

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042599**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.03

(51) Int. Cl. **C07K 14/495** (2006.01)

(21) Номер заявки
202092084

(22) Дата подачи заявки
2019.03.29

(54) **СОЕДИНЕНИЯ - АГОНИСТЫ ФАКТОРА РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ 15 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/653,759**

(56) **WO-A1-2017109706
US-A1-2016120999**

(32) **2018.04.06**

(33) **US**

(43) **2021.01.27**

(86) **PCT/US2019/024756**

(87) **WO 2019/195091 2019.10.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

YUMEI XIONG ET AL.: "Long-acting MIC-1/GDF15 molecules to treat obesity: Evidence from mice to monkeys", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 9, no. 412, 18 October 2017 (2017-10-18), page eaan8732, XP55593022, US, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aan8732, the whole document

(72) Изобретатель:
**Гонсиарз Малгорзата Доната, Обунгу
Виктор Х., Пикард Ричард Тодд (US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)**

(57) В изобретении предложены соединения, которые вызывают потерю массы тела и лечат диабет, дислипидемию, НАСГ и/или ожирение. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, и варианты терапевтического применения таких соединений и композиций, при этом такие соединения действуют как агонисты GDF15 с продленным временем действия и другими полезными свойствами.

B1

042599

042599

B1

Данное изобретение относится к биологии и медицине и, в частности, к соединениям и композициям, включающим в себя соединение - агонист фактора роста и дифференцировки 15 (GDF15), имеющее продленное время действия и другие полезные свойства, а также к способам их использования для стимулирования потери массы и для лечения диабета, дислипидемии, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и/или ожирения. GDF15 (также известный как MIC-1, NAG-1) представляет собой цистеиновый (Cys, C) узелковый белок, принадлежащий к суперсемейству трансформирующего ростового фактора-бета (TGFB). Его циркулирующая концентрация вовлечена в различные биологические функции, такие как раковое истощение и метаболизм (см. Emmerson et al. (2017) Nat. Med. 23: 1215-1219). Зрелый GDF15 человека (SEQ ID NO: 1) представляет собой пептид из 112 аминокислот. Циркулирующий GDF15 формирует гомодимер зрелого белка (25 кДа) посредством того, что, как сообщается, является одной межцепочечной дисульфидной связью между остатком Cys в позиции 77 SEQ ID NO: 1 на каждой цепи гомодимера (что соответствует позиции 316 в SEQ ID NO: 2). Считается, что формирование гомодимера необходимо для биологической активности GDF15 (см. международную публикацию заявки на патент № WO 2017/147743).

Среди множества известных биологических функций зрелого гомодимера GDF15 регуляция энергетического гомеостаза привлекла внимание из-за ее потенциала в лечении ожирения и диабета 2-го типа (Д2Т). Связь между активностью зрелого гомодимера GDF15 и энергетическим гомеостазом основана на наблюдении того, что повышение сывороточных уровней зрелого GDF15 коррелирует с потерей массы у индивидов с прогрессирующим раком простаты (Emmerson et al. (2017)).

Более того, повышение GDF15 у мышей путем введения рекомбинантного GDF15 или посредством его экспрессии и секреции из опухолевых ксенотрансплантатов показало, что GDF15 вызывает потерю массы благодаря своей способности уменьшать потребление пищи и увеличивать расход энергии. Кроме того, трансгенные мыши, сверхэкспрессирующие GDF15, были устойчивы к ожирению, вызываемому рационом, и демонстрировали улучшенную толерантность к глюкозе, тогда как мыши с нокаутом GDF15 имели увеличенную массу тела и жировую массу. Дополнительно, было показано, что стимулированная GDF15 потеря массы уменьшает воспалительные реакции и увеличивает продолжительность жизни у грызунов.

Альфа-подобный рецептор (GFRAL) нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF) был идентифицирован как лиганд-связывающий рецептор для GDF15. Потеря анорексического эффекта GDF15 у GFRAL-дефектных мышей, также как и у крыс, которым вводили анти-GFRAL нейтрализующие моноклональные антитела, показала, что GFRAL в первую очередь ответственен за метаболические эффекты GDF15 (Emmerson et al. (2017)).

Естественный период полужизни ($t_{1/2}$) зрелого циркулирующего агониста гомодимера GDF15 человека является относительно коротким (около 2-3 ч). Однако международная публикация заявки на патент № WO 2015/017710 в целом описывает продление $t_{1/2}$ агонистов GDF15 посредством различных конъюгации, включая конъюгацию с кристаллизующимся фрагментом иммуноглобулина (Fc). Существует потребность в биологически активных соединениях GDF15 с продленным временем действия, которые могут быть использованы в терапии для стимулирования потери массы и для лечения Д2Т, дислипидемии, НАСГ и/или ожирения. Терапевтически подходящее соединение могло бы агонизировать рецептор GFRAL и обеспечивать полезные свойства. Одним из полезных свойств было бы стимулирование снижения массы. Другим полезным свойством могла бы быть стабильность *in vivo* в течение увеличенного периода времени в терапевтическом диапазоне, чтобы обеспечить стабильный уровень соединения в кровотоке при дозировании один раз в неделю для достижения желаемого терапевтического эффекта. Другие желательные свойства также включают в себя уменьшение иммуногенности. Также, желательное соединение могло бы иметь полезные свойства физической и/или химической стабильности. Ввиду вышесказанного, данное изобретение описывает биологически активные соединения-аналоги GDF15, которые имеют продленный $t_{1/2}$ и другие желательные свойства. Более конкретно, соединения, приведенные в данном документе, представляют собой рекомбинантные слитые белки, содержащие бесшарнирный мономерный (одна единица Fc на GDF15) Fc IgG4 человека, соединенный через жесткий линкер с amino (N)-концом соединения-аналога GDF15, в результате чего соединения формируют ковалентно-соединенный гомодимер посредством по меньшей мере одной межцепочечной дисульфидной связи между частями GDF15 каждого из мономеров. Иллюстративное соединение, соединение 2, представляет собой гомодимер двух молекул соединения 1 (SEQ ID NO: 2) и неожиданно показало увеличенное время $t_{1/2}$ вплоть до 117 часов, что может обеспечить продленную эффективность и может сделать возможным дозирование соединения один раз в неделю. Также соединения, приведенные в данном документе, обладают улучшенной физической стабильностью. Например, соединение 2 имеет низкий 4,1% растворимого агрегата с высокой молекулярной массой (ВММ) в пуле захвата белка А. Соединение 2 также демонстрирует улучшенную химическую стабильность, например низкий 0,75% процент роста агрегата с низкой молекулярной массой (НММ) при 1 мг/мл после 4 недель хранения при 40°C в цитратном буфере при pH 6,0.

В одном варианте осуществления, предложено соединение, которое содержит SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления, предложено соединение, которое включает в себя гомодимер, содержащий два мономеры, каждый из которых включает в себя SEQ ID NO: 2, причем два мономеры соединены посредством по меньшей мере одной межцепочечной дисульфидной связи между остатком Cys первого мономера и остатком Cys второго мономера.

В другом варианте осуществления, предложена фармацевтическая композиция, которая включает в себя соединение, имеющее SEQ ID NO: 2, или гомодимер из двух мономеров SEQ ID NO: 2, и один или большее количество фармацевтически приемлемых эксципиентов.

