

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045412**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.11.23**

(21) Номер заявки  
**202090649**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.09.21**

(51) Int. Cl. **C07K 14/605** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

---

(54) **АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА 1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **62/562,283**

(32) **2017.09.22**

(33) **US**

(43) **2020.06.29**

(86) **PCT/US2018/052110**

(87) **WO 2019/060653 2019.03.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Вей Янг, Окамото Харука, Громада  
Джеспер, Дэвис Самьюэл, Мерфи  
Эндрю Дж. (US)**

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

(56) **HYE-SHIN CHUNG ET AL.:** "The N-terminal alanine-extended GLP-1/IgG-Fc fusion protein confers resistance to DPP-IV and reduces serum glucose level in db/db mice", *REGULATORY PEPTIDES*, vol. 170, no. 1-3, 1 October 2011 (2011-10-01), pages 1-3, XP055523607, NL, ISSN: 0167-0115, DOI:10.1016/j.regpep.2011.05.002, abstract, page 1, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1, page 2, left-hand column, last paragraph - page 3, right-hand column, last paragraph, figure 2

**YONG-MO KIM ET AL.:** "Novel AGLP-1 albumin fusion protein as a long-lasting agent for type 2 diabetes", *BMB REPORTS*, vol. 46, no. 12, 31 December 2013 (2013-12-31), pages 606-610, XP055523611, KR, ISSN: 1976-6696, DOI:10.5483/BMBRep.2013.46.12.106, abstract, page 606, right-hand column, last paragraph - page 607, right-hand column, paragraph 1, page 608, left-hand column, paragraph 1, page 608, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 2, page 609, left-hand column, paragraph 3, figures 1, 3  
**KR-B1-101229610**

**WOLFGANG GLAESNER ET AL.:** "Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein", *DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS*, vol. 26, no. 4, 30 April 2010 (2010-04-30), pages 287-296, XP055181624, ISSN: 1520-7552, DOI: 10.1002/dmrr.1080, the whole document

**BIKASH MANANDHAR ET AL.:** "Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Analogs: Recent Advances, New Possibilities, and Therapeutic Implications", *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, vol. 58, no. 3, 12 February 2015 (2015-02-12), pages 1020-1037, XP055402142, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm500810s, the whole document

**CN-A1-104098702**

**EP-A1-3034514**

(57) Изобретение относится к модифицированным полипептидам глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), слитым белкам, содержащим модифицированные полипептиды GLP1, и способам их применения. Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения слитые белки являются агонистами рецептора GLP1, которые содержат модифицированный GLP1, слитый со стабилизирующим доменом. Согласно некоторым вариантам осуществления слитые белки, содержащие модифицированный GLP1, являются применимыми для лечения или уменьшения интенсивности симптомов или признаков нарушения, такого как ожирение и сахарный диабет.

**B1****045412****045412****B1**

**Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение относится к агонистам рецептора глюкагоноподобного пептида 1 человека и терапевтическим способам применения указанных агонистов.

**Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Ожирение стало основной проблемой здравоохранения в Соединенных Штатах Америки, причем считается, что двое из трех американцев страдают избыточной массой тела или ожирением. Ожирение является важным фактором риска развития других заболеваний, таких как заболевание сердечно-сосудистой системы, инсульт и сахарный диабет. Даже небольшое снижение массы тела (5-10% от первоначальной массы тела) снижает риск развития заболеваний, связанных с ожирением, таких как заболевание сердечно-сосудистой системы и сахарный диабет.

Сахарный диабет является хроническим состоянием, которое характеризуется высоким содержанием сахара в крови и резистентностью к инсулину. Без лечения высокое содержание сахара в крови может привести к долгосрочным осложнениям, включая в себя заболевание сердечно-сосудистой системы, инсульт, диабетическую ретинопатию и ампутацию нижних конечностей. Лечение сахарного диабета включает в себя контроль и снижение содержания сахара в крови и включает в себя физические упражнения и модификацию диеты, а также такие лекарственные средства, как инсулин и метформин.

Один из подходов, используемых для лечения ожирения и для контроля содержания глюкозы в крови, включает в себя агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида (GLP)-1, которые нацелены на путь инкретина. Глюкагоноподобный пептид (GLP)-1 представляет собой пептидный гормон, секретлируемый энтероэндокринными клетками кишечника. При пероральном введении глюкозы GLP1 связывается со своим рецептором, что приводит к секреции инсулина и снижению содержания сахара в крови (эффект инкретина). Тем не менее GLP1 быстро инактивируется и разрушается ферментом дипептидилпептидазой 4 (DPP4) и характеризуется очень коротким периодом полужизни, составляющим 1,5 мин. Следовательно, длительно действующие производные GLP1, а также агонисты рецептора GLP1, включая в себя слитые белки, содержащие GLP1, были изучены для контроля сахарного диабета. Аналоги GLP1, слитые белки и агонисты рецептора GLP1 раскрыты, например, в US 7452966, US 8389689, US 8497240, US 8557769, US 8883447, US 8895694, US 9409966, US 2016/0194371, US 2014/0024586, US 2014/0073563, US 2012/0148586, US 2017/0114115, US 2017/0112904, US 2016/0361390, US 2015/0313908, US 2015/0259416, WO 2017/074715, WO 2016/127887, WO 2015/021871, WO 2014/113357, EP 3034514, EP 2470198 и EP 2373681.

Тем не менее существует потребность в новых вариантах пептида GLP1 и агонистах рецептора GLP1, которые являются устойчивыми к разложению за счет DPP4, обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами и характеризуются повышенной эффективностью и устойчивой активностью *in vivo* в гликемическом контроле. Такие варианты GLP1 и агонисты рецептора GLP1 можно использовать для лечения ожирения и сахарного диабета.

**Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к вариантам глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), содержащим по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению со зрелым GLP1 (7-37) (SEQ ID NO: 4), выбранную из группы, состоящей из следующего: (i) добавление аминокислоты к N-концу и (ii) делеция аминокислоты в пептидной последовательности. Согласно определенным вариантам осуществления модификация содержит добавление аланина или глутамина к N-концу.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к агонистам рецептора GLP1, причем агонисты рецептора GLP1 содержат слитые белки, содержащие GLP1 или его вариант. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 содержат пептид GLP1 или вариант пептида GLP1, слитый со стабилизирующим доменом. Согласно одному варианту осуществления стабилизирующий домен представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с рецептором GLP1.

Агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению являются применимыми, среди прочего, для увеличения связывания и/или активности GLP1. Согласно некоторым вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению функционируют путем активации GLP1 и снижения содержания сахара в крови.

Согласно некоторым вариантам осуществления варианты пептида GLP1 и/или агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению являются более устойчивыми к инактивации дипептидилпептидазой 4 (DPP4) и показывают улучшенное время полужизни *in vivo*. Улучшенные агонисты GLP1 согласно настоящему изобретению приводят к значительному снижению содержания сахара в крови, которое поддерживается в течение более 10 дней даже при введении однократной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 функционируют путем усиления индуцированной глюкозой секреции инсулина из бета-клеток поджелудочной железы, увеличения экспрессии инсулина, ингибирования апоптоза бета-клеток, стимулирования регенерации бета-клеток, снижения секреции глюкагона, задержки опорожнения желудка, повышения сытости и увеличения периферической утилизации глюкозы. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 являются применимыми для профилактики, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного

симптома связанного с гипергликемией заболевания или нарушения (например, сахарного диабета) у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, характеризующемуся наличием или подверженному риску сахарного диабета. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 являются применимыми для профилактики, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома или признака ожирения, например снижение массы тела, у субъекта.

Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 представляют собой слитые белки, содержащие вариант GLP1 и стабилизирующий домен, причем стабилизирующий домен содержит иммуноглобулин или его фрагмент. Согласно конкретному варианту осуществления иммуноглобулин содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи и специфически связывается с рецептором GLP1. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 связываются с рецептором GLP1, что приводит к активации рецептора GLP1. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 функционируют путем активации рецептора GLP1, что приводит к гликемическому контролю, т.е. снижению содержания глюкозы в крови.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку, который обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (a) содержит вариантный домен GLP1 и стабилизирующий домен; (b) представляет собой агонист рецептора GLP1; (c) вариантный домен GLP1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 6, 7 или 8; (d) связывается с рецептором GLP1; (e) стабилизирующий домен содержит иммуноглобулин или его фрагмент; (f) стабилизирующий домен содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина; (g) стабилизирующий домен содержит антитело к рецептору GLP1 или его антигенсвязывающий фрагмент; (h) является устойчивым к разложению сывороточными протеазами в течение по меньшей мере 72 ч и (i) приводит к значительному снижению содержания глюкозы в сыворотке, которое поддерживается более 10 дней при введении однократной дозы.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим варианты GLP1 или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13, или по существу сходной с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности по отношению к ним.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любой из слитых белков, содержащих варианты GLP1.

