем документе термин

«гетеродимеризация» по отношению к антителам означает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. При использовании в настоящем документе термин «гетеродимер» по отношению к антителам означает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

**[0081]** Для получения полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию РСТ № WO 2006/028936). Другими словами, выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S\_L368A\_Y407V.

**[0082]** Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во

втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y\_F405A\_Y407V/T394W, T366I\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, L351Y\_Y407A/T366A\_K409F, L351Y\_Y407A/T366V\_K409F, Y407A/T366A\_K409F или T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

**[0083]** В дополнение к вышеописанным способам биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде посредством введения асимметричных мутаций в СНЗ-участках двух моноспецифических гомодимерных антител и образования биспецифических гетеродимерных антител из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в публикации международной патентной заявки № WO2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют с возможностью обладания определенными заменами в домене СНЗ, способствующими стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCSEF), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH=7,0 или при pH=7,4.

**[0084]** Нумерация аминокислотных остатков в константном участке антитела в настоящем описании осуществляется в соответствии с каталогом ЕС, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), если явно не указано иное.

#### **Конъюгаты**

**[0085]** В другом общем аспекте изобретение относится к конъюгату, содержащему антитело изобретения, ковалентно конъюгированное с фармацевтически активной группой, такой как синтетический терапевтический пептид (например, циклический пептид PYY или вариант пептида оксинтомодулина), сайт-специфическим образом так, что связанный с антителом пептид имеет удлиненный/увеличенный период полужизни по сравнению с неконъюгированным пептидом. Конъюгаты используют для профилактики, лечения или облегчения заболеваний или расстройств, описанных в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, способам их получения и применения.

**[0086]** В определенных вариантах осуществления антитело изобретения модифицируют таким образом, чтобы оно содержало по меньшей мере одну замену цистеинового остатка, которая обладает возможностью конъюгирования с фармацевтически активной группой для удлинения/увеличения периода полураспада фармацевтически активной группы. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна замена цистеинового остатка содержится в определяющей комплементарности области антитела. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна замена цистеинового остатка находится в определяющей комплементарности области тяжелой цепи (HCDR). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна замена цистеинового остатка находится в HCDR3, причем HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В определенных вариантах осуществления антитело, содержащее HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, имеет по меньшей мере одну дополнительную цистеиновую замену, которая обладает возможностью конъюгирования

с фармацевтически активной группой.

**[0087]** В определенных вариантах осуществления фармацевтически активная группа может содержать линкер. Линкер можно химически модифицировать для обеспечения конъюгирования антитела с фармацевтически активной группой. Линкер может, например, включать, без ограничений, пептидный линкер, углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (PEG) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер, гибридный линкер, состоящий из PEG и внедренного гетероцикла, и углеводородную цепь. ПЭГ-линкеры могут, например, содержать 2–24 ПЭГ-звеньев.

**[0088]** В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело изобретения конъюгировано с одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью интересующими фармацевтически активными группами (например, терапевтическим (-ими) пептидом (-ами)). В предпочтительных вариантах осуществления ненацеленное моноклональное антитело конъюгировано с двумя интересующими фармацевтически активными группами. В определенных вариантах осуществления, в которых моноклональное антитело конъюгировано с по меньшей мере двумя интересующими фармацевтически активными группами, интересующие фармацевтически активные группы могут представлять собой одну и ту же фармацевтически активную группу или могут представлять собой различные фармацевтически активные группы.

**[0089]** Способы конъюгирования антител изобретения с фармацевтически активными группами изобретения известны в данной области. Другими словами, антитела изобретения можно восстанавливать с помощью восстанавливающего агента (например, TSEP (трис (2-карбоксиил) фосфин)), очищенного (например, посредством адсорбции на белке А или гель-фильтрации) и конъюгированного с фармацевтически активной группой (например, посредством добавления лиофилизированного пептида к восстановленному антителу в условиях, обеспечивающих конъюгацию). 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 антитела изобретения могут быть очищены перед восстановлением с использованием способов НИС. Более подробное описание способов конъюгации приведено, например, в примерах 3 и 7 и публикации Dennler et al., *Antibodies* 4:197–224 (2015).

[0090] Термин «гомодимеризация», используемый в настоящем документе применительно к конъюгатам, означает взаимодействие двух идентичных фармацевтически активных групп с антителом. Термин «гомодимер», используемый в настоящем документе применительно к конъюгатам, означает антитело, конъюгированное с двумя идентичными фармацевтически активными группами.

[0091] Термин «гетеродимеризация», используемый в настоящем документе применительно к конъюгатам, означает взаимодействие двух различных фармацевтически активных групп с антителом. Термин «гетеродимер», используемый в настоящем документе применительно к конъюгатам, означает антитело, конъюгированное с двумя различными фармацевтически активными группами.

#### **Циклические пептиды PYY**

[0092] PYY<sub>3-36</sub> 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 потребления пищи, а также его антисекреторные эффекты и эффекты, стимулирующие всасывание, в желудочно-кишечном тракте у млекопитающих, PYY<sub>3-36</sub> может быть эффективен при лечении ожирения и связанных с ним состояний, а также при ряде желудочно-кишечных расстройств. Однако терапевтическая полезность самого PYY<sub>3-36</sub> в качестве лечебного агента ограничена его быстрым метаболизмом и коротким периодом полужизни в кровотоке. Таким образом, антитела изобретения можно использовать в качестве носителя для PYY<sub>3-36</sub>, предпочтительно модифицированного PYY<sub>3-36</sub>, который увеличивает период полужизни пептида PYY<sub>3-36</sub> и снижает метаболизм пептида в условиях *in vivo*.

[0093] В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированные пептиды PYY<sub>3-36</sub> представляют собой циклические пептиды PYY. Термины «циклический пептид PYY», «циклический

аналог PYY<sub>3-36</sub>» и «циклический аналог пептида PYY<sub>3-36</sub>» можно использовать взаимозаменяемо. Примеры циклических пептидов PYY, которые можно использовать в конъюгатах, описаны в предварительной заявке на патент США № 62/413,613, поданной 27 октября 2016 г., и в заявке на патент США № \_\_\_\_\_ под названием «Cyclic peptide tyrosine tyrosine compounds as modulators of neuropeptide receptors», поданной в тот же день, что и настоящая заявка с номером досье патентного поверенного № PRD3411, содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[0094] Примеры конъюгатов, содержащих антитело изобретения и циклический пептид PYY, описаны в предварительной заявке на патент США № 62/413,586, поданной 27 октября 2016 г., и в заявке на патент США № \_\_\_\_\_ под названием «Antibody coupled cyclic peptide tyrosine tyrosine compounds as modulators of neuropeptide Y receptors», поданной в тот же день, что и настоящая заявка с номером досье патентного поверенного № PRD3436, содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Например, в циклических пептидах PYY N-концевой аминокислотный остаток цикла связан посредством своей функциональной  $\alpha$ -аминогруппы со связующей группой, которая, в свою очередь, соединяется с остатком боковой цепи аминокислоты в положении 31 пептида NTSC-PYY. Остатки лизина могут быть введены в различные положения последовательности hPYY<sub>3-36</sub> для обеспечения удобной функциональной подцепи для дополнительной дериватизации. Лизиновые остатки можно модифицировать как для прямого, так и для непрямого связывания с моноклональным антителом. В непрямом связывании с моноклональным антителом лизиновый остаток можно модифицировать таким образом, чтобы он содержал линкер, который позволит связать циклический пептид PYY с моноклональным антителом. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в качестве таковых можно также эффективно использовать соответствующие ортологи, рассмотренные в настоящем документе.

#### **Пептиды оксинтомодулина**

[0095] Оксинтомодулин (ОХМ) представляет собой пептид из 37 аминокислот, секретируемый энтероэндокринными L-клетками в

кишечнике. Благодаря своей агонистической активности в отношении рецептора GLP-1 (GLP1R) и рецептора глюкагона (GCGR), ОХМ усиливает функцию  $\beta$ -клеток, снижает потребление пищи и повышает расход энергии. Посредством этих комплементарных механизмов ОХМ-опосредованное снижение веса может быть выше по сравнению с присутствующими в настоящее время на рынке агонистами GLP1R. ОХМ может также снижать уровень холестерина и триглицеридов в плазме. Период полужизни ОХМ у людей очень мал, приблизительно несколько минут (Schjoldager et al., Eur. J. Clin. Invest. 18(5):499-503 (1988)). Таким образом, вариант осуществления изобретения относится к конъюгату, содержащему антитело изобретения, ковалентно связанное с оксинтомодулином для обеспечения двойных агонистических свойств оксинтомодулина и удлиненного периода полужизни, достаточного для реализации дозирования один раз в неделю.

[0096] Увеличение периода полужизни пептида получают за счет обеспечения пептида ОХМ устойчивостью к протеолизу и путем сокращения клиренса из плазмы. Например, протеолиз посредством DPP4 подавляли путем замены серина в положении 2 аминокислотой (Aib). Спиральную конфигурацию пептида стабилизировали путем введения раздвоенного солевого мостика от Q20R к S16E и Q24E, а потенциальную подверженность окислению уменьшали путем замены метионина 27 лейцином. Продолжительность существования пептида в кровотоке увеличивали за счет ковалентного присоединения моноклонального антитела (mAb). Такие конъюгаты антитела с лекарственным средством способны показывать длительные периоды полужизни в плазме за счет своего размера, который может сокращать гломерулярную фильтрацию, и за счет рециркуляции посредством неонатального Fc-рецептора. Между mAb и пептидом располагали короткий олигоэтиленгликолевый спейсер для обеспечения беспрепятственного доступа пептида к GCGR и GLP1R.

[0097] В соответствии с вариантами осуществления изобретения оксинтомодулиновый конъюгат изобретения обладает четырьмя характеристиками. (А) Двойной агонизм: оксинтомодулиновые конъюгаты обладают двойным агонизмом к рецепторам GLP-1 и глюкагона. (В) Рецепторный баланс:

оксинтомодулиновые конъюгаты не имеют чрезмерного смещения активности в отношении GLP1R или GCGR, поскольку чрезмерное смещение в отношении GLP1R может привести к конъюгации, при которой при увеличении воздействия развиваются GLP-1-опосредованные нежелательные явления со стороны ЖКТ перед взаимодействием с целевыми GCGR, а чрезмерное смещение к GCGR может уменьшать гликемическую эффективность. (C)

**Биораспределение:** оксинтомодулиновые конъюгаты имеют умеренное смещение активности в отношении рецептора GLP-1 (по сравнению с неконъюгированным оксинтомодулином) с целью достижения целевого взаимодействия с периферическими GCGR и центральными, модулирующими потребление энергии, GLP1R при аналогичных уровнях воздействия. (D) **Дозирование** один раз в неделю: оксинтомодулиновые конъюгаты являются конкурентоспособными за счет возможности их введения нуждающемуся в этом субъекту один раз в неделю.

#### **Другие терапевтические пептиды**

**[0098]** В настоящем документе также предложены конъюгаты, содержащие другие пептиды, которые обладают возможностью конъюгирования с платформой моноклонального антитела, описанной в настоящем документе. Пептиды могут, например, быть выбраны из группы, состоящей из глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), эксендина (эксенатид), амилина (прамлинтид), альфа-меланоцитстимулирующего гормона (MSH), кокаин- и амфетамин-регулируемого транскрипта (CART), антагонистов рецептора Y1 нейропептида Y (NPY1), антагонистов рецептора Y5 нейропептида Y (NPY5), нейротензина S, нейропептида B, нейропептида W, грелина, бомбезиноподобного рецептора 3 (BRS3), галанина, холецистокинина (ССК), орексина, меланин-концентрирующего гормона (MCH), окситоцина и стресскопина.

**[0099]** Глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1) представляет собой пептидный гормон длиной 30 аминокислот, полученный в результате тканеспецифической посттрансляционной обработки гена проглюкагона. Выработку и секрецию GLP-1 осуществляют некоторые кишечные энтероэндокринные L-клетки и некоторые нейроны при потреблении пищи. Первоначальный продукт GLP-1 (1-37)

восприимчив к амидированию и протеолитическому расщеплению, что приводит к образованию двух усеченных форм с одинаковой биологической активностью: амида GLP-1 (7-36) и GLP-1 (7-37). Эндогенный GLP-1 быстро разрушается посредством множества путей, главным образом дипептидилпептидазой 4 (DPP-4 или DPP-IV), но также нейтральной эндопептидазой 24.11 (NEP 24.11) и посредством почечного клиренса, за счет чего получают период полужизни приблизительно 2 минуты. Способы лечения на основе GLP-1 связаны со снижением веса и уменьшением рисков гипогликемии, что важно при лечении диабета II типа.

**[00100]** Эксендин (эксенатид) представляет собой агонист GLP-1, который относится к группе миметиков инкретина, которые были утверждены для лечения сахарного диабета II типа (T2DM). Эксенатид представляет собой синтетическую версию эксендина-4 (39-аминокислотный пептидный гормон), который представляет собой стимулятор секреции инсулина с глюкорегуляторными эффектами. Эксендин-4 имеет обширную гомологию и схожие функции с GLP-1 млекопитающего, но обладает терапевтическим преимуществом, так как он устойчив к разрушению посредством DPP-4 (DPP-IV), что позволяет получать более длительный фармакологический период полужизни. Из-за биологических характеристик эксендина-4 рассматривают возможности его применения в качестве способа лечения T2DM.

**[00101]** Амилин (островковый амилоидный полипептид (IAPP)) представляет собой 37-аминокислотный пептидный гормон, секретлируемый вместе с инсулином из панкреатических  $\beta$ -клеток. Амилин оказывает влияние на регуляцию гликемии посредством замедления опорожнения желудка и стимуляции чувства насыщения. Амилин (IAPP) образуется из 89-аминокислотного пептида. Предшественник островкового амилоидного полипептида (proIAPP) образуется в панкреатических  $\beta$ -клетках из 89-аминокислотного пептида и после отщепления 22-аминокислотного сигнального пептида представляет собой 67-аминокислотный пептид. Считается, что нарушение обработки proIAPP может приводить к возникновению условий, провоцирующих появление диабета II типа, поскольку отсутствие продукции амилина (IAPP) может способствовать

исчезновению контроля уровня глюкозы. Прамлинтид представляет собой амилиномиметический агент и обладает активностью, по меньшей мере такой же как у человеческого амилина. Он представляет собой 37-аминокислотный полипептид и отличается от аминокислотной последовательности человеческого амилина заменой аминокислот на пролин в положениях 25 (аланин), 28 (серин) и 29 (серин). Пролины представляют собой вариации природного происхождения, встречающиеся в крысином амилине. В результате этих замен прамлинтид является растворимым, неадгезивным и неагрегирующим, таким образом преодолевая ряд физико-химических недостатков нативного человеческого амилина (Janes et al., Diabetes 45(Suppl 2):235A (1996); Young et al., Drug Dev. Res. 37:231-48 (1996b)).

**[00102]**  $\alpha$ -меланоцитстимулирующий гормон ( $\alpha$ -MSH) представляет собой эндогенный пептидный гормон и нейропептид семейства меланокортина.  $\alpha$ -MSH является наиболее важным из меланоцитстимулирующих гормонов (MSH) при стимулировании меланогенеза, который представляет собой процесс у млекопитающих, ответственный за пигментацию волос и кожи.  $\alpha$ -MSH также играет роль в пищевом поведении, энергетическом гомеостазе, половой активности и защите от ишемического и реперфузионного повреждения.

**[00103]** Кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт (CART) представляет собой нейропептид, кодируемый геном CARTPT у людей. Пептиды CART, в частности CART (55-102), предположительно выполняют важную функцию в регулировании гомеостаза энергии, так как пептиды CART взаимодействуют с несколькими гипоталамическими контурами аппетита. Экспрессию CART регулируют периферические пептидные гормоны, участвующие в регуляции аппетита, которые включают лептин, холецистокинин и грелин. CART и холецистокинин оказывают синергетическое действие на регуляцию аппетита. Считается, что пептиды CART оказывают влияние на тревожное поведение, вызванное отменой этанола; модулируют локомоторные эффекты, условные рефлексы на место и эффект самостоятельного введения кокаина психостимуляторов; подавляют потребление пищи; и участвуют в тревожном и гиперэмплексическом поведении.

Снижение активности CART в гипоталамусе связано с гиперфагией и увеличением веса, и считается, что CART участвует в опиоидном мезолимбическом дофаминовом контуре, который модулирует процессы естественного вознаграждения.

**[00104]** Нейропептид Y (NPY) играет множество ролей в организме, которые включают, например, контроль за пищевым поведением, корковую нейрональную активность, сердечную активность и эмоциональное регулирование. NPY также связан с некоторыми человеческими заболеваниями, включая ожирение, алкоголизм и депрессию. Кроме того, блокада центральных действий NPY при помощи антител к NPY, антисмысловых олигонуклеотидов к NPY и антагонистам рецепторов NPY приводит к снижению потребления пищи у животных, лишенных энергии. В частности, показано, что рецептор Y5 нейропептида Y (NPY5) и рецептор Y1 нейропептида Y (NPY1) стимулируют различные фазы кормления (*Br J Pharmacol.* 2003 Aug;139(8):1433-40). Таким образом, антагонисты NPY5 и NPY1 могут быть эффективными при лечении ожирения и других родственных метаболических заболеваний.

**[00105]** Нейротензин представляет собой 13-аминокислотный нейропептид, который участвует в регуляции высвобождения лютеинизирующего гормона и пролактина и имеет сильную взаимосвязь с дофаминергической системой. Нейротензин распределен по всей центральной нервной системе, причем наивысшие уровни находятся в гипоталамусе, миндалевидном теле и прилежащем ядре. Нейротензин способен индуцировать различные эффекты, в том числе анальгезию, гипотермию, повышение локомоторной активности, и участвует в регулировании дофаминовых путей.

**[00106]** Нейропептид В (NPВ) представляет собой короткий биологически активный пептид, предшественник которого закодирован геном NPB. NPВ может действовать посредством двух связанных с G-белком рецепторов, называемых нейропептидными рецепторами В/В 1 и 2 (NPBWR1 и NPBWR2). Считается, что нейропептид В связан с регулированием кормления, нейроэндокринной системы, памяти, обучения и афферентного

болевого пути.

**[00107]** Нейропептид W (NPW) существует в двух формах, состоящих из 23 (NPW23) или 30 (NPW30) аминокислот. Эти нейропептиды связываются и действуют посредством двух связанных с G-белком рецепторов NPBWR1 (также известен как GPR7) и NPBWR2 (также известен как GPR8). Показано, что NPW подавляет потребление пищи и массу тела и увеличивает как продукцию тепла, так и температуру тела, что указывает на функционирование NPW в качестве эндогенной катаболической сигнальной молекулы.