В другом варианте осуществления, предложен способ для стимулирования потери массы или для лечения Д2Т, дислипидемии, НАСГ и/или ожирения у индивида, который включает в себя введение индивиду эффективного количества соединения, имеющего SEQ ID NO: 2, гомодимера, содержащего два мономеры SEQ ID NO: 2, или фармацевтической композиции, содержащей соединение, имеющее SEQ ID NO: 2, или гомодимер, содержащий два мономеры SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления, предложено соединение, которое включает в себя SEQ ID NO: 2 или гомодимер, содержащий два мономеры SEQ ID NO: 2, для применения в терапии. В альтернативном варианте, предложено соединение, которое включает в себя SEQ ID NO: 2 или гомодимер, содержащий два мономеры SEQ ID NO: 2, для применения в стимулировании потери массы или для применения в лечении Д2Т, дислипидемии, НАСГ и/или ожирения.

В другом варианте осуществления, предложены применения для соединения, включающего в себя SEQ ID NO: 2 или гомодимер, содержащий два мономеры SEQ ID NO: 2, в производстве лекарственного средства для стимулирования потери массы или для лечения Д2Т, дислипидемии, НАСГ и/или ожирения.

В других вариантах осуществления, предложено соединение, которое получают путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, в таких условиях, при которых полипептид экспрессируется, и выделения соединения. Кроме того, предложен способ для стимулирования потери массы у индивида или для лечения Д2Т, дислипидемии, НАСГ и/или ожирения, который включает в себя введение индивиду эффективного количества соединения, приведенного в данном документе, или композиции, приведенной в данном документе, один раз в неделю.

В контексте данного документа, "около" подразумевает нахождение в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, заявленная концентрация, длина, молекулярная масса, pH, идентичность последовательности, временная рамка, температура или объем. Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка, типично в пределах 20%, более типично в пределах 10%, и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином "около", будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

Как применяется в данном документе, "эффективное количество" обозначает количество или дозу соединения, приведенного в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей соединение, приведенное в данном документе, которое при однократном или многократном введении доз пациенту или субъекту будет вызывать биологическую или терапевтическую реакцию, или желаемый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, что находится под наблюдением исследователя, ветеринара, врача или другого лечащего персонала. Предпочтительно, введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения или композиций, содержащих соединение согласно данному изобретению, будет приводить к неспецифической потере массы тела. Доза может включать в себя более высокую начальную ударную дозу с последующей более низкой дозой.

Как применяется в данном документе, "индивид", "пациент" и "субъект" используются взаимозаменяемо и обозначают животное, в частности человека. В случае человека, индивид характеризуется заболеванием, нарушением или патологией, что улучшится от введения соединения или композиции, приведенных в данном документе.

Как применяется в данном документе, "лечение" или "лечить" означает ведение индивида и уход за индивидом, имеющим патологию, для которой рекомендуется введение GDF15 с целью борьбы с симптомами, или облегчения симптомов и осложнений таких патологий. Лечение включает в себя введение индивиду, нуждающемуся в этом, соединения или композиции, включающей в себя соединение, приведенное в данном документе, для предотвращения появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений, или устранения заболевания, патологии или нарушения. В частности, лечение включает в себя введение индивиду, нуждающемуся в этом, соединения или композиции, включающей в себя соединение, приведенное в данном документе, приводящее к неспецифической потере массы тела. Индивид, которого лечат, может представлять собой животное, в частности человека.

Фармацевтические композиции, приведенные в данном документе, могут быть парентерально введены индивиду, нуждающемуся в таком лечении. Парентеральное введение может осуществляться путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией с помощью шприца, необязательно шприца-ручки, или инъектора механического действия. В альтернативном варианте, парентеральное введение может осуществляться с помощью инфузионной помпы. Кроме того, фармацевтические композиции мо-

гут включать в себя один или большее количество фармацевтически приемлемых эксципиентов. Такие фармацевтические композиции могут быть получены любым из множества способов с применением традиционных эксципиентов для фармацевтических продуктов, которые хорошо известны в данной области техники (смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, PA, USA (2006)).

Соединения и композиции, приведенные в данном документе, могут быть использованы в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов, которые полезны для стимулирования потери массы и для лечения диабета, патологий, связанных с Д2Т, дислипидемии, НАСГ, и/или ожирения. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, которые могут быть скомбинированы с предложенными соединениями, включают в себя, но не ограничены лишь этими: инсулин или аналоги инсулина; бигуаниды; сульфонилмочевины; тиазолидиндионы; ингибиторы дипептидилпептидазы-4 ("DPP-4"); ингибиторы натрий-зависимого транспортера глюкозы (SGLT2); инкретиновые соединения, такие как глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) или аналоги GLP-1, желудочный ингибиторный полипептид (GIP) или аналоги GIP, окситомодулин (ОХМ) или аналоги окситомодулина (ОХМ); или комбинации любых вышеуказанных агентов. Соединения, приведенные в данном документе, и дополнительный терапевтический агент(ы) могут быть введены либо вместе с помощью одинакового пути доставки и средства, такого как одна пилюля, капсула, таблетка или инъекционная лекарственная форма; либо введены раздельно либо в одно и то же время различными средствами доставки или путями; либо введены последовательно. Соединения, приведенные в данном документе, могут быть получены различными методами, известными специалисту в данной области техники. Например, соединения могут быть получены путем получения белка или молекулы белка-предшественника с использованием методов рекомбинантной ДНК. ДНК, включая кДНК и синтетическую ДНК, может быть двухпочечной или однопочечной. Кодированные последовательности, которые кодируют соединения, могут различаться в результате избыточности или вырожденности генетического кода. ДНК может быть введена в клетку-хозяина для получения соединения или его предшественника. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, такие как штаммы K12 или B Escherichia coli, грибковые клетки, такие как дрожжевые клетки, или клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка ("CHO").

Подходящую клетку-хозяина временно или стабильно трансфицируют или трансформируют системой экспрессии, такой как векторы экспрессии, для получения соединения, приведенного в данном документе, или его предшественника. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать маркеры селекции, например, на тетрациклин, неомицин, глутамин синтетазу и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить возможность отбора тех клеток, которые трансформированы желаемыми последовательностями ДНК. Соединения, приведенные в данном документе, могут быть получены с помощью различных методов, известных специалисту в данной области техники, а также методов, описанных ниже. Могут быть использованы, не использованы или комбинированы в различных сочетаниях конкретные стадии биосинтеза или синтеза для каждой из описанных стадий, для получения соединений, приведенных в данном документе. Соединения-аналоги GDF15, приведенные в данном документе, могут действовать как соединения GFRAL и продуцироваться в системе экспрессии клетки млекопитающего с использованием производных клетки CHO K1. Гены, кодирующие белки GDF15, субклонируют в каркасы плазмид экспрессии, содержащих глутаминсинтетазу (ГС) (плазмиды на основе pEE12.4). Последовательность кДНК (SEQ ID NO: 16), кодирующая соединение 1 (SEQ ID NO: 2), иллюстративный белок Fc-GDF15, слита по рамке считывания с кодирующей последовательностью последовательности сигнального пептида, METDTLLLWVLLLVWPGSTG (SEQ ID NO: 3), для усиления секреции желаемого продукта в среду для культивирования ткани.