Согласно связанному аспекту настоящее изобретение относится к рекомбинантным экспрессионным векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий вариант GLP1 или слитый белок, содержащий вариант GLP1, как описано в настоящем документе. Например, настоящее изобретение включает в себя рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любой из вариантов GLP1 или слитые белки, содержащие варианты GLP1. В объем настоящего изобретения также включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения белков или их фрагментов путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать белки или их фрагменты и извлекать белки и фрагменты, полученные таким образом.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного рекомбинантного белка или его фрагмента, который специфически связывается с рецептором GLP1, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно связанному аспекту настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию белка агониста рецептора GLP1 и второго терапевтического средства. Согласно одному варианту осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое благоприятным образом комбинируется с агонистом рецептора GLP1. Иллюстративные средства, которые можно благоприятным образом комбинировать с агонистом рецептора GLP1, включают в себя без ограничения другие средства, которые активируют активность рецептора GLP1 (включая в себя другие белки или метаболиты и т.д.), и/или средства, которые непосредственно не связываются с рецептором GLP1, но, тем не менее, облегчают или уменьшают интенсивность или лечат связанное с рецептором GLP1 заболевание или нарушение (например, сахарный диабет). Дополнительные виды комбинированной терапии и совместные составы, включающие в себя белки - агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, раскрыты в другом месте в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения связанного с GLP1 заболевания или нарушения, такого как сахарный диабет, у субъекта с использованием агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, причем терапевтические способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту. Согласно определенным вариантам осуществления агонист рецептора GLP1 содержит вариант GLP1 или слитый белок, содержащий вариант GLP1. Нарушение, которое лечат, представляет собой любое заболе-

вание или состояние, которое улучшается, интенсивность которого уменьшается, которое ингибируется или предотвращается путем активации активности рецептора GLP1. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам профилактики, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома связанного с рецептором GLP1 заболевания или нарушения, причем способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам уменьшения интенсивности или снижения тяжести по меньшей мере одного симптома или признака связанного с рецептором GLP1 заболевания или нарушения у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества белка - агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, причем по меньшей мере один симптом или признак выбран из группы, состоящей из высокого содержания сахара в крови, полидипсии, учащенного мочеиспускания, наличия кетонов в моче, патологической усталости, колебаний массы тела, нечеткости зрения, язв с медленным заживлением, частых инфекций, отеков или болезненных десен, ожирения, заболевания сердечно-сосудистой системы, инсульта, заболевания почек, заболевания глаз, повреждения нервов и высокого кровяного давления. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам снижения массы тела у субъекта с избыточной массой тела или ожирением, причем способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, который связывает рецептор GLP1 и активирует активность рецептора GLP1. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам снижения содержания сахара в крови у субъекта, причем способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, который связывает рецептор GLP1 и активирует активность рецептора GLP1. Согласно некоторым вариантам осуществления агонист рецептора GLP1 можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, характеризующемуся наличием или подверженному риску гипергликемии. Подверженные риску субъекты включают в себя без ограничения субъектов пожилого возраста, беременных женщин, субъектов с высоким уровнем HbA1c и субъектов с одним или несколькими факторами риска, включая в себя ожирение, высокое содержание холестерина в крови, курение, чрезмерное потребление алкоголя и/или недостаток физических упражнений. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения диабета 2 типа, который не контролируется лечением инсулином и/или метформином, причем способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту. Согласно определенным вариантам осуществления агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством нуждающемуся в этом субъекту. Второе терапевтическое средство можно выбрать из группы, состоящей из инсулина или аналога инсулина, бигуанида (например, метформина), тиазолидиндиона, сульфонилмочевины (например, хлорпропамида), глинида (например, натеглинида), ингибитора альфа-глюкозидазы, ингибитора DPP4 (например, ситаглиптина), прамлинтида, бромокриптина, ингибитора SGLT2 (например, канаглифлозина), антигипертензивного лекарственного средства, статины, аспирина, модификации диеты, физических упражнений и диетической добавки. Дополнительные терапевтические средства, которые можно использовать в комбинации со слитыми белками - агонистами рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, описаны в другом месте в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое помогает нейтрализовать или снизить любой(ые) возможный(е) побочный(е) эффект(ы), ассоциированный(ые) с агонистом рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, если такой(ие) побочный(е) эффект(ы) должен(должны) иметь место. Агонист рецептора GLP1 можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикожно, интраперитонеально, перорально, внутримышечно или интракраниально. Агонист рецептора GLP1 можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 0,1 - приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению можно вводить в одной или нескольких дозах, содержащих от 0,1 до 600 мг.

Настоящее изобретение также предусматривает применение агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения, на которое произвела бы положительный эффект стимуляция связывания и/или активности рецептора GLP1 (например, сахарный диабет, включая в себя сахарный диабет 2 типа).

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора следующего подробного раскрытия.

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Прежде чем будут описаны настоящие способы, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать при практическом применении или испытании настоящего изобретения, ниже описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в настоящем описании публикации полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

### Определения

Термин "GLP1", также называемый "глюкагоноподобный пептид 1", относится к пептидному гормону из 31 аминокислоты, высвобождаемому из L-клеток кишечника после потребления питательных веществ. GLP1 связывается с рецептором GLP1 и усиливает индуцируемую глюкозой секрецию инсулина из бета-клеток поджелудочной железы, повышает экспрессию инсулина, ингибирует апоптоз бета-клеток, способствует регенерации бета-клеток, снижает секрецию глюкагона, задерживает опорожнение желудка, способствует сытости и увеличивает периферической утилизации глюкозы. Согласно определенным вариантам осуществления термин "GLP1" относится к зрелому пептидному гормону из 31 аминокислоты (SEQ ID NO: 4), содержащему аминокислоты от 7 до 37 полноразмерного пептида GLP1 (SEQ ID NO: 3). Термин также включает в себя варианты GLP1, причем варианты содержат 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, добавлений или делеций. Например, термин включает в себя варианты, которые содержат аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 5, 6, 7 или 8.

Используемый в настоящем документе термин "стабилизирующий домен" представляет собой любую макромолекулу, которая при слиянии с пептидом увеличивает активность и/или стабильность пептида *in vivo*. Например, стабилизирующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен иммуноглобулина СН3. Согласно определенным вариантам осуществления стабилизирующий домен увеличивает период полужизни пептида в сыворотке. Согласно определенным вариантам осуществления стабилизирующий пептид увеличивает активность пептида *in vivo*. Неограничивающим примером стабилизирующего домена является Fc-часть иммуноглобулина, например Fc-домен IgG, выбранный из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любой аллотип в каждой изотипной группе. Согласно определенным вариантам осуществления стабилизирующий домен представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В качестве другого примера, стабилизирующий домен может представлять собой иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления стабилизирующий домен представляет собой иммуноглобулин, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем иммуноглобулин связывается со специфическим антигеном. Согласно определенным вариантам осуществления стабилизирующий домен содержит антигенсвязывающий домен и Fc-домен (например, антитела IgG1 или IgG4) или может содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab, F(ab)<sub>2</sub> или scFv) и может быть модифицирован, чтобы повлиять на функциональность. Согласно конкретному варианту осуществления стабилизирующий домен представляет собой иммуноглобулин, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем иммуноглобулин связывается с рецептором GLP1. Согласно другим вариантам осуществления стабилизирующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие стабилизирующие домены включают в себя пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой застезки, мотива "спираль-петля" или мотива типа спиральной катушки (coiled-coil).

Используемый в настоящем документе термин "агонист рецептора GLP1" относится к белку, который связывается с рецептором GLP1. В контексте настоящего изобретения этот термин относится к слитому белку, содержащему GLP1 или вариант GLP1, слитые со стабилизирующим доменом. Согласно определенным вариантам осуществления термин включает в себя слитые белки, содержащие вариант GLP1, слитый с иммуноглобулином или его фрагментом. Согласно конкретным вариантам осуществления термин включает в себя слитые белки, содержащие GLP1 или вариант GLP1, слитые с N-концом переменной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина. Согласно одному конкретному варианту осуществления термин включает в себя GLP1 или вариант GLP1, слитые с N-концом VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с рецептором GLP1.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями, а также к их мультимерам (например, IgM) или их антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>) переменной области Ig, которая может представлять собой переменную область тяжелой цепи ("HCVR" или "V<sub>H</sub>") или переменную область легкой цепи ("LCVR или "V<sub>L</sub>"). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи ("LCVR или "V<sub>L</sub>") и константной области легкой цепи (C<sub>L</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> можно дополнительно подразделить на области гиперпеременной, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасны-

ми областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут являться идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть естественным образом или искусственно модифицированы. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании параллельного сравнительного анализа двух или более CDR. Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающий белок" также включает в себя антитела.

Кроме того, возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, которые для связывания могут обойтись без одной или двух CDR. Padlan с соавт. (1995, *FASEB J.* 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и их антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и пришли к выводу, что только приблизительно одна пятая - одна треть остатков CDR действительно контактируют с антигеном. Padlan также обнаружил много антител, в которых одна или две CDR не характеризуются наличием аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al., 2002, *J. Mol. Biol.* 320:415-428).

Способы и техники идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей VR хорошо известны в настоящей области техники и их можно использовать для идентификации CDR в пределах заданных аминокислотных последовательностей VR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на изменчивости последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении областей структурной петли, а определение AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikam et al., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в пределах антигенсвязывающего домена антигенсвязывающего белка или антитела.