**[00108]** Грелин (также известный как иеноморелин (INN)) представляет собой пептидный гормон, продуцируемый грелинергическими клетками в желудочно-кишечном тракте, который функционирует как нейропептид в центральной нервной системе. Грелин играет роль в регулировании аппетита, регулировании распределения и скорости использования энергии, регулировании восприятия вознаграждения в дофаминовых нейронах. Грелин закодирован геном GHRL, и считается, что он образуется при расщеплении препрогрелина, который расщепляется с получением прогрелина, который расщепляется с образованием 28-аминокислотного грелина. В отличие от других эндогенных пептидов грелин способен проникать через гематоэнцефалический барьер, за счет чего экзогенно вводимый грелин приобретает уникальный клинический потенциал.

**[00109]** Бомбезиноподобный рецептор 3 (BRS3) представляет собой связанный с G-белком рецептор, который взаимодействует только с бомбезиновыми пептидами природного происхождения с низкой аффинностью, и, поскольку он не имеет высокоаффинного лиганда, BRS3 классифицируют как сиротский рецептор.

**[00110]** Галанин представляет собой нейропептид, кодируемый геном GAL. Галанин обширно экспрессируется в головном мозге, спинном мозге и кишечнике людей, а также других животных. Функции галанина еще полностью не изучены; тем не менее галанин главным образом участвует в модуляции и ингибировании потенциалов действия в нейронах. Галанин был вовлечен во многие биологически различные функции, включая, без ограничений, ноцицепцию, регулирование пробуждения и сна, когнитивную

функцию, кормление, регулирование настроения и регулирование кровяного давления. Галанин часто локализован совместно с классическими нейромедиаторами, такими как ацетилхолин, серотонин и норэпинефрин, а также с нейромодуляторами, такими как нейропептид Y, вещество P и вазоактивный кишечный пептид.

**[00111]** Холецистокинин (ССК) представляет собой пептидный гормон системы желудочно-кишечного тракта, ответственный за стимулирование расщепления жира и белка. ССК синтезируется и секретруется энтероэндокринными клетками в тонком кишечнике, и его присутствие вызывает высвобождение пищеварительных ферментов и желчи из поджелудочной железы и желчного пузыря. ССК отвечает за пищеварение, чувство насыщения и тревогу.

**[00112]** Орексин (также называемый гипокретином) представляет собой нейропептид, который регулирует активацию, бодрствование и аппетит. Существует два типа орексина: орексин А и В (гипокретин-1 и -2), которые имеют длину 33 и 28 аминокислот соответственно. Сначала считали, что система орексина участвует в стимуляции потребления пищи, и в дополнение к описанным выше функциям, орексины регулируют расход энергии и модулируют висцеральную функцию.

**[00113]** Меланин-концентрирующий гормон (MCH) представляет собой циклический 19-аминокислотный орексигенный гипоталамический пептид, который, как считается, участвует в регулировании пищевого поведения, настроения, циклов сна и бодрствования и энергетического баланса. Нейроны, экспрессирующие MCH, расположены в пределах латерального гипоталамуса и неопределенной зоны, и, несмотря на такую ограниченную локализацию, нейроны MCH имеют разветвленную сеть отростков по всему головному мозгу.

**[00114]** Окситоцин представляет собой пептидный гормон и нейропептид, который обычно продуцируется паравентрикулярным ядром гипоталамуса и высвобождается задней долей гипофиза. Считается, что окситоцин играет роль в формировании социальных связей, половом размножении, а также во время и после родов. Окситоциновый рецептор представляет собой связанный с G-белком рецептор, которому необходимы магний и холестерин и который

относится к группе связанных с G-белком рецепторов родопсинового типа (класс I).

[00115] Человеческий стресскопин (h-SCP) представляет собой 40-аминокислотный пептид, который является членом семейства кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ). Биологическое действие пептидов семейства КРГ обусловлено двумя 7-трансмембранными G-протеинсвязанными рецепторами, рецептором КРГ 1-го типа (CRHR1) и рецептором КРГ 2-го типа (CRHR2). Несмотря на то что для рецепторов характерна высокая гомология последовательности, различные пептиды семейства КРГ демонстрируют существенные различия относительных значений аффинности связывания, степени активации рецептора и селективности к этим двум рецепторам. В отличие от многих пептидов семейства КРГ, h-SCP демонстрирует большую селективность к CRHR2 и выступает в качестве посредника, способствующего ослаблению процессов развития и поддержания физиологического стресса. Помимо очевидного влияния на формирование состояния физиологического стресса, также есть свидетельства, что из-за h-SCP возникает некоторое число иных физиологических действий. Он оказывает воздействие на эндокринную, центральную нервную, сердечно-сосудистую, легочную, желудочно-кишечную, почечную, скелетно-мышечную и воспалительную системы. CRHR2 также играет роль в развитии заболеваний, связанных с атрофией скелетных мышц, таких как саркопения, влияет на двигательную активность и потребление пищи, вызывает кардиопротекторный эффект и проявляет бронхорелаксирующую и противовоспалительную активность. Кроме того, выявлены миметики стресскопина, используемые для лечения заболеваний, опосредованных активностью рецептора 2 кортикотропин-рилизинг-гормона; см., например, заявку на патент США №: 20100130424.

#### **Фрагменты, продлевающие период полужизни**

[00116] В дополнение к антителу настоящего изобретения или его антигенсвязывающему фрагменту конъюгаты изобретения могут включать одну или более других групп для увеличения периода полужизни фармацевтически активной группы, 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 могут быть введены в конъюгаты изобретения, включают, например, молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например лаурат, мирилат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандикарбоновая кислота, тетрадекадикарбоновая кислота, октадекадикарбоновая кислота, докозандикарбоновая кислота и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлоза, олиго- или полисахариды) для получения желаемых 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.

[00117] 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.

[00118] 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 *in vitro* или *in vivo* и сравнивать.

#### **Фармацевтические композиции**

[00119] В другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгаты изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтическая композиция» в контексте настоящего документа означает продукт, содержащий конъюгат изобретения, вместе с фармацевтически

приемлемым носителем. Конъюгаты изобретения и содержащие их композиции можно также использовать для получения лекарственного средства для терапевтических областей применения, упомянутых в настоящем документе.

[00120] 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. В контексте настоящего документа 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 использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела.

[00121] 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, сахариновую или трифторуксусную кислоту.

**[00122]** 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.

**[00123]** 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 группы, состоящей из буферной системы, консерванта (-ов), агента (-ов), регулирующего (-их) тоничность, хелатирующего (-их) агента (-ов), стабилизатора (-ов) и поверхностно-активного (-ых) вещества (веществ).

**[00124]** 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.

**[00125]** 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.

**[00126]** В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию можно готовить в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, посредством шприца или инфузионного насоса. Инъекция может быть, например, доставлена подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутривенно.

**[00127]** 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.

**[00128]** 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.

**[00129]** В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, внутривенно или сублингвально.

**[00130]** 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 рН состава равен от около 3,0 до около 7,0.

**[00131]** В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буферный раствор. Не имеющие ограничительного характера примеры буферных растворов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бицин, 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.

**[00132]** В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Не имеющие ограничительного характера примеры буферных растворов включают хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксибензоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксибензоат, имидомочевину, метил-4-гидроксибензоат, фенол, 2-феноксиэтанол, 2-фенилэтанол, пропи-4-гидроксибензоат, 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.

**[00133]** В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит изотонический агент. Неограничивающие примеры данного варианта осуществления 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, гидроксипропилкрахмал 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. Фармацевтические композиции, содержащие каждый изотонический агент, указанный в данном параграфе, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения. 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.

**[00134]** 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.

**[00135]** 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.

**[00136]** 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-метилтиоэтанол, 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.

**[00137]** 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 группы, состоящей 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.

**[00138]** В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или более ингибиторов протеазы, таких как, например, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) 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.

**[00139]** 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 (таким 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.

**[00140]** Специалисту в данной области также очевидно, что терапевтически эффективная доза конъюгатов настоящего изобретения или их фармацевтической композиции будет варьироваться в зависимости от желаемого эффекта. Следовательно, специалист в данной области может легко определить оптимальные дозы для введения, и они будут варьироваться в зависимости от конкретного применяемого конъюгата, способа введения, концентрации препарата и степени прогрессирования состояния заболевания. Кроме того, факторы, связанные с конкретным субъектом, получающим лечение, включая возраст субъекта, массу

тела, рацион питания и время введения, приводят к необходимости корректировки дозы до соответствующего терапевтического уровня.

**[00141]** Для всех указаний конъюгаты изобретения предпочтительно вводят периферически в дозе от около 1 мкг до около 5 мг в сутки в однократных или разделенных дозах (например, однократную дозу можно разделять на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 поддоз) или от около 0,01 мкг/кг до около 500 мкг/кг, более предпочтительно от около 0,05 мкг/кг до около 250 мкг/кг, наиболее предпочтительно ниже около 50 мкг/кг. Дозировки в этих диапазонах будут различаться по активности каждого агониста, и специалист в данной области может легко определять их. Следовательно, приведенные выше дозы представляют собой примеры для среднего случая. Несомненно, возможны индивидуальные случаи, требующие применения более высоких или более низких диапазонов доз, которые входят в объем данного изобретения.

**[00142]** В определенных вариантах осуществления конъюгаты изобретения вводят в дозе от около 1 мкг до около 5 мг или в дозе от около 0,01 мкг/кг до около 500 мкг/кг, более предпочтительно в дозе от около 0,05 мкг/кг до около 250 мкг/кг, наиболее предпочтительно в дозе ниже около 50 мкг/кг с дозой второго терапевтического агента (например, лираглутид) в дозе от около 1 мкг до около 5 мг или в дозе от около 0,01 мкг/кг до около 500 мкг/кг, более предпочтительно в дозе от около 0,05 мкг/кг до около 250 мкг/кг, наиболее предпочтительно в дозе около 50 мкг/кг.

**[00143]** 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.

**[00144]** Фармацевтические композиции изобретения можно вводить любыми способами, подходящими для намеченной цели. Примеры включают парентеральное, подкожное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, 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.

**[00145]** 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.

**[00146]** Конъюгаты настоящего изобретения могут дополнительно существовать в одной или более полиморфных или аморфных кристаллических формах, и подразумевается, что они включены в объем 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 обладает возможностью выделения, например, если одна или более молекул растворителя включены в кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. 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.

[00147] 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 предотвращения 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.

[00148] В другом варианте осуществления изобретение относится к конъюгатам изобретения для применения в качестве лекарственного средства.

[00149] 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.

[00150] 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  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (D) и  $^3\text{H}$  (T). Аналогично ссылки на углерод и кислород охватывают  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ , и  $^{14}\text{C}$ , и  $^{16}\text{O}$ , и  $^{18}\text{O}$  соответственно. Изотопы могут быть радиоактивными или

нерадиоактивными. Содержащие радиоактивную метку конъюгаты изобретения могут содержать радиоактивный изотоп, выбранный из группы, состоящей из  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{122}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$  и  $^{82}\text{Br}$ . Радиоактивный изотоп предпочтительно выбран из группы, состоящей из  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$  и  $^{18}\text{F}$ .

**[00151]** 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.

**[00152]** 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.

**[00153]** 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  $^1\text{H}$  ЯМР, приводящие к появлению сложных мультиплетов и объединению пиков на спектре  $^1\text{H}$  ЯМР.

[00154] 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.

#### **Способы применения**

[00155] 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 нуждающегося в этом субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: вводят нуждающемуся в этом субъекту эффективное количество конъюгата или фармацевтической композиции изобретения.

[00156] В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние может представлять собой любое заболевание, расстройство или состояние, которое может быть излечено пептидом или соединением, обладающим возможностью связывания с платформой в виде моноклонального антитела настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления заболевание расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей 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.

[00157] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которое является достаточным 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 симптома, связанного с ним; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) регрессия причины заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) предотвращение развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) предотвращение повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости субъекта с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или симптомом, связанным с ним; (xi) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (-их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

[00158] 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.

[00159] 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 субъекта, но может быть видимым у субъекта. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также относиться к провоцированию регрессии, предотвращению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, предотвращению 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 предотвращению рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у субъекта.

[00160] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения ожирения или любого одного или более симптомов ожирения у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: вводят нуждающемуся в этом субъекту эффективное количество конъюгата или фармацевтической композиции изобретения. В некоторых вариантах осуществления масса тела

субъекта 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 субъекта перед введением любого из конъюгатов, фармацевтических композиций, форм или лекарственных средств изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными субъектами, не получающими любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

[00161] 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.

[00162] В настоящем изобретении предложен способ предотвращения, лечения, задержки возникновения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания или любого одного или более симптомов указанного синдрома, расстройства или заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем упомянутый синдром, расстройство или заболевание выбраны из группы, состоящей 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, 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, неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и экземы, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества конъюгата или фармацевтической композиции изобретения.

**[00163]** В контексте настоящего документа метаболический синдром относится к субъекту, имеющему любое одно или более из следующего: высокий уровень сахара в крови (например, высокий уровень сахара в крови в состоянии натощак), 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 пламиногена плазмы и фибриногена (т. е. протромботическое состояние).

**[00164]** В настоящем изобретении предложен способ снижения потребления пищи у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: вводят нуждающемуся в этом субъекту эффективное количество конъюгата или фармацевтической композиции изобретения. В некоторых вариантах осуществления потребление пищи субъектом 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 субъектом до введения любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными субъектами, не получающими любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

**[00165]** 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.

**[00166]** В настоящем изобретении предложен способ снижения гликированного гемоглобина (A1C) у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: вводят нуждающемуся в этом субъекту эффективное количество конъюгата или фармацевтической композиции изобретения. В некоторых вариантах осуществления A1C субъекта 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 субъекта перед введением любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными субъектами, не получающими любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

[00167] В других вариантах осуществления предложены способы снижения уровней глюкозы в крови натощак у нуждающегося в этом субъекта, причем способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества конъюгата или фармацевтической композиции изобретения. Уровни глюкозы в крови 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 натощак у субъекта до введения любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными субъектами, не получающими любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

[00168] В настоящем изобретении предложен способ модуляции активности рецептора Y2 у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: вводят нуждающемуся в этом субъекту эффективное количество конъюгата или фармацевтической композиции изобретения. В контексте настоящего документа термин «модулирование» относится к увеличению или уменьшению активности рецептора.

[00169] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество конъюгата изобретения или его формы, композиции или

лекарственного средства вводят нуждающемуся в этом субъекту 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 изобретения или его формы, композиции или лекарственного средства вводят нуждающемуся в этом субъекту 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.

**[00170]** 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 нуждающегося в этом субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: вводят нуждающемуся в этом субъекту эффективное количество конъюгата 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.

**[00171]** В настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения субъекту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии.

**[00172]** При использовании в настоящем документе термин «комбинированная терапия» относится к введению нуждающемуся в этом субъекту одного или более дополнительных терапевтических агентов или проведению для нуждающегося в этом субъекта одной или более хирургических терапий одновременно с введением эффективного количества конъюгата 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 изобретения.

**[00173]** В определенных вариантах осуществления, в которых заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета типа II, метаболического синдрома, резистентности к инсулину и дислипидемии, второе терапевтический агент может представлять собой противодиабетический агент. В определенных вариантах осуществления противодиабетический агент может представлять собой модулятор рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1).

**[00174]** Настоящее изобретение также предусматривает профилактику, лечение, задержку возникновения или облегчение любого из заболеваний, расстройств, синдромов или симптомов, описанных в настоящем документе, у нуждающегося в этом субъекта с помощью комбинированной терапии, которая включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества конъюгата 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 глюкозата (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, карбутаид 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 изобретения. В некоторых вариантах осуществления при использовании в комбинации с конъюгатом изобретения дополнительный (-ые) терапевтический (-ие) агент (-ы) можно применять в меньших дозах по сравнению с использованием каждого по отдельности.

**[00175]** В определенных вариантах осуществления, в которых заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета типа I или типа II, метаболического синдрома (т. е. синдрома X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной врожденным гиперинсулинизмом (CHI), 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, второй терапевтический агент может представлять собой лираглутид.

**[00176]** Настоящее изобретение предусматривает предотвращение, лечение, отсрочку возникновения или облегчение любого из заболеваний, расстройств, синдромов или симптомов, описанных в настоящем документе, у нуждающегося в этом субъекта с помощью комбинированной терапии, которая включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества конъюгата 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

гастрэктомии; регулируемое бандажирование желудка; билиопанкреатическое шунтирование с исключением двенадцатиперстной кишки; внутрижелудочный баллон; пликацию желудка; и их комбинации).

[00177] В вариантах осуществления, в которых один или более дополнительных терапевтических агентов вводят в тот же день, что и эффективное количество конъюгата изобретения, конъюгат или соединение изобретения можно вводить перед или одновременно с дополнительным терапевтическим агентом или после него. Применение термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором лекарственные средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить перед (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 нуждающемуся в этом субъекту или одновременно с таким введением.

#### **ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

[00178] В настоящем изобретении также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

[00179] Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область легкой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, и переменную область тяжелой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, за исключением HCDR3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически не связывается с каким-либо человеческим антигеном в условиях *in vivo*.

[00180] Вариант осуществления 2 представляет собой

выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, причем выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 и 21 соответственно.

**[00181]** Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2, причем выделенное моноклональное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

**[00182]** Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело по любому одному из вариантов осуществления 1–3, дополнительно содержащее Fc-участок.

**[00183]** Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело по варианту осуществления 4, в котором Fc-участок дополнительно содержит Fc-область, полученную из Fc-области человеческого IgG4.

**[00184]** Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело по варианту осуществления 5, в котором Fc-область человеческого IgG4 имеет замены, которые исключают эффекторную функцию.

**[00185]** Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело по варианту осуществления 6, причем выделенное моноклональное антитело дополнительно содержит модифицированную Fc-область человеческого IgG4, содержащую по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из замены пролина на глутамат в положении 233, аланина или валина на фенилаланин в положении 234, аланина или глутамата на лейцин в положении 235, аланина на аспарагин в положении 297.

**[00186]** Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело по варианту осуществления 6

или 7, в котором Fc-область человеческого IgG4 содержит замену серина на пролин в положении 228.

[00187] Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело по любому одному из вариантов осуществления 4–8, содержащее тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15.

[00188] Вариант осуществления 10 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1–9.

[00189] Вариант осуществления 11 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 10.

[00190] Вариант осуществления 12 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор по варианту осуществления 11.

[00191] Вариант осуществления 13 представляет собой способ получения выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, при этом способ содержит этапы, на которых: культивируют клетку-хозяина по варианту осуществления 12 в условиях, позволяющих получать моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и восстанавливают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из клетки или культуры.

[00192] Вариант осуществления 14 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1–9, дополнительно содержащее по меньшей мере одну конъюгированную с ним фармакологически активную группу.

[00193] Вариант осуществления 15 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 14, в котором фармакологически активная группа представляет собой терапевтический пептид.