Экспрессия управляется вирусным промотором цитомегаловируса (ЦМВ). Клетки CHO K1SV стабильно трансфицируют с использованием электропорации и соответствующего количества рекомбинантной плазмиды экспрессии, и трансфицированные клетки поддерживают в суспензионной культуре при подходящей плотности клеток. Отбор трансфицированных клеток осуществляют путем выращивания в бессывороточной среде, содержащей 25 мкМ метионинсульфоксимиона (МСК), и инкубируют при около 35-37°C и около 5-7% CO₂. Белки GDF15 или слитые белки Fc-GDF15 секретируются в среду из клеток CHO. Части GDF15 белков связываются друг с другом, создавая гомодимеры, содержащие два белка GDF15, или гомодимеры слитого белка Fc-GDF15, соединенные друг с другом посредством межпептидной дисульфидной связи. Гомодимеры GDF15 или Fc-GDF15 могут быть очищены с помощью аффинной хроматографии с белком А с последующей анионообменной и гидрофобной хроматографией.

Гомодимеры белка GDF15 из собранной среды захватываются на смоле Capto Blue (GE). Гомодимеры белка Fc-GDF15 из собранной среды захватываются на смоле Mab Select Protein A (GE). Затем смолу быстро промывают рабочим буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (ФСБ; pH 7,4), или рабочим буфером, содержащим Трис, для удаления неспецифически связанного материала. Белок элюируют из смолы раствором с низким pH, таким как 10 mM лимонная кислота pH 3. Фракции, содержащие белки GDF15, объединяют и могут удерживаться при низком pH для инактивации потенциальных вирусов. pH

может быть нейтрализован добавлением основания, такого как 0,1 М Трис pH 8,0. Белок GDF15 может быть дополнительно очищен с помощью анионообменной хроматографии с использованием смол, например Poros XQ (Life Technologies). Белок GDF15 элюируют из колонки AEX с использованием градиента NaCl от 0 до 200 мМ в 50 мМ Трис, pH 8,0, посредством 15-ти объемов колонки. Слитый белок Fc-GDF15 может быть дополнительно очищен хроматографией с гидрофобным взаимодействием с использованием колонки для хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ) Capto Phenyl ImpRes (GE Healthcare). Колонку подготавливают путем доведения заряженного раствора до около 0,5 М сульфата натрия и выполняют элюирование с использованием градиента 10-ти объемов колонки (ОК), переходящего от 0,5 до 0 М сульфата натрия в 20 мМ растворе Трис с pH 8. После ХГВ белок может быть дополнительно очищен с помощью эксклюзионной хроматографии путем загрузки концентрированного пула Capto Phenyl ImpRes на Superdex200 (GE Healthcare) с изократическим элюированием в ФСБ pH 7,4.

Очищенные соединения GDF15 могут быть пропущены через удерживающий вирусы фильтр, такой как Planova 20N (Asahi Kasei Medical), с последующим концентрированием/диафильтрацией в 10 мМ цитрат, 150 мМ NaCl, pH 7, с использованием ультрафильтрации в тангенциальном потоке на регенерированной целлюлозной мембране (Millipore).

Растворимый внеклеточный домен (ВКД) GFRAL человека продуцируют в системе экспрессии клетки млекопитающего с использованием производных клетки CHO K1. ВКД GFRAL, тэгируемый полигистидином, из собранной среды захватывают на никелевую колонку в аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (ИМАС). Затем смолу быстро промывают рабочим буфером, таким как ФСБ pH 7,4 или рабочим буфером, содержащим Трис (pH 8,0, 500 мМ NaCl), для удаления неспецифически связанного материала. Связанный HIS-тэгируемый ВКД GFRAL (SEQ ID NO: 4) элюируют с использованием 0-250 мМ имидазола в ФСБ или Трис (pH 8,0, 500 мМ NaCl) посредством 10-ти объемов колонки. ВКД GFRAL с тэгом HIS может быть дополнительно очищен с помощью эксклюзионной хроматографии путем загрузки концентрированного пула ИМАС на Superdex200 (GE Healthcare) с изократическим элюированием в PBS (pH 7,4).

Экспрессия антител у млекопитающих приводит к гликозилированию. Как правило, гликозилирование происходит в области Fc антитела, в высококонсервативном сайте N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. В обычной константной области иммуноглобулинов IgG есть только один сайт для N-гликозилирования. Однако, этот сайт может быть модифицирован для предотвращения гликозилирования или могут быть добавлены дополнительные сайты для дополнительных или различных структур гликозилирования. Также, гликозилирование иногда действительно происходит случайно в других областях молекул, экспрессируемых в клетках млекопитающих.

Приведенные в данном документе соединения получают этим или подобным способом, что может быть легко определено специалистом в данной области техники.

Примеры

Нижеследующие неограничивающие примеры предлагаются в целях иллюстрации, а не ограничения.

Пример 1. Аффинность рецептора *in vitro*.

Параметры связывания *in vitro* гомодимера GDF15 человека и иллюстративного соединения 2 с рецептором GFRAL человека определяют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). ВКД GFRAL включает в себя три Cys-богатых домена (D1, D2 и D3). Аффинность гомодимера GDF15 человека (des-ARN SEQ ID NO: 1; то есть GDF15, не имеющего Ala, Arg и Asp с N-конца) и соединения 2, гомодимера соединения 1 Fc-GDF15 (SEQ ID NO: 2) к HIS-тэгируемому ВКД GFRAL человека (SEQ ID NO: 4) может быть измерена с помощью ППР. Кинетика подытожена в табл. 1.

Для измерения связывания GDF15 человека (des-ARN SEQ ID NO: 1) или соединения 2 с ВКД GFRAL человека используют прибор Biacore T200 для измерения кинетики связывания гомодимера GDF15 человека (des-ARN SEQ ID NO: 1) и соединения 2 с ВКД GFRAL. Измерения проводят при 25°C. Образцы растворяют в HBS-EP+, pH 7,4 (GE Healthcare; 10 мМ ГЭПЭС (HEPES) pH 7,4+150 мМ NaCl+3 мМ ЭДТК+0,05% ПАВ P20). Козье антитело против GDF15 кролика (R&D) иммобилизуют на проточных ячейках сенсорного чипа CM5 с использованием химии аминного связывания. Образцы GDF15 готовят в концентрации 25 мкг/мл путем разведения в рабочем буфере.

Образцы ВКД GFRAL человека готовят в конечных концентрациях 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0 и 0 (пустой контроль) нМ путем разбавления в рабочем буфере. Эксперимент ППР включает в себя следующие этапы: (1) захват образцов GDF15 на отдельных проточных ячейках (Fc2, Fc3 и Fc4), (2) инъекция 200 мкл ВКД GFRAL человека во все проточные ячейки со скоростью 100 мкл/мин, (3) диссоциация в течение 600 с, (4) восстановление поверхностей чипа с помощью инъекции 10 мкл (30 с) глицина, pH 1,5, при 20 мкл/мин, и (5) уравнивание поверхностей чипа с помощью инъекции 10 мкл (30 с) HBS-EP+ при 20 мкл/мин. Каждую концентрацию ВКД GFRAL человека вводят в дубликатах.

Данные обрабатывают с использованием стандартного двойного контроля и подгонки к модели связывания 1:1 с использованием Biacore T200 Evaluation Software для определения скорости ассоциации (k_{on} , $M^{-1}s^{-1}$), скорости диссоциации (k_{off} , s^{-1}) и максимального ответа (R_{max} ; единицы ответа (ЕО)). Кон-

станта равновесной диссоциации (K_d) рассчитывается из соотношения $K_d = k_{off}/k_{on}$ (M).