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) из областей CDR согласно Kabat, лежащих вне CDR согласно Chothia, путем молекулярного моделирования и/или опытным путем. Если CDR или его остаток(остатки) опущен(ы), ее(их), как правило, заменяют аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать эмпирически. Эмпирические замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антигенсвязывающего белка, "антигенсвязывающий фрагмент" антигенсвязывающего белка и т.п. включают в себя любой встречающийся в природе, полученный ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающие фрагмент" антигенсвязывающего белка или "фрагмент антигенсвязывающего белка" относятся к одному или нескольким фрагментам антигенсвязывающего белка, которые сохраняют способность специфически связываться с рецептором GLP1. Фрагмент антигенсвязывающего белка может включать в себя фрагмент Fab, фрагмент  $F(ab')_2$ , фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Согласно определенным вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептиду или его фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Антигенсвязывающие фрагменты антигенсвязывающего белка или антитела можно получить, например, из полных молекул белка с использованием любых подходящих стандартных техник, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные техники генной инженерии, предусматривающие манипуляции с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующую переменные и (необязательно) константные домены антигенсвязывающего белка. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая в себя, например, фаговые библиотеки антител), или же ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и воздействовать на нее химически или с использованием техник молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты  $F(ab')_2$ ; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные распознающие звенья, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-

специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетраатела, мини-антитела, наноантитела (например, мовалентные наноантитела, бивалентные наноантитела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также предусмотрены используемым в настоящем документе выражением "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающего белка или антитела согласно настоящему изобретению, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или расположена в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен  $V_H$ , ассоциированный с доменом  $V_L$ , домены  $V_H$  и  $V_L$  могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может являться димерной и может содержать димеры  $V_H - V_H$ ,  $V_H - V_L$  или  $V_L - V_L$ . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающего белка может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают в себя следующее: (i)  $V_H - C_{H1}$ ; (ii)  $V_H - C_{H2}$ ; (iii)  $V_H - C_{H3}$ ; (iv)  $V_H - C_{H1} - C_{H2}$ ; (v)  $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ; (vi)  $V_H - C_{H2} - C_{H3}$ ; (vii)  $V_H - C_L$ ; (viii)  $V_L - C_{H1}$ ; (ix)  $V_L - C_{H2}$ ; (x)  $V_L - C_{H3}$ ; (xi)  $V_L - C_{H1} - C_{H2}$ ; (xii)  $V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ; (xiii)  $V_L - C_{H2} - C_{H3}$  и (xiv)  $V_L - C_L$ . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая в себя любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, что дает в результате гибкое или полугибкое соединение между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

Как и в случае с полными молекулами белка, антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающего белка, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных переменных домена, причем каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антигенсвязывающих белков, включая в себя иллюстративные форматы биспецифических антигенсвязывающих белков, раскрытые в настоящем документе, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению с использованием стандартных техник, доступных в настоящей области техники.

Подразумевается, что используемые в настоящем документе термины "полностью человеческое антитело", "антитело человека", "полностью человеческий антигенсвязывающий белок" или "антигенсвязывающий белок человека" включает в себя антигенсвязывающие белки, содержащие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антигенсвязывающие белки человека согласно настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающий белок человека" не включает в себя антигенсвязывающие белки, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека. Термин включает в себя антигенсвязывающие белки или антитела, рекомбинантно произведенные в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Подразумевается, что термин не включает в себя антигенсвязывающие белки или антитела, выделенные или созданные в субъекте-человеке.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантный" относится к слитым белкам или их фрагментам согласно настоящему изобретению, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью технологий или способов, известных в настоящей области техники, как технология рекомбинантных ДНК, которая включает в себя, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к слитым белкам, экспрессируемым у млекопитающего, не являющегося человеком (включая в себя трансгенных млекопитающих, не являющихся человеком, например, трансгенных мышей), или в клеточной (например, клетках CHO) экспрессионной системе или выделенным из

комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител человека.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или т.подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, равной по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М или меньше (например, меньшее значение  $K_D$  обозначает более плотное связывание). Способы определения того, являются ли две молекулы специфически связывающимися, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс, изотермическую титрационную калориметрию и т.п.

Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают в себя любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антигенсвязывающего белка или антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам белка иммуноглобулина, которые сохраняют способность связываться с рецептором GLP1.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин " $K_D$ " относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере приблизительно в 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма измерения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты с существенной идентичностью по отношению к эталонной молекуле нуклеиновой кислоты в некоторых случаях может кодировать полипептид, характеризующийся такой же или по существу сходной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за внесение пропусков по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, содержащим боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентное отношение или степень сходства можно скорректировать в сторону увеличения, чтобы отрегулировать консервативный характер замены. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя следующее: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серии и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992), *Science*, 256:1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности с использованием показателей сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая в себя консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последователь-

ности или идентичности последовательности между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентное отношение идентичности последовательности областей наилучшего перекрытия между последовательностью-запросом и последовательностями поиска (Pearson (2000) выше). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См. например, Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410 и (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевается количество, которое обеспечивает требуемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет определяться специалистом в настоящей области техники с использованием известных техник (см., например, Lloyd (1999), The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся в уменьшении интенсивности, профилактике и/или лечении заболевания или нарушения, связанного с GLP1. Термин включает в себя субъектов-людей, которые характеризуются наличием или подвержены риску связанного с GLP1 заболевания или нарушения. Например, термин включает в себя субъектов, которые характеризуются наличием или подвержены риску развития сахарного диабета (например, сахарного диабета 2 типа). Согласно определенным вариантам осуществления термин включает в себя субъектов, которые характеризуются наличием или подвержены риску развития ожирения, инсульта или инфаркта миокарда. Термин также включает в себя субъектов, которые характеризуются высоким содержанием сахара в крови и/или повышенными содержаниями одного или нескольких биомаркеров сахарного диабета, например HbA1c. Термин также включает в себя субъектов с сахарным диабетом, которым стандартное лечение (например, метформин) противопоказано или является непереносимым или чье заболевание является неконтролируемым, несмотря на лечение (например, с помощью метформина).

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к снижению или ослаблению тяжести по меньшей мере одного симптома или признака связанного с GLP1 заболевания или нарушения вследствие введения терапевтического средства, такого как агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. Термины включают в себя ингибирование прогрессирования заболевания или ухудшения симптомов. Термины также включают в себя положительный прогноз заболевания, т.е. субъект может характеризоваться отсутствием симптомов или признаков или может характеризоваться сниженной интенсивностью симптомов или признаков при введении терапевтического средства, такого как белок - агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Например, субъект с сахарным диабетом может характеризоваться снижением содержания глюкозы в крови при введении агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Терапевтическое средство можно вводить субъекту в терапевтической дозе.

Термины "предотвращать", "профилактика" или "предотвращение" относятся к ингибированию проявления любых симптомов или признаков связанного с гипергликемией заболевания или нарушения при введении агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Термин включает в себя ингибирование проявления симптома или признака связанного с рецептором GLP1 заболевания или нарушения у субъекта, подверженного риску развития такого заболевания или нарушения.

GLP1 (7-37) (SEQ ID NO: 4) характеризуется очень коротким периодом полужизни в кровотоке (1-2 мин) из-за его быстрой инактивации ферментом дипептидилпептидазой 4 (DPP4). Предыдущая работа показала, что различные аминокислотные замены в положении 8 GLP1 (7-37) делают его более устойчивым к DPP4, таким образом обеспечивая более длительный период полужизни. Однако существует остаточная чувствительность этих молекул к расщеплению DPP4 (Deacon et al., 1998, Diabetologia, 41:271-278). Таким образом, существует необходимость в разработке новых молекул, которые обладают повышенной устойчивостью к разложению с помощью DPP4.

Авторы настоящего изобретения предположили, что для придания лучшей устойчивости к DPP4 первым шагом было введение мутаций, которые удлиняют или укорачивают аминоконец GLP1 либо путем добавления аминокислоты (т.е. Ala, Gln) к N-концу, либо путем делеции His или Ala в пептидной последовательности для обеспечения лучшей устойчивости к расщеплению DPP4. Авторы настоящего изобретения показали в настоящем документе, что эти новые варианты GLP1 действительно очень устойчивы к разложению с помощью DPP4. Второй шаг состоял в том, чтобы компенсировать какую-либо ослабленную или пониженную активность GLP1 путем слияния GLP1 с антителом к рецептору GLP1, которое связывает ослабленный GLP1 с рецептором GLP1 и тем самым повышает его активность. Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что эти слитые белки, вероятно, потому что они содержат Fc-домен, характеризовались увеличенным периодом полужизни в сыворотке и приводили к по-

вышенному снижению содержания сахара в крови, которое поддерживалось в течение более 10 дней. Новые варианты GLP1 и слитые белки, раскрытые в настоящем документе, характеризуются значительно улучшенной устойчивостью к разложению с помощью DPP4 *in vitro* и *in vivo* и демонстрируют значительно улучшенную эффективность в гликемическом контроле, как показано в настоящем документе. Термины "значительно улучшенный", или "усиленный", или "увеличенный", как они используются в настоящем документе, в контексте устойчивости к разложению с помощью DPP4 относятся к повышенной устойчивости к разложению при инкубации с DPP4 в течение более 4 ч, более 8 ч, более 16 ч, более 24 ч, более 36 ч или более 70 ч, согласно измерениям, описанным в настоящем документе. Термины "значительно улучшенный", или "усиленный", или "повышенный", используемые в настоящем документе, в контексте снижения содержания сахара в крови относятся к устойчивому снижению содержания сахара в крови в течение более 1 дня, более 2 дней, более 3 дней, более 4 дней, более 5 дней, более 6 дней, более 7 дней, более 8 дней, более 9 дней или более 10 дней у субъекта при введении агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению.

Агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению связываются с рецептором GLP1 с высокой аффинностью и приводят к активации рецептора GLP1. Согласно некоторым вариантам осуществления белки применимы для лечения субъекта, страдающего сахарным диабетом. Белки при введении нуждающемуся в этом субъекту могут снижать содержание сахара в крови у субъекта. Их можно использовать отдельно или в качестве дополнительной терапии с другими терапевтическими фрагментами или способами, известными в настоящей области техники для лечения гипергликемии.

Определенные белки - агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению способны связываться и стимулировать активность рецептора GLP1, как определено в анализах *in vitro* или *in vivo*. Способность белков согласно настоящему изобретению связываться и усиливать активность рецептора GLP1 можно измерить с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в настоящей области техники, включая в себя анализы связывания или анализы активности, как описано в настоящем документе.

Антигенсвязывающие белки, специфические в отношении рецептора GLP1, могут не содержать никаких дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания местоположение метки (если таковая имеется) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан этот пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет ориентирован так, что C-концевой участок пептида будет дистальным по отношению к поверхности. Согласно одному варианту осуществления метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, обнаруживаемую с помощью МРТ. Согласно определенным вариантам осуществления такие меченые антигенсвязывающие белки можно использовать в диагностических анализах, включая в себя анализы визуализации.

Биоэквиваленты.

Агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных агонистов рецептора GLP1, но которые сохраняют способность связываться с рецептором GLP1. Такие вариантные агонисты рецептора GLP1 содержат одну или несколько вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является по существу эквивалентной активности описанных агонистов рецептора GLP1. Аналогично, кодирующие агонист рецептора GLP1 последовательности ДНК согласно настоящему изобретению охватывают последовательности, которые содержат одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют агонист рецептора GLP1, который является по существу биоэквивалентом по отношению к агонисту рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению.

Два белка считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, скорость и степень абсорбции которых не показывают значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе в аналогичных условиях эксперимента, либо в виде одной дозы, либо в виде нескольких доз. Некоторые белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же их можно считать биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не имеют существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначительными для конкретного исследуемого лекарственного средства.

Согласно одному варианту осуществления два белка - агониста рецептора GLP1 являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые различия в их безопасности, чистоте и активности.

Согласно одному варианту осуществления два белка - агониста рецептора GLP1 являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или несколько раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска нежелательных эффектов, включая в себя

клинически значимое изменение иммуногенности или пониженную эффективность, по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два белка - агониста рецептора GLP1 являются биоэквивалентными, если оба они действуют посредством общего механизма или механизмов действия для условия или условий использования, в той степени, в которой такие механизмы являются известными.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают в себя, например, (a) анализ *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрацию белка или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию времени; (b) анализ *in vitro*, который был скоррелирован с данными о биодоступности *in vivo* у человека и является обоснованно прогностическим в отношении этих данных; (c) анализ *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект белка (или его мишени) измеряют как функцию времени; и (d) хорошо контролируемое клиническое испытание, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты белков - агонистов рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению можно сконструировать, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные белки могут включать в себя варианты, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики белков, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Биологические характеристики агонистов рецептора GLP1.

В общем, агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению функционируют путем связывания с рецептором GLP1 и способствуют активации рецептора GLP1 при связывании. Согласно определенным вариантам осуществления белка согласно настоящему изобретению связываются с высокой аффинностью с рецептором GLP1. Например, настоящее изобретение включает в себя агонисты рецептора GLP1, которые приводят к активации рецептора GLP1 (например, при 25 или при 37°C), что измеряют с помощью анализа репортерного гена люциферазы, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 2 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 активируют рецептор GLP1 с EC<sub>50</sub> менее чем 10 нМ, менее чем 500 пМ или менее чем 250 пМ, как измеряют с помощью анализа репортерного гена люциферазы, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 2 в настоящем документе, или с помощью по существу аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает в себя агонисты рецептора GLP1, которые снижают содержания сахара в крови *in vivo* после введения нуждающемуся в этом субъекту, например, как показано в примере 3, или с помощью по существу аналогичного анализа. Агонисты рецептора GLP1 влияют на усиление гликемического контроля при введении, что приводит к снижению содержания глюкозы в крови. Согласно определенным вариантам осуществления даже однократная терапевтически эффективная доза агонистов рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению приводит к значительному снижению содержания сахара в крови, которое поддерживается в течение более 10 дней.

Настоящее изобретение также включает в себя агонисты рецептора GLP1, которые показывают повышенную устойчивость к разложению сывороточными протеазами/пептидазами, как измерено масс-спектроскопией, например, как показано в примере 4 в настоящем документе, или по существу аналогичным способом. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 устойчивы к разложению дипептидилпептидазой 4 (DPP4) в течение более 4 ч, более 6 ч, более 12 ч, более 24 ч, более 48 ч или более 70 ч, как измерено анализом, описанным в примере 4 в настоящем документе.

Агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими вышеупомянутыми биологическими характеристиками или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики белков согласно настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в настоящей области техники из обзора настоящего раскрытия, включая в себя рабочие примеры, приведенные в настоящем документе.

Терапевтическое введение и составы.

Настоящее изобретение относится к терапевтическим композициям, содержащим агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Терапевтические композиции согласно настоящему изобретению вводят в состав с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые вводят в составы для обеспечения улучшенной транспортировки, доставки, переносимости и тому подобного. Множество приемлемых составов можно найти в рецептурном справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты,

безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Вводимая пациенту доза агониста рецептора GLP1 может варьироваться в зависимости от возраста и размеров субъекта, которому производят введение, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Когда антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению используют для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента или для профилактики такого заболевания, благоприятным является введение антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе, составляющей приблизительно 0,001 - приблизительно 100 мг/кг массы тела, более предпочтительно приблизительно 0,001 - приблизительно 60, приблизительно 0,01 - приблизительно 10 или приблизительно 0,01 - приблизительно 1 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно скорректировать. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере приблизительно 0,001 мг - приблизительно 100 мг, приблизительно 0,001 - приблизительно 50 мг, приблизительно 0,005 - приблизительно 50 мг, приблизительно 0,01 - приблизительно 40 мг, до приблизительно 30 мг или до приблизительно 10 мг. Согласно определенным вариантам осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз агониста рецептора GLP1 в количестве, которое является приблизительно таким же или меньшим, чем количество начальной дозы, причем интервал между последующими дозами составляет по меньшей мере 1-3 дня; по меньшей мере 1 неделю; по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987), J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают в себя без ограничения внутривенные, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, через слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным. Фармацевтическую композицию также можно доставить в везикуле, в частности липосоме (см., например, Langer (1990), Science, 249:1527-1533).

Использование наночастиц для доставки агонистов рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению также предусмотрено в настоящем документе. Конъюгированные с белком наночастицы можно использовать как для терапевтического, так и для диагностического применения. Наночастицы можно разработать и конъюгировать с антигенсвязывающими белками, содержащимися в фармацевтических композициях, для нацеливания на клетки. Наночастицы для доставки лекарственного средства также описаны, например, в патентах США № 8257740 или 8246995, каждый из которых полностью включен в настоящий документ.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления можно использовать насос. Согласно другому варианту осуществления можно использовать полимерные материалы. Согласно еще одному варианту осуществления систему контролируемого высвобождения можно поместить в непосредственной близости от мишени композиции, таким образом, понадобится лишь доля системной дозы.

Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутривенных, интракраниальных, интраперитонеальных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты можно получить общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты можно получить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антигенсвязывающего белка или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существует, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, НСО-50 (полиоксиэтиленовый) (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый

спирт и т.д. Полученной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки, устройство доставки шприц-ручка легко находит применение при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такое устройство доставки шприц-ручка может являться многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве доставки шприц-ручка, как правило, используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж пуст, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки шприц-ручку можно повторно использовать. В одноразовом устройстве доставки шприц-ручке нет сменного картриджа. Напротив, одноразовое устройство доставки шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар освобождается от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывают.

Многочисленные многоразовые устройства доставки шприцы-ручки и автоинъекторы находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают в себя без ограничения следующее: AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Inn.), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручка BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), называя лишь несколько из них. Примеры одноразовых устройств доставки шприц-ручка, находящихся свое применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения следующее: шприц-ручка SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, Calif), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручка HUMTRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park, IL), называя лишь несколько из них.

Фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, преимущественно получают в виде лекарственных форм в стандартной дозе, которая соответствует дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают в себя, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося агониста рецептора GLP1, как правило, составляет от приблизительно 0,001 до приблизительно 100 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекций предпочтительно, чтобы агонист рецептора GLP1 содержался в количестве, составляющем от приблизительно 0,001 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения агонистов рецептора GLP1.

Агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения и/или профилактики заболевания, или нарушения, или состояния, связанного с гипергликемией, такого как сахарный диабет, и/или для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. Согласно одному варианту осуществления агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с сахарным диабетом (например, сахарным диабетом типа 2).

Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения субъектов, страдающих от заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, ожирения, инсулинорезистентности, гипертензии, дислипидемии, сахарного диабета типа 2, сахарного диабета типа 1, преддиабета, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, застойной сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, артериосклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, респираторной дисфункции, заболевания почек, жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH) и метаболического синдрома.

Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения субъектов с избыточной массой тела или ожирением и/или профилактики или лечения одного или нескольких связанных с ожирением нарушений, таких как заболевание сердечно-сосудистой системы, инсульт и сахарный диабет.

Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения субъектов, страдающих сахарным диабетом, и/или профилактики одного или нескольких осложнений сахарного диабета, таких как заболевание сердечно-сосудистой системы, инсульт, заболевание почек, ретинопатия, слепота и повреждение нервов.

В настоящем документе также предусмотрено применение одного или нескольких белков - агонистов рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению профилактически для субъектов с риском развития сахарного диабета (например, сахарного диабета 2 типа). Подверженные риску субъекты включают в себя без ограничения субъектов преклонного возраста, беременных женщин и субъектов с одним или несколькими факторами риска, включая в себя семейный анамнез ожирения, высокое содержание холестерина в крови, курение, чрезмерное употребление алкоголя и/или отсутствие физических упражнений.

Согласно дополнительному варианту осуществления белки согласно настоящему изобретению используют для получения фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения пациентов, страдающих от заболевания или нарушения, такого как сахарный диабет и ожирение. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению используют в качестве дополнительной терапии с помощью любого другого средства или любой другой терапией, известных специалистам в настоящей области техники, применимых для лечения или уменьшения интенсивности заболевания или нарушения, связанного с гипергликемией, такого как сахарный диабет (например, сахарный диабет 2 типа).

Виды комбинированной терапии.

Виды комбинированной терапии могут включать в себя агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которое можно эффективно комбинировать с агонистом рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению или с его биологически активным фрагментом согласно настоящему изобретению. Агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению можно синергически комбинировать с одним или несколькими лекарственными средствами или терапией, применяемыми для лечения любого заболевания или нарушения, связанного с гипергликемией (например, сахарного диабета). Согласно некоторым вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению можно комбинировать со вторым терапевтическим средством для снижения содержания сахара в крови у субъекта или для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов сахарного диабета.

Агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации со следующим: инсулин (инсулин или аналог инсулина), сенситизаторы инсулина, такие как бигуаниды (например, метформин) и тиазолидинионы (например, росиглитазон), стимуляторы секреции инсулина, такие как сульфонилмочевины (например, хлорпропамид) и глиниды (например, натеглинид), ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, акарбоза), ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (DPP4) (например, ситаглиптин), прамлинитид, бромокриптин, ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGL) (например, канаглифлозин), антигипертензивное лекарственное средство (например, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, блокатор рецепторов ангиотензина, диуретик, блокатор кальциевых каналов, блокатор альфа-адренорецепторов, блокатор рецепторов эндотелина-1, органический нитрат и ингибитор протеинкиназы C), статины, аспирин, другой агонист рецептора GLP1, диетическая добавка или любая другая терапия (например, физические упражнения) для лечения или ведения сахарного диабета. Согласно определенным вариантам осуществления агонисты рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим средством или терапией, выбранными из группы, состоящей из следующего: инсулин, аналог инсулина, метформин, росиглитазон, пиоглитазон, хлорпропамид, глибенкламид, глимепирид, глипизид, толазамид, толбутамид, натеглинид, репаглинид, акарбоза, миглитол, эксенатид, лираглутид, албиглутид, дулаглутид, ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, алоглиптин, прамлинитид, бромокриптин с быстрым высвобождением, канаглифлозин, дапаглифлозин, эмпаглифлозин, модификации диеты и физические упражнения.

Используемый в настоящем документе термин "в комбинации с" означает, что дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Термин "в комбинации с" также включает в себя последовательное или одновременное введение агониста рецептора GLP1 и второго терапевтического средства.

Дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту перед введением агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "перед" вторым компонентом, если первый компонент вводят за 1 неделю до, 72 ч до, 60 ч до, 48 ч до, 36 ч до, 24 ч до, 12 ч до, 6 ч до, 5 ч до, 4 ч до, 3 ч до, 2 ч до, 1 ч до, 30 мин до, 15 мин до, 10 мин до, 5 мин до или меньше чем за 1 мин до введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту после введения агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Например, первый компонент может считаться введенным "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, 5 мин после, 10 мин после, 15 мин после, 30 мин после, 1 ч после, 2 ч после, 3 ч после, 4 ч после, 5 ч после, 6 ч после, 12 ч после, 24 ч после, 36 ч после, 48 ч после, 60 ч после, 72 ч после введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. "Одновременное" введение для целей настоящего

изобретения включает в себя, например, введение агониста рецептора GLP1 и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту с интервалом между ними в пределах приблизительно 30 мин или меньше. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем (например, как агонист рецептора GLP1, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить разным путем (например, агонист рецептора GLP1 можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить перорально). В любом случае все из следующего: введение компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями, считается "одновременным введением" для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего раскрытия введение агониста рецептора GLP1 "до", "одновременно с" или "после" (как эти термины определены выше в настоящем документе) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением агониста рецептора GLP1 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом.

Настоящее изобретение включает в себя фармацевтические композиции, в которых агонист рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению составлен совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте в настоящем документе.

Схемы введения.

Согласно определенным вариантам осуществления однократную дозу агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию агониста рецептора GLP1 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) можно вводить нуждающемуся в этом субъекту. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения многократные дозы агониста рецептора GLP1 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию агониста рецептора GLP1 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно этому аспекту настоящего изобретения предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению.

Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу агониста рецептора GLP1 вводят пациенту в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Согласно настоящему изобретению предусмотрены способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы агониста рецептора GLP1 с последующей одной или несколькими вторичными дозами агониста рецептора GLP1 и необязательно последующей одной или несколькими третичными дозами агониста рецептора GLP1.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения агониста рецептора GLP1 согласно настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (ее также называют "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество агониста рецептора GLP1, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Тем не менее согласно определенным вариантам осуществления количество агониста рецептора GLP1, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, варьируется относительно друг друга (например, его корректируют выше или ниже в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или больше (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в виде "насыщающих доз", после которых вводят последующие дозы, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы").

Согласно одному иллюстративному варианту осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-48 ч (например, через 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или больше) после непосредственно предшествующей дозы. Используемая в настоящем документе фраза "непосредственно предшествующая доза" в последовательности нескольких введений означает дозу агониста рецептора GLP1, которую вводят пациенту до введения непосредственно следующей дозы в последовательности без каких-либо промежуточных доз. Согласно определенным вариантам осуществления каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через день, через каждые 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после непосредственно предшествующей дозы. Согласно определенным вариантам осуществления каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через каждые 0,5, 1, 2, 3 или 4 недели после непосредственно предшествующей дозы.

Способы согласно этому аспекту настоящего изобретения могут предусматривать введение пациен-

ту любого количества вторичных и/или третичных доз агониста рецептора GLP1. Например, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления вводят пациенту две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована в течение курса лечения врачом в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

#### Дозировка.

Количество агониста рецептора GLP1, вводимого субъекту в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, как правило, является терапевтически эффективным количеством. Используемая в настоящем документе фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество агониста рецептора GLP1, которое приводит в результате в одному или нескольким из следующего: (а) снижение высокого содержания сахара до нормального содержания (например, препрандиальное содержание глюкозы в крови, составляющее 80-130 мг/дл) и/или (b) обнаруживаемое улучшение одного или нескольких симптомов или признаков сахарного диабета.

В случае агониста рецептора GLP1 терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 0,001 до приблизительно 100 мг, например, приблизительно 0,001 мг, приблизительно 0,002 мг, приблизительно 0,003 мг, приблизительно 0,004 мг, приблизительно 0,005 мг, приблизительно 0,006 мг, приблизительно 0,007 мг, приблизительно 0,008 мг, приблизительно 0,009 мг, приблизительно 0,01 мг, приблизительно 0,02 мг, приблизительно 0,03 мг, приблизительно 0,04 мг, приблизительно 0,05 мг, приблизительно 0,06 мг, приблизительно 0,07 мг, приблизительно 0,08 мг, приблизительно 0,09 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 0,2 мг, приблизительно 0,3 мг, приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,5 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно 0,7 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 0,9 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 9 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 55 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 65 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 85 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 95 мг или приблизительно 100 мг агониста рецептора GLP1. Согласно определенным вариантам осуществления 0,005-50 мг, 0,005-30 мг, 0,005-10 мг, 0,1-10 мг или 0,1-5 мг агониста рецептора GLP1 вводят нуждающемуся в этом субъекту.

Количество агониста рецептора GLP1, содержащееся в отдельных дозах, можно выразить в мг антитела на кг массы тела субъекта (т.е. мг/кг). Например, агонист рецептора GLP1 можно вводить субъекту в дозе, составляющей приблизительно от 0,0001 до приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта.

#### Выбранные варианты осуществления.

Согласно варианту осуществления 1 настоящее изобретение относится к варианту глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), содержащему зрелый GLP1 (7-37) (SEQ ID NO: 4) по меньшей мере с одной модификацией аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из следующего: (i) добавление аминокислоты к N-концу и (ii) делеция аминокислоты из пептидной последовательности; причем вариант GLP1 характеризуется усиленной устойчивостью к протеолитическому расщеплению и/или усиленной способностью снижать содержание глюкозы в крови.

Согласно варианту осуществления 2 настоящее изобретение относится к варианту GLP1 согласно варианту осуществления 1, в котором модификация аминокислоты содержит добавление аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из аланина (Ala) и глутамина (Gln), к N-концу.

Согласно варианту осуществления 3 настоящее изобретение относится к варианту GLP1 согласно варианту осуществления 1 или 2, в котором модификация аминокислоты содержит добавление Gln к N-концу.