[00194] Вариант осуществления 16 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент по варианту осуществления 15, в котором терапевтический пептид конъюгирован с цистеиновым остатком SEQ ID NO: 18.

[00195] Вариант осуществления 17 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 15 или 16, в котором терапевтический пептид конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера.

[00196] Вариант осуществления 18 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 17, в котором линкер представляет собой пептидный линкер, углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (PEG) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер или гибридный линкер, состоящий из PEG и встроенного гетероцикла.

[00197] Вариант осуществления 19 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 15–18, в котором терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из оксинтомодулина, глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), пептида тирозин-тирозина (PYY), эксендина (эксенатид), амилина (прамлинтид), альфа-меланоцитстимулирующего гормона (MSH), кокаин- и амфетамин-регулируемого транскрипта (CART), антагонистов рецептора Y1 нейропептида Y (NPY1), антагонистов рецептора Y5 нейропептида Y (NPY5), нейротензина S, нейропептида B, нейропептида W, грелина, бомбезиноподобного рецептора 3 (BRS3), галанина, холецистокинина (CCK), орексина, меланин-концентрирующего гормона (MCH), окситоцина и стресскопина.

[00198] Вариант осуществления 20 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 19, в котором терапевтический пептид представляет собой оксинтомодулин, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

[00199] Вариант осуществления 21 представляет собой конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с терапевтическим пептидом оксинтомодулином, причем конъюгат имеет структуру SEQ

ID NO: 27, как показано на Фиг. 11, при этом mAb представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым одним из вариантов осуществления 1-9, а ]<sub>2</sub> показывает, что 1 или 2 из терапевтических пептидов оксинтомодулина ковалентно конъюгированы с mAb.

[00200] Вариант осуществления 22 представляет собой способ получения выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому одному из вариантов осуществления 15-21, включающий реагирование электрофила, предпочтительно бромацетамида или малеимида, введенного в боковую цепь терапевтического пептида, с сульфгидрильной группой цистеинового остатка SEQ ID NO: 18 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, с образованием таким образом ковалентной связи между терапевтическим пептидом и моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[00201] Вариант осуществления 23 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 14-21 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00202] Вариант осуществления 24 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 14-21, при этом способ содержит этапы, на которых: комбинируют моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[00203] Вариант осуществления 25 представляет собой набор, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-9 и 14-21.

[00204] Вариант осуществления 26 представляет собой способ увеличения периода полужизни терапевтического пептида у субъекта, при этом способ содержит этапы, на которых: происходит конъюгация терапевтического пептида с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим определяющую

комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 и 21 соответственно, причем терапевтический пептид конъюгирован с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в цистеиновом остатке SEQ ID NO: 18.

**[00205]** Вариант осуществления 27 представляет собой способ по варианту осуществления 26, в котором терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из оксинтомодулина, глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), пептида тирозин-тирозина (PYU), эксендина (эксенатид), амилина (прамлинтид), альфа-меланоцитстимулирующего гормона (MSH), кокаин- и амфетамин-регулируемого транскрипта (CART), антагонистов рецептора Y1 нейропептида Y (NPY1), антагонистов рецептора Y5 нейропептида Y (NPY5), нейротензина S, нейропептида B, нейропептида W, грелина, бомбезиноподобного рецептора 3 (BRS3), галанина, холецистокинина (ССК), орексина, меланин-концентрирующего гормона (MCH), окситоцина и стресскопина.

**[00206]** Вариант осуществления 28 представляет собой способ по варианту осуществления 27, в котором терапевтический пептид представляет собой оксинтомодулин.

**[00207]** Вариант осуществления 29 представляет собой способ по п. 28, в котором оксинтомодулин имеет полипептидную последовательность SEQ ID NO: 24.

**[00208]** Вариант осуществления 30 представляет собой способ по любому одному из вариантов осуществления 25-29, в котором моноклональное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12.

**[00209]** Вариант осуществления 31 представляет собой способ по любому одному из пп. 25-30, в котором моноклональное антитело содержит тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13.

**[00210]** Вариант осуществления 32 представляет собой способ по любому одному из вариантов осуществления 25-31, в котором моноклональное антитело содержит переменный домен легкой цепи

(VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

**[00211]** Вариант осуществления 33 представляет собой способ по любому одному из вариантов осуществления 25–32, в котором моноклональное антитело содержит легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15.

**[00212]** Вариант осуществления 34 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18, причем выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают возможностью связывания с терапевтическим пептидом.

#### **ПРИМЕРЫ**

##### **Пример 1. Определение подлинности и получение mAb MSCB97**

**Выбор PH9L3 VL и PH9H5 VH в качестве исходных переменных областей для конструирования**

**[00213]** Переменная область легкой цепи (VL) антитела PH9L3 (SEQ ID NO: 3) (Teplyakov et al., «Structural diversity in a human antibody germline library», mAbs Aug-Sep 8(6):1045–63 (2016)) и переменная область тяжелой цепи (VH) PH9H5 (SEQ ID NO: 4) (Teplyakov et al., «Structural diversity in a human antibody germline library», mAbs Aug-Sep 8(6):1045–63 (2016)) были выбраны в качестве исходных переменных областей для конструирования mAb, пригодных для конъюгации с пептидом. PH9L3 состоит полностью из человеческих последовательностей гена зародышевой линии переменной области Ig и поэтому не содержит каких-либо мутаций последовательностей, полученных в процессе созревания аффинности в условиях *in vivo*, что обеспечивает высокоаффинное антиген-специфическое связывание. CDR3 PH9H5 является единственным сегментом, который не состоит из человеческих последовательностей гена зародышевой линии переменной области в этой VH. CDR3 (SEQ ID NO: 5) PH9H5 идентична CDR3 антитела к человеческому CCL2 (CNTO 888, нейтрализующее антитело к CCL2); см., например, US 20100074886 A1, соответствующее описание CNTO 888 полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Получали Fab, содержащий пару PH9H5/PH9L3 VH/VL.

[00214] Последовательности PH9L3, PH9H5 и человеческие последовательности зародышевой линии V-области и J-области, с которыми они наиболее схожи, выравнивали для определения идентичности или сходства последовательности с последовательностями зародышевой линии. PH9H5 выравнивали с цепочкой (SEQ ID NO: 6) соединенных человеческих генов зародышевой линии Ig IGHV3-23\*01 (PubMed ID: M99660) (SEQ ID NO: 7) и человеческих IGJ1\*01 (PubMed ID: J00256) (SEQ ID NO: 8), причем единственное различие между аминокислотной последовательностью PH9H5 и соединенной человеческой последовательностью IGHV3-23\*01-IGJ1\*01 находится в участке VH CDR3, который в случае PH9H5 представлял собой SEQ ID NO: 5.

[00215] PH9L3 выравнивали с цепочкой (SEQ ID NO: 9) соединенных человеческих генов зародышевой линии Ig IGKV3-11\*01 (PubMed ID: X01668) (SEQ ID NO: 10) и IGKJ1\*01 (PubMed ID: J00242) (SEQ ID NO: 11), причем единственным различием является одно отклонение в участке соединения гена V с геном J.

**[00216] Конструирование и получение Cys-замещенных вариантов PH9H5 и PH9L3**

[00217] Варианты VH PH9H5, которые содержат одну цистеиновую замену в выбранных остатках CDR во всех трех CDR V-области, конструировали, получали и клонировали в виде полных тяжелых цепей с константной областью человеческого IgG1 в экспрессионный вектор млекопитающего-хозяина. Структуру Fab PH9H5/PH9L3 использовали для облегчения выбора остатков CDR для замены, которые более доступны для конъюгации, а в некоторых вариантах дополнительные остатки глицина (Gly) вставляли на одной из сторон введенного цистеинового остатка для потенциального увеличения доступности цистеина для конъюгации. Конструировали и получали аналогичные варианты VL PH9L3, за исключением того, что их клонировали в виде полных легких цепей с человеческой константной областью каппа в экспрессионный вектор. Всего создавали 24 экспрессионных конструкта вариантов PH9H5 с единичным цистеином и 22 экспрессионных конструкта вариантов PH9L3 с единичным цистеином. Остатки, выбранные для замены в пределах PH9H5\_VH (SEQ ID NO: 4) и в пределах PH9L3\_VL

(SEQ ID NO: 3), представлены на Фиг. 2.

**[00218]** Полученные экспрессионные конструкторы использовали для экспрессирования Cys-вариантов путем временной котрансфекции каждой конструкции Cys-варианта HC на основе PH9H5 вместе с конструкцией LC PH9L3 дикого типа или котрансфекции каждой конструкции Cys-варианта LC на основе PH9L3 вместе с конструкцией HC PH9H5 дикого типа. Для начальных пробных трансфекций использовали клетки Expi293, полученные из HEK, в качестве клетки-хозяина для экспрессии в объеме 20 мл. Большинство Cys-вариантов HC и LC демонстрировали хороший уровень экспрессии при определении на основе количественного анализа в культуре супернатанта.

**[00219]** Пять исходных Cys-вариантов HC (MSCB33–MSCB37) экспрессировали в клетках Expi293 в объеме 750 мл и очищали варианты белков. Выход после очистки и качественные свойства очищенных вариантов были практически идентичными и достаточными для использования очищенных белков в начальных реакциях конъюгации пептидов.

**[00220] Оценка конъюгации пептидов с Cys-вариантами HC на основе PH9H5**

**[00221]** Аналитическое определение массы белка MSCB33 и других вариантов белков показало наличие цистеиновых аддуктов в цистеиновых остатках, предназначенных для конъюгации (два на одном mAb), а также отсутствие лизинового остатка на C-конце HC, что обычно наблюдается в полученных путем рекомбинации моноклональных антителах. Для получения варианта mAb для конъюгации аддукты удаляли с помощью процесса восстановления, разработанного для сохранения исходных дисульфидных связей в mAb (см. пример 3). Начальные пробные конъюгации с аналогом человеческого пептида оксинтомодулина (ОХМ) (GCG Aib<sub>2</sub>, Gly<sub>16,24</sub>, Arg<sub>20</sub>, Leu<sub>27</sub>, Lys<sub>30</sub> (PEG<sub>12</sub>)-NH<sub>2</sub>) проводили малеимидным способом для всех пяти Cys-вариантов HC mAb. Эффективность конъюгации различалась между вариантами mAb, которую качественно оценивали по продуктам реакции конъюгации и относительному процентному содержанию каждого из них. По сравнению с другими I102C-вариантами, содержащими фланкирующие глициновые остатки,

наибольшую эффективность, определенную по наибольшему процентному содержанию гомодимера, наблюдали с MSCB33, а при использовании Y103C-вариантов MSCB35 или MSCB37 конъюгация была слабой или отсутствовала.

**[00222]** Несколько других Cys-вариантов HC и LC с выполненными цистеиновыми заменами в различных CDR (замена T28C, S30C и S54C в RH9H5\_VH (SEQ ID NO: 129) и замена S30C и S92C в RHrL3\_VL (SEQ ID NO: 128)) были экспрессированы в большом объеме в Expi293. Удаление цистеиновых аддуктов из этих очищенных белков путем восстановления было сложным, и эти варианты дополнительно не исследовали. В связи с проблемами, возникшими с большинством Cys-вариантов, и исходной высокой эффективностью конъюгации, наблюдаемой с I102C-вариантом RH9H5 mAb (MSCB33), усилия по разработке и дополнительному конструированию сосредоточили на данном конкретном варианте.

#### **[00223] Конструирование Fc-области MSCB33**

**[00224]** Для снижения функции Fc в условиях *in vivo* MSCB33 реконструировали с возможностью включения неактивной Fc-области человеческого IgG4\_PAA. Человеческий IgG4\_PAA имеет мутации S228P/F234A/L235A на человеческом IgG4 аллотипе nG4m(a) (на основании аллеляIGHG4\*01, определенного как указано в IMGT). Создавали экспрессионный конструктор с VH MSCB33, слитой с Fc-областью IgG4\_PAA, и использовали ее вместе с тем же экспрессионным конструктором LC, который использовали для экспрессии MSCB33, с получением IgG4\_PAA-варианта MSCB33, обозначенного как MSCB97. Аминокислотные последовательности VH, HC, VL и LC MSCB97 представлены в SEQ ID NO: 12, 13, 14 и 15 соответственно.

**[00225]** Пробную экспрессию MSCB97 проводили временно в объеме 20 мл в клетках Expi293, и этот вариант mAb имел хороший уровень экспрессии. MSCB97 очищали из большого объема клеток Expi293, в которых проводили экспрессию. Выход MSCB97 после очистки составлял 264,53 мг/л, а качество составляло 85% мономерных молекул. Выход и качество при последующих этапах экспрессии в больших объемах были такими же или лучше и указывали на стабильность, с которой может быть получено данное

mAb.

**[00226] Оценка конъюгации пептидов в основе MSCB97 и возможность проведения реакции конъюгации в различных объемах**

**[00227]** Дисульфидные связи LC-НС отличаются между изотипами IgG1 и IgG4, поэтому была изучена возможность переноса восстановления и малеимидной конъюгации с mAb IgG1 MSCB33 на mAb IgG4\_PAA MSCB97 посредством восстановления TCEP и конъюгации пробного пептида OXM-малеимида, описанного выше. Известно, что связь, образуемая при малеимидной конъюгации, потенциально обратима, поэтому адаптировали и успешно применяли способ бромацетамидной конъюгации, который приводит к созданию более стабильной связи в объеме 10 мг на основе исходного MSCB97.

**[00228]** Конъюгат MSCB97 аналога OXM GCG Aib2, Glu16,24, Arg20, Leu27, Lys30- $\epsilon$ -(PEG<sub>12</sub>)-NH<sub>2</sub> (соединение 2 - «соединение 2» и «конъюгат 2» можно использовать в данном документе взаимозаменяемо) (MSCB97, конъюгированный с H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRARDFVEWLLNTK-(COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>NHCOCH<sub>2</sub>Br)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 24) с образованием соединения 2 (Фиг. 11; SEQ ID NO: 27)), полученного с помощью бромацетамидного способа, анализировали для определения активностей GLP-1R и GCGR *in vitro*. Активности по сравнению с эталонными пептидами и эталонными неструктурированными пептидными конъюгатами были приемлемыми и схожими с таковыми конъюгата, полученного с тем же пептидом, что и в случае MSCB33 (IgG1). Это показало, что единственное различие между MSCB97 (IgG4\_PAA) и MSCB33 (IgG1), то есть различие в изотипе, не оказывает влияния на активность конъюгатов, содержащих один и тот же пептид. Кроме того, эти данные показали, что желаемые активности в условиях *in vitro* могут сохраняться в конъюгате пептид-mAb, полученном с помощью бромацетамидного способа, который обеспечивает создание стабильной *in vivo* связи. Другие аналоги OXM были также конъюгированы с MSCB97 и оценивали активности *in vitro* этих конъюгатов. Эти конъюгаты имели активности GLP-1R и GCGR, аналогичные соединению 2, что указывает на способность MSCB97 конъюгировать с различными пептидами с сохранением при этом активности пептида.

**[00229] Оценка связывания конъюгата пептид-MSCB97 с человеческим CCL2**

**[00230]** Хотя MSCB97 выбирали и конструировали с возможностью отсутствия в нем специфического связывания с антигеном, наиболее вероятным антигеном, которым mAb может связываться, является человеческий CCL2, на основании происхождения VH CDR3. Демонстрирует ли MSCB97 какое-либо специфическое связывание с CCL2, оценивали с использованием двух конъюгатов пептид-MSCB97 с аналогом пептида OXM (соединение 2) или аналогом пептида PYY (соединение 1 – «соединение 1» и «конъюгат 1» можно использовать в данном документе взаимозаменяемо).

**[00231]** Потенциальное связывание с CCL2 напрямую измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), в котором конъюгаты иммобилизовали на поверхности с использованием способа захвата антителами к Fc. В качестве положительного контроля использовали доступные в продаже мышиные mAb к CCL2, а в качестве отрицательных контролей выступали два неспецифических человеческих антитела CNTO 9412 и HN3B33. Все контроли аналогичным образом иммобилизовали на поверхности, а рекомбинантный человеческий CCL2 прогоняли над иммобилизованными конъюгатами и контролями в концентрациях до 400 нМ. На основе предварительно заданных критериев анализа наблюдали накопление CCL2, указывающее на специфическое связывание с антигеном, в положительном контроле, но не в отрицательном контроле и не в конъюгате пептид-MSCB97 (соединение 1 или 2). Это подтверждает, что MSCB97 в соответствующей терапевтической форме конъюгата пептид-mAb не имеет связывания с человеческим CCL2.

**[00232] Способ измерения связывания с использованием SPR.** Измерения связывания с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) выполняли с помощью системы ProteOn XPR36 (BioRad). Биосенсорную поверхность получали путем связывания смеси антител к Fc человеческого IgG (Jackson, кат. № 109-005-098) и антител к Fc мышиного IgG (Jackson, кат. № 315-005-046) с поверхностью чипа GLC (BioRad, кат. № 176-5011), покрытой слоем модифицированного альгинатного полимера, в соответствии с

инструкциями производителя по проведению реакции аминного сочетания. Было иммобилизовано приблизительно 5700 отвечающих единиц (RU) mAb. Эксперименты по связыванию проводили при 25 °C в подвижном буферном растворе (DPBS; 0,01% P20; 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA)). Для проведения кинетического эксперимента связывания пробы (соединение 2, соединение 1 и положительные и отрицательные контрольные mAb) захватывали с последующими введениями рекомбинантного человеческого CCL2 (Thermo, кат. № RMCР120) в концентрациях 5 (в 4-кратном последовательном разведении). Фазу ассоциации отслеживали в течение 3 минут при 50 мкл/мин с последующим 5-минутным пропуском потока буферного раствора (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали двумя 18-секундными импульсами 100 мМ Н<sub>3</sub>РO<sub>4</sub> (Sigma, кат. № 7961) при 100 мкл/мин.

**[00233]** Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения ProteOn Manager. Сначала корректировали данные по отношению к фону, используя промежуточные участки. Впоследствии выполняли двойное вычитание эталона данных посредством ввода буферного раствора вместо ввода аналитов. Предварительно установленные критерии анализа для определения специфического обнаруживаемого связывания соединения 2, соединения 1 и положительного контроля с CCL2 требовали пропорционального дозе ответа и сигнала > 10 RU при самой высокой концентрации и сигналов отрицательного контроля < 10 RU. На основании критериев анализа результаты для каждой пробы фиксировали в виде «Да» или «Нет» в отношении зависящего от дозы связывания с человеческим CCL2.