Таблица 1

Кинетика связывания гомодимера GDF15 человека и гомодимера соединения 2 с рецептором ВКД GFRAL человека (D1-D2-D3-ECD) при 25°C

Соединение	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_d (нМ)
GDF15 человека (гомодимер двух соединений, включающих в себя des-ARN SEQ ID NO: 1)	2,92E + 05	7,21E-03	7,2
Соединение 2 (гомодимер двух соединений, включающих в себя SEQ ID NO: 2)	1,05E+06	8,71E-03	8,3

Результаты показывают, что гомодимер GDF15 человека (два соединения, содержащие дез-ARN SEQ ID NO: 1) имел аффинность 7,2 нМ для ВКД GFRAL человека, а гомодимер соединения 2 (два соединения, содержащие SEQ ID NO: 2) имел аффинность 8,3 нМ для ВКД GFRAL человека.

Пример 2. Функциональная активность *in vitro* GFRAL, рецептор для GDF15, является членом семейства рецепторов GDNF и содержит единственный трансмембранный домен и не содержит внутриклеточного сигнального домена. Члены семейства рецепторов GDNF, включая GFRAL, используют рецептор RET для передачи сигнала. Известно, что стимуляция комплекса рецептор GDNF/RET активирует сети передачи сигналов, включающие фосфорилирование ERK, АКТ и STAT.

Чтобы оценить активность и относительную эффективность зрелых вариантов GDF15 человека, клетки HEK293 (ATCC) трансфицируют ЦМВ-управляемыми векторами экспрессии млекопитающих, содержащими GFRAL человека (Стандарт. последовательность № NP_997293.2 NCBI) и RET51 человека (Стандарт. последовательность № NP_066124.1 NCBI), и выращивают в течение трех недель в присутствии генетицина и пурамицина (Life Technologies) для создания пула клеток, стабильно экспрессирующих оба белка. Измерение фосфорилирования ERK1/2 выбрано в качестве измеряемого параметра для оценки активации RET с использованием AlphaLISA Surefire Ultra Phospho-ERK1/2 Assay Kit (Perkin Elmer), в соответствии с инструкциями производителя, и EnVision Multilabel Microplate Reader Model 2102 (Perkin Elmer). Вкратце, клетки HEK293-hGFRAL/hRET, между пересевами 10-20, вносят в количестве 20000 клеток/лунка на покрытые поли-D-лизином 96-луночные плашки и выращивают в течение трех дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% O₂. Клетки инкубируют в бессывороточной среде в течение 4 ч, а затем обрабатывают, как указано, в течение 10 мин, лизируют и замораживают до проведения анализа. Лизаты клеток размораживают путем инкубации в течение 1 ч при 4°C, перемешивают на орбитальном шейкере для плашек и переносят в белую 384-луночную плашку. Способ AlphaLISA "2 чашки/1 инкубация" используется путем добавления смесей акцептора и донора, поставляемых с набором для анализа, к лизатам, и инкубации при комнатной температуре в темноте в течение 8 ч перед измерением сигнала AlphaLISA на EnVision Plate Reader.

Каждая плашка с клетками, используемая для анализа, содержит нативный зрелый GDF15 человека в качестве контроля проведения анализа. Данные фосфорилирования ERK1/2 (pERK1/2) с нескольких плашек собираются в один график путем преобразования необработанных сигнальных данных AlphaLISA по оси Y в %Maxima относительно эталонного стандарта GDF15 человека с использованием следующей формулы:

$$\%Maxima = 100 * (x - \text{мин}) / (\text{макс} - \text{мин})$$

где мин = 0 и представляет отсутствие стимуляции, макс = 100 и представляет стимуляцию, наблюдаемую при насыщающей дозе соединения, и x = любое данное лечение. EC₅₀ для каждого соединения определяют с использованием сигмоидальной кривой доза-ответ с переменным наклоном с четырехпараметрической логистической регрессией в GraphPad Prism версии 7.00. EC₅₀, указанное для каждого соединения в табл. 2, определяют путем вычисления среднего геометрического EC₅₀ для 3 независимых анализов каждого соединения с использованием следующей формулы:

$$\text{Геометрическое среднее} = \sqrt[3]{X1 * X2 * X3}$$

Клетки HEK293, экспрессирующие как GFRAL человека, так и RET51 человека, используют для оценки эффективности соединения 2. Нативный зрелый GDF15 человека (SEQ ID NO: 1) в качестве гомодимера используют как контрольный образец для каждой плашки с клетками. Исследуемые образцы анализируют в четырех повторностях в трех независимых экспериментах.

Таблица 2

Сравнение эффективности соединения 2 с GDF15 человека

Исследуемый образец	EC ₅₀ (пМ)	СОС (стандартная ошибка среднего)	N
Зрелый GDF15 человека (гомодимер двух соединений, включающих в себя SEQ ID NO: 1)	27,9	2,9	3
Соединение 2 (гомодимер двух соединений, включающих в себя SEQ ID NO: 2)	86,2	5,8	3

Данные репрезентативного эксперимента показаны как среднее \pm стандартная ошибка. N - количество независимых экспериментов.

Пример 3. Эффективность *in vivo* в обычных крысиных моделях.

Ожирение - обычное сопутствующее заболевание, связанное с диабетом и устойчивостью к инсулину. Сообщалось, что GDF15 уменьшает потребление пищи, вызывает потерю массы и улучшает гомеостаз глюкозы. Следовательно, соединение GDF15 может быть эффективным в терапии для стимулирования потери массы, и таких патологий, как Д2Т, дислипидемия, НАСГ и/или ожирение. Соединение 2 вводят самцам крыс Sprague Dawley в течение 15 дней с ежедневными измерениями массы тела и потребления пищи.

Обычных самцов крыс Sprague-Dawley (Envigo; возраст 14 недель) по прибытии в учреждение удерживают на обычном питании (TD2014; Teklad, Мэдисон, Висконсин), и используют в дальнейших исследованиях. Животных размещали раздельно в помещении с контролируемой температурой (24°C) с 12-часовым циклом "свет/тьма" (свет зажигается в 06:00) и с свободным доступом к пище (TD2014) (Teklad) и воде.

После как минимум одной недели адаптации к помещению крыс рандомизировали в соответствии с их массой тела, так что каждая экспериментальная группа животных имела сходную массу тела. Масса тела колебалась от 332 до 369 граммов.

Все группы содержат по пять крыс. Носитель или соединение 2 (диапазон доз от 0,01 до 0,3 мг/г), растворенные в носителе (ФСБ), вводят с помощью подкожной (п/к) инъекции (1 мл/кг) каждые 3 суток в течение 15 суток обычным крысам, которых кормят на свое усмотрение.

П/к инъекции осуществляют в день 1, 4, 7, 10 и 13. Ежедневные измерения массы тела и потребления пищи производятся в течение всего периода исследования.

Процентная масса тела рассчитывается ежедневно от начальной массы тела каждого животного следующим образом:

$$\% \text{ Масса тела} = (\text{ежедневная масса тела} / \text{начальная масса тела}) \times 100.$$

Все данные представлены как среднее значение \pm СОС для пяти животных в группе. Концентрации эффективных доз для процентной потери массы и совокупного потребления пищи определяют в Graph-Pad Prism с помощью инструмента нелинейной подгонки. Статистический анализ выполняют с помощью повторяемых оцениваний дисперсионным анализом, с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений. Определяют статистически значимую разницу при *-p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001, **** - p<0,0001.

