

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391921 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.08.24(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)  
A61K 38/16 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2022.02.01

## (54) ФРАГМЕНТЫ, УВЕЛИЧИВАЮЩИЕ ПЕРИОД ПОЛУЖИЗНИ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/144,696

(32) 2021.02.02

(33) US

(86) PCT/US2022/014728

(87) WO 2022/169757 2022.08.11

(71) Заявитель:  
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Ферранте Андреа, Хойер Йосеф  
Джордж, Ли Стейси Линн, Вердино  
Петра (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина  
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,  
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.  
(RU)

(57) Изобретение в целом относится к биологии и медицине, и, более конкретно, оно относится к соединениям, выступающим в качестве фрагментов, увеличивающих период полужизни ( $t_{1/2}$ ), для применения с терапевтическими средствами, в особенности для улучшения  $t_{1/2}$  терапевтических средств на биологической основе (т.е. биотерапевтических средств или биопрепаратов). Изобретение также относится к слитым молекулам и конъюогатам, которые включают одно или более соединений, выступающих в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов, а также включающим их фармацевтическим композициям и их применению для лечения различных состояний, заболеваний или нарушений.

A1

202391921

202391921

A1

## ФРАГМЕНТЫ, УВЕЛИЧИВАЮЩИЕ ПЕРИОД ПОЛУЖИЗНИ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

[001] Настоящее изобретение в целом относится к биологии и медицине и, более конкретно, оно относится к однодоменным антителам, известным как переменные домены антител, содержащих только тяжелые цепи (VHH), которые сконструированы/модифицированы так, чтобы выступать в качестве фрагментов, увеличивающих период полужизни ( $t_{1/2}$ ), для применения с терапевтическими агентами, в особенности для улучшения  $t_{1/2}$  терапевтических агентов на биологической основе (т. е., биотерапевтических средств или биопрепаратов). Изобретение также относится к слитым молекулам и конъюгатам, которые включают один или более увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов на основе VHH и терапевтический агент, а также включающим их фармацевтическим композициям и их применению для лечения различных состояний, заболеваний или нарушений.

[002] Биотерапевтические средства являются нативными или модифицированными компонентами физиологических путей и, как правило, обладают высокой селективностью, эффективностью и безопасностью. Однако они имеют некоторые ограничения. Одним из ограничений, за некоторыми исключениями, является то, что биотерапевтические средства нельзя вводить перорально. Другое ограничение заключается в том, что многие биотерапевтические средства имеют относительно короткий  $t_{1/2}$  при использовании в клинических условиях.

[003] Существует несколько стратегий увеличения  $t_{1/2}$  биотерапевтических средств, которые могут улучшить их фармакокинетические (ФК) и/или фармакодинамические (ФД) профили. В таких стратегиях обычно используются фрагменты, увеличивающие объем, или рециркуляция, опосредованная неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Таким образом, антитела (Ab) или их фрагменты (например, Fab, Fc и т. д.); полимеры, такие как полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловая кислота (PSA), гиалуроновая кислота (HA) и гидроксипропилкрахмал (HES); жирные кислоты и другие липиды; N- или O-гликозилирование; и сывороточный альбумин или другие белки плазмы (такие как трансферрин) могут быть ковалентно и/или нековалентно связаны с отдельно взятым биотерапевтическим средством для увеличения его  $t_{1/2}$ . См., например, Hamers-Casterman *et al.* (1993) *Nature* 363:446-448; Harmsen & Haard (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:13-22; Kontermann (2016) *Expert Opin. Biol. Ther.* 16:903-915; Müller *et al.* (2012) *MAbs* 4:673-685; Podust *et al.* (2013) *Protein Eng. Des. Sel.* 26:743-753; Strohl (2015) *BioDrugs* 29:215-239; и Werle U Bernkop-Schnürch (2006) *Amino Acids* 30:351-367.

[004] Несмотря на огромное количество стратегий увеличения  $t_{1/2}$ , существует потребность в дополнительных структурах для увеличения или улучшения ФК свойств, таких как  $t_{1/2}$ , биотерапевтических средств.

[005] Для удовлетворения этой потребности в описании сначала описаны соединения, которые могут применяться в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов для биотерапевтических средств. В одном случае предложено соединение, которое включает аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:1-37 и 124-126.

[006] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:1). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:1.

[007] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:2). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:2.

[008] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:3). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:3.

[009] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:4). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:4.

[0010] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDITY  
YLDVKGRFTISKDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG  
QGTQVTVSS (SEQ ID NO:5). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:5.

[0011] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

[0012] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGG  
SVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANL  
YDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:6). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:6.

[0013] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPYWG  
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:7). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:7.

[0014] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:8). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:8.

[0015] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:9). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:9.

[0016] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDET  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW  
GGTLVTVSS (SEQ ID NO:10). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:10.

[0017] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDQT  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW  
GGTLVTVSS (SEQ ID NO:11). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:11.

[0018] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITA  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTTLVTVSS (SEQ ID NO:12). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:12.

[0019] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITE  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTTLVTVSS (SEQ ID NO:13). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:13.

[0020] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITQ  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTTLVTVSS (SEQ ID NO:14). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:14.

[0021] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITS  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:15). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:15.

[0022] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITT  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:16). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:16.

[0023] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:17). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:17.

[0024] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:18). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:18.

[0025] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:19). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:19.

[0026] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:20). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:20.

[0027] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:21). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:21.

[0028] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:22). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:22.

[0029] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:23). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:23.

[0030] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:24). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:24.

[0031] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:25). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:25.

[0032] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:26). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:26.

[0033] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:27). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:27.

[0034] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATRPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:28). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:28.

[0035] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARQGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:29). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:29.



[0036] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATRQGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:30). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:30.

[0037] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSQVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:31). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:31.

[0038] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:32). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:32.

[0039] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVAELYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:33). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:33.

[0040] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVASLYPYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO:34). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:34.

[0041] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQAE LYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:35). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:35.

[0042] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQAS LYPYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO:36). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:36.

[0043] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVAD LYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:37). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:37.

[0044] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGARPGRPLITSKVAD LYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:124). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:124.

[0045] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGARPGRPLITSKVAD LYPYWG  
QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:125). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:125.

[0046] В другом случае предложено соединение, которое включает следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGTRPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLLVTVSSPP (SEQ ID NO:126). В качестве альтернативы, соединение может иметь аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с SEQ ID NO:126.

[0047] Во-вторых, в настоящем раскрытии описаны соединения, которые включают по меньшей мере один из увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов на основе VHH, как описано в настоящем документе, и биотерапевтическое средство. В некоторых случаях соединения могут включать следующую структуру, от amino-конца (N-конца) к карбокси-концу (C-концу):

M-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-M,  
M-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-M,  
M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>,  
M-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,  
M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>,  
M-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M,  
X<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-M,  
X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M,  
X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-M,  
X<sub>1</sub>-M-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-M-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,  
M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,  
M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M,

$X_2$ - $L_2$ - $X_1$ - $L_1$ -M или

$M$ - $L_1$ - $X_1$  в сочетании с  $M$ - $L_2$ - $X_2$  (т. е. нековалентно связанные),

[0048] где M представляет собой соединение, выступающее в качестве увеличивающего  $t\frac{1}{2}$  фрагмента и имеющее аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-37 и 124-126, или имеющее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с ней, где  $L_1$  (если присутствует) представляет собой первый линкер, где  $L_2$  (если присутствует) представляет собой второй линкер, где  $X_1$  представляет собой биотерапевтический белок, пептид или олигомер, и где  $X_2$  представляет собой биотерапевтический белок, пептид или олигомер, который может быть таким же как  $X_1$  или отличным от него (например, когда биотерапевтическое средство представляет собой гомодимер или когда биотерапевтическое средство представляет собой гетеродимер,  $X_1$  может представлять собой одну его цепь ( $\alpha$ -цепь), а  $X_2$  может представлять собой другую его цепь ( $\beta$ -цепь)).  $X_1$  и  $X_2$  также могут полностью отличаться друг от друга. В некоторых случаях  $L_1$  может иметь аминокислотную последовательность  $(GGGGQ)_n$  (SEQ ID NO:38),  $(GGGQ)_n$  (SEQ ID NO:39),  $(GGGGS)_n$  (SEQ ID NO:40),  $(PGPQ)_n$  (SEQ ID NO:41),  $(PGPA)_n$  (SEQ ID NO:42),  $GGGG(AP)_nGGGG$  (SEQ ID NO:43),  $(GGE)_n$  (SEQ ID NO:44),  $(GGGGE)_n$  (SEQ ID NO:45),  $(GGK)_n$  (SEQ ID NO:46),  $(GGGGK)_n$  (SEQ ID NO:47),  $GGGG(EP)_nGGGG$  (SEQ ID NO:48),  $GGGG(KP)_nGGGG$ , (SEQ ID NO:49),  $(PGPE)_n$  (SEQ ID NO:50) или  $(PGPK)_n$  (SEQ ID NO:51), где n может составлять от 1 до 15, в особенности от приблизительно 5 до приблизительно 10. В других случаях  $L_1$  может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:52-63. В других случаях  $L_1$  может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен, так что  $L_1$  имеет аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с любой из SEQ ID NO:52-63.

[0049] В некоторых случаях  $L_2$  может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:64-65. В других случаях  $L_2$  может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен, так что  $L_2$  имеет аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с любой из SEQ ID NO:64-65.

[0050] В других случаях  $L_1$  или  $L_2$  может представлять собой полимер, такой как полиэтиленгликоль (PEG), в особенности  $(PEG)_n$ , где n может составлять от 1 до 20.

[0051] В некоторых случаях  $X_1$ ,  $X_2$  или  $X_1/X_2$  представляет собой пептид или белок (и даже олигомер, например, гомодимер или гетеродимер, который может быть или может не быть ковалентно связан). Примеры таких пептидов или белков включают, не ограничиваясь

перечисленным, антитело (Ab), фрагмент антитела (например, Fab, scFv, Fab-Fab, VH, VL или VHH другой специфичности), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор роста/дифференцировки 15 (GDF15), инкретин (INC), интерлейкин (IL), нейрегулин (NRG) или гормон. В некоторых случаях INC может представлять собой инсулин (INS), глюкозозависимый инсулиотропный пептид (GIP), глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), GIP/GLP-1 или даже INC, обладающий тройной рецепторной активностью (т. е. активностью рецептора глюкагона-GIP-GLP-1). В некоторых случаях IL представляет собой интерлейкин-2 (IL-2). В некоторых случаях NRG представляет собой нейрегулин-1 (NRG1) или нейрегулин-4 (NRG4). В некоторых случаях гормон представляет собой адренокортикотропный гормон (АКТГ) или релаксин-2 (RLN-2). В некоторых случаях Fab связывается с G1TR; и в некоторых случаях Fab связывается с G1TR и является антагонистом G1TR.

[0052] В конкретных случаях соединения могут иметь любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:100-118. В качестве альтернативы, соединения могут обладать от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством последовательности с любой аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:100-118.

[0053] В-третьих, в настоящем раскрытии описаны фармацевтические композиции, которые включают по меньшей мере одно соединение, предложенное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0054] В-четвертых, в настоящем раскрытии описаны способы применения соединений и фармацевтических композиций в качестве лекарственных средств и для увеличения  $t_{1/2}$  биотерапевтических средств.

[0055] В-пятых, в настоящем раскрытии описано применение соединений, предложенных в настоящем документе, для производства лекарственных средств и для увеличения  $t_{1/2}$  биотерапевтических средств.

[0056] Преимущество увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов и включающих их соединений состоит в том, что они могут быть химически или рекомбинантно синтезированы в виде одноцепочечного полипептида (т. е. мономерного) и, таким образом, не требуют эндопротеолитического процессинга для обеспечения биологической активности. Однако предполагается, что в некоторых случаях соединения, выступающие в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов, могут быть слиты не только с одноцепочечными пептидами и белками, но также и с пептидами с более чем одной цепью, например двухцепочечными пептидами, многоцепочечными пептидами и белками. На соединениях, выступающих в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов, можно осуществлять химическую конъюгацию не только с N- и C-концом, но также с любой расположенной на

поверхности аминокислотой увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов (при условии, что такая конъюгация не полностью нейтрализует связывание альбумина).

[0057] Преимущество соединений, выступающих в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов, и соединений, которые их включают, заключается в том, что увеличивающие  $t_{1/2}$  фрагменты обеспечивают увеличенную продолжительность действия у млекопитающих, таких как люди, и могут иметь  $t_{1/2}$  от приблизительно 20 дней до приблизительно 30 дней, тем самым обеспечивая возможность по меньшей мере еженедельного введения или введения раз в две недели по сравнению с нативными пептидами и белками, что может улучшить соблюдение режима лечения и может улучшить качество жизни, особенно в случаях хронических заболеваний, требующих пожизненной терапии.

[0058] Преимущество соединений, выступающих в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов, предложенных в настоящем документе, состоит в том, что они обладают настраиваемой фармакокинетикой, достигаемой за счет изменения аффинности к альбумину увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов.

[0059] Преимущество соединений, выступающих в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов, предложенных в настоящем документе, заключается в том, что они могут обеспечивать рекомбинантную экспрессию в стандартных организмах-продуцентах, таких как дрожжи, млекопитающие или прокариоты.

[0060] Более того, преимуществом соединений, выступающих в качестве увеличивающих  $t_{1/2}$  фрагментов, предложенных в настоящем документе, является то, что они имеют аналогичное связывание не только с сывороточным альбумином человека, но и с сывороточным альбумином обезьян, мышей, крыс, собак и свиней, что позволяет проводить фармакодинамические, фармакокинетические и токсикологические исследования для более легкого перехода с этих видов на людей. Соответственно, увеличивающие  $t_{1/2}$  фрагменты, предложенные в настоящем документе, могут применяться не только для лечения людей, но также и для лечения животных.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0061] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные методам и материалам, описанным в настоящем документе, могут быть использованы в практике осуществления или при тестировании аналогов, фармацевтических композиций и способов, предпочтительные методы и материалы описаны в настоящем документе.

[0062] Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности присутствия более, чем одного элемента, если контекст явно не предполагает наличия одного и только одного элемента. Соответственно, термины в единственном числе обычно означают «по меньшей мере один».

[0063] *Определения*

[0064] В настоящем документе термин «приблизительно» означает в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, указанная концентрация, длина, молекулярная масса, рН, сходство последовательностей, временной интервал, температура, объем и т. д. Такое значение или диапазон может быть в пределах одного порядка величины, обычно в пределах 20%, чаще в пределах 10% и еще чаще в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином «приблизительно», будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

[0065] В настоящем документе и в отношении одного или более рецепторов, «активность», «активировать», «активирующий» и тому подобное означает способность соединения, например, слитой молекулы, предложенной в настоящем документе, осуществлять связывание и индуцировать ответ рецептора(ов), согласно измерениям с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

[0066] В настоящем документе «адренокортикотропный гормон» или «АКТГ» означает АКТГ, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. АКТГ включает как нативный АКТГ (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного АКТГ). Одна последовательность для АКТГ представлена в SEQ ID NO:95 (идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P01189). У людей АКТГ связывается с рецептором АКТГ (ACTHR, также известным как меланокортиновый рецептор 2 типа или MC2R), и одна последовательность для ACTHR представлена в SEQ ID NO:96 (идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt Q01718). ACTHR представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком, расположенный на внешней клеточной плазматической мембране; он связан с Gαs и повышает уровни цАМФ путем активации аденилатциклазы.

[0067] В настоящем документе «аминокислота» означает молекулу, которая с химической точки зрения характеризуется наличием одной или более аминогрупп и одной или более групп карбоновой кислоты и может содержать другие функциональные группы. Как известно в данной области техники, существует набор из двадцати аминокислот,

называемых стандартными аминокислотами, которые могут использоваться в качестве строительных блоков для большинства пептидов/белков, продуцируемых любым живым существом. Аминокислотные последовательности в данном описании содержат стандартные однобуквенные или трехбуквенные коды для двадцати природных аминокислот.

[0068] В настоящем документе «аналог» означает соединение, такое как синтетический пептид или полипептид, которое активирует рецептор-мишень и вызывает по меньшей мере один эффект *in vivo* или *in vitro*, вызываемый нативным агонистом этого рецептора.

[0069] В настоящем документе «биотерапевтическое средство» и т. п. означает соединения на основе аминокислот или нуклеиновых кислот, такие как антитела, факторы коагуляции, факторы свертывания крови, цитокины, ферменты, факторы роста, гормоны и их фрагменты, обладающие по меньшей мере одной терапевтической активностью/областью применения, а также терапевтические молекулы ДНК и/или РНК.

[0070] В настоящем документе «CNTF» или «цилиарный нейротрофический фактор» означает CNTF, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. CNTF включает как нативный CNTF (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного CNTF). Одна последовательность для CNTF представлена в SEQ ID NO:97 (идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P26441). У человека CNTF связывается с CNTF $\alpha$ -рецептором (CNTFR $\alpha$ ), и одна последовательность для CNTFR $\alpha$  представлена в SEQ ID NO:98 (идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P26992). CNTFR $\alpha$  также содержит две трансмембранные субъединицы, передающие сигнал, LIFR $\beta$  и gp130, которые вместе активируют сигнальный путь Jak-STAT. См. Stahl *et al.* (1994) Science 263:92-95 и Stahl & Yancopoulos (1994) *J. Neurobiol.* 25:1454-1466.

[0071] В настоящем документе «консервативная замена» означает вариант референсного пептида или полипептида, который идентичен референсной молекуле, за исключением наличия одной или более консервативных аминокислотных замен в его аминокислотной последовательности. Как правило, вариант, полученный путем консервативной модификации, включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична референсной аминокислотной последовательности. Более конкретно, консервативная замена относится к замене аминокислоты аминокислотой, имеющей аналогичные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость основной цепи, и т. д.) и оказывающей минимальное влияние на биологическую активность полученного путем



замены пептида или полипептида. Консервативные замены функционально подобных аминокислот хорошо известны в данной области техники, и поэтому нет необходимости в их исчерпывающем описании в настоящем документе.

[0072] В настоящем документе «эффективное количество» означает количество или дозу одного или более соединений, предложенных в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемой соли, которые при однократном или многократном введении дозы индивидууму, нуждающемуся в этом, обеспечивают желаемый эффект у такого индивидуума, находящегося на диагностике или лечении (т. е. могут вызывать клинически измеримые различия в состоянии индивидуума, такие как, например, усиление ангиогенеза, повышение эластичности сосудов, увеличение сердечного кровотока, увеличение печеночного кровотока, увеличение легочного кровотока, увеличение почечного кровотока, повышение скорости клубочковой фильтрации, снижение артериального давления, уменьшение (или предотвращение) воспаления и/или уменьшение (или предотвращение) фиброза сердца, почек, печени или легких). Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники путем применения известных способов и путем анализа результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для индивидуума учитывается ряд факторов, в том числе, не ограничиваясь перечисленным, вид млекопитающего, его размер, возраст и общее состояние здоровья, конкретное рассматриваемое заболевание или нарушение, степень или поражение или тяжесть заболевания или нарушения, ответ субъекта, конкретное вводимое соединение, способ введения, характеристики биодоступности вводимого препарата, выбранная схема дозирования, применение сопутствующей терапии и другие имеющие значение обстоятельства.