### **Пример 2. Экспрессия и очистка mAb**

**[00234]** Полностью человеческие моноклональные антитела (mAb) могут быть рекомбинантно экспрессированы в экспрессионной клетке-хозяине млекопитающего и очищены из супернатанта клеточной культуры с помощью стандартных способов, известных в данной области. Например, последовательность кДНК, кодирующую легкую (LC) и тяжелую цепи (HC) mAb, причем каждая из них включает подходящий сигнальный пептид для обеспечения секреции,

можно клонировать в отдельные экспрессионные векторы млекопитающего или в один экспрессионный вектор с помощью стандартных способов молекулярной биологии. Применяемые экспрессионные векторы могут представлять собой любые из доступных в продаже векторов, таких как pEE12.4, pCDNA™3.1(+) или pIRESpuro3 или любой нестандартный экспрессионный вектор с аналогичными функциональными возможностями. В таких векторах транскрипция каждой из тяжелой и легкой цепей mAb индуцирована любым из известных эффективных промоторов, таких как промотор hCMV-MIE. Плазмидную ДНК для трансфекции получают для отдельных экспрессионных конструкторов LC и HC или одного конструктора, экспрессирующего как LC, так и HC, с использованием стандартных способов, таких как набор QIAGEN Plasmid Midi Kit.

**[00235]** Очищенную плазмидную ДНК подготавливают для трансфекции с помощью реактива для трансфекции на основе липидов, такого как трансфекционный реагент Freestyle™ Max, следуя инструкциям производителя, и впоследствии трансфицируют в стандартную экспрессионную линию клеток-хозяев млекопитающего, такую как CHO-S или HEK 293-F. Если LC и HC mAb закодированы отдельными экспрессионными конструкторами, трансфекция этих двух конструкторов происходит одновременно. Перед трансфекцией и после нее клетки млекопитающего культивируют для поддержания или для экспрессии mAb в соответствии со стандартными способами культивирования клеток, при этом плотность клеток находится в диапазонах для поддержания, а культуральная среда для применения и другие условия культивирования клеток определяют конкретной используемой линией клеток-хозяев млекопитающего. Эти параметры, как правило, указаны поставщиком, который предоставил клеточную линию, или в научной литературе. Например, клетки CHO-S поддерживали в среде CHO Freestyle™ в суспензии с перемешиванием при 125 об./мин в увлажненном инкубаторе при температуре 37 °C и 8% CO<sub>2</sub> и разделяли, когда концентрация клеток составляла от 1,5 до 2,0 × 10<sup>6</sup> клеток в мл.

**[00236]** Супернатанты клеточной культуры из временно трансфицированных клеток млекопитающего, экспрессирующих mAb, собирали через несколько дней после трансфекции, очищали путем

центрифугирования и фильтровали. Продолжительность экспрессии для клеток CHO-S, как правило, составляет четыре дня, но может быть скорректирована и может отличаться для разных линий клетки-хозяина млекопитающего. Трансфекции больших объемов (> 10 литров) концентрируют в 10 раз с помощью концентратора, такого как Centramate. mAb очищают из осветленного супернатанта с помощью колонки с белком А для проведения аффинной хроматографии, например HiTrap MabSelect Sure, используя стандартные способы связывания mAb со смолой, содержащей белок А, промывки смолы и элюирования белка с использованием буферного раствора с низким рН. Фракции белка немедленно нейтрализовали путем элюирования в пробирки, содержащие буферный раствор с рН 7, а пиковые фракции объединяли, фильтровали и диализировали против фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), рН 7,2, в течение ночи при 4 °С. После диализа mAb снова фильтровали (фильтр с размером пор 0,2 мкм) и определяли концентрацию белка по поглощению на длине волны 280 нм. Качество очищенного белка mAb оценивали с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ, а концентрации эндотоксина измеряли с помощью анализа с лизатом амебоцитов мечехвоста (LAL). Очищенные mAb хранили при 4 °С.

**[00237] Экспрессия и очистка MSCB97 из временно трансфицированных клеток CHO**

**[00238]** MSCB97 экспрессировали в клетках ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific, г. Уолтем, штат Массачусетс, США; кат. № A29127) путем временной трансфекции клеток очищенной плазмидной ДНК экспрессионного конструкта MSCB97 в соответствии с рекомендациями производителя. Другими словами, клетки ExpiCHO-S™ поддерживали в суспензии в экспрессионной среде ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, кат. № A29100) в инкубаторе с функцией встряхивания при 37 °С, 8% CO<sub>2</sub> и 125 об./мин. Клетки пересевали таким образом, чтобы в день трансфекции можно было обеспечивать разведения до 6,0 x 10<sup>6</sup> 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 32 °С в течение пяти дней перед сбором супернатантов культуры.

[00239] Супернатанты культуры из временно трансфицированных клеток ExpiCHO S™ собирали путем осветления посредством центрифугирования (30 мин, 6000 об./мин) с последующей фильтрацией (мембрана PES 0,2 мкм, Corning). Трансфекции большого объема (от 5 до 20 литров) сначала концентрировали в 10 раз, используя систему тангенциальной проточной фильтрации Pall Centramate. К фосфатно-солевому буферному раствору Дульбекко в концентрации 10x (DPBS), 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 А (GE Healthcare; г. Литл Чалфонт, Великобритания) 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 3,5. Фракции белка немедленно нейтрализовали путем элюирования в пробирки, содержащие 2,0 М трис (гидроксиметил) аминметана (Трис), pH 7, при объеме фракции элюирования 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 SynergyHT™. 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).

### **Пример 3. Конъюгация mAb и циклических пептидов РУУ**

#### **[00240] Способ А. Частичное сокращение mAb с помощью ТСЕР**

**[00241]** Раствор mAb в концентрации 10 мг/мл в трис-ацетатном буферном растворе (20 мл, 1 мМ в ЭДТА) обрабатывали 3 эквивалентами ТСЕР. Показатель pH раствора доводили до 6 и через 1 ч при комнатной температуре (КТ) высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ХЖМС) показала, что дисульфидные аддукты в положении C102 полностью восстановлены. Восстановленное mAb очищали путем адсорбции на белке А и элюирования (4 объема колонки 100 мМ уксусной кислоты) с образованием 180 мг восстановленного mAb.

#### **[00242] Конъюгация восстановленных mAb и циклических пептидов РУУ**

**[00243]** Лиофилизированный пептид (5 экв. по отношению к mAb) добавляли к восстановленным mAb, описанным выше. ЭДТА добавляли до получения конечной концентрации 1 мМ и доводили pH до 7. Концентрацию доводили до 8 мг/мл и реакционную смесь выдерживали при осторожном перемешивании в течение 16 ч при комнатной температуре. Добавляли ТСЕР (0,5 экв. по отношению к mAb) и реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 4 ч при КТ при осторожном перемешивании, после чего количество соединений с высокой молекулярной массой (ММ) сократилось до менее 3%.

**[00244]** Реакционную смесь доводили до pH 5,5 и очищали с помощью ионообменной хроматографии на смоле CantoSP с использованием градиента от 100% А (100 мМ трис-ацетата, pH 5,5) до 100% В (100 мМ трис-ацетата, pH 5,5; 0,5 М NaCl) за 20 объемов колонки. Фракции, содержащие желаемый конъюгат, объединяли и извлекали 140 мг конъюгата, совместно элюируя небольшое количество непрореагировавшего пептида. Окончательную очистку проводили посредством адсорбции на белке А и элюирования (4 объема колонки, 100 мМ уксусная кислота). Значение pH продукта доводили до 6 с получением 120 мг конъюгата (выход 60%) с чистотой > 90% и содержанием высокомолекулярных соединений <

3%.

**[00245] Способ В**

**[00246] Очистка mAb посредством гидрофобной хроматографии (HIC)**

**[00247]** Раствор mAb 20 мг/мл в трис-ацетатном буферном растворе помещали на колонку для гидрофобной хроматографии (TOSOH TSKgel phenyl 7,5×21 см) и элюировали с линейным градиентом (0–70% В/А, растворитель А: 5% iPrOH, 1М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 мМ фосфатный буферный раствор, рН 6,0; растворитель В: 20% iPrOH, 100 мМ фосфатный буферный раствор). Пики мономеров mAb объединяли, концентрировали (5–10 мг/мл) и диализировали против 3-(N-морфолино)пропансульфонокислотного (MOPS) буферного раствора (100 мМ, рН 5,5).

**[00248] Частичное восстановление с помощью TCEP и конъюгация восстановленного mAb с аналогом пептида**

**[00249]** К очищенным mAb (27 мл, 9,28 мг/мл) добавляли 4 экв. TCEP с последующим добавлением ЭДТА (1 мМ). Через 2 ч при комнатной температуре ЖХМС показала, что дисульфидные аддукты в положении C102 были полностью восстановлены. Восстановленные mAb обрабатывали на колонке для обессоливания Zebra (7 x 10 мл, 7К MWC0, предварительное уравнивание с помощью 100 мМ MOPS, рН 5,5) для удаления освобожденных цистеинов/глутатиона. К объединенным фракциям восстановленных mAb (28 мл) добавляли раствор циклического пептида PYY в воде Milli Q (6,5 экв. по отношению к mAb, 15–20 мг/мл) с последующим добавлением ЭДТА (1 мМ). Показатель рН реакционной смеси довели до 7,2–7,4 путем добавления по каплям 1 н. NaOH. Реакционную смесь выдерживали в течение 18 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Реакционную смесь выдерживали еще в течение 12 ч после добавления дополнительных 0,5 экв. TCEP для восстановления димера mAb–mAb, образованного в ходе реакции, и обеспечения превращения в желаемый гомодимер mAb. Показатель рН реакционной смеси снижали до рН 5,5 путем добавления 2 М уксусной кислоты, и неочищенный конъюгат очищали с помощью гидрофобной хроматографии и элюировали линейным градиентом (0–100% В/А, растворитель А: 5% iPrOH, 1М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 мМ фосфатный буферный раствор, рН 6,0;

растворитель В: 20% iPrOH, 100 мМ фосфатный буферный раствор). Окончательную очистку проводили путем адсорбции на белке А (PBS) и элюирования (NaOAc, pH 3,5). Показатель pH продукта доводили до 6 и диализировали против PBS с получением конечной пробы (56%).

**[00250]** В альтернативном варианте осуществления mAb восстанавливали с помощью глутатиона и/или цистеина. После удаления восстанавливающего агента путем тангенциальной проточной фильтрации (TFF) к восстановленным mAb добавляли избыток пептида необязательно в присутствии 0,2–0,5 эквивалента TSEP.

#### **Пример 4. Исследования *in vitro***

**[00251]** Оценивали способность соединения 1 (SEQ ID NO: 2), представляющего собой моноклональное антитело, связывающееся с циклическим пептидом PYY (Фиг. 3), активировать рецепторы NPY *in vitro* в клональных клетках (НЕК или СНО), экспрессирующих рецепторы Y2 человека, крысы, мыши и макаки резус и рецепторы Y1, Y4 и Y5 человека. В эти анализы в качестве исследуемых контролей включали PYY3–36, NPY и PP.

#### **[00252] Клеточные линии**

**[00253]** Для применения в анализах с цАМФ разработали стабильные трансфицированные клональные клеточные линии, экспрессирующие рецепторы NPY. Другими словами, клеточные линии НЕК293 трансфицировали с использованием набора Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в соответствии с прилагаемым протоколом, экспрессионными плазмидами, несущими последовательности, кодирующие человеческий рецептор Y2 (учетный номер: NM\_000910.2), человеческий рецептор Y5 (учетный номер: NM\_006174.2), мышинный рецептор Y2 (учетный номер: NM\_008731) и рецептор Y2 макаки резус (учетный номер: NM\_001032832). Через сорок восемь часов после трансфекции клетки повторно высевали с селективной средой (DMEM с высоким содержанием глюкозы и 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), 50 МЕ пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия и 600 мкг/мл G418). Клетки выдерживали в селективной среде в течение 2 недель, а затем отбирали одиночные клоны с

использованием способа предельного разведения. Впоследствии трансфицированные клетки культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Cellgro), обогащенной 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой, 1%-м L-глутамином, 1%-м пируватом натрия, 1%-м пенициллином/стрептомицином и 600 мкг/мл G418.

**[00254]** Кроме того, в компании DiscoverX Corporation приобретали клеточные линии CHO-K1, экспрессирующие человеческий рецептор Y1 (кат. №: 93-0397C2) и человеческий рецептор Y4 (кат. №: 95-0087C2). Клетки DiscoverX культивировали в среде F12 (Gibco), обогащенной 10% FBS, и в условиях селекции G418 (800 мкг/мл). Крысиный рецептор Y2 экспрессировали в линии Glo-Sensor CHO-K1, полученной от компании Promega Corporation. Эти клетки были трансфицированы плазмидой цАМФ pGloSensor™-23F Camp для люминесцентного анализа цАМФ, но были протестированы и одобрены для применения в анализе цАМФ Perkin-Elmer LANCE. Крысиные клетки Y2 выращивали в среде F12 (Gibco), обогащенной 10% FBS и 800 мкг/мл G418.

**[00255]** Все клеточные линии помещали во флаконы (4×10<sup>6</sup> клеток/флакон) и хранили в жидком азоте до применения. За день до анализа флаконы размораживали и их содержимое добавляли к 15 мл подходящей среды. Клетки центрифугировали при 450 x g в течение 5 мин, супернатанты отсасывали и клетки ресуспендировали в не содержащей G418 среде с плотностью 0,2×10<sup>6</sup> клеток/мл. Клетки помещали (25 мкл/лунка) в белые 384-луночные покрытые коллагеном планшеты Bioscoat до достижения конечной плотности 5000 клеток/лунка. Планшеты с клетками инкубировали в течение ночи в увлажненном инкубаторе для тканевой культуры при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>/90% O<sub>2</sub>.

#### **[00256] Протокол эксперимента**

**[00257]** Для различных рецепторов выполняли один и тот же анализ цАМФ. Набор цАМФ LANCE (Perkin Elmer Corporation; г. Уолтем, штат Массачусетс, США) использовали во всех экспериментах для количественного определения внутриклеточных концентраций цАМФ. В день анализа клеточную среду сливали с клеток и в лунки добавляли по 6 мкл пептидов (концентрация 2X). Пептиды готовили в виде 11 разведений (начиная с 100 нМ или 10

мкМ с последовательными разведениями 1 : 3) в буферном растворе для стимуляции для оценивания ответа в зависимости от дозы. Буферный раствор для стимуляции состоит из 5 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 500 мкМ IBMX и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнка). К клеткам добавляли следующие 6 мкл буферного раствора для стимуляции, содержащего форсколин (2X, конечная концентрация 5 мкМ) и антитело к цАМФ LANCE (1 : 100). После инкубации в течение 25 минут при кт в каждую лунку добавляли 12 мкл аналитической детекционной смеси. Детекционную смесь получали путем разбавления комплексов биотин-цАМФ (1 : 750) и Europium-W8044 (1 : 2250) в детекционном буферном растворе, входящем в набор цАМФ LANCE. Планшет инкубировали в течение 2 часов при кт, а затем считывали как анализ TR-FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции с временным разрешением) на планшетном спектрофотометре Envision (возбуждение 320 нм, эмиссия 615 нм и 665 нм). Данные флуоресценции канала 1 (относительные единицы флуоресценции при 615 нм) и канала 2 (относительные единицы флуоресценции при 665 нм), а также значения их отношения экспортировали в файл Excel.

#### [00258] Анализ данных

[00259] 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. Данные анализировали с применением внутреннего программного обеспечения для анализа данных Crucible, разработанного Eudean Shaw. 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 в среде R (открытый источник <http://cran.us.rproject.org/>) реализованного отделом неклинической статистики и вычислений компании Janssen

R&amp;D.

Таблица 1. Данные in vitro

Соединение	Активность человеческой изоформы (EC <sub>50</sub> нМ)				Межвидовая активность (EC <sub>50</sub> нМ)		
	hY2	hY1	hY4	hY5	Мышиный Y2	Крысиный Y2	Y2 макаки резус
Соединение 1	0,006	> 2910	> 2910	345,7	0,004	0,04	0,004
РУУЗ-36	0,08	66,4	136,7	12,3	0,03	0,50	0,06

**Пример 5. Фармакокинетика (ФК)****[00260] ФК у мышей D10**

**[00261]** Самцов мышей D10 C57BL/6N (возраст 20 недель, 14 недель на диете с высоким содержанием жиров) приобретали в компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-ч циклом свет/темнота. Мышам давали ad libitum доступ к воде и поддерживали на диете с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet).

**[00262]** Мышам подкожно (п/к) вводили 1 мг/кг соединения 1, в каждый момент времени умерщвляли 3 животных и собирали кровь через t=4, 8, 24, 48, 72, 120 и 168 часов. Кроме того, собирали кровь 3 интактных животных. Приблизительно 300 мкл крови от каждого животного собирали через яремную вену после декапитации под газовой анестезией, индуцированной смесью 70% CO<sub>2</sub> и 30% O<sub>2</sub>. Пробы крови (приблизительно 300 мкл) собирали в покрытые КЗЕ (ЭДТА) пробирки Sarstedt Microvette®, содержащие 12 мкл (соотношение 4%) полного раствора ингибитора протеазы и 3 мкл (соотношение 1%) ингибитора DPP-IV. Пробы крови помещали на жидкий лед, а затем центрифугировали со скоростью 10 000 об./мин в течение ~ 4 минут в условиях охлаждения (~ 5 °C) для удаления клеток в течение 30 минут после сбора в каждый момент времени и всю доступную плазму переносили на 96-луночный планшет. Луночный планшет хранили на сухом льду, а затем помещали в морозильник при -80 °C. Полученные данные представлены в таблице 2 и на Фиг. 4.

**[00263] Фармакокинетика у крыс**

**[00264]** Соединение 1 вводили подкожно и внутривенно самцам крыс линии Спрег-Доули (Charles River Laboratories, г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США) с уровнем дозы 1,0 мг/кг в PBS (рН 7,0–7,6). Приблизительно 500 мкл крови собирали у трех животных в каждый момент времени через подкожную вену (t=1, 4, 24, 48, 72, 96, 168 и 240 часов после введения дозы). Через 336 часов после введения дозы собирали пробы крови через яремную вену после декапитации под газовой анестезией, индуцированной смесью 70% CO<sub>2</sub> и 30% O<sub>2</sub>. Пробы крови собирали в покрытые КЗЕ (ЭДТА) пробирки Sarstedt Microvette®, содержащие 20 мкл (соотношение 4%) полного раствора ингибитора протеазы и 5 мкл (соотношение 1%) ингибитора DPPIV. Пробы крови помещали на жидкий лед, а затем центрифугировали со скоростью 10 000 об./мин в течение ~ 4 минут в условиях охлаждения (~ 5 °С) для удаления клеток в течение 60 минут после сбора в каждый момент времени, и всю доступную плазму переносили на 96-луночный планшет. Концентрации соединения 1 измеряли с использованием способа ЖХМС, описанного ниже. Полученные данные показаны в таблице 3.