Таблица 3

Влияние обработки соединением 2 на процентную массу тела и совокупное потребление пищи у обычных крыс СД (Спрег-Доули)

Обработка	Масса тела (%)	Совокупное потребление пищи (г)
Носитель (1 мл/кг, п/к)	106,69 \pm 0,54	264,48 \pm 7,28
Соединение 2 (0,01 мг/кг)	93,34 \pm 2,13*	193,04 \pm 8,54*
Соединение 2 (0,03 мг/кг)	85,18 \pm 2,60*	155,42 \pm 11,13*
Соединение 2 (0,06 мг/кг)	81,80 \pm 1,66*	122,54 \pm 14,05*
Соединение 2 (0,1 мг/кг)	78,30 \pm 3,71*	115,74 \pm 15,75*
Соединение 2 (0,3 мг/кг)	73,57 \pm 1,56*	91,22 \pm 8,57*

Все данные представлены как среднее \pm СОС 5 животных/группа с дня 14. Статистический анализ выполняли с помощью повторяемых оцениваний дисперсионным анализом, с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений. Статистически значимые различия были выявлены при * p<0,05.

Систематическая обработка соединением 2 у обычных самцов крыс СД привела к статистически значимому уменьшению потребления пищи и статистически значимому уменьшению процентной массы тела по завершении исследования по сравнению с животными, которых обрабатывали носителем в зависимости от дозы. Кумулятивное потребление пищи снижается с 264,48 до 91,22 при максимальной испы-

танной дозе, а уменьшение массы тела колеблется от 7 до 26%. Данные, по-видимому, указывают на то, что соединение 2 оказывает статистически значимое влияние на снижение массы тела и потребления пищи у нормальных крыс СД дозозависимым образом.

Пример 4. Эффективность *in vivo* у мышей с алиментарным ожирением (АО).

Чтобы исследовать влияние соединения 2 на потерю массы, метаболизм, состав тела и стеатоз печени, соединение 2 систематически вводят мышам C57/B16 АО. Самцов мышей C57/B16 АО (Taconic) в возрасте от 24 до 25 недель по прибытии в учреждение содержат на высококалорийной диете (TD95217; Teklad, Мэдисон, Висконсин), и их используют в дальнейших исследованиях. Животных размещают раздельно в помещении с контролируемой температурой (24°C) с 12-часовым циклом "свет/тьма" (свет зажигается в 22:00) и с свободным доступом к пище (TD95217) (Teklad) и воде. После как минимум 2-ух недель адаптации к помещению мышей рандомизируют в соответствии с их массой тела, так что каждая экспериментальная группа животных имеет сходную массу тела. Масса тела колеблется от 40 до 50 г. Все группы содержат по пять мышей. Носитель или соединение 2 (0,002, 0,006, 0,02, 0,06 и 0,2 мг/кг), растворяют в носителе (ФСБ) и вводят с помощью подкожной (п/к) инъекции (10 мл/кг) мышам АО, которых кормят неограниченно, каждые 3 суток в течение 21 суток за 30-90 мин до начала темного цикла. П/к инъекции осуществляют в день 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 и 22. Массу тела и потребление пищи измеряют ежедневно на протяжении всего исследования.

Абсолютные изменения массы тела рассчитывают путем вычитания массы тела того же животного перед первой инъекцией молекулы. В день 17 животных не кормят в 06:00 и в 13:00, собирают кровь для измерения уровня глюкозы и инсулина в крови натощак. Уровень глюкозы в крови измеряют глюкометрами AccuChek® (Roche Diabetes Care, Inc.; Индианаполис, Индиана). Инсулин измеряют с помощью ИФА (MSD, Роквилл, Мэриленд). Индекс инсулинорезистентности рассчитывают по формуле: HOMA IR = инсулин плазмы натощак (мМЕл/л) * (глюкоза крови натощак (ммоль/л)/22,5. В день 24 животных умерщвляют до наступления темного фотопериода, и печень извлекают и замораживают. Уровни триглицеридов, установленные в гомогенатах печени, собранных при умерщвлении, и исследуемое вещество в плазме измеряют на клиническом анализаторе Hitachi Modular P.

Таблица 4

Влияние обработки соединением 2 на массу тела и совокупное потребление пищи у мышей АО в день 16

Обработка	Изменение массы тела по сравнению с первоначальным измерением (г)	Совокупное потребление пищи (г)
Носитель (10 мл/кг, п/к)	-0,68±0,14	41,30±0,94
Соединение 2 (0,002 мг/кг)	-4,58±0,71*	33,22±0,99*
Соединение 2 (0,006 мг/кг)	-8,64±0,41*	29,24±1,41*
Соединение 2 (0,02 мг/кг)	-11,82±0,57*	23,00±1,86*
Соединение 2 (0,06 мг/кг)	-9,02±0,57*	23,86±0,96*
Соединение 2 (0,2 мг/кг)	-9,08±0,59*	27,52±1,30*

Все данные представлены как среднее ±СОС 5 животных/группа.

Значения представлены как среднее ±СОС с n=5. *p<0,05 по сравнению с группой носителя; однофакторный дисперсионный анализ, с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений.

Таблица 5

Влияние обработки соединением 2 на сывороточную глюкозу, холестерин, аланин-аминотрансферазу (АЛТ) и триглицериды печени у мышей АО в день 24

Обработка	Глюкоза (мг/дл)	Холестерин (мг/дл)	АЛТ (МЕ/л)	Триглицериды печени (мг/г ткани)
Носитель (10 мл/кг, п/к)	339,18±30,58	271,80±12,02	310,80±34,92	210,10±11,82
Соединение 2 (0,002 мг/кг)	317,52±17,95	220,80±4,89*	231,60±25,39	69,88±18,88*
Соединение 2 (0,006 мг/кг)	261,00±20,43*	177,00±7,82*	159,60±73,32*	46,56±13,85*
Соединение 2 (0,02 мг/кг)	223,38±16,02*	172,80±18,51*	87,00±13,04*	24,82±8,80*
Соединение 2 (0,06 мг/кг)	245,94±10,10*	199,20±15,34*	114,60±22,72*	58,90±14,45*
Соединение 2 (0,2 мг/кг)	241,02±8,88*	167,40±8,72*	112,80±19,15*	34,62±10,88*

Значения представлены как среднее ±СОС с n=5. *p<0,05 по сравнению с группой носителя; однофакторный дисперсионный анализ, с последующим применением критерия Даннета.

Таблица 6

Влияние обработки соединением 2 на глюкозу, инсулин в крови натошак, и НОМА-IR, у мышей АО в день 17

Обработка	Глюкоза натошак (ммоль/л)	Инсулин натошак (мМЕ/л/мл)	НОМА-IR
Носитель (10 мл/кг, п/к)	6,80±0,28	85,64±13,68	25,78±4,13
Соединение 2 (0,002 мг/кг)	6,64±0,28	45,94±4,66*	13,51±1,32*
Соединение 2 (0,06 мг/кг)	5,16±0,53*	26,44±2,95*	6,22±1,15*

Все данные представлены как среднее \pm СОС 5 животных/группа с дня 17. Статистический анализ выполняли с применением повторяемых оцениваний дисперсионным анализом, с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений. Статистически значимые различия выявлены при $p < 0,05$.

Соединение 2 дозозависимо уменьшает массу тела и потребление пищи у самцов мышей АО, что указывает на то, что оно может быть использовано в терапии для стимулирования потери массы и ожирения (табл. 4). Соединение 2 также снижает сывороточный уровень глюкозы, что указывает на то, что оно может быть использовано в лечении диабета (табл. 5). Соединение 2 дополнительно снижает уровень холестерина, что указывает на то, что оно может быть использовано в лечении дислипидемии (табл. 5). Соединение 2 улучшает состояние печени (демонстрируется снижением сывороточного уровня АЛТ) и снижает уровень триглицеридов в печени, что указывает на то, что оно может быть использовано в терапии НАСГ (табл. 5). Исследование уровня глюкозы и инсулина в крови натошак, выполненное в день 17, демонстрирует повышенную чувствительность к инсулину и пониженный индекс инсулинорезистентности, что дополнительно подтверждает возможность применения соединения 2 в лечении диабета (табл. 6).