[0073] В настоящем документе «увеличенная продолжительность действия» означает, что аффинность связывания и активность для слитой молекулы, включающей по меньшей мере одно соединение, предложенное в настоящем документе, и биотерапевтическое средство, предложенное в настоящем документе, сохраняется в течение периода времени, превышающего этот период для нативного биотерапевтического средства, что позволяет вводить дозу реже, например, один раз в сутки или даже три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Профиль действия может быть измерен с помощью известных методов фармакокинетического анализа, таких как методы, используемые в приведенных ниже примерах.

[0074] В настоящем документе «индуцируемый глюкокортикоидами TNFR-родственный белок» или «GITR», также известный как член 18 надсемейства рецепторов фактора некроза

опухоли (TNFRSF18), означает GTR, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. GTR включает как нативный GTR (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного GTR). Одна последовательность для полноразмерного GTR человека (но без сигнального пептида) представлена в SEQ ID NO:122 (см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt Q9Y5U5). Одна последовательность для ECD GTR человека (но без сигнального пептида) представлена в SEQ ID NO:123.

[0075] В настоящем документе «глюкозозависимый инсулиотропный пептид(ы)», «желудочный ингибиторный пептид(ы)» или «GIP» («ЖИП») означает GIP, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. GIP включает как нативный GIP (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного GIP). GIP образуется в результате процессинга из предшественника, proGIP. Одна последовательность для proGIP представлена в SEQ ID NO:67 (см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P09681), а одна последовательность для GIP представлена в SEQ ID NO:68. Альтернативным GIP является GIP<sub>1-30</sub> (см. Hansen *et al.* (2016) *Br. J. Pharmacol.* 173:826-838). У человека существует один рецептор GIP (GIPR; SEQ ID NO:69; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P48546), который действует как рецептор, сопряженный с G-белком. См. Yaqub *et al.* (2010) *Mol. Pharmacol.* 77:547-558.

[0076] В настоящем документе «глюкагоноподобный пептид-1» или «GLP-1» означает GLP-1, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. GLP-1 включает как нативный GLP-1 (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного GLP-1). GLP-1 образуется в результате процессинга из предшественника, проглюкагона (proGCG). Одна последовательность для proGIP представлена в SEQ ID NO:70 (см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P01275), а одна последовательность для GLP-1 представлена в SEQ ID NO:71. Известно два активных физиологических варианта, которые представлены в SEQ ID NO:72 и 73. У человека существует один рецептор GLP-1 (GLP-1R; SEQ ID NO:74; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P43220), который действует как рецептор, сопряженный с G-белком. См. Dillon *et al.* (1993) *Endocrinol.* 133:1907-1910; Graziano *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:141-146; и Thorens *et al.* (1993) *Diabetes* 42:1678-1682.

[0077] В настоящем документе «фактор роста/дифференцировки 15» или «GDF15» означает GDF15, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. GDF15 включает как нативный GDF15 (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного GDF15). GDF15 представляет собой гомодимерный пептид, который образуется в результате процессинга из предшественника, proGDF15. Одна последовательность для предшественника представлена в SEQ ID NO:75, а одна последовательность для GDF15 представлена в SEQ ID NO:76 (см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt Q99988). У человека существует один рецептор GDF15 (GFRAL; SEQ ID NO:77; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt Q6UXV0), который действует как RET-рецепторная тирозинкиназа. См. Emmerson *et al.* (2017) *Nat Med.* 23:1215-1219; Yang *et al.* (2017) *Nat. Med.* 23:1158-1166; и Baek & Eling (2019) *Pharmacol. Ther.* 198:46-58.

[0078] В настоящем документе «период полужизни» или « $t_{1/2}$ » означает время, необходимое для того, чтобы половина количества соединения, такого как слитая молекула, описанная в настоящем документе, была удалена из жидкости или другого физиологического пространства, такого как сыворотка или плазма индивидуума, с помощью биологических процессов. В качестве альтернативы,  $t_{1/2}$  также может означать время, за которое некоторое количество такой слитой молекулы теряет половину своей фармакологической, физиологической или радиологической активности.

[0079] В настоящем документе «полумаксимальная эффективная концентрация» или «EC<sub>50</sub>» означает концентрацию соединения, которая приводит к 50% активации/стимуляции конечной точки анализа, такой как кривая зависимости доза-ответ (например, CNTF: Jak, STAT, Ras, PI3K/Akt и MAPK/ERK; NRG: PI3K/Akt, Jak, STAT, Ras и PLC $\gamma$ ; GDF15: PI3K/AKT и MAPK/ERK и Smad; IL-2: JAK-STAT, PI3K/Akt и MAPK/ERK; GLP1: cAMP, PI3K, MAPK/ERK, PKC $\delta$ ; TNF: TRAF, MKK, IKK и NF $\kappa$ B; АКТГ: cAMP и PKA).

[0080] В настоящем документе «в комбинации с» означает введение по меньшей мере одной из слитых молекул, предложенных в данном документе, одновременно, последовательно или в виде единого комбинированного препарата с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

[0081] В настоящем документе «индивидуум, нуждающийся в этом» означает млекопитающее, например, человека, имеющего состояние, заболевание, нарушение или симптом, требующие лечения или терапии, в том числе, например, перечисленные в

настоящем документе. В частности, предпочтительным индивидуумом, подлежащим лечению, является человек.

[0082] В настоящем документе «инкретин(ы)» или «INC» означает пептид, секретируемый энтероэндокринными клетками, который может повышать секрецию инсулина после приема пищи. INC может представлять собой инкретин, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. У человека INC включают INS, GIP и GLP-1, которые обсуждались выше.

[0083] В настоящем документе «инсулин» или «INS» означает инсулин, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека, при этом нативная форма представляет собой гетеродимерный пептид, имеющий две пептидные цепи (например, цепь А и цепь В), соединенные двумя дисульфидными связями, при этом цепь А дополнительно имеет одну внутримолекулярную дисульфидную связь. У людей процессинг INS начинается с препроинсулина (см. идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P01308), который претерпевает процессинг до проинсулина (включает цепь А, цепь В и С-пептид; нативный INS имеет структуру В-С-А; см. SEQ ID NO:78; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P01308). Проинсулин претерпевает дальнейший процессинг, при котором С-пептид отщепляется с образованием INS (цепь А нативного INS человека см. в SEQ ID NO:79, а цепь В нативного INS человека см. в SEQ ID NO: 80; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P01308).

[0084] В настоящем документе «интерлейкин(ы)» или «IL» означает интерлейкин, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. IL включает как нативный IL (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного IL). У человека существует ряд нативных изоформ IL; однако в настоящем документе интерес представляет IL-2. IL-2 представляет собой цитокин, который может передавать сигналы по трем различным сигнальным путям, включая пути JAK-STAT, PI3K/Akt/mTOR и MAPK/ERK. Одна последовательность для IL-2 человека представлена в SEQ ID NO:83 (см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P60568). У человека существует один рецептор IL-2, который включает  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы (IL-2R; SEQ ID NO:84-86; см. также идентификационные номера в базе данных UniProt/SwissProt P01589, P14784 и P31785). См. Liao *et al.* (2011) *Curr. Opin. Immunol.* 23:598-604; и Malek & Castro (2010) *Immunity* 33:153-165.

[0085] В настоящем документе «длительного действия» означает, что аффинность связывания и активность композиции, предложенной в настоящем документе, сохраняется

в течение периода времени, превышающего этот период для нативного пептида или белка, что позволяет вводить дозу реже, например, один раз в сутки или даже три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю или ежемесячно. Профиль действия соединений, предложенных в настоящем документе, может быть измерен с помощью известных методов фармакокинетического анализа, таких как методы, описанные в приведенных ниже примерах.

[0086] В настоящем документе «нейрегулин(ы)» или «NRG» означает нейрегулин, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. NRG включает как нативный NRG (т. е. полноразмерный), так и его варианты (т. е. добавления, делеции, вставки и/или замены нативного NRG). У человека существует ряд нативных членов семейства NRG; однако в настоящем документе интерес представляет NRG1. Как и все NRG, NRG1 образуется в результате процессинга из более крупного предшественника. Одна последовательность для предшественника представлена в SEQ ID NO:87, а одна последовательность для NRG1 представлена в SEQ ID NO:88 (см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt Q02297). У человека существует два рецептора NRG1, ErbB3 (SEQ ID NO:89; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P21860) и ErbB4 (SEQ ID NO: 90; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt Q15303). См. Mei & Xiong (2008).

[0087] В настоящем документе «нестандартная аминокислота» означает аминокислоту, которая может естественным образом встречаться в клетках, но не участвует в синтезе пептидов. Нестандартные аминокислоты могут быть составляющими пептида и часто образуются путем модификации стандартных аминокислот в пептиде (т. е. посредством посттрансляционной модификации). Нестандартные аминокислоты могут включать D-аминокислоты, которые имеют абсолютную хиральность, противоположную указанным выше стандартным аминокислотам.

[0088] В настоящем документе «олигомер» означает молекулу, имеющую несколько схожих или идентичных повторяющихся звеньев, которые могут происходить из копий меньшей молекулы, ее мономера. Эти мономеры могут быть соединены связями, которые могут быть сильными или слабыми, ковалентными или нековалентными (например, внутримолекулярными).

[0089] В настоящем документе «пациент», «субъект» и «индивидуум» используются взаимозаменяемо и означают млекопитающее, в особенности человека. В некоторых случаях индивидуум дополнительно характеризуется наличием у него состояния,

заболевания, нарушения или симптома, которые могут улучшиться при введении соединения или композиции, предложенных в настоящем документе.

[0090] В настоящем документе «фармацевтически приемлемый буфер» означает любой из стандартных фармацевтических буферов, известных специалистам в данной области техники.

[0091] В настоящем документе «релаксин-2» или «RLN-2» означает релаксин-2, полученный или происходящий из любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека, при этом нативная форма представляет собой гетеродимерный пептид, имеющий две пептидные цепи (например, цепь А и цепь В), соединенные двумя дисульфидными связями, при этом цепь А дополнительно имеет одну внутримолекулярную дисульфидную связь. У людей процессинг RLN-2 начинается с препрорелаксина (см. идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P04090), который претерпевает процессинг до прорелаксина (включает цепь А, цепь В и С-пептид; нативный RLN имеет структуру В-С-А; см. SEQ ID NO:91; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P04090). Прорелаксин подвергается дальнейшему процессингу, при котором С-пептид отщепляется с образованием RLN-2 (цепь А RLN-2 см. в SEQ ID NO: 92, а цепь В RNL-2 см. в SEQ ID NO:93; см. также идентификационный номер в базе данных UniProt/SwissProt P04090).

[0092] В настоящем документе «сходство последовательностей» означает количественное свойство двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей биологических соединений, такое как, например, соответствие по всей длине или в пределах окна сравнения указанных двух или более последовательностей. Сходство последовательностей может быть измерено по (1) процентной идентичности или (2) процентного сходства. С помощью процентной идентичности измеряют процент остатков, идентичных для двух биологических соединений, деленный на длину самой короткой последовательности; тогда как с помощью процентного сходства измеряют идентичность и, кроме того, включают в оценку гэпы в последовательностях и сходство остатков. Способы и алгоритмы определения сходства последовательностей хорошо известны в данной области техники, и поэтому нет необходимости в их исчерпывающем описании в настоящем документе. Установленный процент идентичных положений нуклеотидов или аминокислот составляет по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше.

[0093] В настоящем документе «лечение» или «лечить» означает ведение и уход за индивидуумом, имеющим состояние, заболевание, нарушение или симптом, при которых

показано введение соединения, предложенного в настоящем документе, с целью ослабления, сдерживания, реверсии, замедления или остановки прогрессирования или уменьшения тяжести указанного состояния, заболевания, нарушения и/или симптома. Лечение включает введение соединения, предложенного в настоящем документе, или композиции, содержащей соединение, предложенное в настоящем документе, индивидууму для предотвращения появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений или устранения состояния, заболевания, нарушения или симптома. Лечение включает введение индивидууму соединения, предложенного в настоящем документе, или композиции, содержащей соединение, предложенное в настоящем документе, с целью, например, усиления ангиогенеза, повышения эластичности сосудов, увеличения сердечного кровотока, увеличения печеночного кровотока, увеличения легочного кровотока, увеличения почечного кровотока, повышения скорости клубочковой фильтрации, снижения артериального давления, уменьшения (или предотвращения) воспаления и/или уменьшения (или предотвращения) фиброза сердца, почек, печени или легких. Индивидуум, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее, в особенности человека.

[0094] В настоящем документе «VНН» или «фрагмент VНН» означает форму однодоменного антитела, в особенности фрагмент антитела, содержащий единственную мономерную переменную область антитела, содержащего только тяжелую цепь (HcAb), который может иметь размер приблизительно 15 кДа. В настоящем документе было обнаружено, что соединения на основе сконструированных/модифицированных VНН могут применяться в качестве фармакокинетического усилителя для увеличения продолжительности действия и/или улучшения  $t_{1/2}$  биотерапевтических средств. Соединения на основе VНН связывают сывороточный альбумин; однако соединения на основе VНН можно применять для связывания IgG (включая Fc-домен), неонатального Fc-рецептора (FcRn) или других сывороточных белков длительного действия. Таким образом, соединение на основе VНН можно применять для улучшения  $t_{1/2}$  соединения, такого как пептид или белок, или даже других молекул, таких как, например, малые молекулы.

[0095] Некоторые сокращения определены следующим образом: «ACR» относится к альбумин-креатининовому соотношению в моче; «AUC» относится к площади под кривой; «цАМФ» относится к циклическому аденозинмонофосфату; «CMV» относится к цитомегаловирусу; «ДНК» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте; «ECD» относится к внеклеточному домену; «EDC» относится к гидрохлориду 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида; «ЕТА» относится к этаноламину; «GS» относится к глутаминсинтетазе; «НС» относится к тяжелой цепи; «ХГВ» относится к хроматографии

гидрофобных взаимодействий; «ч» относится к часу или часам; «в/в» относится к внутривенному введению; «кДа» относится к килодальтонам; «LC» относится к легкой цепи; «ЖХ-МС» относится к жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией; «мин» относится к минуте или минутам; «МС» относится к масс-спектрометрии; «MSX» относится к метионин сульфоксимины; «NHS» относится к N-гидроксисукцинимиду; «OtBu» относится к O-трет-бутилу; «ПЭИ» относится к полиэтиленимину; «ОФ-ВЭЖХ» относится к обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии; «сек» относится к секунде или секундам; «NaOAc» относится к ацетату натрия; «gcf» означает относительную центробежную силу; «комн. т.» означает комнатную температуру; «RU» означает резонансные единицы; «п/к» относится к подкожному введению; «SEC» относится к эксклюзионной хроматографии; «SEM» относится к стандартной ошибке среднего; «SPR» означает поверхностный плазмонный резонанс; «TFA» относится к трифторуксусной кислоте; и «Trt» относится к тритилу.

[0096] *Соединения на основе VHH, выступающие в качестве увеличителей периода полужизни, и включающие их слитые или конъюгированные соединения*

[0097] Вкратце, соединения, предложенные в настоящем документе, могут включать аминокислотную последовательность, от N-конца к C-концу, имеющую одну из следующих структур:

M-X<sub>1</sub>,  
 X<sub>1</sub>-M,  
 M-X<sub>2</sub>,  
 X<sub>2</sub>-M,  
 M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>,  
 M-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,  
 M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>,  
 M-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,  
 X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M,  
 X<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-M,  
 X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M,  
 X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-M,  
 X<sub>1</sub>-M-X<sub>2</sub>,  
 X<sub>2</sub>-M-X<sub>1</sub>,  
 X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M-X<sub>2</sub>,  
 X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M-X<sub>1</sub>,



$X_1$ -M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>,

$X_2$ -M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>,

$X_1$ -L<sub>1</sub>-M-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,

$X_2$ -L<sub>1</sub>-M-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,

M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,

M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,

$X_1$ -L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M,

$X_2$ -L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M или

M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub> в сочетании с M-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub> (т. е. нековалентно связанные),

[0098] где M представляет собой соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего  $t_{1/2}$  фрагмента и имеющее аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-37 и 124-126, или имеющее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с ней, где L<sub>1</sub> (если присутствует) представляет собой первый линкер, где L<sub>2</sub> (если присутствует) представляет собой второй линкер, где X<sub>1</sub> (если он присутствует) представляет собой биотерапевтический белок, пептид или олигомер, и где X<sub>2</sub> (если он присутствует) также представляет собой биотерапевтический белок, пептид или олигомер, который может быть таким же как X<sub>1</sub> или отличным от него (например, когда биотерапевтическое средство представляет собой гомодимер или когда биотерапевтическое средство представляет собой гетеродимер, X<sub>1</sub> может представлять собой одну его цепь ( $\alpha$ -цепь), а X<sub>2</sub> может представлять собой другую его цепь ( $\beta$ -цепь)). X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> также могут полностью отличаться друг от друга.

[0099] В некоторых случаях L<sub>1</sub> может иметь аминокислотную последовательность (GGGGQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:38), (GGGQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:39), (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:40), (PGPQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:40), (PGPA)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:42), GGGG(AP)<sub>n</sub>GGGG (SEQ ID NO:43), (GGE)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:44), (GGGGE)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:45), (GGK)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:46), (GGGGK)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:47), GGGG(EP)<sub>n</sub>GGGG (SEQ ID NO:48), GGGG(KP)<sub>n</sub>GGGG (SEQ ID NO:49), (PGPE)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:50) или (PGPK)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:51), где n может составлять от 1 до 15, в особенности от приблизительно 5 до приблизительно 10. В других случаях L<sub>1</sub> может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:52-63. В других случаях L<sub>1</sub> может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен, так что L<sub>1</sub> имеет аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с любой из SEQ ID NO:52-63.

[00100] В некоторых случаях L<sub>2</sub> может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:64-65. В других случаях L<sub>2</sub> может содержать одно или

более добавлений, делеций, вставок или замен, так что L<sub>2</sub> имеет аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 99% сходством с любой из SEQ ID NO:64-65.

[00101] В других случаях L<sub>1</sub> или L<sub>2</sub> может представлять собой полимер, такой как полиэтиленгликоль (PEG), в особенности малеимид-(PEG)<sub>12</sub>.

[00102] В совокупности иллюстративные слитые молекулы представляют собой:

[00103] Соединение 1, представляющее собой слитую молекулу VHH-CNTF, которая включает CNTF, линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), имеет следующую аминокислотную последовательность:

MAFTEHSPLTPHRRDLASRSIWLARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVA  
STDRWSELTEAERLQENLQAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTPTEGDFHQAIHTLLLQVAA  
FAYQIEELMILLEYKIPRNEADGMPINVG DGGLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLR  
FISSHQTGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAA  
SGRYIDETAVAWFRQAPGKERE FVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM  
NSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSSPP (SEQ ID NO:100).

[00104] Соединение 2, представляющее собой слитую молекулу VHH-CNTF, которая включает соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и CNTF, имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKERE FVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGT LVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQMAFTEHSPLTPHRRDLASRSIWL  
ARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVASTDRWSELTEAERLQENLQAYR  
TFHVLLARLLEDQQVHFTPTEGDFHQAIHTLLLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPRNEADG  
MPINVG DGGLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLRFISSHQTG (SEQ ID NO:101).