**[00265] ФК у яванского макака**

**[00266]** Все животные голодали по меньшей мере в течение восьми часов перед дозированием и первых четырех часов после сбора проб крови. Трое животных получали однократную в/в дозу 1 мг/кг соединения 1, и трое животных получали однократную п/к дозу 1 мг/кг соединения 1. Кровь собирали до введения дозы и через 1, 6, 10, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 432 и 504 часа после введения дозы. Дополнительную пробу собирали через 0,5 часа после введения дозы для в/в группы. Приблизительно 1 мл крови от каждого животного собирали в покрытые КЗЕ (ЭДТА) пробирки Sarstedt Microvette®, содержащие 4% полного раствора ингибитора протеазы и 1% ингибитора DPPIV. Пробы крови помещали на мокрый лед, а затем центрифугировали в течение 30 минут после сбора в каждый момент времени, а полученную плазму разделяли на три части и переносили в трех повторениях в 96-луночный планшет. Луночный планшет хранили на сухом льду, а затем помещали в морозильник при -80 °С. Полученные данные представлены в таблице

4 и на Фиг. 5.

**[00267] Интактный масс-спектрометрический анализ для определения концентраций в плазме**

**[00268]** Пробы плазмы обрабатывали путем иммуноаффинного захвата с использованием антитела к человеческому Fc с последующей обращенно-фазовой ЖХ с масс-спектрометрическим анализом с высоким разрешением и полным сканированием на времяпролетном масс-спектрометре TripleTOF. Необработанные MS-спектры подвергали деконволюции для определения молекулярных масс компонентов во введенных пробах. Для количественного определения использовали пик молекулярного иона интактного конъюгата. Пробы для построения стандартной кривой и пробы 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 пробы. Данные по ФК у мышей D10, крыс и яванских макак показаны в таблицах 2-4 соответственно. Данные по ФК у мышей D10 и яванских макак также показаны на Фиг. 4 и 5 соответственно.

Таблица 2. ФК у мышей D10

Анализ	Доза (мг/кг)	T <sub>1/2</sub> ч	T <sub>макс</sub> ч	C <sub>макс</sub> нг/мл	AUC <sub>посл</sub> ч*нг/мл
Интактный	1,0	81,05	48	8750	995 460

Таблица 3. ФК у крыс

Путь введения	Доза (мг/кг)	T <sub>1/2</sub> ч	T <sub>макс</sub> ч	C <sub>макс</sub> нг/мл	AUC <sub>посл</sub> ч*нг/мл
в/в	1,0	93,0	1	19,5	809,2
п/к	1,0	88,7	48	4,2	602,0

Таблица 4. ФК у яванского макака

Путь введения	Доза (мг/кг)	T <sub>1/2</sub> ч	T <sub>макс</sub> ч	C <sub>макс</sub> нг/мл	AUC <sub>посл</sub> ч*нг/мл
в/в	1,0	178,39	0,67	30 290	1207,39
п/к	1,0	104,32	10	5590	712,19

Пример 6. Исследования эффективности в условиях *in vivo*

**[00269] Снижение веса у мышей с алиментарным ожирением (DIO). Острое дозирование**

[00270] Оценивали способность соединения 1 уменьшать потребление пищи и массу тела у самцов мышей DIO C57B1/6 после однократной дозы. Самцов мышей DIO C57BL/6N (возраст 20 недель, 14 недель на диете с высоким содержанием жиров) приобретали в компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-ч циклом свет/темнота. Мышам давали ad libitum доступ к воде и поддерживали на диете с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet). Животных акклиматизировали к помещению по меньшей мере за одну неделю до начала эксперимента.

[00271] За день до введения дозы мышей группировали в когорты из восьми животных в зависимости от индивидуальной массы тела. На следующий день в 15:00–16:00 животных взвешивали и лечили несущей средой (dPBS, pH 7,2), соединением 1 в дозе 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 7,5 нмоль/кг или дулаглутидом в дозе 0,3 нмоль/кг посредством подкожного (п/к) введения. Массу тела и потребление пищи измеряли через 24 ч, 48 ч и 72 ч после дозирования и рассчитывали снижение веса в процентах и снижение потребления пищи. Статистический анализ проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки в программе Prism. Все данные представлены в виде среднего значения  $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего) (Фиг. 6 и Фиг. 7).

[00272] **Снижение веса у мышей с алиментарным ожирением.**  
**Хроническая дозировка**

[00273] Оценивали способности соединения 1 уменьшать потребление пищи и массу тела, а также улучшать гомеостаз глюкозы при многократном дозировании у самцов мышей DIO C57B1/6 в течение 8 дней. Самцов мышей DIO C57BL/6N (возраст 20 недель, 14 недель на диете с высоким содержанием жиров) приобретали в компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-ч циклом свет/темнота. Мышам давали ad libitum доступ к воде и поддерживали на диете с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet). Животных акклиматизировали к помещению по меньшей мере за одну неделю до начала эксперимента.

[00274] За день до введения дозы мышей группировали на основании индивидуальной массы тела. В 15:00–16:00 каждого из последующих 8 дней взвешивали животных и потребляемую пищу. Животных лечили несущей средой (dPBS, pH 7,2) или дулаглутидом в дозе 0,3 нмоль/кг посредством ежедневного подкожного введения или соединением 1 в дозах 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 нмоль/кг посредством подкожного введения один раз в три дня. Через 8 дней мышей не кормили в течение 5 часов, а затем им перорально болюсно вводили 2 г/кг глюкозы при  $t=0$ . Через  $t=0, 30, 60, 90$  и 120 минут после введения глюкозы измеряли концентрацию глюкозы в крови, а через  $t=0, 30$  и 90 минут забирали кровь для измерения инсулина в плазме. Статистический анализ проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа или двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки в программе Prism. Все данные представлены в виде среднего значения  $\pm$ SEM (Фиг. 8 и 9 и таблицы 5–8).

**Таблица 5. Влияние соединения 1 на массу тела (г) в течение 8 дней лечения**

Лечение	Несущая среда	Соединение 1 (нмоль/кг)				Дулаглутид (нмоль/кг)
		0,1	0,3	1,0	3,0	
День	Н/П	0,1	0,3	1,0	3,0	0,3
-1	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	46,7 $\pm$ 0,8	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6
0	46,1 $\pm$ 0,7	46,0 $\pm$ 0,6	46,8 $\pm$ 0,7	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	45,9 $\pm$ 0,6
1	45,8 $\pm$ 0,7	45,0 $\pm$ 0,6	45,2 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,5	43,9 $\pm$ 0,6	44,1 $\pm$ 0,6
2	45,2 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,6	43,6 $\pm$ 0,7	42,4 $\pm$ 0,7*	41,8 $\pm$ 0,7*	42,2 $\pm$ 0,6*
3	45,1 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,6	42,8 $\pm$ 0,6	41,0 $\pm$ 0,6*	40,1 $\pm$ 0,6*	40,6 $\pm$ 0,6*
4	44,7 $\pm$ 0,7	43,4 $\pm$ 0,6	42,0 $\pm$ 0,6	39,9 $\pm$ 0,6*	38,5 $\pm$ 0,6*	39,3 $\pm$ 0,6*
5	44,5 $\pm$ 0,7	43,0 $\pm$ 0,6	41,5 $\pm$ 0,5*	39,1 $\pm$ 0,6*	36,8 $\pm$ 0,7*	38,1 $\pm$ 0,7*
6	44,5 $\pm$ 0,7	43,1 $\pm$ 0,6	41,4 $\pm$ 0,5*	38,6 $\pm$ 0,6*	35,5 $\pm$ 0,8*	37,1 $\pm$ 0,8*

7	44,3 ± 0,7	43,1 ± 0,7	41,3 ± 0,5*	38,2 ± 0,6*	34,8 ± 0,9*	36,4 ± 1,0*
8	45,2 ± 0,6	46,3 ± 0,7	41,9 ± 0,5*	38,8 ± 0,6	34,7 ± 1,0*	36,5 ± 1,1*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

\*р < 0,05 по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки

**Таблица 6. Влияние соединения 1 на концентрацию глюкозы в крови (мг/дл) в тесте переносимости перорального введения глюкозы (OGTT), проведенном через 8 дней лечения**

Лечение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)					Полная AUC (мг/дл/12 0 мин)	Дельта AUC (мг/дл/1 20 мин)
		0	30	60	90	120		
Несущая среда	Н/П	148 ± 6	227 ± 15	272 ± 12	206 ± 9	209 ± 13	26 492 ± 1232	8702 ± 1082
Соед. 1	0,1	151 ± 4	213 ± 9	249 ± 10	186 ± 11	194 ± 15	24 598 ± 849	6433 ± 677
	0,3	137 ± 6	191 ± 11	208 ± 10*	146 ± 8*	160 ± 8*	20 786 ± 728*	4379 ± 364*
	1,0	117 ± 5	146 ± 9*	203 ± 10*	135 ± 8*	136 ± 5*	18 285 ± 769*	4319 ± 522*
	3,0	73 ± 11*	129 ± 5*	149 ± 10*	93 ± 9*	101 ± 9*	13 703 ± 913*	5004 ± 585
Дулаглу тид	0,3	76 ± 9*	151 ± 14*	174 ± 17*	104 ± 10*	119 ± 9*	15 758 ± 1054*	6668 ± 1846

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

\*р < 0,05 по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки для значений уровней глюкозы; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки для AUC

**Таблица 7. Влияние соединения 1 на концентрацию инсулина (нГ/мл) в тесте ОГТТ, проведенном через 8 дней лечения**

Лечение	Доза (нмоль/кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)			Полная AUC (мг/дл/120 мин)
		0	30	90	
Несущая среда	Н/П	5,6 ± 1,4	11,3 ± 3,0	4,0 ± 0,6	711,4 ± 164,1.
Соед. 1	0,1	3,0 ± 0,4	6,6 ± 0,8*	2,4 ± 0,2	415,6 ± 44,2
	0,3	2,3 ± 0,2	4,0 ± 0,6*	1,7 ± 0,2	264,3 ± 33,0*
	1,0	1,3 ± 0,2*	2,2 ± 0,1*	1,1 ± 0,2	151,6 ± 12,5*
	3,0	0,4 ± 0,1*	1,2 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*	73,9 ± 9,0*
Дулаглутид	0,3	0,6 ± 0,1*	1,7 ± 0,2*	0,7 ± 0,2	108,8 ± 12,3*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

\* $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки для значений уровней глюкозы; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки для AUC

**Таблица 8. Влияние соединения 1 на концентрацию глюкозы в крови (мг/дл) после приема пищи через 8 дней лечения**

Лечение	Доза (нмоль/кг)	Концентрация глюкозы (мг/дл)
Несущая среда	Н/П	180 ± 5
Соединение 1	0,1	164 ± 6
	0,3	160 ± 5
	1,0	149 ± 6
	3,0	105 ± 12*
Дулаглутид	0,3	114 ± 13*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

\*  $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

**Пример 7. Стратегия синтеза для получения соединения mAb с**

**оксинтомодулином (mAb-OXM)**

[00275] Человеческий оксинтомодулин (ОХМ) представляет собой 37-аминокислотный эндогенный пептид (SEQ ID NO: 23), который, как было показано, имеет хорошие фармакологические характеристики у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. Фармакологические характеристики обеспечиваются вследствие агонизма GLP1R и GCGR. Исследования аналогов ОХМ выявили вариант пептида, который обеспечивал хороший контроль уровня глюкозы и снижение веса у модельного грызуна. Период полужизни ОХМ в условиях *in vivo* у людей составляет порядка нескольких минут. Таким образом, вносили дополнительные модификации в ОХМ для обеспечения периода полужизни, позволяющего выполнять дозирование один раз в неделю. Увеличение периода полужизни было достигнуто за счет повышения стабильности пептида ОХМ в отношении протеолиза и увеличения периода полужизни пептида в кровотоке посредством ковалентного присоединения моноклонального антитела (mAb). Подверженность пептида протеолизу DPP4 снижали путем замены серина в положении 2 аминокислотной кислотой (Aib). Спиральную конфигурацию пептида стабилизировали путем введения раздвоенного солевого мостика от Q20R к S16E и Q24E, а потенциальную подверженность окислению уменьшали с помощью варианта M27L. Выбирали исходное mAb MSCB97 (описано выше), обладающее слабым собственным антигенсвязыванием, при этом точечная мутация изолейцина на цистеин в области HCDR3 (SEQ ID NO: 18) тяжелой цепи (I102C) выступала в качестве точки прикрепления синтетического пептида. Эффекторную функцию инактивировали с использованием IgG4 изотипа РАА. Между mAb и пептидом внедряли короткий олигоэтиленгликолевый спейсер для обеспечения беспрепятственного доступа пептида к GLP1R и GCGR. Спейсер также обеспечивает хорошую растворимость в воде, что облегчает процесс конъюгации. Присоединение комплекса пептид-спейсер к mAb проводили путем введения реакционноспособной бромацетамидной группы на дистальный конец гликолевого разделителя. Проксимальный конец спейсера присоединяли к варианту ОХМ посредством боковой цепи K30. Аминокислотная последовательность глюкагона и варианта пептида ОХМ представлены

в SEQ ID NO: 22 и 24 соответственно. Конъюгацию выполняли с помощью реакции с тиольной функциональной группой цистеиновой точечной мутации в тяжелой цепи mAb. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей mAb представлены в SEQ ID NO: 13 и 15 соответственно.

**[00276] Химический синтез соединения mAb-OXM**

**[00277]** Общая схема синтеза для получения соединения mAb-OXM показана на Фиг. 10.

**[00278]** Получение варианта пептида оксинтомодулина (OXM). Связанный смолой защищенный пептид синтезировали с использованием стандартных 9-фторенилметилоксикарбонильных (Fmoc) аминокислот (за исключением N-концевого гистидина, N $\alpha$ -Boc-His(Boc)-OH и Lys30, N $\alpha$ -Fmoc-Lys(ivDDE)-OH) на смоле PAL-PEG-полистирол. Во всех случаях применяли стандартные стратегии аминокислотной активации и снятия защиты Fmoc. После завершения последовательности с боковой цепи C-концевого лизина селективно снимали защиту путем обработки разбавленным безводным гидразином в N,N-диметилформамиде (DMF). Fmoc-dPEG<sub>12</sub>-CO<sub>2</sub>H соединяли с освобожденным амином путем активации диизопропилкарбодиимидом (DIC) / этил(гидроксиимино)цианоацетатом. Группу Fmoc удаляли и полученный амин бромацетилювали с помощью раствора бромуксусного ангидрида в DMF.

**[00279]** Пептид удаляли из смолы при одновременном снятии всех защитных групп путем обработки трифторуксусной кислотой (ТФУ), содержащей фенол, воду и триизопропилсилан в качестве поглотителей. Неочищенный пептид выделяли путем холодного осаждения эфиром и очищали посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с использованием смеси ацетонитрил/вода с 0,1% об./об. ТФУ в качестве элюента. Чистый пептид собирали в виде рыхлого белого твердого вещества после лиофилизации и хранили при -80 °C.

**[00280]** Восстановление моноклонального антитела MSCB97. Моноклональное антитело выделяли с помощью внедренного остатка Cys102, связанного дисульфидным мостиком с добавочными остатками цистеина или глутатиона, взятыми либо из цитозоля, либо из среды для выращивания. Таким образом, перед конъюгацией варианта

пептида OXM необходимо предварительно восстанавливать эти дисульфиды с последующим удалением нежелательного цистеина. Восстановление проводили с использованием mAb, иммобилизованного на гранулах смолы с белком А. Восстановитель (трикарбоксииэтилфосфин, ТСЕР) прогоняли через колонку при pH 5 до завершения восстановления (1 ч). Преимущество ТЭП в качестве восстановителя при данных условиях заключается в незначительности преобразования дисульфидной связи при более низком значении pH, несмотря на то что восстановление является эффективным. После вымывания побочных продуктов восстановленный адсорбированный белок элюировали из колонки с помощью кислого буферного раствора (ацетат натрия при pH 3,5). Восстановленные mAb дважды диализовали против 50 mM 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты (MOPS) при pH 5,5.

**[00281]** Более мелкие пробные партии получали путем восстановления 2,5 эквивалента ТСЕР по отношению к mAb в растворе при pH 5. Реакции позволяли протекать в течение 2 часов при комнатной температуре. Низкомолекулярные побочные продукты удаляли путем гель-фильтрации (колонка PD10), а восстановленные MSCB97 элюировали с помощью 10 mM MOPS, pH 5,5.

**[00282]** Получение соединения mAb-OXM. Раствор восстановленных MSCB97 добавляли к 7,6-кратному избытку лиофилизированного варианта пептида OXM. Добавляли 1 mM раствора ЭДТА для защиты реакционноспособных тиолов от катализируемого металлом окисления и повышали pH реакционного раствора до 7,3 путем добавления буферного раствора MOPS (1 M, pH 8,1). Реакционную смесь выдерживали в течение 18 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Реакцию останавливали путем доведения pH до 5,5 добавлением 2 M уксусной кислоты, а неочищенный конъюгат очищали посредством адсорбции на белке А с промывкой для удаления избытка пептида, несвернутого продукта и побочных продуктов. После элюирования продукта (ацетат натрия, pH 3,6) выполняли диализ в ацетатный буферный раствор с pH 5.

**[00283]** Выполняли три независимых синтеза, начиная с 250 мг, 500 мг и 500 мг MSCB97, и продукты объединяли в одну партию.

**[00284]** Анализ соединения mAb-OXM

**[00285]** Свойства полученного соединения mAb-OXM анализировали с помощью (i) аналитической гидрофобной хроматографии (HIC), (ii) измерения массы исходного вещества с помощью жидкостной хроматографии с электрораспылительной ионизацией и масс-спектрометрией (LC-ESIMS), (iii) аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) и (iv) электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

**[00286] Стабильность в плазме человека и обезьяны**

**[00287]** Пептидазы плазмы быстро метаболизируют OXM. Для определения устойчивости соединения mAb-OXM (соединение 2) (Фиг. 11) к ферментативному разложению в плазме человека и обезьяны оценивали стабильность соединения 2 в условиях *ex vivo*. Соединение 2 инкубировали при 20 нМ со свежей (не подвергавшейся замораживанию) гепаринизированной плазмой при 37 °С в течение 168 часов. Биологический анализ представлял собой функциональный клеточный биоанализ, в котором измеряли образование цАМФ в клетках НЕК, трансфицированных человеческим рецептором GLP-1. Количество продуцированного цАМФ было прямо пропорционально концентрации активного аналога OXM, а уровни активных аналогов OXM в пробах для оценивания стабильности определяли в этом анализе путем интерполяции из эталонных стандартов известных концентраций. Этот анализ использовали для оценивания стабильности по отношению к ранее определенному более стабильному контролю (контроль 1) и ранее определенному менее стабильному контролю (контроль 2). Данные использовали для определения относительной стабильности (показаны на Фиг. 12 и 13).