Согласно варианту осуществления 4 настоящее изобретение относится к варианту GLP1 согласно варианту осуществления 1, в котором модификация аминокислоты содержит делецию гистидина (His1) или аланина (Ala2) из SEQ ID NO: 4.

Согласно варианту осуществления 5 настоящее изобретение относится к варианту GLP1 согласно любому из вариантов осуществления 1-4, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8.

Согласно варианту осуществления 6 настоящее изобретение относится к варианту GLP1 согласно варианту осуществления 5, содержащему аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6.

Согласно варианту осуществления 7 настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему вариант GLP1 согласно любому из вариантов осуществления 1-6, слитый со стабилизирующим

доменом, причем стабилизирующий домен представляет собой антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с рецептором GLP1 и который содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR).

Согласно варианту осуществления 8 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно варианту осуществления 7, причем вариант GLP1 слит с N-концом или C-концом HCVR антигенсвязывающего белка или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно варианту осуществления 9 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно варианту осуществления 7, причем вариант GLP1 слитый с N-концом или C-концом LCVR антигенсвязывающего белка или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно варианту осуществления 10 настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему вариант GLP1 согласно любому из вариантов осуществления 1-6, слитый со стабилизирующим доменом, причем стабилизирующий домен представляет собой иммуноглобулин (Ig) или его фрагмент.

Согласно варианту осуществления 11, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 и 13.

Согласно варианту осуществления 12 настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему вариант GLP1, слитый со стабилизирующим доменом, причем стабилизирующий домен представляет собой антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR).

Согласно варианту осуществления 13 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно варианту осуществления 12, причем вариант GLP1 слит с N-концом или C-концом HCVR антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

Согласно варианту осуществления 14 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно варианту осуществления 12, причем вариант GLP1 слит с N-концом или C-концом LCVR антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

Согласно варианту осуществления 15 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно любому из вариантов осуществления 12-14, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент специфически связывается с рецептором GLP1.

Согласно варианту осуществления 16 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно любому из вариантов осуществления 12-15, содержащему вариант GLP1 согласно любому из представленных выше вариантов осуществления.

Согласно варианту осуществления 17 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно любому из вариантов осуществления 12-16, причем вариант GLP1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8.

Согласно варианту осуществления 18 настоящее изобретение относится к слитому белку согласно варианту осуществления 16 или 17, причем вариант GLP1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6.

Согласно варианту осуществления 19 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1, содержащему вариант GLP1, причем вариант GLP1 слит со стабилизирующим доменом, причем стабилизирующий домен представляет собой антигенсвязывающий белок или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR) и переменную область легкой цепи (LCVR).

Согласно варианту осуществления 20 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1 согласно варианту осуществления 19, причем вариант GLP1 слит с N-концом или C-концом HCVR антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

Согласно варианту осуществления 21 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1 согласно варианту осуществления 19, причем вариант GLP1 слит с N-концом или C-концом LCVR антигенсвязывающего белка или его фрагмента.

Согласно варианту осуществления 22 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1 согласно любому из вариантов осуществления 19-21, причем антигенсвязывающий белок или его фрагмент специфически связывается с рецептором GLP1.

Согласно варианту осуществления 23 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1 согласно любому из вариантов осуществления 19-22, содержащему вариант GLP1 согласно варианту осуществления 1.

Согласно варианту осуществления 24 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1 согласно любому из вариантов осуществления 19-23, причем вариант GLP1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8.

Согласно варианту осуществления 25 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1 согласно варианту осуществления 23 или 24, причем вариант GLP1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6.

Согласно варианту осуществления 26, настоящее изобретение относится к агонисту рецептора

GLP1, содержащему вариант GLP1, причем вариант GLP1 слит со стабилизирующим доменом, причем стабилизирующий домен представляет собой иммуноглобулин (Ig) или его фрагмент.

Согласно варианту осуществления 27 настоящее изобретение относится к агонисту рецептора GLP1 согласно варианту осуществления 26, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 и 13.

Согласно варианту осуществления 28 настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей белок согласно любому из вариантов осуществления 1-27 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Согласно варианту осуществления 29, настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует вариант GLP1, как представлено в любом из вариантов осуществления 1-6.

Согласно варианту осуществления 30 настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, как представлено в любом из вариантов осуществления 10, 11.

Согласно варианту осуществления 31 настоящее изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует агонист рецептора GLP1, как представлено в любом из вариантов осуществления 26, 27.

Согласно варианту осуществления 32 настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотидную последовательность согласно любому из вариантов осуществления 29-31.

Согласно варианту осуществления 33 настоящее изобретение относится к клетке, экспрессирующей вектор согласно варианту осуществления 32.

Согласно варианту осуществления 34 настоящее изобретение относится к способу снижения содержания сахара в крови, предусматривающему введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество белка согласно любому из вариантов осуществления 1-27, нуждающемуся в этом субъекту.

Согласно варианту осуществления 35 настоящее изобретение относится к способу согласно варианту осуществления 34, при котором субъект характеризуется наличием заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из следующего: сахарный диабет, ожирение, инсулинорезистентность, гипертензия, дислипидемия, сахарный диабет 2 типа, сахарный диабет 1 типа, преддиабет, сердечно-сосудистое заболевание, атеросклероз, застойная сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, артериосклероз, заболевание периферических артерий, инсульт, респираторная дисфункция, заболевание почек, жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH) и метаболический синдром.

Согласно варианту осуществления 36 настоящее изобретение относится к способу профилактики, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, признака или осложнения сахарного диабета 2 типа, причем способ предусматривает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество белка согласно любому из вариантов осуществления 1-27, нуждающемуся в этом субъекту.

Согласно варианту осуществления 37 настоящее изобретение относится к способу согласно варианту осуществления 36, при котором по меньшей мере один симптом, признак или осложнение выбраны из группы, состоящей из высокого содержания сахара в крови, полидипсии, учащенного мочеиспускания, наличия кетонов в моче, патологической усталости, колебаний массы тела, нечеткости зрения, язв с медленным заживлением, частых инфекций, отекающих или болезненных десен, ожирения, заболевания сердечно-сосудистой системы, инсульта, заболевания почек, заболевания глаз, повреждения нервов и высокого кровяного давления.

Согласно варианту осуществления 38 настоящее изобретение относится к способу согласно любому из вариантов осуществления 34-37, при котором фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством или терапией.

Согласно варианту осуществления 39 настоящее изобретение относится к способу согласно варианту осуществления 38, при котором второе терапевтическое средство или терапию выбирают из группы, состоящей из следующего: инсулин или аналог инсулина, бигуанид (например, метформин), тиазолидиндион, сульфонилмочевина (например, хлорпропамид), глинид (например, натеглинид), ингибитор альфа-глюкозидазы, ингибитор DPP4 (например, ситаглиптин), прамлинтид, бромокриптин, ингибитор SGLT2 (например, канаглифлозин), антигипертензивное лекарственное средство, статин, аспирин, модификация диеты, физические упражнения и диетическая добавка.

Согласно варианту осуществления 40 настоящее изобретение относится к способу согласно любому из вариантов осуществления 34-39, при котором фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикочно, интраперитонеально, перорально или внутримышечно.

#### **Примеры**

Следующие примеры представлены таким образом, чтобы специалисты в настоящей области техники имели полное раскрытие и описание того, как реализовать и применить способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоя-

шего изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количествам, температуре и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части даны по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Иллюстративные слитые белки, содержащие GLP1.

GLP1 (7-37) характеризуется очень коротким периодом полужизни в кровообращении (1-2 мин) из-за его быстрой инактивации ферментом дипептидилпептидазой 4 (DPP4). Предыдущая работа показала, что различные аминокислотные замены в положении 8 GLP1 (7-37) делают его более устойчивым к DPP4, тем самым обеспечивая более длительный период полужизни (Deacon et al., 1998, *Diabetologia*, 41:271-278). Тем не менее существует остаточная чувствительность этих молекул к расщеплению DPP4. Таким образом, существует необходимость в разработке новых молекул, которые являются еще более устойчивыми к DPP4.

Чтобы придать лучшую устойчивость к DPP4, первая часть технологии заключается во введении мутаций, которые удлиняют или укорачивают аминоконец GLP1 либо добавлением аминокислоты (т.е. Ala, Gln) к N-концу, либо делецией His7 или Ala8 в пептидной последовательности для обеспечения лучшей устойчивости к расщеплению с помощью DPP4. Эти модификации также ослабляют активность GLP1, и вторая часть технологии заключается в том, чтобы компенсировать сниженную активность путем присоединения ослабленного агониста к рецептору с использованием антитела к GLP1R путем слияния пептида с N-концом последовательности легкой цепи антитела к GLP1R. В качестве доказательства концепции проводили слияние модифицированных последовательностей лиганда GLP1 (7-37) с N-концом легкой цепи антитела GLP1R, как описано ниже.

Зрелый GLP1 представляет собой пептидный гормон из 31 аминокислоты, содержащий аминокислоты 7-37 полноразмерного GLP1 (SEQ ID NO: 3), и характеризуется аминокислотной последовательностью NAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 4).