[00105] Соединение 3, представляющее собой слитую молекулу VHH-NRG1, которая включает NRG1, линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), имеет следующую аминокислотную последовательность:

SHLVKCAEKEKTF CVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHL  
GIEFMEA EELYQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRL  
SCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKERE FVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTL  
YLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSSPP (SEQ ID  
NO:102).

[00106] Соединение 4, представляющее собой слитую молекулу VHH-NRG1, которая включает соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего  $t\frac{1}{2}$  фрагмента (подчеркнуто), линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и NRG1, имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFM  
 VKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHLGIEFMEAEELYQ (SEQ ID NO:103).

[00107] Соединение 5, представляющее собой слитую молекулу VHH-GDF15, которая включает соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего  $t\frac{1}{2}$  фрагмента (подчеркнуто), линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и GDF15, имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLE  
 DLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASY  
 NPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:104).

[00108] Соединение 6, представляющее собой слитую молекулу VHH-IL-2, которая включает IL-2, линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего  $t\frac{1}{2}$  фрагмента (подчеркнуто), имеет следующую аминокислотную последовательность:

APQSSSTQQTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL  
 EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR  
 WITFAQSIISTLTGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRL  
SCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTL  
YLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID  
 NO:105).

[00109] Соединение 7, представляющее собой слитую молекулу VHH-IL-2, которая включает соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего  $t\frac{1}{2}$  фрагмента (подчеркнуто), линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и IL-2, имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQAPQSSSTQQTQLQLEHLLLDLQ  
 MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR

PRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:106).

[00110] Соединение 8, представляющее собой слитую молекулу VHH-GLP-1, которая включает GLP-1, линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), имеет следующую аминокислотную последовательность:

HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGQGGGGQ  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:107).

[001111] Соединение 9, представляющее собой слитую молекулу VHH-Fab, которая включает НС, линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI  
DYADSVEGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYW GQGTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGQG  
*GGGQGGGGQGGGGQGGGGQ*EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGRYIDETA VAWFR  
QAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA  
ARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSSPP (SEQ ID NO:108).

[00112] Соединение 9 дополнительно включает LC, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPS  
RFGSGSGGTDFLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL  
TLISKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:109).

[00113] Соединение 10, представляющее собой слитую молекулу VHH-Fab, которая включает LC, линкер (G4Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), имеет следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS  
RFGSGSGGTDFLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGECGGGGOGGGGGOGGGGGOGGGGGOG

GGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKERE FVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSSPP (SEQ ID NO:111).

[00114] Соединение 10 дополнительно включает HC, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVS AITWNSGHI  
DYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS YLSTASSLDYWGQGT L  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD (SEQ ID  
NO:110).

[00115] Соединение 11, представляющее собой слитую молекулу VHH-Fab, которая включает соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего  $t_{1/2}$  фрагмента (подчеркнуто), линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и HC, имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKERE FVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSS*GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ*EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS YLSTASSLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD (SEQ ID NO:112).

[00116] Соединение 11 дополнительно включает LC, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA AASTLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTL  
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:113).

[00117] Соединение 12, представляющее собой слитую молекулу VHH-Fab, которая включает соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего  $t_{1/2}$  фрагмента (подчеркнуто), линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом) и LC, имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKERE FVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSS*GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA AASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDV

ATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:115).

[00118] Соединение 12 дополнительно включает НС, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI  
DYADSVEGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWQGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD (SEQ ID  
NO:114).

[00119] Соединение 13, представляющее собой слитую молекулу VHH-GLP-1, которая включает GLP-1, линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом), соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто) и С-концевой Cys, имеет следующую аминокислотную последовательность:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTTLVTVSSC (SEQ ID NO:116).

[00120] Соединение 14, представляющее собой слитый конъюгат VHH-GLP-1/АКТГ, который включает GLP-1, линкер (G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub> (выделен курсивом), соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), С-концевой Cys и АКТГ, соединенный в направлении от С-конца к N-концу с линкером малеимид(PEG)<sub>12</sub>, имеет следующую аминокислотную последовательность:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTTLVTVSSC-малеимид-(PEG)<sub>12</sub>-АКТГ (в направлении от С-конца к N-концу) (SEQ ID  
NO:117).

[00121] Соединение 15, представляющее собой слитый конъюгат VHH-АКТГ, который включает соединение на основе VHH, выступающее в качестве увеличивающего t<sub>1/2</sub> фрагмента (подчеркнуто), С-концевой Cys и АКТГ, соединенный в направлении от С-конца к N-концу с линкером малеимид(PEG)<sub>12</sub>, имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGT LVT VSSC-малеимид-(PEG)<sub>12</sub>-(АКТГ в направлении от С-конца к N-концу) (SEQ ID NO:118).

[00122] *Фармацевтические композиции и наборы*

[00123] Соединения (т. е. слитые молекулы на основе VHH или конъюгаты на основе VHH, такие как, например, соединения 1-15 выше), предложенные в настоящем документе, могут быть представлены в составе фармацевтических композиций, которые можно вводить парентеральными путями (например, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно или чрескожно). Такие фармацевтические композиции и методики их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington, “The Science and Practice of Pharmacy” (D.B. Troy ed., 21<sup>st</sup> Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). В конкретных случаях композиции вводят п/к или в/в. Однако, в качестве альтернативы, композиции могут быть представлены в формах для других фармацевтически приемлемых путей, таких как, например, таблетки или другие твердые лекарственные формы для перорального введения; капсулы с модифицированным высвобождением; и любые другие формы, используемые в настоящее время, включая кремы, лосьоны, лекарственные формы для ингаляции и т. п.

[00124] Как отмечалось ранее и, чтобы улучшить их совместимость и эффективность *in vivo*, слитые молекулы на основе VHH или конъюгаты на основе VHH, предложенные в настоящем документе, могут быть подвергнуты взаимодействию с любым количеством неорганических и органических кислот/оснований с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты/основания. Фармацевтически приемлемые соли и обычные методики их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Stahl *et al.*, “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use” (2<sup>nd</sup> Revised Ed. Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для применения, предложенного в настоящем документе, включают соли натрия, трифторацетат, гидрохлорид и ацетат.

[00125] Соединения, предложенные в настоящем документе, могут быть введены врачом или введены самостоятельно с помощью инъекции. Понятно, что калибр иглы и величина объема инъекции могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Однако объем инъекции может составлять  $\leq$  приблизительно 2 мл или даже  $\leq$  приблизительно 1 мл, а калибр иглы может составлять  $\geq$  приблизительно 27 G или даже  $\geq$  приблизительно 29 G.

[00126] Согласно изобретению также предложены и, следовательно, охвачены новые промежуточные вещества и способы, пригодные для синтеза соединений, предложенных в

настоящем документе, или их фармацевтически приемлемой соли. Промежуточные вещества и соединения могут быть получены различными методиками, которые хорошо известны в данной области техники. Например, способ с использованием рекомбинантного синтеза проиллюстрирован в приведенных ниже примерах. Конкретные этапы для каждой из описанных методик можно комбинировать различным образом для получения соединений. Реагенты и исходные вещества являются легко доступными для специалиста в данной области техники.

[00127] Соединения, предложенные в настоящем документе, обычно эффективны в широком диапазоне доз. Иллюстративные дозы соединений или включающих их фармацевтических композиций могут быть в миллиграммовых (мг) или микрограммовых (мкг), наногаммовых (нг) или пикограммовых (пг) количествах на килограмм (кг) массы тела индивидуума. Таким образом, суточная доза может составлять от приблизительно 1 мкг до приблизительно 100 мг.

[00128] В данном случае эффективное количество соединения в фармацевтической композиции может представлять собой дозу от приблизительно 0,25 мг до приблизительно 5,0 мг. Однако специалисту в данной области техники ясно, что в некоторых случаях эффективное количество (т. е. доза/дозировка) может быть ниже нижнего предела указанного выше диапазона и быть более чем достаточным, в то время как в других случаях эффективное количество может представлять собой более высокую дозу и может применяться с приемлемыми побочными действиями.

[00129] В дополнение к соединению, предложенному в настоящем документе, фармацевтическая композиция также может включать по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, такой как, например, терапевтический агент, обычно используемый в качестве стандарта лечения при конкретном состоянии, заболевании и нарушении (например, сердечно-сосудистом, неврологическом, иммунологическом, метаболическом, онкологическом, психологическом, легочном и/или почечном состоянии, заболевании или нарушении).

[00130] Таким образом, фармацевтическая композиция может включать эффективное количество одного или более соединений, предложенных в настоящем документе, фармацевтически приемлемый носитель и необязательно по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент. Например, фармацевтическая композиция может включать эффективное количество соединения с SEQ ID NO:100 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:101 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:102 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с



SEQ ID NO:103 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:104 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:105 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:106 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:107 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:108 и 109 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:110 и 111 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:112 и 113 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:114 и 115 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:116 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество соединения с SEQ ID NO:117 и фармацевтически приемлемый носитель и эффективное количество соединения с SEQ ID NO:118 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00131] В качестве альтернативы, соединения, предложенные в настоящем документе, могут быть представлены как часть набора. В некоторых случаях набор включает устройство для введения индивидууму по меньшей мере одного соединения (и необязательно по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента). В некоторых случаях набор включает шприц и иглу для введения указанного по меньшей мере одного соединения (и необязательно по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента). В конкретных случаях соединение (и необязательно по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент) предварительно готовят в водном растворе внутри шприца.

[00132] *Способы получения и применения соединений на основе VHH, выступающих в качестве увеличителей периода полужизни, или содержащих их слитых молекул и конъюгатов*

[00133] Соединения, предложенные в настоящем документе, могут быть получены с помощью любого количества стандартных методов на основе рекомбинантной ДНК или стандартных методов химического пептидного синтеза, известных в данной области техники. Что касается методов на основе рекомбинантной ДНК, можно использовать стандартные рекомбинантные методики для конструирования полинуклеотида, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность для соединения (т. е. слитого пептида, или слитого белка, или слитого конъюгата), включения этого полинуклеотида в рекомбинантные векторы экспрессии и

введения векторов в клетки-хозяева, такие как бактериальные клетки, дрожжевые клетки и клетки млекопитающих, с получением соединения. См., например, Green & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4<sup>th</sup> ed. 2012).

[00134] Что касается методов на основе рекомбинантной ДНК, соединения, предложенные в настоящем документе, могут быть получены путем продуцирования молекулы белка или белка-предшественника с использованием методик на основе рекомбинантной ДНК. ДНК, включая кДНК и синтетическую ДНК, может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и содержащиеся в ней кодирующие последовательности, которые кодируют соединение, предложенное в настоящем документе, могут варьировать в результате избыточности или вырожденности генетического кода. Вкратце, последовательности ДНК, кодирующие соединения, предложенные в настоящем документе, вводят в клетку-хозяина для продуцирования соединения или его предшественника. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, такие как штаммы K12 или B *Escherichia coli*, клетки грибов, такие как дрожжевые клетки, или клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

[00135] Подходящую клетку-хозяина временно или стабильно трансфицируют или трансформируют системой экспрессии, такой как векторы экспрессии, для продуцирования соединения, предложенного в настоящем документе, или его предшественника. Векторы экспрессии, как правило, могут реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать маркеры селекции, например, на тетрациклин, неомицин, G418 и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить возможность отбора тех клеток, которые трансформированы желаемыми последовательностями ДНК.

[00136] Для получения соединений, предложенных в настоящем документе, конкретные этапы биосинтеза или синтеза для каждого из этапов, описанных в настоящем документе могут быть использованы, не использованы или комбинированы в различных сочетаниях.

[00137] Что касается методов химического пептидного синтеза, можно использовать стандартные процедуры твердофазного синтеза в ручном или автоматизированном режиме. Например, автоматизированные синтезаторы пептидов коммерчески доступны от, например, Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния) и Protein Technologies Inc. (Тусон, Аризона). Реагенты для твердофазного синтеза легко доступны из коммерческих источников. Твердофазные синтезаторы можно использовать в соответствии с инструкциями производителя для блокирования мешающих групп, защиты аминокислот во время реакции, связывания, снятия защиты и экпирования непрореагировавших аминокислот.

[00138] Одним из применений соединений, предложенных в настоящем документе, является лечение сердечно-сосудистых, неврологических, иммунологических, метаболических, онкологических, психологических, легочных и/или почечных состояний, заболеваний или нарушений.

[00139] Способы могут включать этапы, описанные в настоящем документе, и они могут выполняться, но не обязательно выполняются, в описанной последовательности. Однако возможны и другие последовательности выполнения. Более того, отдельно взятые этапы или несколько этапов могут выполняться параллельно, и/или с перекрытием во времени, и/или по отдельности, или в многократно повторяемых этапах. Кроме того, способы могут включать дополнительные неуказанные этапы.

[00140] Таким образом, такие способы могут включать выбор индивидуума, имеющего, например, неврологическое состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему. В качестве альтернативы, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего метаболическое состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему. В качестве альтернативы, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего сердечно-сосудистое состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему. В качестве альтернативы, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего онкологическое состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему. В качестве альтернативы, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего психологическое состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему. В качестве альтернативы, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего легочное состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему. В качестве альтернативы, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего почечное состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему. В качестве альтернативы, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего аутоиммунное состояние, заболевание или нарушение, или предрасположенного к нему.

[00141] Способы также могут включать введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного соединения, предложенного в настоящем документе, которое может быть представлено в форме фармацевтической композиции, как также описано в настоящем документе. В некоторых случаях соединение/фармацевтическая композиция может включать дополнительный терапевтический агент.

[00142] Концентрация/доза/дозировка соединения и необязательного дополнительного терапевтического агента обсуждаются в других местах настоящего документа.

[00143] Что касается пути введения, соединение или включающая его фармацевтическая композиция могут быть введены известными способами, такими как, например, перорально; с помощью инъекции (т. е. внутриартериально, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, интрацеребрально, интрацеребровентрикулярно, внутримышечно, внутриглазным путем, внутрипортально или внутриочагово); с помощью систем замедленного высвобождения или с помощью имплантируемых устройств. В некоторых случаях соединение или включающая его фармацевтическая композиция могут вводиться п/к путем болюсной инъекции или непрерывно.

[00144] Что касается частоты дозирования, соединение или включающая его фармацевтическая композиция могут быть введены ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (т. е. еженедельно), раз в две недели (т. е. каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях соединение или включающую его фармацевтическую композицию вводят п/к через день, п/к три раза в неделю, п/к два раза в неделю, п/к один раз в неделю, п/к каждые две недели или п/к ежемесячно. В конкретных случаях соединение или включающую его фармацевтическую композицию вводят п/к один раз в неделю (1 р/нед).

[00145] В качестве альтернативы, и при в/в введении, соединение или включающую его фармацевтическую композицию вводят в/в через день, в/в три раза в неделю, в/в два раза в неделю, в/в один раз в неделю, в/в раз в две недели или в/в ежемесячно. В конкретных случаях соединение или включающую его фармацевтическую композицию вводят в/в один раз в неделю (1 р/нед).

[00146] Что касается тех случаев, когда соединение или включающую его фармацевтическую композицию вводят в комбинации с эффективным количеством по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, дополнительный терапевтический агент может вводиться одновременно, отдельно или последовательно с соединением или включающей его фармацевтической композицией.

[00147] Более того, дополнительный терапевтический агент может вводиться с такой же частотой, что и соединение или включающая его фармацевтическая композиция (т. е. через день, два раза в неделю или даже еженедельно). В качестве альтернативы, дополнительный терапевтический агент может вводиться с частотой, отличной от частоты введения соединения или включающей его фармацевтической композиции. В других случаях дополнительный терапевтический агент может вводиться п/к. В других случаях дополнительный терапевтический агент может вводиться в/в. В других случаях дополнительный терапевтический агент может вводиться перорально.

[00148] Также предполагается, что способы можно комбинировать с диетой и физическими упражнениями и/или можно комбинировать с дополнительными терапевтическими агентами, отличными от тех, которые обсуждались выше.

## ПРИМЕРЫ

[00149] Следующие неограничивающие примеры приведены в целях иллюстрации, а не ограничения.

### [00150] ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И КОНЬЮГАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ

[00151] Пример 1. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 1 на основе VHH

[00152] Пример 1 представляет собой слитую молекулу CNTF-VHH, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

MAFTEHSPLTPHRRDLASRSIWLARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVA  
STDRWSELTEAERLQENLQAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTPTEGDFHQAIHTLLLQVAA  
FAYQIEELMILLEYKIPRNEADGMPINVGDDGLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLR  
FISSHQTGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA  
SGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM  
NSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:100).

[00153] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:100 получали в системе экспрессии клеток млекопитающих с использованием производных клеток CHO K1. Последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:100, субклонировали в GS-содержащий остов плазмид экспрессии (плазмид на основе pEE12.4). Последовательность кДНК сливали внутри рамки считывания с кодирующей последовательностью последовательности сигнального пептида, METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:66), для усиления секреции слитой молекулы на основе VHH в среду для культивирования ткани. Экспрессией управлял вирусный промотор CMV.

[00154] Для получения слитой молекулы на основе VHH посредством временной трансфекции клетки CHO K1 трансфицировали рекомбинантной плазмидой экспрессии методом на основе ПЭИ. Вкратце, соответствующий объем суспензии клеток CHO K1 с плотностью  $4 \times 10^6$  клеток/мл переносили во встряхиваемые колбы, и к клеткам добавляли как ПЭИ, так и рекомбинантную плазмидную ДНК. Клетки инкубировали в суспензионной культуре при 32 °C в течение 6 дней. В конце периода инкубации клетки удаляли

центрифугированием на низкой скорости, и слитую молекулу на основе VHH очищали из кондиционированной среды.

[00155] В качестве альтернативы и для создания слитой молекулы на основе VHH посредством стабильных трансфекций клетки CHO-K1 стабильно трансфицировали с помощью электропорации и соответствующего количества рекомбинантной плазмиды экспрессии, и трансфицированные клетки поддерживали в суспензионной культуре при подходящей плотности клеток. Отбор трансфицированных клеток осуществляли путем выращивания в бессывороточной среде, содержащей 25 мкМ MSX, и инкубирования при приблизительно 37 °C и приблизительно 6% CO<sub>2</sub>.

[00156] Слитую молекулу на основе VHH, секретированную в среду из клеток CHO, очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А с последующей ионообменной хроматографией, хроматографией гидрофобных взаимодействий или эксклюзионной хроматографией. А именно, слитую молекулу на основе VHH из собранной среды захватывали на смоле Mab Select Protein A (GE Healthcare). Затем смолу быстро промывали рабочим буфером, таким как натрий-фосфатный буфер (PBS; pH 7,4), или рабочим буфером, содержащим Трис, для удаления неспецифично связанного материала. Слитую молекулу на основе VHH элюировали со смолы раствором с низким pH, таким как 10 мМ лимонная кислота с pH 3. Фракции, содержащие слитую молекулу на основе VHH, объединяли и могли выдерживать их при низком pH для инактивации потенциальных вирусов. pH мог быть нейтрализован добавлением основания, такого как 1М Трис с pH 8,0. Слитая молекула на основе VHH может быть дополнительно очищена с помощью ионообменной хроматографии с использованием таких смол, таких как Poros 50 HS (ThermoFisher). Слитую молекулу на основе VHH элюировали из ионообменной колонки с использованием градиента NaCl от 0 до 500 мМ в 20 мМ NaOAc, pH 5,0, 15 колоночными объемами.