**Пример 8. Исследования *in vitro*. Активность соединения 2 *in vitro* в отношении рецепторов GLP1 и глюкагона человека, мыши, крысы и яванского макака**

**[00288]** Эффективность и видовую специфичность интересующих соединений, включая соединение 2, оценивали в анализах с использованием клеток НЕК293, трансфицированных для обеспечения стабильной экспрессии рецепторов GLP1 или GCG человека, яванского макака, крысы или мыши. Для каждого анализа рецепторов клональные клетки высевали на 384-луночные планшеты с

соответствующими плотностями в диапазоне 2000–5000 клеток/лунка. Соединения разводили в HBSS, обогащенном 5 мМ HEPES, 0,1% BSA и 0,5 мМ IBMX, и добавляли к клеткам. Планшеты с клетками инкубировали при комнатной температуре в течение 5 или 10 минут в зависимости от клона клеток, а впоследствии лизировали для измерения цАМФ. Концентрации цАМФ количественно определяли с помощью наборов цАМФ LANCE и планшетного спектрофотометра EnVision. Стандартные кривые включали в каждый планшет для анализа для обратного расчета концентраций цАМФ. Анализировали кривые зависимости ответа от дозы и рассчитывали значения EC<sub>50</sub> с помощью программы Graphpad Prism или Crucible. Данные по EC<sub>50</sub> приведены в таблицах 9–10.

**Таблица 9. Сводные данные по значениям EC<sub>50</sub> (нМ) из анализов человеческих рецепторов GLP1 и глюкагона по цАМФ**

	Человек	
	GCGR	GLP1R
Глюкагон	0,05 ± 0,01	0,96 ± 0,21
Ser-8 GLP1	> 100	0,07 ± 0,01
ОХМ	3,01 ± 0,35	2,40 ± 0,59
Соединение 2	3,31 ± 0,22	0,43 ± 0,02
Дулаглутид	> 100	0,17 ± 0,04

Значения представляют собой среднее ±SEM для экспериментов 3–7.

**Таблица 10. Сводные данные по значениям EC<sub>50</sub> (нМ) из анализов рецепторов GLP1 и глюкагона мыши, крысы и яванского макака по цАМФ**

	Мышь		Крыса		Яванский макак	
	GCGR	GLP1R	GCGR	GLP1R	GCGR	GLP1R
Глюкагон	0,09 ± 0,01	2,13 ± 0,42	1,57 ± 0,33	4,73 ± 0,20	0,03 ± 0,002	1,96 ± 0,38
Ser-8 GLP1	> 100	0,06 ± 0,005	> 100	0,14 ± 0,03	> 100	0,08 ± 0,002
ОХМ	6,31 ± 2,58	1,90 ± 0,31	12,74 ± 3,54	0,98 ± 0,16	0,49 ± 0,08	0,80 ± 0,07
Соединение 2	0,82 ± 0,38	0,11 ± 0,02	5,90 ± 1,46	0,97 ± 0,13	2,03 ± 0,14	0,40 ± 0,03

Дулаглутид	> 100	0,035 ± 0,002	> 100	0,13 ± 0,03	> 100	0,18 ± 0,01
------------	-------	------------------	-------	----------------	-------	----------------

Значения представляют собой среднее ±SEM для экспериментов 3–8.

#### Пример 9. Активность других родственных GPCR

[00289] Активность соединения 2 оценивали в анализах с использованием клеток, экспрессирующих несколько GPCR класса В. Соединение 2 тестировали в панели из шести анализов цАМФ *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих CALCR, PTHR1, PTHR2, CRHR1, CRHR2 и VIPR1. Анализы выполняли в соответствии со стандартными процедурами производителя, при этом для каждого тестируемого рецептора включали положительный контроль.

[00290] Кроме того, соединение 2 тестировали в стабильной клеточной линии, экспрессирующей человеческий рецептор GIP (глюкозозависимый инсулиноподобный пептид). Клетки высевали на 384-луночные планшеты и через 24 часа после этого обрабатывали соединениями в течение 5 минут при комнатной температуре. Концентрации цАМФ измеряли с помощью набора для определения цАМФ CisBio HTRF и результаты анализировали с помощью программы GraphPad Prism. Результаты представлены в таблицах 11–12.

**Таблица 11. Сводные данные по активности соединения 2 в анализах цАМФ**

Соединение	Мишень	RC <sub>50</sub> (мкМ)	Коэффициент Хилла	Нижняя точка кривой	Верхняя точка кривой	Макс. ответ
Кальцитонин	CALCR	0,0007764259	1,5254	-6,2187	105	101,04
PTH(1–34)	PTHR1	0,001080165	1,8672	-5,9767	101	93,574
Саувагин	CRHR1	0,0003082264	1,8133	-3,2011	102,19	106,16
Саувагин	CRHR2	0,003395158	1,3095	-1,175	102,76	107,04
ТИР-39	PTHR2	0,0003934505	1,1032	-3,7746	100,33	100,71
Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП)	VIPR1	0,0003567715	1,9827	-0,96244	105	104,01
Соединение 2	CALCR	> 0,1				0,070838
Соединение 2	CRHR1	> 0,1				1,5625

Соединение 2	CRHR2	> 0,1			0,928
Соединение 2	PTHR1	> 0,1			0,86197
Соединение 2	PThR2	> 0,1			2,2789
Соединение 2	VIPR1	> 0,1			0,60373

**Таблица 12. Активность соединения 2 в анализе рецептора GIP человека**

	Анализ 1		Анализ 2	
	EC <sub>50</sub> (нМ)	R-квадрат	EC <sub>50</sub> (нМ)	R-квадрат
<b>GIP</b>	2,31	1,00	1,28	0,99
<b>Соединение 2</b>	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
<b>Оксинтомодулин</b>	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100

**Пример 10. Исследования в условиях *in vivo*. Эффективность одной дозы у мышей DIO**

[00291] Потребление пищи, массу тела, толерантность к глюкозе и концентрацию FGF21 в плазме оценивали у мышей DIO после однократной дозы соединения 2 или агониста GLP1R дулаглутида. За один день перед введением дозы животных взвешивали и разделяли на группы в зависимости от массы тела (BW). Дозу мышам вводили, как указано, путем подкожной инъекции. На следующее утро пищу удаляли и начинали 6-часовое голодание. Фиксировали BW и массу корма (FW). Измеряли уровень глюкозы в крови натощак и собирали кровь для измерения инсулина в 12:00. Через один час мышам внутрибрюшинно вводили глюкозу (1 г/кг, 20% глюкозы, 5 мл/кг). Еще 20 мкл крови L собирали посредством кровотоечения из хвоста через 10 минут для определения инсулина в плазме. Измеряли глюкометром уровни глюкозы в крови через 10, 30, 60 и 90 минут после введения глюкозы. Впоследствии мышей умерщвляли посредством ингаляции CO<sub>2</sub> и отбирали посмертные пробы крови через пункцию сердца. Результаты представлены в таблицах 13-19.

**Таблица 13. Влияние соединения 2 и дулаглутида на потребление пищи (в граммах) у мышей DIO в течение 18 часов после лечения**

Лечение	24 часа до введения дозы	18 часов после введения дозы
Несущая среда	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	3,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1*^
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	3,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1^#
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	3,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1*^#
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	3,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1*^
Соединение 2 (8,0 нмоль/кг)	3,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2*^

\*р < 0,01 по сравнению с несущей средой (18 часов после введения дозы); ^р < 0,001 по сравнению с соответствующим значением за 24 часа до введения дозы; #р < 0,0001 по сравнению с дулаглутидом (0,3 нмоль/кг) через 18 часов после введения дозы

Двухфакторный дисперсионный анализ, критерий Сидака для множественных сравнений

Значения представляют собой среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе за исключением данных для несущей среды, введенной за 24 часа до введения дозы (n=7).

**Таблица 14. Влияние соединения 2 и дулаглутида на процентное изменение массы тела у мышей DIO через 18 часов после лечения**

Лечение	Изменение массы (%)
Несущая среда	-0,7 ± 0,3
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	-4,1 ± 0,3*
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	-1,9 ± 0,3*^
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	-2,8 ± 0,4*^
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	-4,4 ± 0,3*
Соединение 2 (8,0 нмоль/кг)	-5,2 ± 0,3*^

\*р < 0,01 по сравнению с несущей средой; ^р < 0,05 по сравнению с дулаглутидом (0,3 нмоль/кг)

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки. Данные показаны только для 18-часовой временной отметки

Процентное изменение массы рассчитывали по отношению к массе тела в день 0 (перед дозированием).

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждой группе.

**Таблица 15. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрацию глюкозы в крови (мг/дл) в интраперитонеальном тесте толерантности к глюкозе (IPGTT) у мышей DIO через 24 часа после лечения**

Лечение	Время (мин)				
	0	10	30	60	90
Несущая среда	215 $\pm$ 9	353 $\pm$ 20	436 $\pm$ 19	424 $\pm$ 25	391 $\pm$ 25
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	140 $\pm$ 7	264 $\pm$ 18	267 $\pm$ 22	228 $\pm$ 12	193 $\pm$ 9
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	169 $\pm$ 6	349 $\pm$ 17	411 $\pm$ 30	411 $\pm$ 19	384 $\pm$ 18
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	138 $\pm$ 11	288 $\pm$ 19	349 $\pm$ 27	303 $\pm$ 29	229 $\pm$ 20
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	114 $\pm$ 8	235 $\pm$ 23	237 $\pm$ 34	239 $\pm$ 30	195 $\pm$ 25
Соединение 2 (8,0 нмоль/кг)	96 $\pm$ 7	206 $\pm$ 13	168 $\pm$ 22	166 $\pm$ 19	131 $\pm$ 12

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

**Таблица 16. Фактическая AUC концентрации глюкозы в крови в IPGTT у мышей DIO через 24 часа после лечения**

Лечение	Фактическая AUC концентрации глюкозы в крови
Несущая среда	16 539 $\pm$ 1400
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	8471 $\pm$ 1204*
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	19 214 $\pm$ 1596^
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	13 805 $\pm$ 1840
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	9827 $\pm$ 1046*
Соединение 2 (8,0 нмоль/кг)	6035 $\pm$ 742*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой;  $\wedge p < 0,05$  по сравнению с дулаглутидом (0,3 нмоль/кг) и JNJ-64151789 (4,0 и 8,0 нмоль/кг)

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждой группе.

**Таблица 17. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрацию глюкозы после 6-часового голодания (мг/дл) у мышей DIO через 24 часа после лечения**

Лечение	Концентрация глюкозы (мг/дл)
Несущая среда	215 $\pm$ 9
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	140 $\pm$ 7*
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	169 $\pm$ 6*
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	138 $\pm$ 11*
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	114 $\pm$ 8*
Соединение 2 (8,0 нмоль/кг)	96 $\pm$ 7* <sup>^</sup>

\*  $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой;  $\wedge p < 0,05$  по сравнению с дулаглутидом (0,3 нмоль/кг)

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждой группе.

**Таблица 18. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрации инсулина в плазме (нг/мл) у мышей DIO перед сахарной нагрузкой (через 24 часа после лечения) и через 10 минут после сахарной нагрузки во время IPGTT**

Лечение	Концентрация инсулина в плазме (нг/мл)	
	До сахарной нагрузки	Через 10 минут после сахарной нагрузки
Несущая среда	2,7 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,3
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	1,6 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	2,8 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,2

Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	2,3 ± 0,5	2,9 ± 0,4
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,5
Соединение 2 (8,0 нмоль/кг)	1,5 ± 0,4	2,7 ± 0,3

Значения представляют собой среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждой группе.

**Таблица 19. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрацию FGF21 в плазме (нг/мл) у мышей DIO через 26 часов после лечения**

Лечение	Концентрация FGF21 в плазме (нг/мл)
Несущая среда	0,4 ± 0,1
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	0,8 ± 0,2
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	0,7 ± 0,1
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	1,5 ± 0,3
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	2,1 ± 0,4 <sup>^</sup>
Соединение 2 (8,0 нмоль/кг)	3,5 ± 0,3*

\* p < 0,0001 по сравнению со всеми группами; <sup>^</sup>p < 0,05 по сравнению со всеми группами, кроме соединения 2 (2,0 нмоль/кг)

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждой группе.

**Пример 11. Исследования в условиях *in vivo*. Многократное дозирование у мышей DIO**

[00292] Влияние двойного агониста GLP1R/GCGR, соединения 2 и агониста GLP1R дулаглутида у мышей DIO отслеживали во время многократного дозирования в течение 9 дней. Для контроля частоты дозирования всем животным вводили дозу ежедневно. Частоту введения определяли на основе данных о ФК у мыши DIO для соединения 2 и дулаглутида. Животные в группе дулаглутида получали это лекарственное средство ежедневно. Животным, лечившимся несущей средой, ежедневно вводили несущую среду.

Животным, получавшим соединение 2 в дозе 1,0, 2,0 или 4,0 нмоль/кг, вводили соединение каждый третий день, а в дни, в которые им не вводили соединение, они получали несущую среду. За один день перед началом дозирования животных взвешивали и разделяли на группы по массе тела. Всем мышам дозу вводили, как указано, путем подкожной инъекции в 13:00–15:00. В этих группах лечения ежедневно в 13:00–15:00 отслеживали потребление пищи и массу тела.

[00293] Начиная через 24 ч после введения первой дозы, три группы мышей получали одинаковое кормление (PF) с животными, получавшими лечение соединением 2 в дозе 1,0, 2,0 или 4,0 нмоль/кг. Количество пищи в контейнере для мышей, получающих одинаковое кормление, корректировали таким образом, чтобы оно соответствовало среднему количеству пищи, потребленному за предыдущие 24 часа мышами из группы, получающей лечение соединением, с которой они были сопоставлены. Животным из всех групп PF ежедневно вводили несущую среду. На девятый день (или 10-й день для группы с одинаковым кормлением) животные голодали в течение 6 часов, и у них измеряли массу тела и уровень глюкозы натощак. Собирали кровь для измерений инсулина, FGF21 и липидов плазмы. Данные о потреблении пищи, массе тела, составе тела, концентрации глюкозы натощак, концентрации инсулина натощак, концентрации FGF21 натощак и концентрации липидов в плазме натощак приведены в таблицах 20–26.

**Таблица 20. Влияние соединения 2 и дулаглутида на ежедневное потребление пищи (в граммах) у мышей DIO в течение 9 дней после лечения**

Лечение	Время (дни)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Несущая среда	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,0	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	3,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2*	1,3 ± 0,2*	1,7 ± 0,3*	1,9 ± 0,2*	2,1 ± 0,2*	2,2 ± 0,2*	2,3 ± 0,2	2,9 ± 0,4	2,5 ± 0,2
Соединение 2 (1,0)	3,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1*#	2,5 ± 0,1*#	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,1#	2,7 ± 0,2#	2,6 ± 0,1#	2,9 ± 0,2#	2,8 ± 0,1#	2,7 ± 0,1

нмоль/кг)										
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	3,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1*	2,0 ± 0,1*^	2,7 ± 0,1^	2,5 ± 0,2^	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,1
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	2,9 ± 0,2	1,5 ± 0,1*	1,5 ± 0,2*	2,1 ± 0,2*	1,7 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	1,8 ± 0,2*	2,2 ± 0,3*^	2,1 ± 0,1*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой; ^ $p < 0,05$  по сравнению с дулаглутидом (0,3 нмоль/кг); # $p < 0,05$  по сравнению с соединением 2 (4,0 нмоль/кг)

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки

Животные из всех групп PF получали средние количества пищи (данные не показаны) по отношению к соответствующим группам лечения.

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 6-10 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

**Таблица 21. Влияние соединения 2 и дулаглутида на процентное изменение массы тела у мышей DIO в течение 9 дней лечения**

Т	Время (дни)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V	0,0	-0,1 ± 0,2	-0,1 ± 0,2*	-0,2 ± 0,2*	-0,7 ± 0,3*	-0,5 ± 0,3*	0,2 ± 0,5*	0,1 ± 0,6*	0,0 ± 0,5*	-1,7 ± 0,6*
1	0,0	-3,7 ± 0,3	-6,2 ± 0,6	-7,8 ± 0,8	-9,2 ± 0,8	-10,1 ± ± 0,8	-10,2 ± ± 0,8	-10,7 ± ± 1,0	-11,1 ± ± 0,9	-13,1 ± ± 1,1
2	0,0	-1,9 ± 0,4	-2,9 ± 0,5^	-3,2 ± 0,4^	-4,4 ± 0,7 ^&	-4,7 ± 0,8^&	-4,5 ± 0,8^&	-5,3 ± 1,0^&	-5,2 ± 1,1^&	-6,6 ± 1,1^&
3	0,0	-1,6 ± 0,3	-2,7 ± 0,4^	-3,5 ± 0,4^	-3,8 ± 0,3^	-3,8 ± 0,4^	-3,9 ± 0,5^	-3,5 ± 0,5^	-3,4 ± 0,5^	-4,5 ± 0,5^
4	0,0	-2,8 ± 0,4	-4,7 ± 0,5	-4,9 ± 0,6^	-7,1 ± 0,7	-8,0 ± 0,8	-8,0 ± 0,8	-9,1 ± 0,8#	-10,0 ± ± 0,9#	-11,5 ± ± 0,9#
5	0,0	-3,0 ± 0,4	-4,5 ± 0,4	-5,1 ± 0,5^	-5,3 ± 0,5^	-5,8 ± 0,5^	-6,1 ± 0,5^	-5,8 ± 0,5^	-6,2 ± 0,4^	-6,9 ± 0,4^
6	0,0	-3,7 ± 0,3	-6,8 ± 0,3	-8,8 ± 0,5\$	-11,6 ± ± 0,6#\$	-14,2 ± ± 0,7^#\$	-15,6 ± ± 0,9^#\$	-18,4 ± ± 1,2^#\$	-20,4 ± ± 1,5^#\$	-21,9 ± ± 1,6^#\$
7	0,0	-3,6 ±	-5,6 ±	-6,9 ±	-7,9 ±	-9,1 ±	-10,5	-11,4	-12,3	-13,3

		0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	± 0,3	± 0,3	± 0,3	± 0,3
--	--	-----	-----	-----	-----	-----	-------	-------	-------	-------

T: лечение; V: несущая среда; 1: дулаглутид (0,3 нмоль/кг); 2-3: соединение 2 (1,0 нмоль/кг); 4-5: соединение 2 (2,0 нмоль/кг); 6-7: соединение 2 (4,0 нмоль/кг);

\*  $p < 0,01$  по сравнению со всеми другими типами лечения;  $\wedge p < 0,05$  по сравнению с дулаглутидом (0,3 нмоль/кг); # $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой PF; \$ $p < 0,05$  по сравнению с JNJ-64151789 (1,0 и 2,0 нмоль/кг); & $p < 0,05$  по сравнению с JNJ-64151789 (2,0 нмоль/кг)

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки.