Пример 5. Стабильность различных конструкций Fc-GDF15.

Агрегация белка в фармацевтическом продукте нежелательна, потому что она снижает общий выход продукции и может вызвать иммунный ответ при введении отдельным особям. Таким образом, поддержание соединения в мономерном состоянии, или в этом случае в виде ковалентно связанного гомодимера, является предпочтительным. Чтобы проверить склонность различных слитых белков GDF15 к агрегированию и/или разрушению, различные слитые белки Fc-GDF15 могут быть экспрессированы в клетках СНО млекопитающего. Слитые белки Fc-GDF15 могут быть захвачены белком A Mab Select (GE; Пискатауэй, Нью-Джерси) с рабочим буфером ФСБ (рН 7,4); могут быть быстро промыты рабочим буфером для удаления неспецифически связавшегося материала; и могут быть элюированы 20 мМ уксусной кислотой и 5 мМ лимонной кислотой, рН 3. Фракции, содержащие белки Fc-GDF15, объединяют, и рН нейтрализуют добавлением 1/10 объема 1 М Трис рН 8,0.

Захваченный белком А пул затем анализируют с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ) для определения % агрегата с высокой молекулярной массой (ВММ), указывающего на степень возникшей агрегации. Способ разделения ЭХ выполняют на Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 мкм колонке с размерами 30 см×0,78 см. Подвижная фаза представляет собой ФСБх1, 350 мМ NaCl (рН 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин. Образцы с исходной низкой концентрацией вводят в виде инъекций по 10 мкл и отслеживают при длине волны поглощения 214 нм. % НММ компонентов указывает на химическую стабильность, или на низкомолекулярные продукты распада соединения.

Таблица 7

Сравнение физической и химической стабильности различных слитых белков Fc-GDF15

Соединение	% ВММ	% НММ
Соединение 2 (включая мономерный Fc)	4,1	2,3
Соединение 3 (включая тандемный Fc)	60,8	3,6
Соединение 4 (включая гетеродимерный Fc)	2,0	49,1

Тандемная конструкция слитого белка Fc-GDF15 (две одинаковые части Fc антитела прикрепляют друг к другу конец-в-конец, включая шарнирную область, и затем присоединяют к молекуле GDF15, где части GDF15 затем самообъединяются для создания димера), соединение 3 (гомодимер двух молекул, каждая содержит SEQ ID NO: 5) имеет ВММ 60,8% по сравнению с 4,1% ВММ соединения 2. Это предполагает, что соединение 2 имеет лучшую физическую стабильность, меньшую агрегацию и меньший риск иммуногенных агрегатов, чем тандемная конструкция слитого белка Fc-GDF15.

Гетеродимерный Fc-GDF15 (две разные части Fc антитела, которые связаны друг с другом бок о бок, и где одна часть Fc (цепь В, SEQ ID NO: 17) связана с другой частью Fc, которая присоединена к молекуле GDF15 (цепь А, SEQ ID NO: 6), и где части GDF15 затем самообъединяются с формированием

гомодимера), соединение 4 (гомодимер двух молекул, каждая молекула содержит гетеродимер SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17) имеет высокий 49,1% НММ компонентов по сравнению с соединением 2, которое имеет только 2,3% НММ, что позволяет предположить, что соединение 2 имеет лучшую химическую стабильность и пониженную расположенность к химическому или протеолитическому расщеплению. Химическая стабильность и предотвращение разрушения помогает сохранять эффективность соединения в течение длительных периодов времени. Кроме того, меньшее разрушение сводит к минимуму риск того, что побочные продукты разрушения вызовут дополнительные проблемы с эффективностью из-за препятствующего взаимодействия с активным ингредиентом в лекарственной форме, или что побочные продукты разрушения будут агрегироваться и вызывать проблемы с иммуногенностью.

Пример 6. Сравнение стабильности Fc с двойной и одиночной мутацией.

Уникальная структура части Fc соединений, приведенных в данном документе, с двумя специфическими мутациями, неожиданно демонстрирует лучшую стабильность и более высокую растворимость при высоких концентрациях, чем конструкция Fc с только одной любой мутацией. Получают два Fc с единственной мутацией для нарушения объединения СН3/СН3 в IgG4-Fc и для создания мономерной конструкции Fc. Первым одиночным мутантом является соединение 7, в котором глутамин заменен на фенилаланин в позиции 405 в полноразмерной тяжелой цепи IgG4 человека, соответствующей позиции 173 в SEQ ID NO: 2 (позиция 175 в SEQ ID NO: 9). Второй полученный одиночный мутант представляет собой соединение 8, Fc с глутаминовой кислотой, замещенной тирозином в позиции 407 в полноразмерной тяжелой цепи IgG4 человека, соответствующей позиции 175 в SEQ ID NO: 2 (позиция 177 в SEQ ID NO: 10). Также был получен двойной мутант Fc, соединение 5 (SEQ ID NO: 7), и он содержит обе мутации Fc из соединений 7 и 8. Соединение 5 имеет ту же последовательность, что и соединение 2, за исключением того, что две дополнительные аминокислоты, AP, присутствуют на N-конце области Fc в соединении 5. В соединениях 2, 5, 7 и 8 отсутствует шарнирная область ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 8) для обеспечения формирования мономерного Fc IgG4.

Соединения в этом примере экспрессируют в клетках CHO млекопитающего, и захватывают из собранной среды белком A Mab Select (GE) с рабочим буфером ФСБ (рН 7,4); быстро промывают рабочим буфером для удаления неспецифически связавшегося материала; и элюируют 20 мМ уксусной кислотой и 5 мМ лимонной кислотой, рН 3,0. Фракции, содержащие белки GDF15, объединяют, и рН нейтрализуют добавлением 1/10 объема 1 М Трис рН 8,0.

Затем нейтрализованные, захваченные белком А, пулы замещают буфером в 10 мМ цитрат, рН 5,0, в 0,5 мл центрифужном концентраторе Amicon Ultra с 10 MWCO. Затем одиночные и двойные мутанты Fc-GDF15 пробуют сконцентрировать вплоть до или выше 10 мг/мл с использованием 0,5 мл центрифужного концентратора Amicon Ultra с 10 MWCO.

Таблица 8

Максимальная растворимость слитых GDF15 при рН 5,0

Соединение	Максимальная растворимость при рН 5,0 (мг/мл)	Визуальные наблюдения
Гомодимер Соединения 7 (SEQ ID NO: 9)	1,7	Невозможно достичь 10 мг/мл; замечен осадок во время концентрирования
Гомодимер Соединения 8 (SEQ ID NO: 10)	6,7	Невозможно достичь 10 мг/мл, замечен осадок во время концентрирования
Гомодимер Соединения 5 (SEQ ID NO: 7)	9,8	Прозрачный раствор
Контроль - только мономерный Fc IgG4	12,0	Прозрачный раствор

Результаты показывают, что одиночные мутанты Fc, гомодимеры соединения 7 и соединения 8, имеют пониженную растворимость по сравнению с двойным мутантом Fc, гомодимером соединения 5. Гомодимер соединения 7 не смог достичь 10 мг/мл из-за осаждения и потери материала. Гомодимер соединения 8 продемонстрировал улучшенную растворимость по сравнению с гомодимером соединения 7; однако не было возможным достичь 10 мг/мл из-за потери материала в процессе концентрирования. Гомодимер соединения 5 с новой двойной мутацией в Fc сохранял растворимость на уровне 9,8 мг/мл. Контроль - только мономерный Fc IgG4 - был растворим вплоть до 12 мг/мл.