[00157] Слитая молекула на основе VHH может быть дополнительно очищена с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий с использованием колонки для ХГВ Capto Phenyl ImpRes (GE Healthcare). Очистку выполняли путем доведения раствора для загрузки колонки до приблизительно 0,5 М сульфата натрия и элюирования с использованием градиента 10 колоночных объемов (КО), переходящего от 0,5 М до 0 М сульфата натрия в 20 мМ растворе Трис с pH 8. После ХГВ слитая молекула на основе VHH может быть дополнительно очищена с помощью SEC путем загрузки концентрированного пула Capto Phenyl ImpRes на Superdex200 или Superdex75 (GE Healthcare) с изократическим элюированием в PBS с pH 7,4 или в 20 мМ гистидине, 50 мМ NaCl с pH 6,0.

[00160] Пример 2. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 2 на основе VHH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLLTVTVSSGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQMAFTEHSPLTPHRRDLASRSIWL  
ARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVASTDRWSELTEAERLQENLQAYR  
TFHVLLARLLEDQQVHFTPTGDFHQAIHTLLLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPRNEADG  
MPINVGDGGLFEKKLWGLKVLQELSOWTVRSIHDLRFISSHQTG (SEQ ID NO:101).

[00163] Пример 3. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 3 на основе VHH

SHLVKCAEKEKTF CVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHL  
GIEFMEAEL YQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRL  
SCAASGRYIDETA VAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTL  
YLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGLVTVSSPP (SEQ ID  
NO:102).

[00165] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:102 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что в

плазмиде экспрессии использовали последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:102.

[00166] Пример 4. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 4 на основе VHH

[00167] Пример 4 представляет собой слитую молекулу VHH-NRG1, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFM  
VKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHLGIEFMEAEELYQ (SEQ ID  
NO:103).

[00168] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:103 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии использовали последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:103.

[00169] Пример 5. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 5 на основе VHH

[00170] Пример 5 представляет собой слитую молекулу VHH-GDF15, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLE  
DLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASY  
NPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:104).

[00171] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:104 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии использовали последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:104.

[00172] Пример 6. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 6 на основе VHH

[00173] Пример 6 представляет собой слитую молекулу IL-2-VHH, имеющую следующую аминокислотную последовательность:



APQSSSTQQTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:105).

[00174] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:105 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии использовали последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:105.

[00175] Пример 7. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 7 на основе VHH

[00176] Пример 7 представляет собой аналог слитой молекулы VHH-IL-2, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQAPQSSSTQQTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:106).

[00177] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:106 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии использовали последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:106.

[00178] Пример 8. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 8 на основе VHH

[00179] Пример 8 представляет собой слитую молекулу GLP-1-VHH, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:107).

[00180] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:107 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии использовали последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:107.

[00181] Пример 9. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 9 на основе VHH

[00182] Пример 9 представляет собой слитую молекулу Fab-VHH, содержащую HC-VHH и LC, где HC-VHH имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI  
DYADSVEGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGQG  
GGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFR  
QAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA  
ARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSSPP (SEQ ID NO:108).

[00183] и LC имеет следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTL  
TL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:109).

[00184] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностями SEQ ID NO:108 и 109 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO:108 и 109, клонировали в две плазмиды экспрессии, а затем для трансфекции использовали смесь обеих плазмид в соотношении 1:1.

[00185] Пример 10. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 10 на основе VHH

[00186] Пример 10 представляет собой слитую молекулу Fab-VHH, содержащую HC и LC-VHH, где HC имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI  
DYADSVEGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD (SEQ ID NO:110).

[00187] и LC-VNH имеет следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPS  
RFGSGSGGTDFLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGG  
GGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGG  
VDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLY  
PYWGQGTLLTVSSPP (SEQ ID NO:111).

[00188] В данном случае аналог слитой молекулы на основе VHH с последовательностями SEQ ID NO:110 и 111 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO:110 и 111, клонировали в две плазмиды экспрессии, а затем для трансфекции использовали смесь обеих плазмид в соотношении 1:1.

[00189] Пример 11. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 11 на основе VHH

[00190] Пример 11 представляет собой слитую молекулу Fab-VНН, содержащую VНН-НС и LC, где VНН-НС имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSC  
AASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDN AKNSLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST  
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD (SEQ ID NO:112).

[00191] и ЛС имеет следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPS  
RFGSGSGGTDFLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL  
TLISKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:113).

[00192] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностями SEQ ID NO:112 и 113 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO:112 и 113, клонировали в две

[00194] Пример 12 представляет собой VHH-Fab, содержащий НС и VHH-LC, где НС имеет следующую аминокислотную последовательность:

[00195] и VHH-ЛС имеет следующую аминокислотную последовательность:

[00196] В данном случае аналог слитой молекулы на основе VHH с последовательностями SEQ ID NO:114 и 115 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO:114 и 115, клонировали в две плазмиды экспрессии, а затем для трансфекции использовали смесь обеих плазмид в соотношении 1:1.

[00198] Пример 13 представляет собой Fab, содержащий HC и LC, где HC имеет следующую аминокислотную последовательность:

[00199] и LC имеет следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL  
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:121).

[00200] В данном случае Fab с последовательностями SEQ ID NO:120 и 121 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что последовательности кДНК, кодирующие SEQ ID NO:120 и 121, клонировали в две плазмиды экспрессии, а затем для трансфекции использовали смесь обеих плазмид в соотношении 1:1.

[00201] Пример 14. Рекомбинантная экспрессия и очистка слитой молекулы 13 на основе VHH

[00202] Пример 14 представляет собой слитую молекулу GLP-1-VHH, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ  
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSC (SEQ ID NO:116).

[00203] В данном случае слитую молекулу на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:116 получали по существу как описано в примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии использовали последовательность кДНК, кодирующую SEQ ID NO:116.

[00204] Пример 15. Получение конъюгата 1 на основе VHH

[00205] Пример 15 представляет собой конъюгат GLP-1/AKTГ-VHH, имеющий следующую химическую структуру:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ  
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSC-малеимид-(PEG)<sub>12</sub>-AKTГ (в направлении от C-конца к N-концу; SEQ ID NO:117). Конъюгат на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:117 получали следующим образом. Готовили 1 мг слитой молекулы на основе VHH из примера 14 (SEQ ID NO:116) в концентрации 1 мг/мл (~50 мкМ) путем разбавления исходного раствора концентрацией 10 мг/мл в 10 раз с помощью PBS с pH 7,2. Добавляли четыре эквивалента гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) в PBS, pH 7,2, и инкубировали в

течение 4 часов при комнатной температуре. Успешное восстановление до гомогенных мономеров подтверждали с помощью масс-спектрометрии.

[00206] Реакционную смесь обессоливали с использованием колонки для обессоливания ZEBA с отсечкой MW 7K объемом 2 мл. Буфер для хранения колонки удаляли центрифугированием при 1000 gcf в течение 1 мин. Колонку промывали, добавляя 2 мл PBS с pH 7,2 и центрифугируя при 1000 gcf в течение 1 мин. Реакционную смесь загружали в колонку ZEBA и обессоливали путем центрифугирования в течение 1 мин при 1000 gcf в чистый конический флакон объемом 15 мл. Обессоленный образец концентрировали до ~700 мкМ (~100 мкл) с использованием спин-колонки Amicon Ultra с отсечкой MW 3K.

[00207] АКТГ-(PEG)<sub>12</sub>-малеимид-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:119) получали в концентрации 20 мг/мл (5,2 мМ) в PBS, pH 7,2. 20 мкл АКТГ-(PEG)<sub>12</sub>-малеимид-NH<sub>2</sub>, что соответствовало 2 стехиометрическим эквивалентам, добавляли в обессоленный и концентрированный раствор слитой молекулы на основе VHH из примера 14 (SEQ ID NO:116). Сразу же образовался белый осадок. Реакции дали продолжаться в течение 10 мин и солубилизировали раствор путем снижения pH до 5,5 путем медленного добавления 0,1 М HCl до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. Успешную конъюгацию подтверждали с помощью масс-спектрометрии.

[00208] Желаемый продукт очищали в системе очистки АКТА с использованием колонки со смолой MabSelect Protein A на 5 мл (GE Healthcare) с загрузочным буфером PBS, pH 7,2, и буфером для элюирования, состоящим из 20 мМ цитрата, pH 3. Образец загружали в колонку, и загрузку буферной фазы проводили до тех пор, пока пик непрореагировавшего АКТГ-(PEG)<sub>12</sub>-малеимид-NH<sub>2</sub> не прошел через колонку. Когда сигнал вернулся к исходному уровню, буфер сменяли на 20 мМ цитрат, pH 3, чтобы элюировать желаемый продукт из колонки. По мере элюирования собирали фракции по 1 мл, объединяли и доводили pH до 7 с помощью трис-HCl, pH 8.

[00209] Чтобы раскрыть малеимидное кольцо, pH доводили до 8 добавлением 0,1 М NaOH и оставляли на ночь при комнатной температуре. Для завершения частичного раскрытия кольца pH доводили до 8,5 и инкубировали еще 24 часа при комнатной температуре. Завершение раскрытия кольца подтверждали с помощью масс-спектрометрии и проводили окончательное доведение pH до приблизительно 7,2 путем добавления 0,1 н. HCl. Затем конъюгат на основе VHH из примера 15 хранили при 4°C.

[00210] Пример 16. Получение конъюгата 2 на основе VHH

[00211] Пример 16 представляет собой конъюгат АКТГ-VHH, имеющий следующую химическую структуру:

[00212] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGG GVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADL YPYWGQGTLVTVSSC-малеимид-(PEG)<sub>12</sub>-(АКТГ) (в направлении от С-конца к N-концу; SEQ ID NO:118).

[00213] Конъюгат на основе VHH с последовательностью SEQ ID NO:118 получали следующим образом. Готовили 1 мг контрольного VHH (SEQ ID NO:37) в концентрации 1 мг/мл (приблизительно 70 мкМ) путем разбавления исходного раствора концентрацией 10 мг/мл в 10 раз с помощью PBS с pH 7,2. Добавляли четыре эквивалента TCEP в PBS, pH 7,2, и инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре. Успешное восстановление до гомогенных мономеров подтверждали с помощью масс-спектрометрии.

[00214] Реакционную смесь обессоливали с использованием колонки для обессоливания ZEBA с отсечкой MW 7K объемом 2 мл. Буфер для хранения колонки удаляли центрифугированием при 1000 gcf в течение 1 мин. Колонку промывали, добавляя 2 мл PBS с pH 7,2 и центрифугируя при 1000 gcf в течение 1 мин. Реакционную смесь загружали в колонку ZEBA и обессоливали путем центрифугирования в течение 1 мин при 1000 gcf в чистый конический флакон объемом 15 мл. Обессоленный образец концентрировали до приблизительно 700 мкМ (~100 мкл) с использованием спин-колонки Amicon Ultra с отсечкой MW 3K.

[00215] Получали АКТГ-(PEG)<sub>12</sub>-малеимид-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:119) и конъюгировали с VHH, как описано в примере 15.

#### [00216] ФУНКЦИЯ *IN VITRO* – СВЯЗЫВАНИЕ АЛЬБУМИНА

[00217] Пример 17. Исследования связывания альбумина фрагментами VHH с помощью SPR

[00218] Связывание *in vitro* различных фрагментов VHH с сывороточным альбумином (СА) человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы определяли с помощью SPR. В частности, связывание фрагментов VHH, предложенных в настоящем документе, с СА этих видов обобщено ниже в таблице 1. Связывание фрагментов VHH с последовательностями SEQ ID NO:3 и 8-28 с различными СА осуществляли на приборе Biacore 8K.

[00219] Иммобилизацию СА на поверхности сенсорного чипа серии S CM5 осуществляли в соответствии с инструкциями производителя (набор для иммобилизации по аминокислотной группе BR-1000-50). Вкратце, карбоксильные группы на поверхностях сенсорного чипа (проточная кювета 1 и 2) активировали путем введения 70 мкл смеси, содержащей 75 мг/мл гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и 11,5 мг/мл N-

гидроксисукцинимид (NHS) со скоростью 10 мкл/мин. СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы разводили в 10 mM ацетате натрия, pH 4,0 (BR-1003-49), в концентрациях 1, 1, 3, 1, 1, 1 и 1 мкг/мл, а затем пропускали по поверхностям активированного чипа (проточная кювета 2, каналы с 1 по 8) со скоростью 10 мкл/мин в течение 90 сек. СА человека получали от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури; кат. № A8763). СА яванского макака получали от Athens R&T (Атенс, Джорджия; кат. № 16-16-011202-CM). СА мыши получали от Sigma Aldrich (кат. № A3559). СА крысы получали от Sigma Aldrich (кат. № A4538). СА свиньи получали от Sigma Aldrich (кат. № A4414). СА собаки получали от Molecular Innovations (Нови, Мичиган; кат. № DSA-1213 NC0739153). СА коровы получали от Sigma Aldrich (кат. № A7030). Различные СА ковалентно иммобилизовывали через свободные аминокислотные группы на сенсорном чипе CM5, покрытом карбоксиметилдекстраном, с целью достижения поверхностной плотности около 77 (58-98) RU. Избыточные реакционноспособные группы на поверхностях (проточная кювета 1 и 2) деактивировали путем введения 70 мкл 1 М этаноламина гидрохлорида-NaOH, pH 8,5, со скоростью 10 мкл/мин.

[00220] Фрагменты VHH разводили в буфере HBS-EP + (10 mM HEPES, pH 7,6, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% полисорбата 20) в концентрациях 300 нМ. 150 мкл образца по отдельности последовательно пропускали по поверхности с иммобилизованными СА и диссоциировали в течение 600 сек при скорости потока 50 мкл/мин при 25 °C. Поверхность регенерировали путем введения 10 mM глицина-HCl, pH 1,5 (BR-1003-54) со скоростью 50 мкл/мин в течение 100 сек. Полученные сенсограммы анализировали с помощью программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation Software (версия 2.0.15.12933) для расчета константы скорости диссоциации (kd).

[00221] Таблица 1. Связывание иллюстративных фрагментов VHH с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы при 25°C.

| Фрагмент VHH | СА человека | СА яванского макака | СА мыши  | СА крысы | СА свиньи | СА собаки | СА коровы    |
|--------------|-------------|---------------------|----------|----------|-----------|-----------|--------------|
| SEQ ID NO:   | kd (1/c)    | kd (1/c)            | kd (1/c) | kd (1/c) | kd (1/c)  | kd (1/c)  | kd (1/c)     |
| 3            | 8,0E-04     | 2,0E-03             | 4,3E-03  | 3,5E-03  | 5,2E-03   | 2,2E-03   | 1,5E-02      |
| 3            | 7,8E-04     | 1,9E-03             | 4,3E-03  | 3,4E-03  | 5,2E-03   | 2,3E-03   | 1,4E-02      |
| 8            | 1,0E-03     | 3,0E-03             | 3,2E-03  | 7,5E-03  | 9,2E-03   | 2,2E-03   | 1,5E-02      |
| 9            | 1,2E-03     | 3,2E-03             | 1,3E-02  | 1,1E-02  | 1,2E-02   | 1,1E-02   | очень слабое |
| 10           | слабое      | очень               | очень    | очень    | очень     | очень     | связывание   |



|     |                           |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|-----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|     |                           | слабое                    | слабое                    | слабое                    | слабое                    | слабое                    | отсутствует               |
| 11  | 7,4E-03                   | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 12  | 1,1E-02                   | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 13  | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 14  | 1,3E-02                   | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 15  | 5,8E-03                   | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 16  | 3,9E-03                   | 1,5E-02                   | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует |
| 17  | 1,5E-03                   | 2,2E-03                   | 1,0E-02                   | 8,1E-03                   | 1,3E-02                   | 8,2E-03                   | 1,5E-02                   |
| 3   | 7,7E-04                   | 1,7E-03                   | 4,2E-03                   | 3,1E-03                   | 5,1E-03                   | 2,0E-03                   | 1,5E-02                   |
| 18  | 7,6E-03                   | 7,2E-03                   | очень<br>слабое           | 1,4E-02                   | очень<br>слабое           | 1,5E-02                   | связывание<br>отсутствует |
| 19  | 4,5E-03                   | 7,3E-03                   | 1,5E-02                   | 1,5E-02                   | 1,4E-02                   | 1,4E-02                   | связывание<br>отсутствует |
| 20  | 9,2E-03                   | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует |
| 21  | 2,5E-03                   | 1,4E-02                   | 1,3E-02                   | 1,1E-02                   | 1,0E-02                   | 8,1E-03                   | очень<br>слабое           |
| 22  | 2,8E-03                   | 1,4E-02                   | 1,0E-02                   | 1,0E-02                   | 1,1E-02                   | 7,4E-03                   | очень<br>слабое           |
| 23  | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 24  | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 25  | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует | очень<br>слабое           | очень<br>слабое           | очень<br>слабое           | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует |
| 26  | очень<br>слабое           | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 27  | 1,4E-02                   | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует | связывание<br>отсутствует |
| 3   | 8,6E-04                   | 1,5E-03                   | 4,2E-03                   | 3,0E-03                   | 5,0E-03                   | 1,9E-03                   | 1,5E-02                   |
| 4   | 2,1E-04                   | 5,3E-04                   | 4,3E-03                   | 3,3E-03                   | 5,7E-03                   | 1,7E-03                   | н/д                       |
| 125 | 9,4E-05                   | 6,0E-04                   | 5,6E-03                   | 3,8E-03                   | 6,5E-03                   | 2,1E-03                   | н/д                       |
| 126 | 1,4E-04                   | 7,2E-04                   | 5,4E-03                   | 5,3E-03                   | 5,8E-03                   | 2,1E-03                   | н/д                       |

[00222] Пример 18. Исследования связывания альбумина слитыми молекулами на основе VNH с помощью SPR

[00223] Связывание *in vitro* слитых молекул на основе VHH с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, коровы и кролика определяли с помощью SPR при 25 °С. В частности, аффинность слитых молекул на основе VHH из примеров 1-9 к СА этих видов обобщена ниже в таблицах 2-10.