% изменения массы рассчитывали по отношению к массе тела в день 0 (перед дозированием).

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 10 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

**Таблица 22. Влияние соединения 2 и дулаглутида на состав тела (масса и процентная масса тела) у мышей DIO после многократного дозирования**

	Время (дни)			
	Масса (г)		% массы тела	
Лечение	Нежировая ткань	Жиры	Нежировая ткань	Жиры
Несущая среда	24,0 $\pm$ 0,2	10,6 $\pm$ 0,5	57,5 $\pm$ 0,8	25,4 $\pm$ 0,8
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	22,1 $\pm$ 0,3*	7,6 $\pm$ 1,1	61,0 $\pm$ 1,7	22,8 $\pm$ 1,2
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	23,1 $\pm$ 0,5	9,5 $\pm$ 1,3	57,4 $\pm$ 2,5	23,1 $\pm$ 2,5
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг) PF	23,9 $\pm$ 0,3	10,6 $\pm$ 0,3	57,7 $\pm$ 0,7	25,5 $\pm$ 0,5
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	22,2 $\pm$ 0,4*	8,2 $\pm$ 0,7	59,7 $\pm$ 1,1	22,0 $\pm$ 1,6
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг) PF	23,4 $\pm$ 0,1	9,8 $\pm$ 0,4	58,5 $\pm$ 0,8	24,4 $\pm$ 0,8
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	20,9 $\pm$	7,4 $\pm$ 0,7	61,9 $\pm$ 2,4	21,6 $\pm$ 1,1

нмоль/кг)	0,3*			
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг) PF	21,4 ± 0,6	9,3 ± 0,5	56,8 ± 1,4	24,7 ± 1,0

\*  $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 5 животных в каждой группе.

**Таблица 23. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрацию глюкозы после 6-часового голодания (мг/дл) у мышей DIO после многократного дозирования**

Лечение	Концентрация глюкозы (мг/дл)
Несущая среда	170 ± 5
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	123 ± 5*
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	164 ± 5 <sup>^</sup>
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг) PF	168 ± 7 <sup>^</sup>
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	140 ± 7*
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг) PF	155 ± 6 <sup>^</sup>
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	98 ± 4*#
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг) PF	133 ± 6*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой; <sup>^</sup> $p < 0,05$  по сравнению с дулаглутидом (0,3 нмоль/кг); # $p < 0,05$  по сравнению с JNJ-64151789 (4,0 нмоль/кг) PF

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 10 животных в каждой группе.

**Таблица 24. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрацию инсулина в плазме после 6-часового голодания (нг/мл) у мышей DIO после многократного дозирования**

Лечение	Концентрация инсулина в плазме (нГ/мл)
Несущая среда	3,0 ± 0,4
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	1,4 ± 0,2*
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	2,0 ± 0,3
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг) PF	2,0 ± 0,1*
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	1,1 ± 0,1*^
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг) PF	2,3 ± 0,3
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	0,5 ± 0,1*
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг) PF	1,2 ± 0,1*

\*  $p < 0,05$  по сравнению с несущей средой; ^ $p < 0,05$  по сравнению с соединением 2 (2,0 нмоль/кг) PF

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее ±SEM по данным от 10 животных в каждой группе.

**Таблица 25. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрацию FGF21 в плазме после 6-часового голодания (нГ/мл) у мышей DIO после многократного дозирования**

Лечение	FGF21 (нГ/мл)
Несущая среда	0,7 ± 0,1
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	0,5 ± 0,1
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	0,7 ± 0,2
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг) PF	0,4 ± 0,1
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	0,6 ± 0,1
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг) PF	0,2 ± 0,1
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	1,5 ± 0,3*^
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг) PF	0,3 ± 0,1

\*  $p < 0,05$  по сравнению со всеми группами; ^ $p < 0,05$  по сравнению с соединением 2 (4,0 нмоль/кг) PF

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее ±SEM для данных от 10 животных из каждой группы за исключением соединения 2 (1,0 нмоль/кг) и соединения 2 (4,0 нмоль/кг) PF, где N=9.

**Таблица 26. Влияние соединения 2 и дулаглутида на концентрацию липидов в плазме у мышей DIO после многократного дозирования**

Лечение	Время (дни)			
	Свободные жирные кислоты (мкмоль/л)	Свободный глицерин (ммоль/л)	Триглицериды (мг/дл)	Общий холестерин (мг/дл)
Несущая среда	66,2 ± 3,9	0,6 ± 0,0	30,1 ± 2,8	142,1 ± 5,2
Дулаглутид (0,3 нмоль/кг)	73,2 ± 12,0	0,5 ± 0,1	24,1 ± 2,3	146,1 ± 3,3
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг)	71,8 ± 5,4	0,5 ± 0,0*	32,5 ± 4,5	149,1 ± 2,3
Соединение 2 (1,0 нмоль/кг) PF	58,8 ± 6,1	0,6 ± 0,1	33,7 ± 4,1	161,4 ± 2,0
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг)	73,8 ± 4,6	0,5 ± 0,0*	30,4 ± 3,4	128,0 ± 6,6#
Соединение 2 (2,0 нмоль/кг) PF	84,8 ± 25,3	0,6 ± 0,0*	34,5 ± 3,3	149,9 ± 4,4
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг)	71,2 ± 6,4	0,4 ± 0,0*	16,1 ± 2,0\$	85,7 ± 4,9^
Соединение 2 (4,0 нмоль/кг) PF	102,6 ± 14,5	0,7 ± 0,0	31,8 ± 1,1	137,8 ± 5,7

\*  $p < 0,05$  по сравнению с соединением 2 (4,0 нмоль/кг) PF; ^ $p < 0,05$  по сравнению со всеми другими группами; # $p < 0,05$  по сравнению с соединением 2 (1,0 нмоль/кг) и соединением 2 (2,0 нмоль/кг) PF; \$ $p < 0,05$  по сравнению со всеми группами, кроме группы дулаглутида (0,3 нмоль//кг)

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки

Значения представляют собой среднее значение  $\pm$ SEM по данным от 10 животных на группу для свободных жирных кислот, 8–10 животных на группу для свободного глицерина, 9–10 животных на группу для триглицеридов и общего холестерина.

**Пример 12. Исследования в условиях *in vivo*. Эффективность однократной дозы у яванских макак**

[00294] У яванских макак, не принимавших никаких биологических препаратов, ежедневно отслеживали потребление пищи

в течение трех недель перед лечением. В начале лечения животных распределяли в четыре группы для получения аналогичной средней массы тела ( $n=8-9$ , средняя масса тела  $7,4-7,9$  кг для каждой группы). Животные в каждой группе получали одну подкожную дозу, соответствующую  $1, 3, 5$  или  $7,5$  нмоль/кг соединения **2**. Потребление пищи отслеживали ежедневно в течение дополнительных 14 дней. Массу тела измеряли в день дозирования и через  $4, 7, 10, 14$  и  $21$  день после дозирования. Процентное изменение потребления пищи определяли ежедневно путем сравнения потребления пищи в этот день со средним дневным потреблением пищи в течение семи дней до дозирования. Результаты показаны на Фиг. 14 и 15.

**Пример 13. Анализ фармакокинетики (ФК), фармакокинетики (ФК) / фармакодинамики (ФД)**

[00295] ФК у мышей DIO

[00296] Временную динамику соединения **2** оценивали у мышей DIO (таблица 27). Животные ( $n=3$  на временную отметку) получали п/к инъекцию с дозой  $10$  нмоль/кг.

**Таблица 27. Временная динамика содержания в плазме (нМ) соединения **2**, измеренная посредством биологического анализа и иммунологического анализа**

Время (часы)	Содержание в плазме (нМ)	
	Биологический анализ	Иммунологический анализ
0	Н/П	Н/П
7	$6,9 \pm 2,0$	$16,7 \pm 6,7$
24	$32,6 \pm 3,5$	$71,0 \pm 8,9$
48	$55,5 \pm 2,4$	$111,9 \pm 16,4$
72	$45,3 \pm 4,0$	$95,7 \pm 9,7$
96	$42,3 \pm 14,5$	$86,8 \pm 6,8$
120	$26,5 \pm 6,9$	$58,1 \pm 14,2$

Значения представляют собой среднее  $\pm$ SEM по данным от 3 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

[00297] Фармакокинетика у крыс

[00298] Фармакокинетические параметры соединения **2**

оценивали у крыс линии Спрег-Доули. Для определения фармакокинетических параметров (таблица 28) использовали полученные в биологическом анализе данные от проб, собранных через 0, 24, 48, 72, 144, 216, 312, 408 и 504 часа после дозирования.

**Таблица 28. Фармакокинетические параметры соединения 2 у крыс линии Спрег-Доули**

Параметр	Подкожное введение	Внутривенное введение
$C_{\text{макс}}$ (нМ)	$5,7 \pm 2,1$	Н/П
$T_{\text{макс}}$ (часы)	$64,0 \pm 13,9$	Н/П
$AUC_{0-\infty}$ (нМ*часы)	$456 \pm 154$	$865 \pm 185$
$t_{1/2}$ (часы)	$38,5 \pm 12,8$	$26,2 \pm 6,2$

Данные представляют собой среднее значение +/- стандартное отклонение, значения содержания взяты из биологического анализа.

**[00299] ФК яванского макака**

**[00300]** Фармакокинетические параметры соединения 2 оценивали у яванского макака. Животные получали в/в или п/к инъекцию с дозой 6,45 нмоль/кг. Для определения фармакокинетических параметров (таблица 29) использовали полученные в биологическом анализе данные от проб, собранных через 0, 1, 6, 24, 48, 72, 120, 240, 336, 432 и 528 часа после дозирования.

**Таблица 29. Фармакокинетические параметры соединения 2 у яванских макак**

Параметр	Подкожное введение	Внутривенное введение
$C_{\text{макс}}$ (нМ)	$89,1 \pm 8,7$	Н/П
$T_{\text{макс}}$ (часы)	$56,0 \pm 13,9$	Н/П
$AUC_{0-\infty}$ (нМ*часы)	$11\ 700 \pm 1380$	$14\ 700 \pm 5260$
$t_{1/2}$ (часы)	$51,9 \pm 6,2$	$55,9 \pm 41,7$

Значения представляют собой среднее  $\pm$  стандартное отклонение

**[00301]** 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.

[00302] Все процитированные здесь документы включены путем ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения потребления пищи или лечения заболевания или расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, где указанное заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из ожирения, диабета II типа, метаболического синдрома, резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе, гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии, гипертензии, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ); где способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, включающий:

а. моноклональное антитело, где моноклональное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO:12, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO:14; и

б. по меньшей мере один фармакологически активный фрагмент; и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Способ по п.1, где моноклональное антитело дополнительно содержит Fc-фрагмент.

3. Способ по п.2, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:13, и легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15.

4. Способ по п.1, в котором фармакологически активный фрагмент представляет собой терапевтический пептид.

5. Способ по п.4, где терапевтический пептид конъюгирован с его моноклональным антителом по цистеиновому остатку полипептидной последовательности SEQ ID NO:18.

6. Способ по п.4, где терапевтический пептид конъюгирован с моноклональным антителом через линкер.

7. Способ по п.6, где линкер содержит пептидный линкер, углеводородный линкер, линкер на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), линкер на основе полипропиленгликоля (ППГ), полисахаридный линкер, полиэфирный линкер или гибридный линкер, состоящий из ПЭГ и встроенный гетероцикл.
8. Способ по п.4, где терапевтический пептид выбран из группы, состоящей из оксинтомодулина, глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), экзендина (экзенатида), амилина (прамлинтида), альфа-меланоцитостимулирующего гормона (MSH), кокаин- и амфетамино- регулируемого транскрипта (CART), антагонистов рецептора нейропептида Y1 (NPY1), антагонистов рецептора нейропептида Y5 (NPY5), нейротензина S, нейропептида B, нейропептида W, грелина, бомбезин-подобного рецептора 3 (BRS3), галанина, холецистокинина (ХЦК), орексина, меланин-концентрирующего гормона (MCH), окситоцина и стресскопина.
9. Способ по п.8, где терапевтический пептид представляет собой оксинтомодулин, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO:24.
10. Способ по п.1, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным агентом.
11. Способ по п.10, где дополнительный агент представляет собой модулятор рецептора глюкагоноподобного пептида-1.
12. Способ по п.1, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в комбинации с лираглутидом или дулаглутидом.
13. Способ снижения потребления пищи или лечения заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта, где указанное заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из ожирения, диабета II типа, метаболического синдрома, резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе, гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии, гипертензии, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), где способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, включающий:

а. моноклональное антитело, где моноклональное антитело содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 и 21 соответственно; и

б. два других фармацевтически активных фрагмента; и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ по п.13, где моноклональное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO:12, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

15. Способ по п.14, где моноклональное антитело дополнительно содержит Fc-фрагмент.

16. Способ по п.15, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:13, и легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15.

17. Способ по п.13, в котором две разные фармакологически активные части представляют собой терапевтические пептиды.

18. Способ по п.17, где каждый из терапевтических пептидов конъюгирован с моноклональным антителом по цистеиновому остатку полипептидной последовательности SEQ ID NO:18.

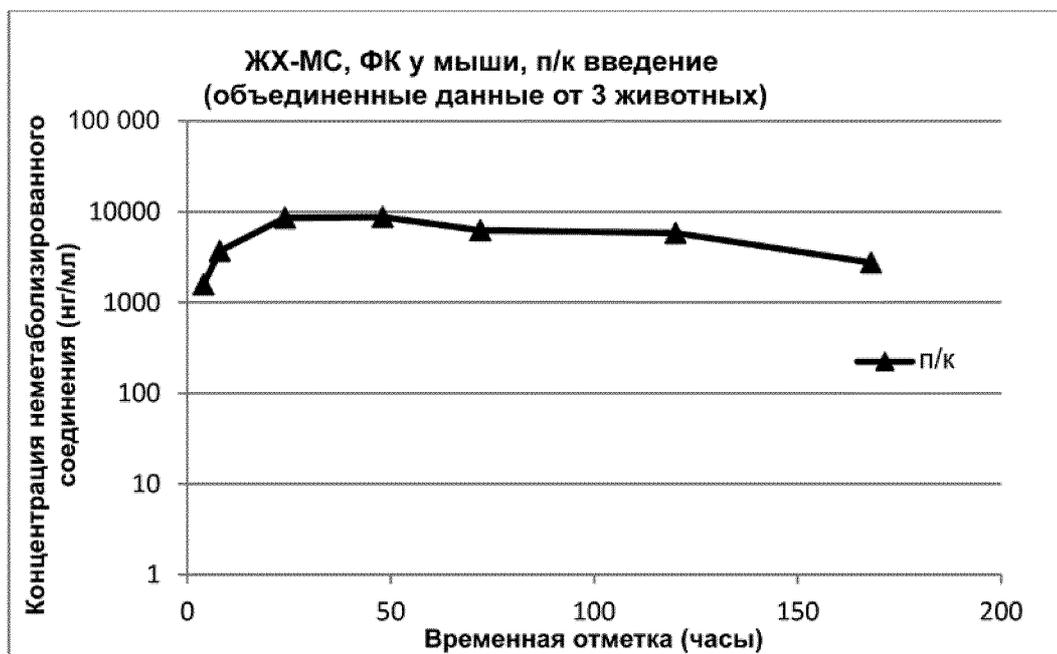
19. Способ по п.17, где каждый из терапевтических пептидов конъюгирован с моноклональным антителом через линкер.

20. Способ по п. 19, где линкер независимо содержит пептидный линкер, углеводородный линкер, линкер полиэтиленгликоля (ПЭГ), линкер полипропиленгликоля (ППГ), полисахаридный линкер, полиэфирный линкер или гибридный линкер, состоящий ПЭГ и встроенный гетероцикл.

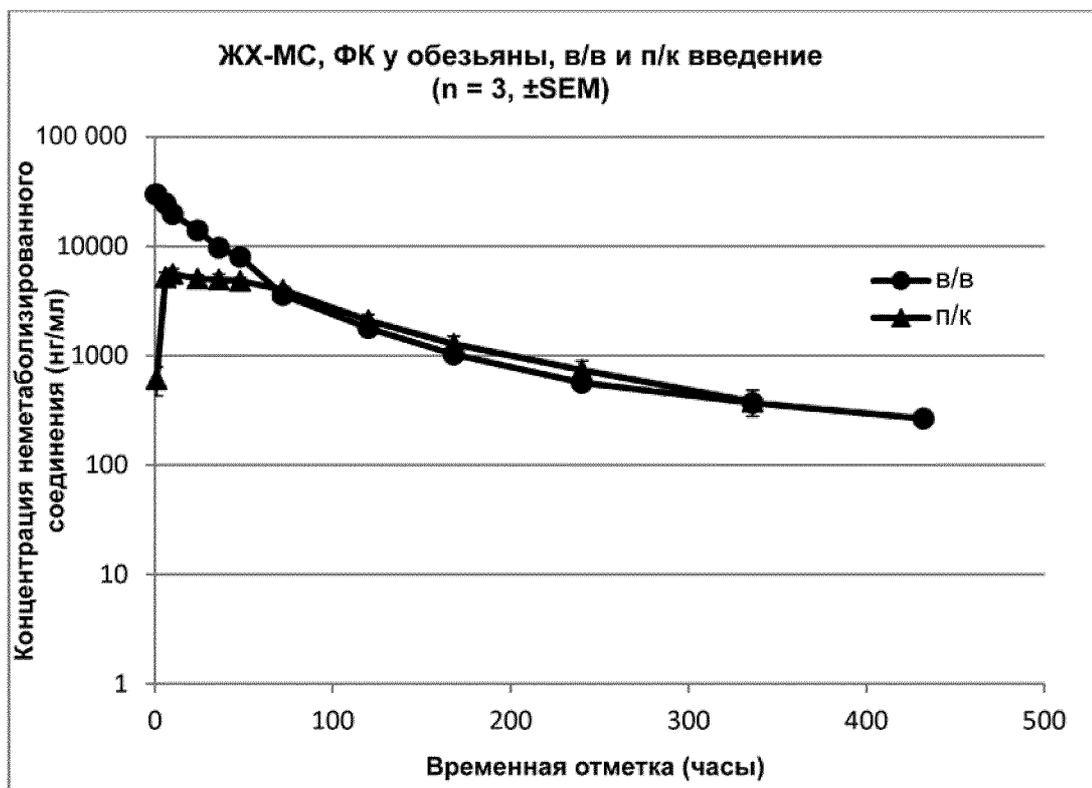
21. Способ по п.17, где терапевтические пептиды выбирают из группы, состоящей из оксинтомодулина, глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), экзендина (экзенатида), амилина (прамлинтида), альфа-меланоцитостимулирующего гормона (MSH), кокаин- и амфетамино- регулируемого транскрипта (CART), антагонистов рецептора нейропептида Y1 (NPY1), антагонистов рецептора нейропептида Y5 (NPY5), нейротензина S, нейропептида B, нейропептида W, грелина, бомбезин-подобного рецептора 3 (BRS3), галанина, холецистокинина (ХЦК), орексина, меланин-концентрирующего гормона (МСГ), окситоцина и стресскопина.
22. Способ по п.13, где фармацевтическую композицию вводят в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным агентом.
23. Способ по п.22, где дополнительный агент представляет собой глюкагоноподобный пептидный-1 модулятор рецептора.
24. Способ по п.13, где фармацевтическую композицию вводят в комбинации с лираглутидом или дулаглутидом.