Пример 7. Сравнение химической стабильности для гибких или жестких линкеров.

Чтобы проверить химическую стабильность соединений GDF15, приведенных в данном документе, такие соединения могут быть подвергнуты диализу в течение ночи при 4°C в следующие буферы: 10 мМ цитрат, рН6 (C6), 10 мМ цитрат, рН7 (C7), 10 мМ Трис, рН 7,0 (T7), 10 мМ Трис, рН 8,0 (T8) или 1хФСБ, рН 7,4 (ФСБ). Для оценки долгосрочной стабильности слитых Fc-GDF15 растворы белка 1,0 мг/мл в соответствующих буферах можно хранить при 4, 25 и 40°C в течение 4 недель, а % НММ определять с помощью аналитической ЭХ.

Способ разделения ЭХ может быть выполнен на Tosoh Bioscience 3000SWXL, 5 мкм колонке с размерами 30 см×0,78 см. Подвижная фаза может представлять собой ФСБ, 350 мМ NaCl, pH 7,4, при скорости потока 0,5 мл/мин. Образцы с исходной низкой концентрацией могут вводиться в виде инъекций по 10 мкл и отслеживаются при длине волны поглощения 214 нм.

Изменения химической стабильности, измеренные по % НММ, оцениваются относительно образцов точки времени 0. Как определено исследованиями, проведенными по существу, как описано выше, рост % НММ для соединений GDF15 подытожен в табл. 9.

Исследуемые соединения представляют собой соединение 2, гомодимер соединения 1 (SEQ ID NO: 2), с жестким линкером G4-AP10-G4, гомодимер соединения 5 (SEQ ID NO: 7) с гибким линкером L5Q (GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ (SEQ ID NO: 12)) и гомодимер соединения 6 (SEQ ID NO: 11) с жестким линкером G4S-AP10-G4S.

Таблица 9
Рост в % НММ для соединений GDF15 при 1 мг/мл, как определено аналитической ЭХ

	Рост % НММ при 1 мг/мл после 4 недель хранения при 4 °С, 25 °С и 40 °С								
	Цитрат pH 6,0			Цитрат pH 7,0 или Трис pH 7,0			Трис pH 8,0 или ФСБ pH 7,4		
	4 °С	25 °С	40 °С	4 °С	25 °С	40 °С	4 °С	25 °С	40 °С
Соединение 2 Линкер: GGGG-AP10-GGGG	0	0	0,75	0	0,36	3,45	0,15	0,99	7,09
Гомодимер Соединения 5 Линкер: L5Q	0,37	0,81	3,99	0,56	1,8	6,63	0,71	2,8	10,5
Гомодимер Соединения 6 Линкер: GGGGS-AP10-GGGGS	1,65	0,76	2,7	1,52	1,2	5,76	1,83	1,52	5,65

Линкер L5Q имеет более высокий % НММ после хранения при 25 и 40°C, чем любой из линкеров AP10, что позволяет предположить более высокую склонность к химическому разрушению слитых белков GDF15, содержащих гибкий линкер L5Q, по сравнению с белком, содержащим жесткий линкер AP10 (APAPAPAPAPAPAPAPAPAP; SEQ ID NO: 13). Также, гомодимер соединения 6 с линкером, содержащим G4S (GGGGS; SEQ ID NO: 14), имеет более высокий % НММ, чем соединение 2, с линкером, содержащим G4 (GGGG; SEQ ID NO: 15), в большинстве условий, что свидетельствует о большей химической стабильности соединения 2 с его линкером G4-AP10-G4. Химическая и физическая стабильность соединений GDF15 с жесткими (соединение 2 и соединение 6) и гибкими линкерами (соединение 5) может быть оценена при высокой концентрации - 10 мг/мл. Соединения могут быть сперва подвергнуты диализу O/N при 4°C в следующие буферы: (a) 10 мМ цитрат, pH 6,5; (b) 10 мМ цитрат, pH 6,5, 150 мМ NaCl; и (c) 10 мМ цитрат, pH 6,5, 0,02% полисорбат 80. В состав добавляют наполнители, такие как 150 мМ NaCl и 0,02% полисорбат, чтобы проверить их влияние на химическую и физическую стабильность гибридов GDF15. Затем соединения могут быть сконцентрированы до 10 мг/мл с использованием концентраторов Millipore Spin 10,000 MWCO, 15 мл. После концентрирования % ВММ и % НММ может быть определен с помощью ЭХ с использованием концентрированного белка (t=0). Способ разделения ЭХ может быть выполнен на колонке 5 мкм с размерами 30 см×0,78 см, Tosoh Bioscience 3000SWXL. Подвижная фаза представляла собой ФСБ, 350 мМ NaCl (pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин. Образцы 10 мг/мл разбавляют до 1 мг/мл в соответствующих буферах, а затем вводят в виде инъекций по 10 мкл и отслеживают при длине волны поглощения 214 нм.

Составы 10 мг/мл могут инкубироваться в течение 4 недель при 4, 25 и 40°C для оценки долгосрочной стабильности в стрессовых условиях. % НММ и % ВММ может быть определен снова через 4 недели (t=4 нед.) с помощью ЭХ. Изменения химической стабильности (% НММ) могут быть оценены относительно образцов точки времени 0.

Таблица 10
Химическая стабильность, представленная как рост % НММ для соединений GDF15 при 10 мг/мл

Рост % НММ при 10 мг/мл после 4 недель хранения при 4 °С, 25 °С и 40 °С		
Цитрат pH 6,5	Цитрат pH 6,5 + 150 мМ NaCl	Цитрат pH 6,5 + 0,02% полисорбат 80

	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
Гомодимер Соединения 5 Линкер: L5Q	0,52	1,03	6,39	0,25	0,86	5,11	0,27	1,04	6,2
Гомодимер Соединения 6 Линкер: GGGS-AP10- GGGS	0	0,2	2,73	0	0,3	2,52	0	0,31	2,8

Таблица 11
Физическая стабильность, представленная как рост % ВММ для соединений GDF15 при 10 мг/мл

	Рост % ВММ при 10 мг/мл после 4 недель хранения при 4, 25 и 40 °C								
	Цитрат pH 6,5			Цитрат pH 6,5 + 150 мМ NaCl			Цитрат pH 6,5 + 0,02% полисорбат 80		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
Гомодимер Соединения 5 Линкер: L5Q	0,06	0,23	3,04	0,05	0,19	7,3	0,1	0,24	3,13
Гомодимер Соединения 6 Линкер: GGGS- AP10-GGGS	0	0,1	2,98	0	0,33	7,18	0	0	2,85

Как показано в табл. 10, гомодимер соединения 5 при 10 мг/мл, содержащий гибкий линкер, показал более высокий уровень % НММ, чем гомодимер соединения 6 с жестким линкером, при 25 и 40°C, что указывает на более низкую химическую стабильность.

Как показано в табл. 11, гомодимер соединения 5 при 10 мг/мл, содержащий гибкий линкер, показал более высокий уровень % ВММ, чем гомодимер соединения 6 с жестким линкером, что указывает на более низкую физическую стабильность. Низкая химическая и/или физическая стабильность может вызвать преципитацию и возможные проблемы с иммуногенностью.