[00224] Связывание слитых молекул на основе VHH из примеров 1-9 с различными СА осуществляли на приборе Biacore 8K. Иммобилизацию различных ортологов СА на поверхности сенсорного чипа серии S CM5 (BR-1006-68) осуществляли в соответствии с инструкциями производителя (набор для иммобилизации по аминокислоте BR-1000-50). Вкратце, карбоксильные группы на поверхностях сенсорного чипа (проточная кювета 1 и 2) активировали путем введения 70 мкл смеси, содержащей 75 мг/мл гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и 11,5 мг/мл N-гидроксисукцинимид (NHS) со скоростью 10 мкл/мин. СА человека, яванского макака, крысы, мыши, собаки, свиньи, коровы и кролика разводили в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,0 (BR-1003-49), в концентрациях 1 и 0,8 мкг/мл, 1 и 0,8 мкг/мл, 1,5 и 0,8 мкг/мл, 4 и 2,5 мкг/мл, 1 и 0,8 мкг/мл, 1 и 1 мкг/мл, 1 и 1 мкг/мл, и 1 и 1,5 мкг/мл, а затем пропускали по поверхностям активированного чипа (проточная кювета 2, каналы с 1 по 8) со скоростью 10 мкл/мин в течение 100 секунд. СА человека получали от Sigma Aldrich (кат. № A8763). СА яванского макака получали от Athens R&T кат. № 16-16-011202-CM). СА мыши получали от Sigma Aldrich (кат. № A3139). СА крысы получали от Sigma Aldrich (кат. № A4538). СА свиньи получали от Sigma Aldrich (кат. № A4414). СА собаки получали от Molecular Innovations (Нови, Мичиган; кат. № DSA-1213 NC0739153). СА коровы получали от Sigma Aldrich (кат. № A7030). СА кролика получали от Fitzgerald Industries International (Актон, Массачусетс; кат. № 30R-3303). СА ковалентно иммобилизовывали через свободные амины на сенсорном чипе CM5, покрытом карбоксиметилдекстраном, при поверхностной плотности 25-78 резонансных единиц (RU) для СА человека, яванского макака, крысы, мыши, собаки, свиньи и коровы, а также 118-372 резонансных единиц (RU) для СА кролика. Избыточные реакционноспособные группы на поверхностях (проточная кювета 1 и 2) деактивировали путем введения 70 мкл 1 М этаноламина гидрохлорида-NaOH, pH 8,5.

[00225] Слитые молекулы на основе VHH разводили в буфере HBS-EP+ (10 мМ HEPES, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% полисорбата 20) в концентрациях 1000, 333,3, 111,1, 37,04, 12,35, 4,12, 1,37, 0,457, 0,152, 0,051 и 0,017 нМ. 180 мкл образца по отдельности последовательно пропускали по поверхности чипа с иммобилизованными СА и диссоциировали в течение 600 сек при скорости потока 60 мкл/мин при 25 °С. Поверхность регенерировали путем введения 10 мМ глицина-HCl, pH 1,5 (BR-1003-54) со скоростью 60 мкл/мин в течение 100 сек. Полученные сенсограммы анализировали с помощью

аппроксимации моделью кинетики связывания 1:1 в составе программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation Software (версия 3.0.11.15423) для расчета параметров кинетики связывания: константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) и равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ).

[00226] Таблица 2. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 1 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °C.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Mc)           | $k_d$ (1/c) | $K_D$ (M) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 7,6E+04                | 2,4E-04     | 3,2E-09   |
| СА яванского макака                  | 6,8E+04                | 8,6E-04     | 1,3E-08   |
| СА мыши                              | 8,1E+04                | 8,2E-03     | 1,0E-07   |
| СА крысы                             | 7,5E+04                | 6,3E-03     | 8,3E-08   |
| СА свиньи                            | 5,8E+04                | 1,1E-02     | 1,9E-07   |
| СА собаки                            | 7,9E+04                | 3,2E-03     | 4,0E-08   |
| СА коровы                            | 9,1E+04                | 7,4E-02     | 8,2E-07   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00227] Полученные значения  $K_D$  составили 3,2, 13, 100, 83, 190, 40 и 820 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 1.

[00228] Таблица 3. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 2 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °C.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Mc)           | $k_d$ (1/c) | $K_D$ (M) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 4,3E+05                | 2,5E-04     | 5,8E-10   |
| СА яванского макака                  | 5,0E+05                | 6,0E-04     | 1,2E-09   |
| СА мыши                              | 4,8E+05                | 4,2E-03     | 8,8E-09   |
| СА крысы                             | 4,9E+05                | 3,0E-03     | 6,1E-09   |
| СА свиньи                            | 3,0E+05                | 5,7E-03     | 1,9E-08   |
| СА собаки                            | 4,6E+05                | 1,7E-03     | 3,7E-09   |
| СА коровы                            | 4,6E+05                | 5,2E-02     | 1,1E-07   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00229] Полученные значения  $K_D$  составили 0,58, 1,2, 8,8, 6,1, 19, 3,7 и 110 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 2.

[00230] Таблица 4. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 3 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °С.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Мс)           | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 1,2E+05                | 2,3E-04     | 1,9E-09   |
| СА яванского макака                  | 1,4E+05                | 8,7E-04     | 6,1E-09   |
| СА мыши                              | 1,4E+05                | 8,8E-03     | 6,2E-08   |
| СА крысы                             | 1,2E+05                | 6,0E-03     | 5,2E-08   |
| СА свиньи                            | 9,3E+04                | 1,2E-02     | 1,3E-07   |
| СА собаки                            | 1,7E+05                | 3,2E-03     | 1,9E-08   |
| СА коровы                            | 1,6E+05                | 7,2E-02     | 4,7E-07   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00231] Полученные значения  $K_D$  составили 1,9, 6,1, 62, 52, 130, 19 и 470 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 3.

[00232] Таблица 5. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 4 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °С.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Мс)           | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 1,0E+06                | 1,9E-04     | 1,9E-10   |
| СА яванского макака                  | 6,8E+05                | 6,3E-04     | 9,4E-10   |
| СА мыши                              | 6,6E+05                | 4,2E-03     | 6,4E-09   |
| СА крысы                             | 9,7E+05                | 3,0E-03     | 3,1E-09   |
| СА свиньи                            | 4,0E+05                | 6,0E-03     | 1,5E-08   |
| СА собаки                            | 7,8E+05                | 1,7E-03     | 2,2E-09   |
| СА коровы                            | 5,7E+05                | 5,8E-02     | 1,0E-07   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00233] Полученные значения  $K_D$  составили 0,19, 0,94, 6,4, 3,1, 15, 2,2 и 100 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 4.

[00234] Таблица 6. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 5 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °С.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Мс)           | $k_d$ (1/с)      | $K_D$ (М) |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|-----------|
| СА человека                          | 6,7E+05                | 1,4E-04          | 2,0E-10   |
| СА яванского макака                  | 7,4E+05                | 3,4E-04          | 4,5E-10   |
| СА мыши                              | 1,4E+06                | 1,2E-03          | 8,6E-10   |
| СА крысы                             | 1,0E+06                | 7,7E-04          | 7,4E-10   |
| СА свиньи                            | 8,5E+05                | 2,8E-03          | 3,3E-09   |
| СА собаки                            | 1,1E+06                | 6,8E-04          | 6,0E-10   |
| СА коровы                            | *не<br>применимо       | *не<br>применимо | 2,8E-08   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |                  |           |

[00235] Полученные значения  $K_D$  составили 0,2, 0,45, 0,86, 0,74, 3,3, 0,6 и 28 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 5.

[00236] Таблица 7. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 6 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °С.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Мс)           | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 1,8E+05                | 2,6E-04     | 1,5E-09   |
| СА яванского макака                  | 1,8E+05                | 8,8E-04     | 5,0E-09   |
| СА мыши                              | 1,7E+05                | 8,7E-03     | 5,0E-08   |
| СА крысы                             | 1,9E+05                | 6,6E-03     | 3,4E-08   |
| СА свиньи                            | 1,2E+05                | 1,2E-02     | 1,0E-07   |
| СА собаки                            | 1,7E+05                | 3,4E-03     | 1,9E-08   |
| СА коровы                            | 1,9E+05                | 7,1E-02     | 3,8E-07   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00237] Полученные значения  $K_D$  составили 1,5, 5,0, 50, 34, 100, 19 и 380 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 6.

[00238] Таблица 8. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 7 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °С.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Мс)           | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 9,1E+05                | 2,1E-04     | 2,3E-10   |
| СА яванского макака                  | 1,4E+06                | 5,6E-04     | 3,9E-10   |
| СА мыши                              | 9,7E+05                | 3,8E-03     | 3,9E-09   |
| СА крысы                             | 9,7E+05                | 2,9E-03     | 3,0E-09   |
| СА свиньи                            | 4,5E+05                | 5,8E-03     | 1,3E-08   |
| СА собаки                            | 9,2E+05                | 1,6E-03     | 1,8E-09   |
| СА коровы                            | 6,7E+05                | 5,2E-02     | 7,8E-08   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00239] Полученные значения  $K_D$  составили 0,23, 0,39, 3,9, 3,0, 13, 1,8 и 78 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 7.

[00240] Таблица 9. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 8 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °С.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Мс)           | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 7,2E+05                | 1,1E-04     | 1,5E-10   |
| СА яванского макака                  | 9,1E+05                | 8,7E-04     | 9,6E-10   |
| СА мыши                              | 5,6E+05                | 1,0E-02     | 1,8E-08   |
| СА крысы                             | 6,6E+05                | 7,1E-03     | 1,1E-08   |
| СА свиньи                            | 4,9E+05                | 1,3E-02     | 2,7E-08   |
| СА собаки                            | 7,1E+05                | 3,8E-03     | 5,4E-09   |
| СА коровы                            | 8,0E+05                | 9,3E-02     | 1,2E-07   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00241] Полученные значения  $K_D$  составили 0,15, 0,96, 18, 11, 27, 5,4 и 120 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 8.

[00242] Таблица 10. Кинетика связывания слитой молекулы на основе VHH из примера 9 с СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика при 25 °С.

| Связывание с<br>иммобилизованными СА | $k_a$ (1/Мс)           | $k_d$ (1/с) | $K_D$ (М) |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|-----------|
| СА человека                          | 2,1E+05                | 2,8E-04     | 1,3E-09   |
| СА яванского макака                  | 2,2E+05                | 9,4E-04     | 4,3E-09   |
| СА мыши                              | 2,3E+05                | 1,0E-02     | 4,3E-08   |
| СА крысы                             | 2,1E+05                | 7,1E-03     | 3,3E-08   |
| СА свиньи                            | 1,5E+05                | 1,3E-02     | 8,3E-08   |
| СА собаки                            | 2,4E+05                | 3,7E-03     | 1,5E-08   |
| СА коровы                            | 2,5E+05                | 8,5E-02     | 3,4E-07   |
| СА кролика                           | Связывание отсутствует |             |           |

[00243] Полученные значения  $K_D$  составили 1,3, 4,3, 43, 33, 83, 15 и 340 нМ для связывания СА человека, яванского макака, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, со слитой молекулой на основе VHH из примера 9.

#### [00244] ФУНКЦИЯ *IN VITRO* – СПЕЦИФИЧНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛЕЗНЫХ НАГРУЗОК

[00245] Пример 19. Активность *in vitro* слитых молекул на основе VHH из примеров 1 и 2

[00246] Анализ CNTFR pSTAT3 человека: клетки IMR-32 (ATCC, кат. № CCL-127), эндогенно экспрессирующие CNTFR, LIFR и gp130 человека, культивировали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, 90% влажности в среде RPMI-1640 (ATCC, кат. № 30-2001) с добавлением конечного 10% FBS, 1 мМ пирувата натрия и 1X антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific, 15240062). В день -1 (за день до анализа pSTAT3) клетки однократно промывали 1X PBS, поднимали из колб с помощью буфера для диссоциации клеток (Gibco, 13151) и ресуспендировали в вышеупомянутой культуральной среде. Клетки высевали в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином (Corning; кат. № 354640) из расчета 150000 клеток/0,1 мл/лунку. Клетки культивировали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, влажности 90% в течение ночи. В день 1 (день проведения анализа pSTAT3) среду аспирировали и заменяли 100 мкл EMEM (ATCC, кат. № 30-2003). Клетки выдерживали в бессывороточной среде при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, влажности 90% в течение 4 ч, затем добавляли 50 мкл 3-кратно последовательно разведенного CNTF человека (R&D Systems; кат. № 257-NT-010), пример

1 или пример 2 в 0,3% BSA, не содержащего IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; кат. № 001-000-162). Добавляли EMEM для конечной концентрации 1X. Клетки инкубировали с этими последовательно разведенными белками в течение еще 10 мин при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, влажности 90%. После завершения периода инкубации содержимое удаляли из планшета. Клетки лизировали и определяли pSTAT3 с использованием набора для анализа AlphaLISA Surefire Ultra p-STAT3 (Tyr705) (Perkin Elmer; ALSU-PST3) и его протокола анализа с двумя планшетами для прикрепленных клеток. Планшеты считывали на приборе Envision 2102 (Perkin Elmer).

[00247] Статистический анализ данных: данные импортировали из прибора-считывателя Envision 2102 в Excel® (Microsoft). Рассчитывали % максимального (1 нМ) сигнала pSTAT3, стимулированного CNTF человека, для каждой протестированной концентрации белка. Значения EC<sub>50</sub> получали из этих расчетов с помощью анализа четырехпараметрической кривой доза-ответ с переменным угловым коэффициентом с использованием программного обеспечения GraphPad Prism® (GraphPad Software, LLC; Ла-Хойя, Калифорния; версия 8.4.3). Результаты анализа представлены ниже в таблице 11.

[00248] Таблица 11. Активность *in vitro* слитых молекул на основе VHH в отношении рецептора CNTF человека.

| Соединение    | EC <sub>50</sub> hCNTFR,<br>пМ, среднее<br>геометрическое | SEM  | N |
|---------------|-----------------------------------------------------------|------|---|
| CNTF человека | 3,50                                                      | 0,45 | 2 |
| Пример 1      | 7,09                                                      | 0,35 | 2 |
| Пример 2      | 8,39                                                      | 0,65 | 2 |

[00249] Пример 20. Активность *in vitro* слитых молекул на основе VHH из примеров 3 и 4

[00250] Проводили клеточный биоанализ димеризации от DiscoverX/eurofins (PathHunter eXpress ErbB4/ErbB4 Dimerization Assay, кат. № 93-0961E3) для проверки активности слитых соединений на основе VHH из примеров 3 и 4 в отношении рецептора Eb4 человека (№ референсной последовательности в NCBI NP\_001036064.1). Анализ выявляет индуцированную лигандом димеризацию двух субъединиц пары рецептор-димер и предназначен для оценки активности. Тестирование проводили в соответствии с протоколом, предоставленным производителем. Вкратце, клетки размораживали и высевали в предоставленный 96-луночный планшет по 100 мкл на лунку. После 24-часовой инкубации при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub> по 10 мкл 11X примера 3, примера 4 и контрольного агониста, rhNRG-1 (eurofins, кат. № 92-1091) добавляли в 11-точечную кривую



последовательных разведений (1:3) в соответствующие лунки в двух повторностях. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 6 часов. После 6-часовой инкубации в каждую лунку добавляли по 110 мкл реагентов для обнаружения. Планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение еще одного часа. Хемилюминесцентный сигнал считывали на считывателе планшетов с использованием времени интегрирования 0,5 с (считыватель планшетов SpectraMax i3x от Molecular Devices). Статистический анализ необработанных данных выполняли с помощью GraphPad PRISM версии 9.0. Среднее фоновое значение вычитали из всех значений, необработанные данные преобразовывали и проводили нелинейный регрессионный анализ (log(агонист) по сравнению с ответом - переменный угловой коэффициент (четыре параметра)) для получения значений EC<sub>50</sub> и определения точности аппроксимации (n=2 для всех данных).

[00251] Таблица 12. Активность слитых соединений на основе VHN из примеров 3 и 4 в биоанализе DiscoverX PathHunter ErbB4.

|                          | rhNRG-1 | Пример 3 | Пример 4 |
|--------------------------|---------|----------|----------|
| EC <sub>50</sub> (нг/мл) | 16,51   | 33,55    | 112,2    |
| R <sup>2</sup>           | 0,9884  | 0,9863   | 0,9986   |

[00252] Пример 21. Активность *in vitro* слитой молекулы на основе VHN из примера 5

[00253] Создание линии клеток HEK293, экспрессирующей GFRAL и RET человека: клетки HEK293 (ATCC) культивировали в DMEM с 10% FBS и 25 mM HEPES, 1x антибиотиками, и делили 1:16 каждые 3-4 дня с помощью TrypLE™ Express (Gibco). Клетки трансфицировали плазмидной ДНК GFRAL человека (GDNF рецептор альфа-подобный; № референсной последовательности в NCBI № NP\_997293.2), RET человека (протоонкогенный тирозинкиназный рецептор RET; № референсной последовательности в NCBI NP\_066124.1) и Eugene. 6 (Promega) согласно инструкции производителя. Трансфицированные клетки отбирали с помощью генетина (Gibco, 1 мг/мл) и пуромицина (Gibco, 0,1 мг/мл) в течение 3-4 недель. Клональные линии получали путем клонирования методом предельных разведений в 96-луночные планшеты и подтверждали ответ на GDF15 с помощью набора для анализа AlphaLISA SureFire Ultra p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (PerkinElmer). Клоны размножали, собирали, ресуспендировали в среде для заморозки клеток, отбирали аликвоты в криопробирки и хранили в жидком азоте для длительного хранения. Выбирали образец с лучшим ответом на GDF15 (отношение сигнала к фону), клональную линию № 7.

[00254] Анализ рецептора GFRAL и RET человека AlphaLISA SureFire Ultra p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204): линии клеток HEK293, экспрессирующие GFRAL человека и RET человека, культивировали в селективной среде (DMEM с 10% FBS с 25 mM HEPES,

1х антибиотиков, 1 мкг/мл пуромицина, 1 мг/мл генетицина). В день -3 (день посева клеток) клетки однократно промывали PBS, поднимали из колб с помощью TrypLE™ Express и ресуспендировали в среде для посева (DMEM с 25 мМ HEPES, 1х антибиотиков, 10% FBS). Клетки высевали в 96-луночный планшет (Falcon, кат. № 356461) из расчета 20000 клеток/0,1 мл/лунку. Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. В день 1 (день проведения анализа) среду удаляли и заменяли 50 мкл бессывороточной среды (DMEM с 25 мМ HEPES, 1х антибиотиков). Планшеты инкубировали при 37 °C в течение 4 ч, затем добавляли 50 мкл 2х лиганда (GDF15, конечная 1х). Планшеты инкубировали еще 10 мин при 37 °C. После завершения периода инкубации среду удаляли из планшетов путем сливания и промокания белыми универсальными салфетками. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл 1х буфера для лизиса AlphaLISA SureFire Ultra и инкубировали планшеты на шейкере для планшетов при 350 об/мин при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем, в соответствии с инструкциями производителя (набор для анализа AlphaLISA SureFire Ultra p-ERK (Thr202/Tyr204), PerkinElmer, кат. № ALSU-pERK-A10K) для протокола 2-планшета/1-инкубация для прикрепленных клеток, 10 мкл клеточного лизата, 5 мкл акцепторной смеси и 5 мкл донорной смеси добавляли в планшет OptiPlate™-384 (PerkinElmer, кат. № 6007290). Планшет запечатывали, заворачивали в фольгу, инкубировали в течение 1 мин на шейкере для планшетов при 250 об/мин при комнатной температуре, инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 8 часов, а затем считывали на многофункциональном считывателе EnVision 2102 с программным обеспечением EnVision Manager (PerkinElmer).

[00255] Статистический анализ данных: данные импортировали из многофункционального считывателя EnVision 2102 в программное обеспечение GraphPad Prism® (GraphPad Software, LLC; Ла-Хойя, Калифорния; версия 8). Значения EC<sub>50</sub> получали с помощью анализа четырехпараметрической кривой доза-ответ с переменным угловым коэффициентом.