Зрелый GLP1 модифицировали с помощью аминокислотных делеций или добавлений на аминоконце для создания вариантов GLP1. Иллюстративные варианты GLP1 представлены ниже:

Des-Ala-GLP1,	содержащий	аминокислотную	последовательность
HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 5);			
Q-GLP1,	содержащий	аминокислотную	последовательность
QNAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 6);			
A-GLP1,	содержащий	аминокислотную	последовательность
ANAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 7);			
desH-GLP1,	содержащий		последовательность
AEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 8)			

Чтобы компенсировать возможное снижение активности вышеуказанных вариантов GLP1, их связывали с рецептором GLP1 (GLP1R) с использованием антитела к GLP1R или с Fc-фрагментом антитела. Иллюстративные слитые белки, содержащие зрелый GLP1 или вариант GLP1, получали путем слияния зрелого GLP1 или варианта GLP1 с N-концом легкой цепи антитела к рецептору GLP1, содержащего вариабельную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 2 и вариабельную область легкой цепи (LCVR) согласно SEQ ID NO: 1 (в дальнейшем именуемого "mAb1"; публикация заявки на выдачу патента США № 20060275288 [Abbott Laboratories]) и перечислены ниже:

Des-Ala-GLP1-mAb1: Des-Ala-GLP1 (SEQ ID NO: 5), слитый с N-концом легкой цепи mAb1;

Q-GLP1-mAb1: Q-GLP1 (SEQ ID NO: 6), слитый с N-концом легкой цепи mAb1;

A-GLP1-mAb1: A-GLP1 (SEQ ID NO: 7), слитый с N-концом легкой цепи mAb1.

Кроме того, создавали слитые белки, содержащие зрелый GLP1 или вариант GLP1 и Fc-фрагмент иммуноглобулина, и они перечислены ниже:

GLP1-hFc ((SEQ ID NO: 9);

A-GLP1-hFc ((SEQ ID NO: 10);

Q-GLP1-hFc ((SEQ ID NO: 11);

Des-Ala-GLP1-hFc ((SEQ ID NO: 12);

desH-GLP1-hFc ((SEQ ID NO: 13).

Контрольный конструктор.

Продукт сравнения: аналог GLP1 с характеристиками аминокислотной последовательности LY2189265, слитый с Fc-доменом hIgG4 (дулаглутид; Eli Lilly), как раскрыто в Glaesner et al., 2010 (*Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287-296), использовали в качестве продукта сравнения (SEQ ID NO: 14) в следующих примерах.

Пример 2. Люциферазный анализ.

Слитые белки GLP1 испытывали в отношении их способности стимулировать продукцию cAMP в репортерной клеточной линии 293/FSC11/Cre-Luc, которая стабильно экспрессирует рецептор GLP1 человека вместе с кодирующей последовательностью люциферазы под контролем промотора Cre, который

отвечает на cAMP.

Для люциферазного биоанализа стабильные клетки 293/FSC11/Cre-Luc GLP1R высевали в 96-луночные аналитические планшеты с плотностью, составляющей 30000 клеток/луночку в среде OPTIMEM с добавлением 0,1% FBS и затем инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. На следующий день для определения реакции дозы исследуемых белков в анализе испытывали GLP1 человека (Phoenix, № по кат. 028-13), des-Ala-GLP1-mAb1, Q-GLP1-mAb1 или A-GLP1-mAb1. Все исследуемые соединения представляли собой очищенные белки, кроме A-GLP1-mAb1, который использовали непосредственно из среды культивирования после транзientной трансфекции клеток CHO вектором, кодирующим модифицированное антитело. Материал в средах культивирования количественно определяли с помощью ELISA. Исследуемые образцы добавляли к клеткам в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,02 пМ до 100 нМ.

Через 5,5 ч инкубации или после инкубации в течение ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> к образцам добавляли реагент OneGlo (Promega, № по кат. E6051) и затем измеряли активность люциферазы с использованием планшет-ридера Victor X (Perkin Elmer). Результаты проанализировали с использованием нелинейной регрессии (три параметра) с помощью программного обеспечения Prism 6 (GraphPad) для получения значений EC<sub>50</sub>.

Как показано в табл. 1, Q- и A-модифицированные слияния антитела mAb1 показали значения EC<sub>50</sub>, составляющие 204 и 312 пМ соответственно для активации GLP1R.

Таблица 1

EC <sub>50</sub> для слитых белков GLP1	
GLP1 слитые белки	EC50
des-Ala-GLP1-mAb1	10 нМ
Q-GLP1-mAb1	0,204 нМ
A-GLP1-mAb1	0,312 нМ
GLP1-hFc	0,147 нМ
A-GLP1-hFc	120 нМ
Q-GLP1-hFc	135 нМ
Des-Ala-GLP1-hFc	Не обнаруживается
Des-H-GLP1-hFc	2560 нМ
Продукт сравнения	0,059 нМ

Значение EC<sub>50</sub> для des-Ala-GLP1-mAb1 составляло 10 нМ. Значение EC<sub>50</sub> для Q- и A-GLP1-hFc составляет только 135 и 120 нМ, тогда как значение EC<sub>50</sub> для Des A-GLP1-hFc является не обнаруживаемым.

Пример 3. Эффект Q-GLP1, слитого с антителом к GLP1R, на содержание глюкозы в крови и толерантность к глюкозе у гуманизированных в отношении GLP1R мышей.

Эффект Q-GLP1, слитого с N-концом легкой цепи антитела к GLP1R (Q-GLP1-mAb1), на содержание глюкозы в крови и толерантность к глюкозе определяли у генетически сконструированных мышей, экспрессирующих белок GLP1R человека ("гуманизированные в отношении GLP1R мыши"). 31 гуманизированную в отношении GLP1R мышь разделили на четыре группы по семь-восемь животных. Каждая группа получала одну подкожную инъекцию изотипического контроля, Q-GLP1-hFc, mAb1 или Q-GLP1-mAb1 в концентрации 194 нмоль/кг. У мышей брали кровь после приема пищи в дни 0, 1, 4, 7, 11, 14, 16, 18 и 22 для измерения содержания глюкозы в крови. Среднее значение ± SEM содержания глюкозы в крови в каждый момент времени рассчитывали для каждой группы, и оно показано в табл. 2.

Таблица 2

Содержание глюкозы в крови					
	Время (дни)	Изотипический контроль	Q-GLP1-hFc	mAb1	Q-GLP1-mAb1
Содержание глюкозы в крови (мг/дл)	0	188 ± 6	188 ± 5	188 ± 6	186 ± 8
	1	185 ± 3	184 ± 8	193 ± 8	133 ± 4
	4	182 ± 9	193 ± 9	180 ± 7	128 ± 5
	7	187 ± 6	199 ± 9	178 ± 7	132 ± 4
	11	180 ± 4	192 ± 6	183 ± 8	152 ± 4
	14	174 ± 6	185 ± 8	184 ± 7	145 ± 4
	16	179 ± 6	193 ± 7	183 ± 7	156 ± 4
	18	172 ± 7	184 ± 8	161 ± 7	154 ± 6
	22	174 ± 6	188 ± 7	181 ± 9	171 ± 7

Тесты на толерантность к глюкозе при пероральном введении (oGTT) проводили в день 3 и 9 после голодания в течение ночи с измерениями содержания глюкозы в крови через 0, 15, 30, 60 и 120 мин после болюсного введения глюкозы. Среднее значение  $\pm$ SEM содержания глюкозы в крови в каждый момент времени и площадь под кривой содержания глюкозы (AUC) рассчитывали для каждой группы, и они показаны в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Содержание глюкозы в крови и AUC глюкозы в день 3

	Время (мин)	Изотипический контроль	Q-GLP1-hFc	mAb1	Q-GLP1-mAb1
Содержание глюкозы в крови (мг/дл)	0	143 $\pm$ 6	147 $\pm$ 5	143 $\pm$ 8	111 $\pm$ 5
	15	242 $\pm$ 13	252 $\pm$ 19	233 $\pm$ 16	193 $\pm$ 11
	30	233 $\pm$ 9	235 $\pm$ 8	217 $\pm$ 8	160 $\pm$ 6
	60	187 $\pm$ 8	195 $\pm$ 7	200 $\pm$ 12	129 $\pm$ 4
	120	151 $\pm$ 7	160 $\pm$ 7	159 $\pm$ 10	115 $\pm$ 4
AUC содержания глюкозы в крови (мг/дл*120 мин)		22884 $\pm$ 594	23756 $\pm$ 681	23229 $\pm$ 959	16556 $\pm$ 386

Таблица 4

Содержание глюкозы в крови и AUC глюкозы в день 9

	Время (мин)	Изотипический контроль	Q-GLP1-hFc	m Ab1	Q-GLP1-mAb1
Содержание глюкозы в крови (мг/дл)	0	143 $\pm$ 4	151 $\pm$ 3	147 $\pm$ 5	116 $\pm$ 4
	15	281 $\pm$ 17	269 $\pm$ 15	253 $\pm$ 15	203 $\pm$ 13
	30	207 $\pm$ 5	228 $\pm$ 15	223 $\pm$ 14	167 $\pm$ 14
	60	200 $\pm$ 7	187 $\pm$ 5	207 $\pm$ 8	139 $\pm$ 10
	120	155 $\pm$ 5	173 $\pm$ 11	157 $\pm$ 6	131 $\pm$ 7
AUC содержания глюкозы в крови (мг/дл*120 мин)		23589 $\pm$ 610	23869 $\pm$ 795	23959 $\pm$ 696	17852 $\pm$ 920

Однократное введение Q-GLP1-mAb1 у нормогликемических гуманизированных в отношении GLP1R мышей приводило к значительному снижению содержания глюкозы в течение 14 дней, тогда как Q-GLP1-hFc или mAb1 не влияли на содержания глюкозы в крови (табл. 2). Q-GLP1-mAb1 снижал содержание глюкозы натощак и улучшал толерантность к глюкозе на 3 и 9 день у мышей, тогда как Q-GLP1-hFc и mAb1 этого не делали. Эти данные свидетельствуют о том, что Q-GLP1 или антитело mAb1 отдельно не изменяет гликемический контроль, однако состоящая из них слитая молекула может проявлять эффекты снижения глюкозы, которые длятся в течение 2 недель после одной инъекцией у нормогликемических животных.