Пример 8. Фармакокинетика соединений GDF15.

Фармакокинетику соединения 2 исследуют на обезьянах. Концентрации соединений GDF15 в плазме определяют способом ИФА в Eli Lilly and Company (Индианаполис, Индиана). Сэндвич-ИФА использует поликлональные козы антитела против GDF15 человека (R&D Systems/AF957) или моноклональные мышинные антитела против GDF15 человека/приматов (R&D Systems/MAB957), нанесенные в количестве 1 или 3 мкг/мл в качестве реагента для захвата. Затем соединение GDF15 детектируют с помощью мышинного антитела против IgG4 pFc-HRP человека (Southern Biotech/9190-05) или мышинного антитела против IgG Fc-HRP человека (Southern Biotech/9200-05). Планшеты проявляют с использованием системы субстрата тетраметилбензидин (ТМБ) (SeraCare/5120), и ферментативную реакцию гасят ТМБ Stop Solution (KPL/50-85-04). Самцам яванского макака вводят однократную подкожную дозу (0,3 мг/кг) соединения 2 в ФСБ (pH 7,4) в объеме 0,5 мл/кг. Кровь собирают у каждого животного перед введением дозы и через 6, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408 и 504 ч после введения дозы для фармакокинетической характеристики.

Таблица 12
Индивидуальные и средние фармакокинетические показатели после введения однократной подкожной дозы 0,3 мг/кг самцам яванского макака

Соединение (Доза)	Животное	t _{1/2} (ч)	T _{max} (ч)	C _{max} (мкг/мл)	AUC _{0-inf} (ч*мкг/мл)	CL/F (мл/ч/кг)
Соединение 2 (0,3 мг/кг)	1	118	48	1,96	206	1,45
	2	116	48	2,44	184	1,63
	Среднее	117	48	2,20	195	1,54

Сокращения: AUC_{0-inf} = площадь под кривой от точки времени 0 ч до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность, T_{max} = время до максимальной концентрации, C_{max} = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме, t_{1/2} = период полужизни.

Данные в табл. 12 показывают, что t_{1/2} у макаков составляет 117 ч. Это неожиданно длинный t_{1/2} для мономерной молекулы Fc. Также, фармакокинетический профиль у макаков стабилен в течение длительного периода времени, что позволяет предположить, что фармакокинетический профиль соединения 2 у людей также может быть явно стабильным в течение длительного периода времени в пределах терапевтического диапазона, делая возможным стабильный уровень лекарственного средства в кровотоке при введении дозы один раз в неделю.

Последовательности

В раскрытие данного изобретения включены ссылки на нижеследующие нуклеиновые и/или аминокислотные последовательности, и они приводятся ниже для справки.

SEQ ID NO: 1 - Зрелый GDF15 человека

ARNGDHCPLGPRCCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM
HAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO: 2 – Слитый белок

EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFQLESR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAGGAPAPAPAPAPAPAPAPA
PAPGGGGDHCPLGPRCCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NO: 3 - Лидерная последовательность

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

SEQ ID NO: 4 - Искусственная последовательность

QTNNCTYLREQCLRDANGCKHAWRVMEDACNDSDPGDPCKMRNSSYCNLSIQYLVES
NFQFKECLCTDDFYCTVNKLLGKKCINKSDNVKEDKFKWNLTRSHHGFKGMWSCLE
VAEACVGDVVCNAQLASYLKACANGNPCDLKQCQAIRFFYQNPFNIAQMLAFDCDC
AQSDIPCQSQEALHSKTCAVNMVPPPTCLSVIRSCQNDLCCRHYRTFQSKCWQRVTR
KCHEDENCISTLSKQDLTCSGSDDCAAAYIDILGTVLQVQCTCRTITQSEESLCKIFQHML
HRKSCFNYP TLSNVKGMALYTRKHANKHHHHHH

SEQ ID NO: 13 - Искусственная последовательность

APAPAPAPAPAPAPAPAPAP

SEQ ID NO: 14 - Искусственная последовательность

GGGGS

SEQ ID NO: 15 - Искусственная последовательность

GGGG

SEQ ID NO: 16 - Искусственная последовательность

gaggccgcccggggaccatcagttcttctgtcccccaaaaccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtg
 gtggtggagctgagccaggaagaccggaggtccagttcaactgtgtacgtggatggcgtggaggtgcataatccaagacaagaccgc
 gggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgc
 aaggtctccaacaaggcctcccctcctccatcagagaaaacctcctcaagcaaggcagccccagagccacaggtgtacacct
 gccccatcccaggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgtcaaggcttctacccagcgacatcgccgtggagt
 gggaaagcaatgggagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctcctccagctcagagcaggt
 aaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagag
 cctctccctgtctctgggtggggtggagctccagccccagctcctcctcctcaccagcacctgccccgctccagcaccgcacct
 ggaggagggggcggtgaccactgtcccctggggcctggccggtgtgagactgcatacagtcgggctccctggaagacctgggtg
 ggcaagtgggtgctctcacctcgcgaggtcaggtgacctgtgattggggtgtccctcacaatttcgagcagtaaacatgcacgccc
 aatcaaacctccctgcaccggcctaaccggatactgttctcctcctcctgctgctgcccagcatcctacaacccccatgggtgctgaccaga
 agacggatacaggggtgctactgcagacctatgatgacctcctggccaagattgccactgtatc

SEQ ID NO: 17 - Искусственная последовательность

DKTHTCPPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее последовательность SEQ ID NO: 2.
2. Соединение, состоящее из последовательности SEQ ID NO: 2.
3. Гомодимер, содержащий два соединения по п.1 или 2, отличающийся тем, что соединения связаны по меньшей мере одной межпептидной дисульфидной связью между остатком цистеина первого соединения и остатком цистеина второго соединения.
4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по пп.1-3, и один или большее количество фармацевтически приемлемых эксципиентов.
5. Способ стимулирования потери массы тела у пациента, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений по пп.1-3 или композиции по п.4.
6. Способ лечения диабета 2-го типа у пациента, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений по пп.1-3 или композиции по п.4.
7. Способ лечения ожирения у пациента, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений по пп.1-3 или композиции по п.4.
8. Способ лечения НАСГ у пациента, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений по пп.1-3 или композиции по п.4.
9. Способ лечения дислипидемии у пациента, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений по пп.1-3 или композиции по п.4.
10. Применение соединения по пп.1-3 для стимулирования потери массы тела.
11. Применение соединения по пп.1-3 для лечения диабета 2-го типа.
12. Применение соединения по пп.1-3 для лечения ожирения.
13. Применение соединения по пп.1-3 для лечения дислипидемии.
14. Применение соединения по пп.1-3 для лечения НАСГ.
15. Применение соединения по пп.1-3 в производстве лекарственного средства для стимулирования

потери массы тела.

16. Применение соединения по пп.1-3 в производстве лекарственного средства для лечения диабета 2-го типа.

17. Применение соединения по пп.1-3 в производстве лекарственного средства для лечения ожирения.

18. Применение соединения по пп.1-3 в производстве лекарственного средства для лечения дислипидемии.

19. Применение соединения по пп.1-3 в производстве лекарственного средства для лечения НАСГ.

20. Соединение, содержащее последовательность SEQ ID NO: 2, причем соединение получают путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу кДНК, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, в таких условиях, при которых полипептид экспрессируется, и выделения соединения.

21. Способ стимулирования потери массы тела у пациента, лечения диабета 2-го типа, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений по пп.1-3 или композиции по п.4 один раз в неделю.