[00256] Таблица 13. Стимуляция фосфорилирования ERK1/2 в клетках HEK293, экспрессирующих GFRAL и RET51 человека, с помощью слитой молекулы на основе VHH из примера 5.

| Соединение     | EC <sub>50</sub> hGFRAL/RET (нМ) | SEM  | N |
|----------------|----------------------------------|------|---|
| GDF15 человека | 2,85                             | 1,08 | 2 |
| Пример 5       | 101                              | 19,5 | 2 |

[00257] Пример 22. Активность *in vitro* слитых молекул на основе VHH из примеров 6 и 7

[00258] Для оценки активности слитых молекул на основе VHH из примеров 6 и 7 использовали клеточный биоанализ димеризации от DiscoverX, PathHunter IL-2 BioAssay

Kit (eurofins/DiscoverX, арт. № 93-1003Y3-00091). Анализ выявляет индуцированную IL-2 димеризацию двух субъединиц пары рецептор IL-2-димер и предназначен для оценки активности IL-2. Анализ проводили в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, клетки размораживали и высевали в предоставленный 96-луночный планшет по 80 мкл на лунку. После 20-часовой инкубации при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub> по 20 мкл 5X исходной концентрации примеров 6 и 7 и предоставленного референсного стандарта IL-2 добавляли в 11-точечную кривую последовательных разведений (1:3) в соответствующие лунки в двух повторностях. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 6 часов. После 6-часовой инкубации с примерами 6 и 7 и референсным стандартом в каждую лунку добавляли по 10 мкл реагента 1 для обнаружения. Перемешивание осуществляли на шейкере для планшетов при 350 об/мин в течение 1 мин, и планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин. Затем в каждую лунку добавляли по 40 мкл реагента 2 для обнаружения и инкубировали при комнатной температуре в темноте еще 1 часа. Хемилюминесцентный сигнал считывали на считывателе планшетов с использованием времени интегрирования 1 с (считыватель планшетов SpectraMax i3x от Molecular Devices). Статистический анализ необработанных данных выполняли с помощью GraphPad PRISM версии 8.4.3. Необработанные данные преобразовывали и проводили нелинейный регрессионный анализ (log(агонист) по сравнению с ответом - переменный угловой коэффициент (четыре параметра)) для получения значений EC<sub>50</sub> и определения точности аппроксимации. (n=2 для всех данных).

[00259] Таблица 14. Активность слитых молекул на основе VHH из примеров 6 и 7 в биоанализе DiscoverX PathHunter IL-2.

|               | EC <sub>50</sub> (нМ) | R <sup>2</sup> | N |
|---------------|-----------------------|----------------|---|
| IL-2 человека | 0,13                  | 0,9983         | 2 |
| Пример 6      | 6,7                   | 0,9978         | 2 |
| Пример 7      | 0,49                  | 0,9980         | 2 |

[00260] Пример 23. Активность *in vitro* слитых молекул на основе VHH из примеров 9 и 13

[00261] Использовали анализ цитотоксичности на основе клеток L929, чтобы *in vitro* оценить эффективность нейтрализации примеров 9 и 13 в отношении растворимого TNFα человека, растворимого TNFα яванского макака или мембранносвязанного TNFα человека.

[00262] Клетки L929 (ATCC), эндогенно экспрессирующие рецептор TNFα человека, культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы с 10% инактивированной нагреванием FBS, 2 mM L-глутамина, 1x заменимых аминокислот, 1x пирувата натрия, 1x антибиотиков, и делили 1:20 каждые 3-4 дня с помощью TrypLE™ Express (Gibco).

[00263] Растворимый белок TNF $\alpha$  человека был получен с помощью синтеза на заказ от Syngene (Бангалор, Индия). Растворимый белок TNF $\alpha$  яванского макака был получен от R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота; кат. № 1070-RM/CF).

[00264] Стабильная линия клеток MT104 H2 CHO, экспрессирующая мембраносвязанный TNF $\alpha$  человека, была получена в Eli Lilly and Company (Индианаполис, Индиана). Клетки культивировали в среде Lilly LM7300 с 8 mM L-глутамина и агентом для отбора G418 (500 мкг/мл) и делили 1:10 каждые 3-4 дня.

[00265] Анализ цитотоксичности L929: в день 1 клетки L929 трипсинизировали с помощью 5 мл TrypLE™ (Gibco № 12605036), добавляли полную среду (объем 1:3) и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Осторожно аспирировали супернатант и ресуспендировали клетки в 15 мл полной среды (среда DMEM с высоким содержанием глюкозы с 10% инактивированной нагреванием FBS, 2 mM L-глутамина, 1x заменимых аминокислот, 1x пирувата натрия, 1x антибиотиков), и подсчитывали аликвоту клеток с помощью счетчика Viacell. Клетки высевали в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином (Corning № 354496) из расчета 10000 клеток/0,1 мл/лунку, и культивировали при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. На 2 день примеры 9 и 13 подвергали воздействию фиксированных количеств антигенов: растворимого TNF $\alpha$  человека (200 мкг/мл), или растворимого TNF $\alpha$  яванского макака (750 пг/мл), или клеток, экспрессирующих мембранный TNF $\alpha$  человека (5000 клеток/мл) в DMEM + FBS с актиномицином D (6,25 мкМ). Начальные концентрации составляли 1,5 мкг/мл, 3 мкг/мл и 10 мкг/мл для нейтрализации растворимого TNF человека, растворимого TNF яванского макака и мембранного TNF человека, соответственно, и их снижали путем 3-кратного последовательного разведения с получением 8 точек. Дозированный комплекс соединение-антиген добавляли в 96-луночные планшеты, содержащие клетки L929, после удаления среды, и инкубировали планшеты при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. Стимулированные лунки отрицательного контроля содержали клетки L929 + актиномицин D + антиген TNF $\alpha$ , тогда как нестимулированные контрольные лунки включали только клетки L929 + актиномицин D.

[00266] На 3 день среду удаляли из 96-луночных планшетов и добавляли по 120 мкл раствора субстрата Cell Titer AQueous ONE (разведение 1:6 в среде DMEM + FBS) в каждую лунку на всех планшетах. Планшеты считывали при OD 490 нм через 2 часа на считывателе планшетов Spectra max с использованием программного обеспечения Softmax 4.7.

[00267] Анализ данных: показания OD в зависимости от концентрации наносили на график в Excel® (Microsoft; Редмонд, Вашингтон); расчет EC<sub>50</sub> и статистический анализ выполняли

с помощью инструментов статистического программного обеспечения Eli Lilly (Global Stats Discovery Team, Lilly).

[00268] Таблица 15. Активность слитых молекул на основе VHH из примеров 9 и 13 *in vitro* в отношении нейтрализации растворимого TNF $\alpha$  человека.

| Соединение | EC <sub>50</sub> ,<br>среднее<br>геометрическое<br>(мкг/мл) | Ошибка | N | Среднее<br>логарифмическое | Sd      |
|------------|-------------------------------------------------------------|--------|---|----------------------------|---------|
| Пример 9   | 0,0562                                                      | 0,0115 | 3 | -1,2506                    | 0,0153  |
| Пример 13  | 0,0333                                                      | 0,0004 | 3 | -1,4781                    | 0,0089  |
| Адалимумаб | 0,0392                                                      | 0,0009 | 3 | -1,407                     | 0,01678 |

[00269] Таблица 16. Активность слитых молекул на основе VHH из примеров 9 и 13 *in vitro* в отношении нейтрализации растворимого TNF $\alpha$  яванского макака.

| Соединение | EC <sub>50</sub> ,<br>среднее<br>геометрическое<br>(мкг/мл) | Ошибка | N | Среднее<br>логарифмическое | Sd     |
|------------|-------------------------------------------------------------|--------|---|----------------------------|--------|
| Пример 9   | 0,1748                                                      | 0,0040 | 3 | -0,7574                    | 0,0170 |
| Пример 13  | 0,1025                                                      | 0,0045 | 3 | -0,9893                    | 0,0333 |
| Адалимумаб | 0,0944                                                      | 0,0021 | 3 | -0,01633                   | 0,0163 |

[00270] Таблица 17. Активность слитых молекул на основе VHH из примеров 9 и 13 *in vitro* в отношении нейтрализации мембранного TNF $\alpha$  человека.

| Соединение | EC <sub>50</sub> ,<br>среднее<br>геометрическое<br>(мкг/мл) | Ошибка | N | Среднее<br>логарифмическое | Sd     |
|------------|-------------------------------------------------------------|--------|---|----------------------------|--------|
| Пример 9   | 0,2943                                                      | 0,0040 | 3 | -0,5312                    | 0,0102 |
| Пример 13  | 0,2005                                                      | 0,0196 | 3 | -0,6979                    | 0,0736 |
| Адалимумаб | 0,2165                                                      | 0,0068 | 3 | -0,6645                    | 0,0238 |

[00271] Таблица 18. Активность слитых молекул на основе VHH из примеров 9 и 13 *in vitro* в отношении нейтрализации различных форм TNF $\alpha$  человека и яванского макака.

| Соединение | EC <sub>50</sub> (нМ) - среднее геометрическое   |                                                          |                                                 |
|------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|            | Ингибирование растворимого TNF $\alpha$ человека | Ингибирование растворимого TNF $\alpha$ яванского макака | Ингибирование мембранного TNF $\alpha$ человека |
| Пример 9   | 0,886                                            | 2,7565                                                   | 4,641                                           |
| Пример 13  | 0,703                                            | 2,1668                                                   | 4,238                                           |
| Адалимумаб | 0,2613                                           | 0,6292                                                   | 1,443                                           |

[00272] Пример 24. Активность *in vitro* мультиспецифичной слитой молекулы и конъюгата на основе VHH из примеров 15 и 16

[00273] Использовали наборы для клеточного анализа циклического АМФ, приобретенные у DiscoverX (eurofins), для оценки активности конъюгатов на основе VHH из примеров 15 и 16 в отношении GLP1R и MC3R. Для цАМФ использовали анализ Hunter eXpress GLP1R CHO-K1 GPCR (кат. № 95-0062E2), и внутренний стандарт GLP-1 (SEQ ID NO:99) использовали в качестве положительного контроля. Для цАМФ использовали анализ Hunter eXpress MC3R CHO-K1 GPCR (кат. № 95-0045E2), и  $\alpha$ -MSH использовали в качестве положительного контроля. Анализы проводили в соответствии с протоколом анализа GPCR, предоставленным производителем. Вкратце, клетки размораживали и высевали в 96-луночный планшет по 100 мкл на лунку. После 24-часовой инкубации при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub> 15 мкл 3X агониста (конъюгат/слитая молекула на основе VHH и контроль) и стандарт цАМФ добавляли в соответствующие лунки в двух повторностях. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 30 минут. Готовили рабочий раствор для обнаружения цАМФ и хранили при комнатной температуре в защищенном от света месте. После 30-минутной инкубации со слитым соединением или конъюгатом на основе VHH в каждую лунку добавляли по 15 мкл реагента антитела к цАМФ. Сразу же после добавления реагента антитела добавляли по 60 мкл рабочего раствора для обнаружения цАМФ, который был приготовлен в течение периода инкубации. Планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч, в каждую лунку добавляли по 60 мкл раствора А цАМФ и инкубировали планшет инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 3-18 ч. Хемилюминесцентный сигнал считывали на считывателе планшетов (считыватель планшетов SpectraMax i3x от Molecular Devices). Статистический анализ необработанных данных выполняли с помощью GraphPad PRISM версии 8. Необработанные данные преобразовывали и проводили нелинейный регрессионный анализ (log(агонист) по сравнению с ответом - переменный угловой коэффициент (4 параметра))

для получения значений  $EC_{50}$  и определения точности аппроксимации ( $n=2$  для всех данных).

[00274] Таблица 19. Активность *in vitro* конъюгатов на основе VHH из примеров 15 и 16 в отношении MC3R.

|           | Пример 15 | Пример 16 | Стандарт<br>цАМФ |
|-----------|-----------|-----------|------------------|
| $EC_{50}$ | 54,2      | 46,17     | 36,25            |
| R-квадрат | 0,9941    | 0,9888    | 0,9932           |

[00275] Таблица 20. Активность *in vitro* конъюгата на основе VHH из примера 15 в отношении GLP1R.

|           | Пример 15 | Положительный<br>контроль GLP-1 | Стандарт<br>цАМФ |
|-----------|-----------|---------------------------------|------------------|
| $EC_{50}$ | 1,807     | 0,5044                          | 39,89            |
| R-квадрат | 0,9925    | 0,9832                          | 0,9971           |

[00276] ФУНКЦИЯ *IN VIVO* – СПЕЦИФИЧНАЯ ФД ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ КАЖДОЙ ПОЛЕЗНОЙ НАГРУЗКИ

[00277] Пример 25. Активность *in vivo* (потеря массы тела у здоровых мышей) слитых соединений на основе VHH из примеров 1 и 2

Исследование проводили на 48 самцах мышей DIO C57BL6, полученных от Taconic. Возраст мышей на начало исследования составлял 15 недель. Животных содержали поодиночке в клетках-микроизоляторах с неограниченным доступом к автоматизированному источнику водопроводной воды (2-5 млн<sup>-1</sup> хлора) и корму с высоким содержанием жира (TD95217). Мышей случайным образом делили на 8 групп ( $n = 6$ ) в зависимости от массы тела с использованием инструмента блочного рандомизированного распределения, разработанного статистиками Lilly для случайного разделения на группы *in vivo*. Чтобы уменьшить потенциальные последствия исследования, связанные со стрессом, всем животным давали привыкнуть к ежедневному обращению в течение как минимум 3 дней до начала исследования. Массу тела и массу пищи регистрировали за 2 дня до начала исследования, а затем ежедневно в течение всего исследования. Препараты вводили подкожно в межлопаточное пространство в течение всего исследования (схема дозирования 1 р/сут) с использованием инсулинового шприца 28G на 0,5 мл (BD кат. № 329461). Нативный CNTF (R&D systems, рекомбинантный CNTF человека, кат. № 257-NT/CF, партия № GL402101A), пример 1 и пример 2 разводили до соответствующих концентраций

в стерильном PBS с pH 7,2 не позднее, чем за 30 минут до введения. Доза нативного CNTF составляла 0,25 мг/кг. Доза примера 1 и примера 2 составляла либо 0,25 мкг/кг, либо 0,1 мкг/кг. Разведения рассчитывали для каждого препарата ежедневно на основе средней массы тела в группе за предыдущий день. 200 мкл PBS вводили животным в группе контроля носителем. Изменения массы тела анализировали с использованием статистического инструмента для внутреннего пользования и строгого подхода на основе модели, разработанного статистиками Lilly для исследований ФД in vivo. Животных исключали из исследования независимо от даты введения дозы по достижении 20% потери массы тела.

[00278] Таблица 21. Влияние различных доз слитых молекул на основе VHH из примеров 1 и 2 на массу тела у здоровых мышей в различные моменты времени.

| Соединение | Доза       | N | % изменения массы тела в разные дни исследования |        |        |       |       |       |       |
|------------|------------|---|--------------------------------------------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
|            |            |   | 0                                                | 1      | 2      | 3     | 4     | 5     | 6     |
| Носитель   | н/д        | 6 | 102,47                                           | 102,11 | 101,01 | 99,98 | 99,50 | 98,61 | 99,32 |
| Пример 1   | 0,1 мг/кг  | 6 | 101,09                                           | 100,51 | 97,61  | 95,38 | 94,24 | 92,73 | 91,44 |
| Пример 1   | 0,25 мг/кг | 6 | 100,81                                           | 97,18  | 91,21  | 85,31 | 81,18 | 79,19 | 82,31 |
| Пример 2   | 0,1 мг/кг  | 6 | 102,13                                           | 100,70 | 98,04  | 95,39 | 94,87 | 93,02 | 91,91 |
| Пример 2   | 0,25 мг/кг | 6 | 102,77                                           | 99,81  | 95,46  | 90,42 | 85,29 | 82,23 | 82,91 |
| rhCNTF     | 0,25 мг/кг | 6 | 100,51                                           | 98,95  | 96,96  | 94,76 | 94,03 | 91,74 | 90,62 |



[00279] Таблица 22. Статистический анализ влияния различных доз слитых молекул на основе VHH из примеров 1 и 2 на массу тела у здоровых мышей в различные моменты времени.

| Соединение | Доза       |                  | День исследования |        |         |          |          |          |          |
|------------|------------|------------------|-------------------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
|            |            |                  | 0                 | 1      | 2       | 3        | 4        | 5        | 6        |
| Пример 1   | 0,1 мг/кг  | величина влияния | 0,580             | 1,566  | 0,650   | 0,626    | 0,208    | 0,989    | 0,823    |
|            |            | р-значение       | 0,997             | 0,751  | 0,995   | 0,996    | 1,000    | 0,958    | 0,983    |
| Пример 1   | 0,25 мг/кг | величина влияния | 0,292             | -1,764 | -5,750  | -9,442   | -12,853  | -12,552  | -8,309   |
|            |            | р-значение       | 1,000             | 0,650  | 0,00026 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| Пример 2   | 0,1 мг/кг  | величина влияния | 1,617             | 1,754  | 1,077   | 0,638    | 0,837    | 1,281    | 1,289    |
|            |            | р-значение       | 0,726             | 0,655  | 0,939   | 0,995    | 0,981    | 0,876    | 0,873    |
| Пример 2   | 0,25 мг/кг | величина влияния | 2,252             | 0,867  | -1,501  | -4,332   | -8,743   | -9,516   | -7,715   |
|            |            | р-значение       | 0,403             | 0,977  | 0,783   | 0,012    | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |

Р-значения приведены по сравнению с группой, получавшей 0,25 мг/кг нативного CNTF.

[00280] Как показано в таблицах 21 и 22, все группы, получавшие препарат, демонстрируют значительную потерю массы тела по сравнению с группой, получавшей носитель, к 3 дню исследования. Пример 1 и пример 2 в дозе 0,1 мг/кг оба демонстрируют потерю массы тела, эквивалентную rhCNTF в дозе 0,25 мг/кг. Животные, получавшие пример 1 в дозе 0,25 мг/кг, демонстрируют значительно большую потерю массы тела ко 2 дню исследования по сравнению с rhCNTF в дозе 0,25 мг/кг. Животные, получавшие пример 1 в дозе 0,25 мг/кг, демонстрируют значительно большую потерю массы тела к 3 дню исследования по сравнению с rhCNTF в дозе 0,25 мг/кг. Животным в группах, получавших дозу 0,25 мг/кг обоих примеров 1 и 2, не вводили дозу на 5 или 6 день из-за клинических признаков обезвоживания и/или достижения 20% потери массы тела.