Пример 4. Стабильность вариантов GLP1.

Стабильность различных вариантов GLP1 и слитых белков испытывали путем их инкубации с сывороточными протеазами и анализа расщепленных пептидов с помощью масс-спектрометрии.

В первом эксперименте 0,5 мкг каждого слитого белка GLP1 добавляли в 50 мкл не подвергавшейся воздействию мышинной сыворотки соответственно. Затем смеси инкубировали при 37°C в течение 6 и 24 ч соответственно. 1 мкл смеси сыворотки в 0 мин, 6 и 24 ч наносили на трис-глициновый гель.

Во втором эксперименте, чтобы дополнительно дифференцировать стабильность, 2 мкг каждого слитого белка GLP1 инкубировали с 500 нг рекомбинантного DPP4 человека (R & D system) в PBS (pH 7,4) при 37°C в течение 0 мин, 1, 4 и 72 ч соответственно. Одну пятую часть вышеуказанной смеси (эквивалентно 400 нг конструктора) загружали на трис-глициновый гель.

Для каждого эксперимента срезы геля, соответствующие молекулярной массе каждого конструктора, вырезали и подвергали расщеплению трипсином в геле. Вырезанные кусочки геля обесцвечивали в смеси 50:50 ацетонитрил: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50 мМ), восстанавливали с помощью 65 мМ дитиотреитола (Sigma) при 37°C в течение 30 мин с последующим алкилированием с помощью 135 мМ йодацетамида (Sigma) при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Затем белки обрабатывали в течение ночи модифицированным свиным трипсином со степенью чистоты для секвенирования (Promega) при 37°C. Пептиды дважды экстрагировали буфером для экстракции (50% ACN, 5% муравьиная кислота в H<sub>2</sub>O). Извлеченные пептиды из каждой полосы высушивали до полного завершения в SpeedVac и восстанавливали 0,1% тетрафторуксусной кислотой (TFA) перед анализом нано-ЖХ-МС/МС.

Смеси восстановленных пептидов разделяли с помощью онлайн-капиллярной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP) (Easy-nLC1000, Thermo Fisher Scientific) и анализировали с помощью

тандемной масс-спектрометрии с электрораспылением (Orbitrap Elite, Thermo Fisher Scientific). Пептидные смеси впрыскивали в колонку PepMap RSLC с внутренним диаметром 75 мкм (C18, 25 см, 100 Å, 2 мкм, Thermo Fisher Scientific) со скоростью потока 250 нл/мин и затем элюировали с помощью ACN от 2% до 35% в 0,1% муравьиной кислоты в 60-минутном градиенте. Масс-спектрометр работал в режиме, зависящем от данных, для автоматического переключения между сбором данных MS и MS/MS. MS спектры полного сканирования для обследования (от m/z 350 до 2000) получали в Orbitrap с разрешением 120000. Наиболее интенсивные ионы (вплоть до десяти) последовательно выделяли для фрагментации в ловушке гибридных ионов с использованием диссоциации, вызванной столкновением (CID), с нормализованной энергией столкновения 35% при целевом значении 5000. Целевые ионы, уже выбранные для MS/MS, динамически исключали на 30 с.

Перечни пиков MS и MS/MS экстрагировали и проверяли по внутренней базе данных белков с использованием ProteomeDiscoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Все поиски предполагали обработку трипсином и рассматривали карбоксиметилирование цистеина как фиксированную модификацию, а окисление метионина как переменную модификацию. Использовали допуск по массе пептида 10 м.д., допуск по массе MS/MS, составляющий 0,8 Да, и допуск вплоть до 1 недореза. Экстракционные площади ионов рассчитывали на основе полученных ионных хроматограмм (XIC) с использованием программного обеспечения Thermo Xcaliber (Thermo Fisher Scientific).

#### Результаты.

Чтобы охарактеризовать восприимчивость каждого конструкта к расщеплению ферментом сыворотки, интактный пептид (N-концевой пептид), расщепленный пептид (N-концевой пептид после расщепления) и один внутренний эталонный пептид (стабильный пептид, невосприимчивый к любой модификации в конструкте) для каждого конструкта контролировали с помощью нано-ЖХ-МС/МС. Сниженное соотношение интактного пептида по сравнению с эталонным пептидом и сопутствующим повышенным соотношением расщепленного пептида к эталонному пептиду указывает на опосредованное ферментом расщепление конструкта с течением времени. Процент расщепления рассчитывали по следующей формуле

$$100 \times \frac{\text{площадь расщепленного пептида}}{\text{площадь расщепленного пептида} + \text{площадь не расщепленного пептида}}$$

GLP1-hFc и A-GLP1-hFc полностью расщеплялись к 6 ч, тогда как desH-GLP1-hFc демонстрировал заметное расщепление (2%) к 6 ч. Q-GLP1-hFc и продукт сравнения не показали какого-либо расщепления после 24-часовой инкубации (табл. 5).

Таблица 5

Процентное отношение расщепления выбранных агонистов рецептора GLP1

	Расщепление в % через 6 часов	Расщепление в % через 24 часа
GLP1-hFc	100%	100%
desH-GLP1-hFc	2%	5%
Q-GLP1-hFc	0%	0%
A-GLP1-hFc	100%	100%
Продукт сравнения	0%	0%

Для дальнейшей дифференциации стабильности Q-GLP1-hFc и продукта сравнения два конструкта смешивали с рекомбинантной DPP4 человека и интактный пептид (N-концевой пептид), расщепленный пептид (N-концевой пептид после расщепления) и один внутренний эталонный пептид (стабильный пептид, невосприимчивый к любой модификации в конструкте) для любого конструкта подвергали мониторингу с помощью нано-ЖХ-МС/МС.

Таблица 6

Стабильность выбранных агонистов рецептора GLP1 к DPP4

	Расщепление в % через 4 часа	Расщепление в % через 72 часа
Q-GLP1-hFc	0%	0%
Продукт сравнения	4%	41%

Продукт сравнения показал заметное расщепление (4%) к 4 ч и более 40% к 72 ч (табл. 6). Напротив, Q-GLP1-hFc не проявлял никакого расщепления даже после 72-часовой инкубации с DPP4 при 37°C.

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными для специалистов в на-

стоящей области техники из предшествующего описания. Подразумевается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий вариант глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1), причем вариант GLP1 состоит из SEQ ID NO: 6 и стабилизирующего домена, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), который специфически связывается с рецептором GLP1, причем слитый белок характеризуется усиленной устойчивостью к протеолитическому расщеплению и/или усиленной способностью снижать содержание глюкозы в крови.

2. Слитый белок по п.1, в котором вариант GLP1 слит с N-концом или C-концом HCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

3. Слитый белок по п.1, в котором вариант GLP1 слит с N-концом или C-концом LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

5. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, как представлено в любом из пп.1-3.

6. Вектор, содержащий полинуклеотидную молекулу по п.5.

7. Клетка, экспрессирующая слитый белок, кодируемый полинуклеотидной молекулой по п.6.

8. Способ снижения содержания сахара в крови, предусматривающий введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество слитого белка по любому из пп.1-3, нуждающемуся в этом субъекту.

9. Способ по п.8, при котором субъект характеризуется наличием заболевания или нарушения, выбранного из группы, состоящей из следующего: сахарный диабет, ожирение, инсулинорезистентность, гипертензия, дислипидемия, сахарный диабет 2 типа, сахарный диабет 1 типа, преддиабет, сердечно-сосудистое заболевание, атеросклероз, застойная сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, артериосклероз, заболевание периферических артерий, инсульт, респираторная дисфункция, заболевание почек, жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH) и метаболический синдром.

10. Способ профилактики, лечения или уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома, признака или осложнения сахарного диабета 2 типа, причем способ предусматривает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество слитого белка по любому из пп.1-3, нуждающемуся в этом субъекту.

11. Способ по п.10, при котором по меньшей мере один симптом, признак или осложнение выбрано из группы, состоящей из высокого содержания сахара в крови, полидипсии, учащенного мочеиспускания, наличия кетонов в моче, патологической усталости, колебаний массы тела, нечеткости зрения, язв с медленным заживлением, частых инфекций, отекающих или болезненных десен, ожирения, заболевания сердечно-сосудистой системы, инсульта, заболевания почек, заболевания глаз, повреждения нервов и высокого кровяного давления.

12. Способ по любому из пп.8-11, при котором фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством или терапией.

13. Способ по п.12, при котором второе терапевтическое средство или терапию выбирают из группы, состоящей из следующего: инсулин или аналог инсулина, метформин, тиазолидиндион, сульфонилмочевина, бигуанид, хлорпропамид, глинид, ингибитор альфа-глюкозидазы, натеглинид, ингибитор DPP4, прамлинтид, ситаглиптин, бромокриптин, ингибитор SGLT2, канаглифлозин, антигипертензивное лекарственное средство, статин, аспирин, модификация диеты, физические упражнения и диетическая добавка.

14. Способ по любому из пп.8-13, при котором фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, интраперитонеально, перорально или внутримышечно.