Фиг. 4

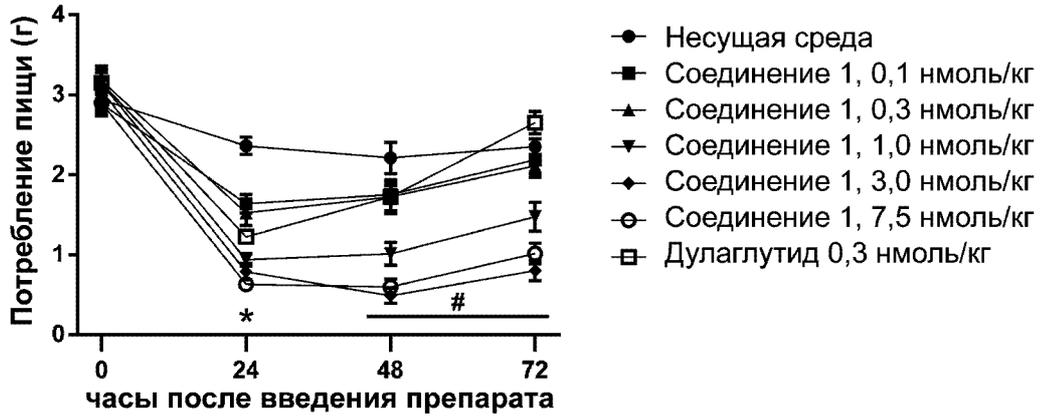


Фиг. 5



Фиг. 6

### Потребление пищи у мышей DIO после введения соединения 1



Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

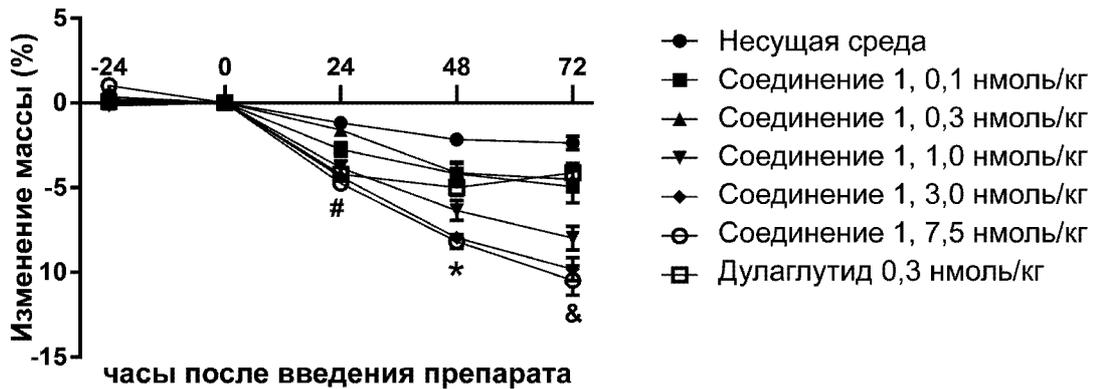
\* $p < 0,05$ , несущая среда по сравнению со всеми группами

# $p < 0,05$ , несущая среда по сравнению с соединением 1

1,0, 3,0 и 7,5 нмоль/кг

Фиг. 7

### Изменение BW у мышей DIO после введения соединения 1



Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

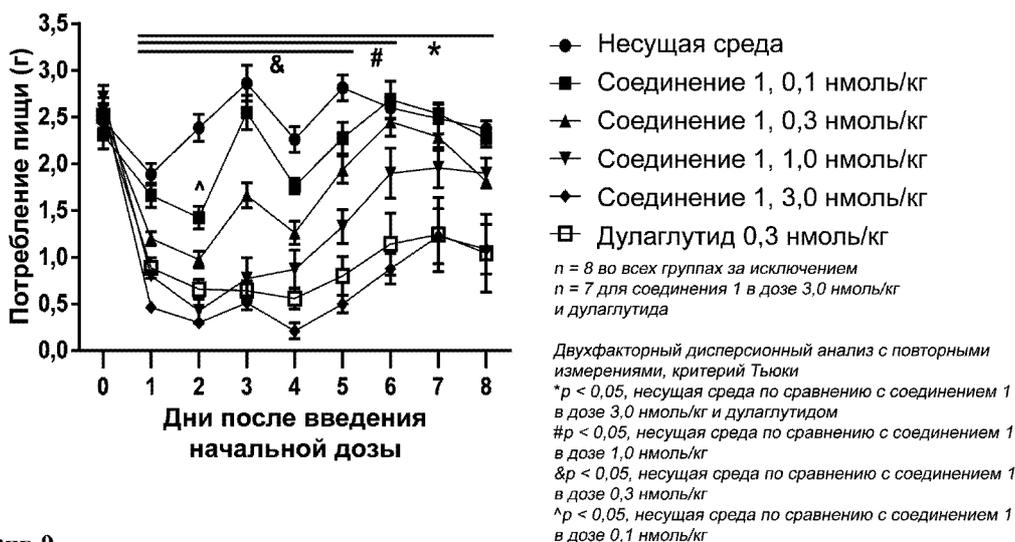
\* $p < 0,05$ , несущая среда по сравнению со всеми группами

# $p < 0,05$ , несущая среда по сравнению с соединением 1 1,0, 3,0, 7,5 нмоль/кг

&  $p < 0,05$ , несущая среда по сравнению со всеми соединениями 1

Фиг. 8

## Потребление пищи у мышей DIO после введения соединения 1

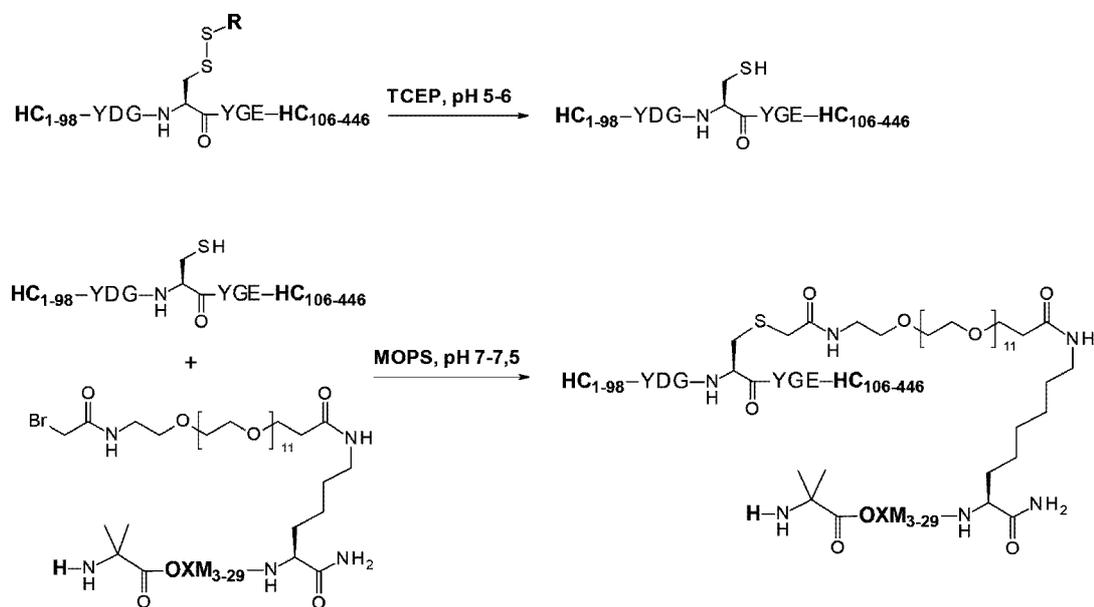


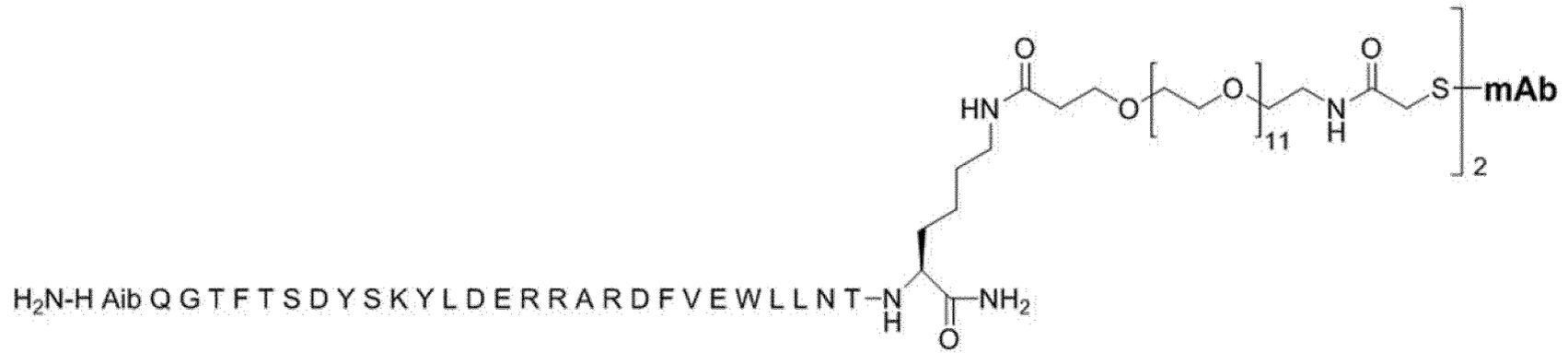
Фиг. 9

## Изменение BW у мышей DIO после введения соединения 1



Фиг. 10

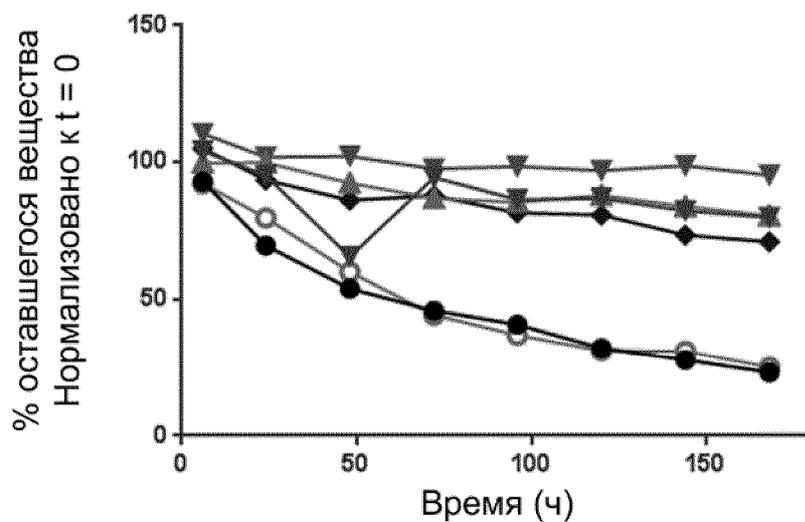




Фиг. 11

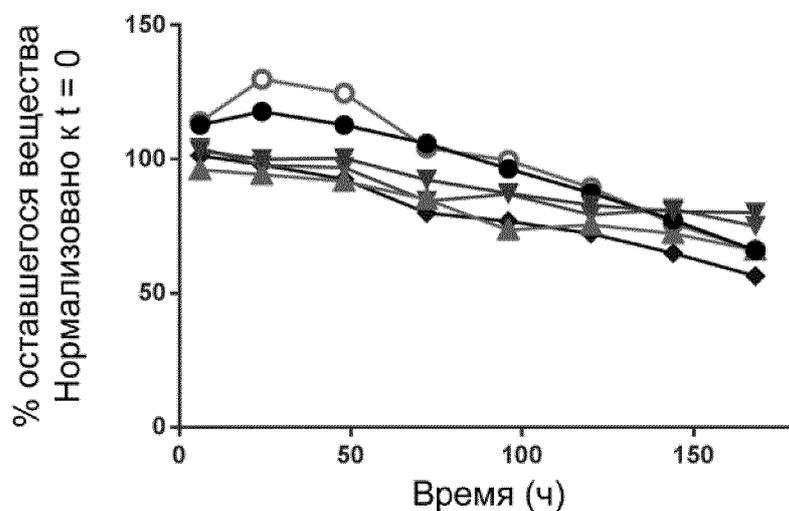
Фиг. 12

**Стабильность конъюгатов OXM-mAb в условиях  
Ex Vivo в плазме человека.  
Анализ человеческого GLP-1R по цАМФ**

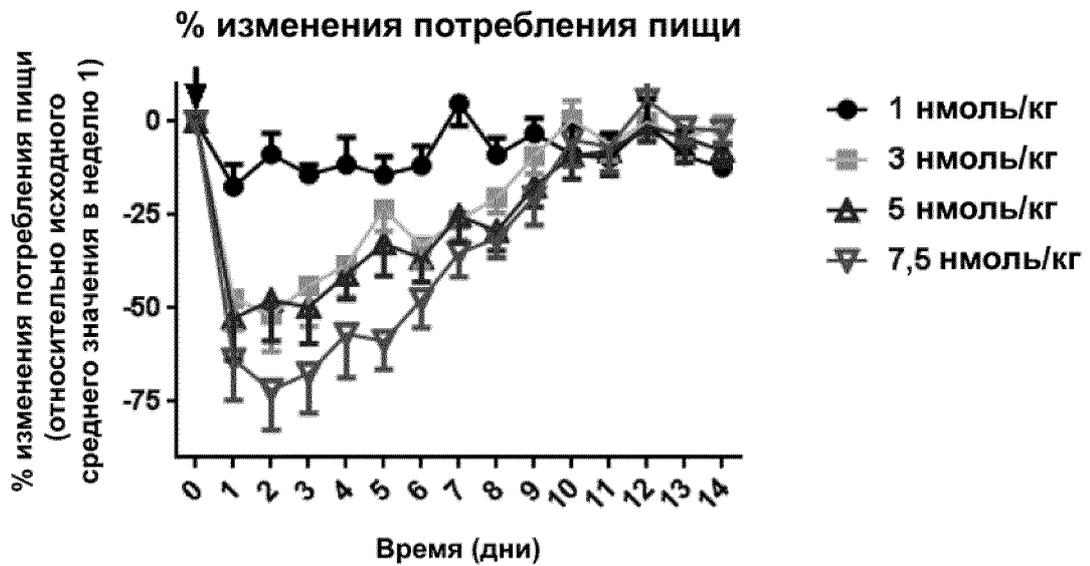


Фиг. 13

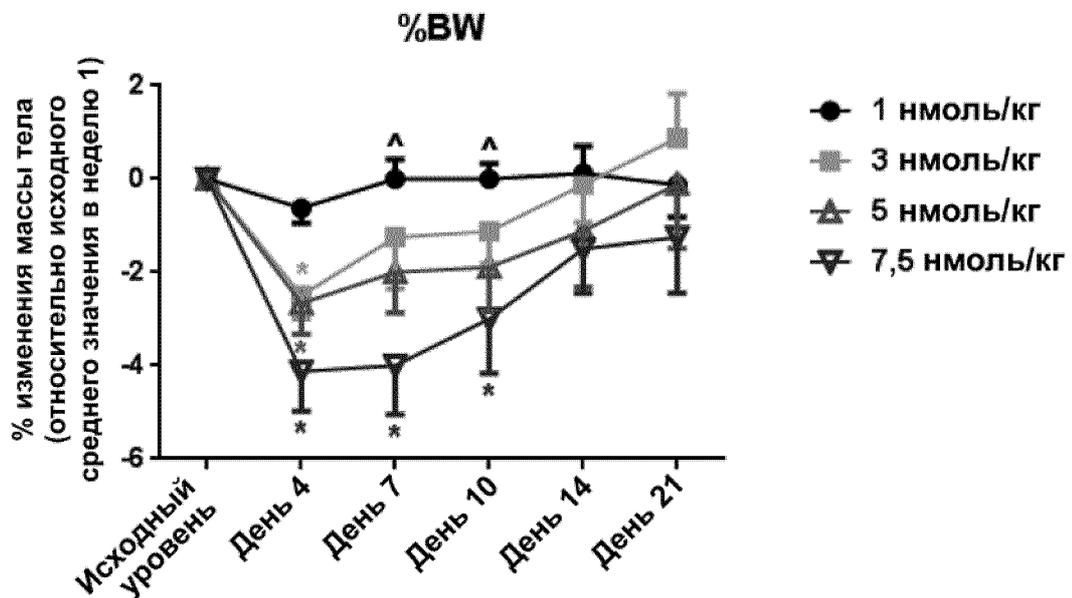
**Стабильность конъюгатов OXM-mAb в условиях  
Ex Vivo в плазме яванского макака.  
Анализ человеческого GLP-1R по цАМФ**



Фиг. 14



Фиг. 15



\* $p < 0,05$ , по сравнению с соответствующим базовым значением

^ $p < 0,05$ , по сравнению с дозой 7,5 нмоль/кг

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202292453**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
см. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 39/395, A61K 38/17, A61K 38/22, A61K 38/26, A61K 47/68, C07K 16/18,  
C07K 16/24, C07K 14/575, A61P 3/04, A61P 3/06, A61P 3/08

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
EAPATIS, Patentscope, Espacenet, USPTO, SIPO, J-PlatPat, RUPTO, Embase, PubMed, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	EA 201290123 A1 (ГЛАКСО ГРУП ЛИМИТЕД (GB)), 2012.10.30, формула и примеры	1-24
A	WO 2014073842 A1 (HANMI PHARM IND CO LTD [KR]), 2014.05.15, реферат и формула	1-24
A	M.P. MONTEIRO "Basic considerations, patient selection and indication for Treatment", cardiovascular and interventional radiology 2015, 38:3 (S40-S41), реферат	1-24

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **11/11/2022**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



А.В. Чебан

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

**202292453**

**КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)**

**A61K 39/395 (2006.01)**

**A61K 38/17 (2006.01)**

**A61K 38/22 (2006.01)**

**A61K 38/26 (2006.01)**

**A61K 47/68 (2017.01)**

**C07K 16/18 (2006.01)**

**C07K 16/24 (2006.01)**

**C07K 14/575 (2006.01)**

**A61P 3/04 (2006.01)**

**A61P 3/06 (2006.01)**

**A61P 3/08 (2006.01)**