[00281] Пример 26. Активность *in vivo* (биохимический анализ крови здоровых мышей) слитых молекул на основе VHN из примеров 3 и 4

Исследование проводили на 48 самках мышей C57BL6, полученных от Envigo, в возрасте 6 недель. Животных содержали попарно в клетках-микроизоляторах с неограниченным доступом к автоматизированному источнику водопроводной воды (2-5 млн<sup>-1</sup> хлора) и стандартному корму (рацион для содержания грызунов Teklad 2014). Мышей случайным образом делили на 6 групп ( $n = 8$ ) в зависимости от массы тела с использованием инструмента блочного рандомизированного распределения, разработанного статистиками Lilly для случайного деления на группы *in vivo*. Чтобы уменьшить потенциальные последствия исследования, связанные со стрессом, всем животным давали привыкнуть к ежедневному обращению в течение как минимум 3 дней до начала исследования. Массу тела и массу пищи регистрировали за 2 дня до начала исследования, а затем отслеживали и регистрировали ежедневно в течение всего исследования. Возраст животных на момент введения первой дозы составлял 8 недель. Препараты вводили подкожно в межлопаточное пространство через день в течение 7 дней, в общей сложности 3 дозы (схема дозирования 1 раз в 2 дня) с использованием инсулинового шприца 28G на 0,5 мл (BD кат. № 329461). Нативный NRG-1 (R&D systems, рекомбинантный EGF-домен NRG1-бета 1 человека, CF, кат. № 396-HB/CF, партия № ACD182101A), пример 3 и пример 4 разводили до соответствующих концентраций в стерильном PBS с pH 7,2 не позднее, чем за 30 минут до введения. Доза нативного NRG-1 составляла 1 мг/кг. Доза примера 3 и примера 4 составляла 1 и 0,3 мкг/кг. Разведения для каждого препарата рассчитывали ежедневно на основе средней массы тела в группе за предыдущий день. Животные в группе контроля носителем получали 200 мкл PBS п/к. Введение осуществляли утром в дни исследования 1, 3 и 5. Всех животных анестезировали изофлураном (4%) на хирургическом столе и обескровливали путем ретроорбитального кровотечения в соответствии с протоколами по уходу за животными и их использованию на 7 день исследования. Кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки (BD, кат № 365967) и держали при комнатной температуре в течение до 90 минут. Кровь центрифугировали в течение 10 минут при 10000 об/мин. Из каждой пробирки собирали сыворотку и отбирали аликвоты для анализа Chem 18. Сыворотку анализировали на модульном биохимическом анализаторе Roche Cobas 8000. Все реагенты для анализа Chem 18 поставлялись компанией Roche, за исключением теста на триглицериды, в котором использовали реагент Fujifilm WAKO. Программное обеспечение JMP для однофакторного анализа доверительного интервала по группам с использованием метода Даннета использовали для статистического анализа биохимических показателей крови.

Таблица 23. Статистический анализ влияния различных доз слитых молекул на основе VHH из примеров 3 и 4 на биохимические показатели крови у здоровых мышей.

| Соединение                        | Доза      | N | Азот                                  |                    |                     |                   | ЩФ<br>МЕ/л             |
|-----------------------------------|-----------|---|---------------------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
|                                   |           |   | мочевины                              |                    |                     |                   |                        |
|                                   |           |   | крови<br>мг/дл                        | креатинин<br>мг/дл | холестерин<br>мг/дл |                   |                        |
| Носитель                          | н/д       | 8 | среднее<br>значение<br>p-<br>значение | 17,51<br>1         | 0,1025<br>1         | 79,125<br>1       | 173<br>1               |
| Пример 3                          | 1 мг/кг   | 8 | среднее<br>значение<br>p-<br>значение | 16,63<br>0,99      | 0,08<br>0,0462      | 98,375<br>0,0004* | 128,75<br><<br>0,0001* |
| Пример 3                          | 0,3 мг/кг | 8 | среднее<br>значение<br>p-<br>значение | 17,22<br>0,8       | 0,08<br>0,0462      | 85<br>0,5397      | 156,625<br>0,1347      |
| Пример 4                          | 1 мг/кг   | 8 | среднее<br>значение<br>p-<br>значение | 17,39<br>1         | 0,0675<br>0,0008*   | 173<br>< 0,0001*  | 81,25<br><<br>0,0001*  |
| Пример 4                          | 0,3 мг/кг | 8 | среднее<br>значение<br>p-<br>значение | 14,7<br>0,015*     | 0,0787<br>0,0324*   | 99,75<br>0,0001*  | 138,25<br>0,0002*      |
| rhNRG-1<br>(нативный<br>контроль) | 1 мг/кг   | 8 | среднее<br>значение<br>p-<br>значение | 14,55<br>0,01*     | 0,0775<br>0,0224*   | 79,375<br>1       | 157,5<br>0,1695        |

\* Указывает на статистически значимое отличие от группы, получавшей носитель

[00282] Как показано в таблице 23, слитые молекулы на основе VHH из примеров 3 и 4 демонстрируют значительное влияние на биохимические показатели крови по сравнению с контролем носителем. Снижение уровня креатинина в сыворотке наблюдается во всех

группах, получавших препарат, причем оба уровня доз примера 4 и контроль нативным rhNRG1 обеспечивает статистически значимое снижение. Значимое снижение ЩФ по сравнению с исходным уровнем имеет место у животных, получавших контроль нативным rhNRG1, и группы, получавшей дозу 1 мг/кг как примера 3, так и 4. Для обоих уровней доз примера 3, при дозе 1 мг/кг примера 4 и в группе контроля нативным rhNRG1 уровни холестерина повышены. Группа контроля нативным rhNRG1 и группа с дозой 0,3 мг/кг примера 4 также демонстрировали значительное снижение азота мочевины крови.

[00283] Пример 27. Активность *in vivo* (потеря массы тела у здоровых мышей) слитого соединения на основе VHH из примера 5.

[00284] 24 самца мышей DIO C57BL6 были получены от Taconic в возрасте 12 недель. Животных содержали поодиночке в клетках-микроизоляторах с неограниченным доступом к автоматизированному источнику водопроводной воды (2-5 млн<sup>-1</sup> хлора) и корму с высоким содержанием жира (TD95217). Мышей случайным образом делили на 4 группы (n = 6) в зависимости от массы тела с использованием инструмента блочного рандомизированного распределения, разработанного статистиками Lilly для случайного распределения на группы *in vivo*. Чтобы уменьшить потенциальные последствия исследования, связанные со стрессом, всем животным давали привыкнуть к ежедневному обращению в течение как минимум 3 дней до начала исследования. Массу тела и массу пищи регистрировали за 2 дня до начала исследования, а затем отслеживали и регистрировали ежедневно в течение всего исследования. 5 доз каждого препарата вводили подкожно в межлопаточное пространство в течение всего исследования (схема дозирования 1 раз в 3 дня) с использованием инсулинового шприца 28G на 0,5 мл (BD кат. № 329461). Нативный GDF-15 (R&D systems, рекомбинантный, кат. № 957-GD/CF; партия ENF232101A) и слитый белок на основе VHH из примера 5 разводили до соответствующих концентраций в стерильном PBS с pH 7,2 не позднее, чем за 30 минут до введения. Нативный GDF-15 вводили в дозе 0,1 мкг/кг, а слитый белок на основе VHH из примера 5 вводили в дозе либо 1 мкг/кг, либо 0,1 мкг/кг в зависимости от средней массы тела в группе за предыдущий день. Животные в группе контроля носителем получали 200 мкл PBS. Изменения массы тела анализировали с использованием статистического инструмента для внутреннего пользования и строгого подхода на основе модели, разработанного статистиками Lilly для исследований ФД *in vivo*.

[00285] Таблица 24. Влияние различных доз слитой молекулы на основе VHH из примера 5 на массу тела у здоровых мышей в различные моменты времени.

| Соединение      | Доза | N | % изменения массы тела в разные дни исследования |       |       |       |       |
|-----------------|------|---|--------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                 |      |   | 0                                                | 3     | 6     | 9     | 12    |
| Носитель        | н/д  | 6 | 100,3                                            | 101,9 | 100,2 | 102,3 | 104,4 |
| Пример 5        | 0,1  | 6 | 100,9                                            | 95,8  | 90,7  | 89,2  | 86,2  |
| Пример 5        | 1    | 6 | 101,9                                            | 95,6  | 91,3  | 87,7  | 85,5  |
| Нативный GDF-15 | 0,1  | 6 | 99,7                                             | 99,2  | 97,1  | 95,7  | 94,8  |

[00286] Таблица 25. Статистический анализ влияния различных доз слитой молекулы на основе VHH из примера 5 на массу тела у здоровых мышей в различные моменты времени.

| Соединение      | Доза |                  | День исследования |          |         |          |         |
|-----------------|------|------------------|-------------------|----------|---------|----------|---------|
|                 |      |                  | 0                 | 3        | 6       | 9        | 12      |
| Пример 5        | 0,1  | Величина влияния | 0,583             | -6,02    | -9,48   | -13,08   | -18,15  |
|                 |      | P-значение       | 0,971             | 6,88E-04 | < 0,001 | < 0,001  | < 0,001 |
| Пример 5        | 1    | Величина влияния | 1,657             | -6,247   | -8,862  | -14,644  | -18,825 |
|                 |      | P-значение       | 0,616             | 4,53E-04 | < 0,001 | < 0,001  | < 0,001 |
| Нативный GDF-15 | 0,1  | Величина влияния | -0,631            | -2,673   | -3,030  | -6,611   | -9,589  |
|                 |      | P-значение       | 0,963             | 0,242    | 0,158   | 1,85E-04 | < 0,001 |

P-значения приведены по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель.

[00287] Как показано в таблицах 24 и 25, значительная потеря массы тела происходит в обеих группах, получавших слитый белок на основе VHH из примера 5 в дозе либо 0,1 мкг/кг, либо 1 мкг/кг на 3 день по сравнению с контролем носителем. Потеря массы тела в группе, получавшей нативный GDF-15, достигает значимости к 9 дню. Нет никакой разницы в потере массы тела в любой момент времени между группами с дозой 1 и 0,1 мг/кг слитого белка на основе VHH из примера 5. Животные, получавшие 1 мг/кг или 0,1 мг/кг слитого белка на основе VHH из примера 5, потеряли значительно больше массы тела к 6 дню исследования по сравнению с животными, получавшими нативный GDF15. Эта значимость сохраняется до конца исследования.

[00288]

[00289] Пример 28. Активность *in vivo* (индукция кортикостерона и потеря массы тела у здоровых мышей) конъюгата на основе VHH из примера 15

[00290] Здоровых 6-недельных самок мышей C57BL6 приобретали у Envigo, содержали группами (по 3 мыши в клетке) в клетках-микроизоляторах с отфильтрованной водопроводной водой в бутылках и кормили стандартным рационом корма (рацион для содержания грызунов 2014 Teklad global). Мышам давали акклиматизироваться после получения в течение как минимум 72 часов. Мышей взвешивали за 1 день до введения дозы. Однократную подкожную дозу слитого конъюгата VHH из примера 15 в концентрации 0,1, 0,3, 1 или 3 нмоль/кг или носителя (DPBS) вводили в день 1;  $n = 3$  на группу. Использовали надрез хвоста для сбора образцов «сухой капли» (DBS) для анализа уровня кортикостерона непосредственно перед введением дозы ( $T_0$ ) и через 2, 6, 24, 30, 48 и 72 часа после введения дозы. Приблизительно 20-30 мкл крови из хвоста каждого животного собирали на карты Whatman DMPK (WB129243). Карты для DBS были предоставлены штатным специалистам по ЖХ-МС для анализа уровня кортикостерона. Массу тела животных также регистрировали ежедневно на протяжении всего исследования. Все экспериментальные процедуры *in vivo* проводили в соответствии со стандартами IACUC и в соответствии с утвержденным протоколом использования животных (19-033). Данные представлены в таблицах 26 и 27 как средние уровни кортикостерона (нг/мл) или среднее процентное изменение относительно массы тела, зарегистрированной в день 0, соответственно.

[00291] Таблица 26. Влияние различных доз конъюгата на основе VHH из примера 15 на уровни кортикостерона у здоровых мышей в различные моменты времени.

| Доза         | N |                  | Часов после введения дозы: |         |         |         |        |        |        |
|--------------|---|------------------|----------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
|              |   |                  | 0                          | 2       | 6       | 24      | 30     | 48     | 72     |
| 0,1 нмоль/кг | 3 | Среднее значение | 8,53                       | 331,44  | 542,62  | 52,60   | 32,77  | 16,36  | 7,54   |
|              |   | SEM              | 0,65                       | 48,23   | 43,88   | 33,65   | 1,43   | 4,00   | 2,73   |
|              |   | P-значение       | 0,17                       | 0,018   | 0,007   | 0,27    | 0,032  | 0,2    | 0,002  |
| 0,3 нмоль/кг | 3 | Среднее значение | 44,71                      | 788,87  | 1278,7  | 132,09  | 53,99  | 5,86   | 18,96  |
|              |   | SEM              | 11,96                      | 125,20  | 120,20  | 96,47   | 11,99  | 0,18   | 1,83   |
|              |   | P-значение       | 0,49                       | 0,006   | 0,0013  | 0,974   | 0,053  | 0,078  | 0,015  |
| 1 нмоль/кг   | 3 | Среднее значение | 25,16                      | 1027,8  | 1315,4  | 1003,8  | 275,68 | 8,02   | 8,28   |
|              |   | SEM              | 15,44                      | 52,55   | 109,56  | 297,4   | 151,60 | 3,08   | 0,16   |
|              |   | P-значение       | 0,3                        | < ,0001 | 0,0008  | 0,045   | 0,63   | 0,098  | 0,0006 |
| 3 нмоль/кг   | 3 | Среднее значение | 52,85                      | 1071,9  | 1315,5  | 1746,4  | 1748,0 | 260,69 | 10,24  |
|              |   | SEM              | 19,44                      | 63,01   | 15,20   | 82,73   | 92,80  | 187,38 | 2,95   |
|              |   | P-значение       | 0,62                       | 0,0001  | < ,0001 | < ,0001 | 0,0001 | 0,302  | 0,005  |
| Носитель     | 3 | Среднее значение | 77,11                      | 126,99  | 321,41  | 135,83  | 192,73 | 38,37  | 30,81  |
|              |   | SEM              | 41,11                      | 21,57   | 2,44    | 55,38   | 49,68  | 13,82  | 2,30   |

P-значения рассчитывали для определения значимости с использованием непарного t-критерия групп, получавших препарат, по сравнению с носителем в отдельные моменты времени в программном обеспечении GraphPad PRISM.

[00292] Как показано в таблице 26, введение конъюгата на основе VHH из примера 15 приводит к значительной индукции уровней кортикостерона по сравнению с контролем носителем через 2 и 6 часов после введения дозы для всех уровней доз. У животных в группах, получавших 3 мкг/кг, повышение уровней кортикостерона остается значительно

выше, чем в группе, получавшей контроль носителем, в течение 30 часов после введения дозы.

[00293] Таблица 27. Влияние различных доз конъюгата на основе VHH из примера 15 на массу тела у здоровых мышей через 72 часа после инъекции.

| Группа, получавшая препарат | Доза (нмоль/кг) | N | Среднее значение % МТ | SEM   | P-значение |
|-----------------------------|-----------------|---|-----------------------|-------|------------|
| Носитель                    | н/д             | 3 | 106,7                 | 1,125 | 1          |
| Пример 15                   | 0,1             | 3 | 105,1                 | 0,563 | 0,2846     |
| Пример 15                   | 0,3             | 3 | 102,1                 | 2,183 | 0,1346     |
| Пример 15                   | 1               | 3 | 97,9                  | 0,671 | 0,0026     |
| Пример 15                   | 3               | 3 | 100,1                 | 1,385 | 0,0211     |

[00294] Как показано в таблице 27, введение конъюгата на основе VHH из примера 15 приводило к предотвращению увеличения массы тела в группах, получавших 1 нмоль/кг и 3 нмоль/кг препарата, в ходе исследования. Разница в процентном увеличении массы тела является значимой для этих двух групп, получавших препарат, к 3 дню по сравнению с контролем носителем. Р-значения рассчитывали с использованием непарного t-критерия групп, получавших препарат, по сравнению с носителем в программном обеспечении GraphPad PRISM.

#### [00295] ФУНКЦИЯ *IN VIVO* – ФК

[00296] Пример 29. ФК слитых молекул на основе VHH из примера 4 у самцов крыс Спрег-Доули

[00297] Самцам крыс Спрег-Доули однократно внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили дозу 106,8 нмоль/кг для примера 4, включенного в буфер PBS (pH 7,4), при объеме дозы 2,6 мл/кг. Кровь для характеристики ФК собирали через 1, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 168 и 240 часов после введения дозы для в/в введения; и через 6, 12, 24, 48, 96, 144, 168 и 240 часов после введения дозы для п/к введения.

[00298] Концентрации в плазме слитых молекул на основе VHH из примера 4 определяли квалифицированным анализом ЖХ/МС в компании Altascience (Лаваль, Квебек, Канада) с использованием масс-спектрометра Q/Exactive Plus (Thermo Scientific, Сан-Хосе, Калифорния). Слитые молекулы на основе VHH из примера 4 и внутренний стандарт выделяли из плазмы крыс в КЗЭДТА посредством иммунопреципитации с конъюгатом анти-VHH-антитело-биотин и магнитными шариками, покрытыми стрептавидином. После



этапов промывки для удаления мешающих эндогенных белков выделенные слитые молекулы на основе VHH из примера 4 восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином, и анализировали триптические пептиды с помощью ЖХ/МС в качестве суррогатного показателя интактных слитых молекул. Концентрации слитых молекул на основе VHH из примера 4 в плазме использовали для расчета ФК параметров, приведенных в таблице 28.

[00299] Таблица 28. Средние фармакокинетические параметры в плазме для слитых молекул на основе VHH из примера 4 после однократного в/в или п/к введения дозы самцам крыс Спрег-Доули.

| Соединение | Путь введения | Доза (нмоль/кг) | T <sub>max</sub> (ч) | C <sub>0</sub> (в/в)<br>C <sub>max</sub> (п/к)<br>(нмоль/л) | AUC <sub>0-inf</sub> (ч*нмоль/л) | CL (в/в)<br>CL/F (п/к)<br>(мл/ч/кг) | t <sub>1/2</sub> (ч) |
|------------|---------------|-----------------|----------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Пример 4   | в/в           | 106,8           | НД                   | 2310<br>(461)                                               | 4,40E4<br>(5,27E3)               | 2,45<br>(0,274)                     | 30<br>(1,3)          |
|            | п/к           | 106,8           | 24<br>(0)            | 127<br>(27)                                                 | 6,83E3<br>(1,51E3)               | 16,2<br>(3,50)                      | 38<br>(3,2)          |

ПРИМЕЧАНИЕ: Сокращения: t<sub>1/2</sub> = период полужизни, T<sub>max</sub> = время до достижения максимальной концентрации, C<sub>max</sub> = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме, C<sub>0</sub> = концентрация в плазме, экстраполированная до момента времени 0, AUC<sub>0-inf</sub> = площадь под кривой от момента времени 0 часов до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность. Значения стандартного отклонения включены в таблицу под средними значениями ФК параметров в скобках. (N = 3/группа)

[00300] Как показано в таблице 28, слитая молекула на основе VHH из примера 4 демонстрирует увеличенный ФК профиль у крыс Спрег-Доули по сравнению с неслитыми белками (данные не представлены).

[00301] Пример 30. ФК слитых молекул на основе VHH из примеров 5, 6 и 7 у самцов крыс Спрег-Доули

[00302] Самцам крыс Спрег-Доули однократно внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили дозу 50 нмоль/кг для примера 5, 25 нмоль/кг для примера 6 или 7, включенных в буфер PBS (pH 7,4), при объеме дозы 4 мл/кг. Кровь для характеристики ФК собирали через 1, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 168 и 240 часов после введения дозы для в/в введения; и через 6, 12, 24, 48, 96, 144, 168 и 240 часов после введения дозы для п/к введения.

[00303] Концентрации в плазме слитых молекул на основе VHH из примеров 5-7 определяли квалифицированным анализом ЖХ/МС в Covance Laboratories (Гринфилд,

Индиана) с использованием масс-спектрометра Q/Exactive Plus (Thermo Scientific, Сан-Хосе, Калифорния). Слитые молекулы на основе VHH из примеров 5-7 и внутренний стандарт выделяли из плазмы крыс в КЗЭДТА посредством иммунопреципитации с конъюгатом анти-VHH-антитело-биотин и магнитными шариками, покрытыми стрептавидином. После этапов промывки для удаления мешающих эндогенных белков выделенные слитые молекулы на основе VHH из примеров 5-7 восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином, и анализировали триптические пептиды с помощью ЖХ/МС в качестве суррогатного показателя интактных слитых молекул. Концентрации слитых молекул на основе VHH из примеров 5-7 в плазме использовали для расчета ФК параметров, приведенных в таблице 29.

[00304] Таблица 29. Средние фармакокинетические параметры в плазме для слитых молекул на основе VHH из примеров 5, 6 и 7 после однократного в/в или п/к введения дозы самцам крыс Спрег-Дули.

| Соединение | Путь введения | Доза (нмоль/кг) | T <sub>max</sub> (ч) | C <sub>0</sub> (в/в)<br>C <sub>max</sub> (п/к)<br>(нмоль/л) | AUC <sub>0-inf</sub><br>(ч*нмоль/л) | CL (в/в)<br>CL/F (п/к)<br>(мл/ч/кг) | t <sub>1/2</sub> (ч) |
|------------|---------------|-----------------|----------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Пример 5   | в/в           | 50              | НД                   | 1480<br>(231)                                               | 1,48E5*<br>(7,08E3)                 | 0,438*<br>(0,0290)                  | 106*<br>(12,9)       |
|            | п/к           | 50              | 64<br>(28)           | 269<br>(56)                                                 | 8,77E4*<br>(1,89E4)                 | 1,14*<br>(0,160)                    | 206*<br>(102)        |
| Пример 6   | в/в           | 25              | НД                   | 383<br>(42,4)                                               | 8390<br>(892)                       | 3,00<br>(0,317)                     | 15,7<br>(2,35)       |
|            | п/к           | 25              | 32<br>(14)           | 57,8<br>(12,0)                                              | 3240<br>(746)                       | 7,96<br>(1,62)                      | 12,6<br>(0,968)      |
| Пример 7   | в/в           | 25              | НД                   | 309<br>(29,2)                                               | 5830<br>(180)                       | 4,30<br>(0,134)                     | 13,9<br>(4,78)       |
|            | п/к           | 25              | 24<br>(0)            | 31,6<br>(16,9)                                              | 1520<br>(755)                       | 20,2<br>(11,6)                      | 13,2<br>(3,19)       |

КОММЕНТАРИИ: \*Продолжительность исследования слишком мала, чтобы полностью охарактеризовать фазу выведения ФК профиля. Данные представляют собой средние значения (стандартное отклонение в скобках): для примера 5 значения составляют N = 3 (в/в и п/к от 1 до 240 часов); для примера 6 значения в/в составляют N=3 (1-168 часов) и N=1 (240 часов), а значения п/к составляют N=3 (6-144 часа); для примера 7 значения в/в составляют N=3 (1-96 часов), N=2 (144 часа) и N=1 (168, 240 часов); и значения п/к составляют N = 3 (от 6 до 96 часов), N = 2 (144 часа) и N = 1 (168 часов).

ПРИМЕЧАНИЕ: Сокращения:  $t_{1/2}$  = период полужизни,  $T_{\max}$  = время до достижения максимальной концентрации,  $C_{\max}$  = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме,  $C_0$  = концентрация в плазме, экстраполированная до момента времени 0,  $AUC_{0-\infty}$  = площадь под кривой от момента времени 0 часов до бесконечности,  $CL/F$  = клиренс/биодоступность.

[00305] Как показано в таблице 29, слитые молекулы на основе VHH из примеров 5, 6 и 7 демонстрируют увеличенный ФК профиль у крыс Спрег-Дули по сравнению с неслитыми белками (данные не представлены).

[00306] Пример 31. ФК слитой молекулы Fab-VHH из примера 9 и соответствующего неслитого Fab (пример 13) у самцов крыс Спрег-Дули

[00307] Самцам крыс Спрег-Дули однократно внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили дозу 63,4 нмоль/кг для примера 9, 78,9 нмоль/кг для примера 13, включенных в буфер PBS (pH 7,4), при объеме дозы 4 мл/кг. Кровь для характеристики ФК собирали через 1, 6, 12, 24, 48, 96, 144, 168 и 240 часов после введения дозы для в/в введения; и через 6, 12, 24, 48, 96, 144, 168 и 240 часов после введения дозы для п/к введения.

[00308] Концентрации в плазме слитой молекулы Fab-VHH из примера 9 и соответствующего неслитого Fab из примера 13 определяли квалифицированным анализом ЖХ/МС в компании Altascience (Лаваль, Квебек, Канада) с использованием масс-спектрометра Q/Exactive Plus (Thermo Scientific, Сан-Хосе, Калифорния). Слитую молекулу Fab-VHH из примера 9 и Fab из примера 13 и внутренний стандарт выделяли из плазмы крыс в КЗЭДТА посредством иммунопреципитации с конъюгатом анти-легкая каппа-цепь человека-биотин и магнитными шариками, покрытыми стрептавидином, или конъюгатом анти-VHH-антитело-биотин и магнитными шариками, покрытыми стрептавидином. После этапов промывки для удаления мешающих эндогенных белков выделенные белки из примеров 9 и 13 восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином, и анализировали триптические пептиды с помощью ЖХ/МС в качестве суррогатного показателя интактных слитых молекул. Концентрации в плазме Fab-VHH из примера 9 (таблица 30) использовали для расчета ФК параметров, приведенных в таблице 31. Концентрации в плазме неслитых Fab из примера 13 были слишком низки для расчета ФК параметров.

[00309] Таблица 30. Средняя концентрация в плазме (указана в нмоль/л) слитой молекулы Fab-VNH из примера 9 и соответствующего неслитого Fab (пример 13) после однократного в/в или п/к введения дозы самцам крыс Спрег-Доули.

| Соединение | Путь введения | Время (часы)     |                  |                 |                 |                 |                 |                 |                |                |
|------------|---------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
|            |               | 1                | 6                | 12              | 24              | 48              | 96              | 144             | 168            | 240            |
| Пример 9   | в/в           | 1909,8<br>(35,4) | 1378,2<br>(93,2) | 999,7<br>(19,7) | 797,8<br>(40,3) | 515,3<br>(44,0) | 257,4<br>(10,6) | 133,1<br>(17,4) | 96,9<br>(14,2) | 34,6<br>(5,0)  |
|            | п/к           | НД               | 28,1<br>(7,1)    | 79,2<br>(26,5)  | 159,6<br>(30,0) | 229,8<br>(16,2) | 183,1<br>(16,4) | 103,0<br>(13,4) | 85,0<br>(8,3)  | 46,0<br>(20,9) |
| Пример 13  | в/в           | 75,7<br>(7,1)    | 18,8<br>(11,3)   | 6,9<br>(4,2)    | 2,7<br>(Н/Р)    | Ниже<br>ПКО     | Ниже<br>ПКО     | Ниже<br>ПКО     | Ниже<br>ПКО    | Ниже<br>ПКО    |
|            | п/к           | НД               | 12,1<br>(1,2)    | 5,6<br>(1,2)    | Ниже<br>ПКО     | Ниже<br>ПКО     | Ниже<br>ПКО     | Ниже<br>ПКО     | Ниже<br>ПКО    | Ниже<br>ПКО    |

Значения стандартного отклонения включены в таблицу под средними значениями концентрации в скобках. N = 3/группа

[00310] Как показано в таблице 30, слитая молекула Fab-VNH из примера 9 демонстрирует значительно более высокие средние концентрации в плазме у крыс Спрег-Доули по сравнению с соответствующим неслитым Fab (пример 13).

[00311] Таблица 31. Средние фармакокинетические параметры слитой молекулы Fab-VNH из примера 9 после однократного в/в или п/к введения дозы самцам крыс Спрег-Доули.

| Соединение | Путь введения | Доза (нмоль/кг) | T <sub>max</sub> (ч) | C <sub>0</sub> (в/в)<br>C <sub>max</sub> (п/к)<br>(нмоль/л) | AUC <sub>0-inf</sub> (ч*нмоль/л) | CL (в/в)<br>CL/F (п/к)<br>(мл/ч/кг) | t <sub>1/2</sub> (ч) |
|------------|---------------|-----------------|----------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Пример 9   | в/в           | 78,9            | НД                   | 2039<br>(23)                                                | 8,17Е4<br>(3,16Е3)               | 0,966<br>(0,037)                    | 49,4<br>(1,7)        |
|            | п/к           | 78,9            | 48<br>(0)            | 230<br>(16)                                                 | 3,56Е4<br>(6,24Е3)               | 2,259<br>(0,361)                    | 73,8<br>(20,9)       |

ПРИМЕЧАНИЕ: Сокращения: t<sub>1/2</sub> = период полужизни, T<sub>max</sub> = время до достижения максимальной концентрации, C<sub>max</sub> = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме, C<sub>0</sub> = концентрация в плазме, экстраполированная до момента времени 0, AUC<sub>0-inf</sub> = площадь под кривой от момента времени 0 часов до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность.

Значения стандартного отклонения включены в таблицу под средними значениями  $\Phi K$  параметров в скобках.  $N = 3/\text{группа}$

[00312] Как показано в таблице 31, слитая молекула Fab-VHH из примера 9 демонстрирует увеличенный  $\Phi K$  профиль у крыс Спрег-Дули, в то время как средние концентрации в плазме соответствующего неслитого Fab (пример 13) настолько низки, что невозможен расчет  $\Phi K$  параметров.

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[00313] В описании данного изобретения содержатся ссылки на нижеследующие нуклеотидные и/или аминокислотные последовательности, которые приведены ниже для информации.

[00314] SEQ ID NO:1 – фрагмент VHH 1 (MC6.1C22)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00315] SEQ ID NO:2 – фрагмент VHH 2 (MC6.1C80)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00316] SEQ ID NO:3 – фрагмент VHH 3 (MC6.1C22.43)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSPP

[00317] SEQ ID NO:4 – фрагмент VHH 4 (MC6.1C80.43)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSPP

[00318] SEQ ID NO:5 – фрагмент VHH 5 (MC6)

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDITY  
YLDVKGRFTISKDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG  
QGTQVTVSS

[00319] SEQ ID NO:6 – фрагмент VHH 6 (MC6.1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG  
QGTLVTVSS

[00320] SEQ ID NO:7 – фрагмент VHH 7 (MC6.1C6)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00321] SEQ ID NO:8 – фрагмент VHH 8 (MC6.1C22-G26Y)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00322] SEQ ID NO:9 – фрагмент VHH 9 (MC6.1C22-R27A)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00323] SEQ ID NO:10 – фрагмент VHH 10 (MC6.1C22-I57E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDET  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW  
GQGTLVTVSS

[00324] SEQ ID NO:11 – фрагмент VHH 11 (MC6.1C22-I57Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDQT  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW  
GQGTLVTVSS

[00325] SEQ ID NO:12 – фрагмент VHH 12 (MC6.1C22-Y59A)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITA  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00326] SEQ ID NO:13 – фрагмент VHH 13 (MC6.1C22-Y59E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITE  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00327] SEQ ID NO:14 – фрагмент VHH 14 (MC6.1C22-Y59Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITQ  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00328] SEQ ID NO:15 – фрагмент VHH 15 (MC6.1C22-Y59S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITS  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00329] SEQ ID NO:16 – фрагмент VHH 16 (MC6.1C22-Y59T)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITT  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00330] SEQ ID NO:17 – фрагмент VHH 17 (MC6.1C22-R102K)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00331] SEQ ID NO:18 – фрагмент VHH 18 (MC6.1C22-R102Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00332] SEQ ID NO:19 – фрагмент VHH 19 (MC6.1C22-R102S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00333] SEQ ID NO:20 – фрагмент VHH 20 (MC6.1C22-P103)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00334] SEQ ID NO:21 – фрагмент VHH 21 (MC6.1C22-P103Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00335] SEQ ID NO:22 – фрагмент VHH 22 (MC6.1C22-P103S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00336] SEQ ID NO:23 – фрагмент VHH 23 (MC6.1C22-L104E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00337] SEQ ID NO:24 – фрагмент VHH 24 (MC6.1C22-L104G)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00338] SEQ ID NO:25 – фрагмент VHH 25 (MC6.1C22-L104Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS



[00339] SEQ ID NO:26 – фрагмент VHH 26 (MC6.1C22-L104T)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00340] SEQ ID NO:27 – фрагмент VHH 27 (MC6.1C22-S107E)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00341] SEQ ID NO:28 – фрагмент VHH 28 (MC6.1C80-A98T)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATRPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00342] SEQ ID NO:29 – фрагмент VHH 29 (MC6.1C80-P100Q)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARQGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00343] SEQ ID NO:30 – фрагмент VHH 30 (MC6.1C80-A98T, P100Q)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATRQGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00344] SEQ ID NO:31 – фрагмент VHH 31 (MC6.1C80-K108Q)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSQVADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00345] SEQ ID NO:32 – фрагмент VHH 32 (MC6.1C80-V109Q)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQADLYPYWG  
QGTLVTVSS

[00346] SEQ ID NO:33 – фрагмент VHH 33 (MC6.1C80-D111E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVAELYPYWG  
QGTLVTVSS

[00347] SEQ ID NO:34 – фрагмент VHH 34 (MC6.1C80-D111S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVASLYPYWGQ  
GTLVTVSS

[00348] SEQ ID NO:35 – фрагмент VHH 35 (MC6.1C80-V109Q, D111E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQAE LYPYWG  
QGTLVTVSS

[00349] SEQ ID NO:36 – фрагмент VHH 36 (MC6.1C80-V109Q, D111S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQASLYPYWGQ  
GTLVTVSS

[00350] SEQ ID NO:37 – фрагмент VHH 37 (MC6.1C80Cys)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSC

[00351] SEQ ID NO:38 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (GGGGQ)<sub>n</sub>)

GGGGQ

[00352] SEQ ID NO:39 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (GGGQ)<sub>n</sub>)

GGGQ

[00353] SEQ ID NO:40 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (GGGGS)<sub>n</sub>)

GGGGS

[00354] SEQ ID NO:41 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (PGPQ)<sub>n</sub>)

PGPQ

[00355] SEQ ID NO:42 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (PGPA)<sub>n</sub>)

PGPA

[00356] SEQ ID NO:43 – L<sub>1</sub> (основная последовательность GGGG(AP)<sub>n</sub>GGGG)

GGGG-AP-GGGG

[00357] SEQ ID NO:44 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (GGE)<sub>n</sub>)

GGE

[00358] SEQ ID NO:45 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (GGGGE)<sub>n</sub>)

GGGGE

[00359] SEQ ID NO:46 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (GGK)<sub>n</sub>)

GGK

[00360] SEQ ID NO:47 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (GGGGK)<sub>n</sub>)

GGGGK

[00361] SEQ ID NO:48 – L<sub>1</sub> (основная последовательность GGGG(EP)<sub>n</sub>GGGG)

GGGG-EP-GGGG

[00362] SEQ ID NO:49 – L<sub>1</sub> (основная последовательность GGGG(KP)<sub>n</sub>GGGG)

GGGG-KP-GGGG

[00363] SEQ ID NO:50 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (PGPE)<sub>n</sub>)

PGPE

[00364] SEQ ID NO:51 – L<sub>1</sub> (основная последовательность (PGPK)<sub>n</sub>)

PGPK

[00365] SEQ ID NO:52 – L<sub>1</sub> 1 (GGGGQ)<sub>5</sub>

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

[00366] SEQ ID NO:53 – L<sub>1</sub> 2 (PGPQ)<sub>8</sub>  
PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ

[00367] SEQ ID NO:54 – L<sub>1</sub> 3 (PGPA)<sub>8</sub>  
PGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPA

[00368] SEQ ID NO:55 – L<sub>1</sub> 4 ((GGE)<sub>8</sub>)

GGE GGEG GEGG EGGE GGEG GE

[00369] SEQ ID NO:56 – L<sub>1</sub> 5 ((GGGGE)<sub>5</sub>)  
GGGGEGGGGEGGGGEGGGGEGGGGE

[00370] SEQ ID NO:57 – L<sub>1</sub> 6 ((GGK)<sub>8</sub>)  
GGKGGKGGKGGKGGKGGKGGKGGKGGK

[00371] SEQ ID NO:58 – L<sub>1</sub> 7 ((GGGGK)<sub>5</sub>)  
GGGGKGGGGKGGGGKGGGGKGGGGK

[00372] SEQ ID NO:59 – L<sub>1</sub> 8 ((GGGG(AP)<sub>10</sub>GGGG))  
GGGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGGG

[00373] SEQ ID NO:60 – L<sub>1</sub> 9 ((GGGG(EP)<sub>10</sub>GGGG))  
GGGGGEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPGGGG

[00374] SEQ ID NO:61 – L<sub>1</sub> 10 ((GGGG(KP)<sub>10</sub>GGGG))  
GGGGKPKPKPKPKPKPKPKPKPKPGGGG

[00375] SEQ ID NO:62 – L<sub>1</sub> 11 ((PGPE)<sub>8</sub>)  
PGPEPGPEPGPEPGPEPGPEPGPEPGPEPGPE

[00376] SEQ ID NO:63 – L<sub>1</sub> 12 ((PGPK)<sub>8</sub>)  
PGPKPGPKPGPKPGPKPGPKPGPKPGPKPGPK

[00377] SEQ ID NO:64 – L<sub>2</sub> 1  
GGGSGGSGGG

[00378] SEQ ID NO:65 – L<sub>2</sub> 2

GGGSGGSGGSGGG

[00379] SEQ ID NO:66 – сигнальный пептид

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

[00380] SEQ ID NO:67 – proGIP человека

MVATKTFALLLLSLFLAVGLGEKKEGHFSALPSLPVGSHAKVSSPQPRGPRYAEGTFISD  
YSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQREARALELASQANRKEEEAVEPQSS  
PA KNPSDEDLR DLIQELLACLLDQTNLCRLRSR

[00381] SEQ ID NO:68 – GIP человека

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

[00382] SEQ ID NO:69 – рецептор GIP человека

RAETGSKGQTAGELYQRWERYRRECQETLAAAEPPSGLACNGSFDMYVCWDYAAPNA  
TARASCPWYLPWHHHVAAGFVLRQCGSDGQWGLWRDHTQCENPEKNEAFLDQRLILE  
RLQVMYTVGYSLATLLLALLILSLFRRLHCTRNYIHINLFTSFMLRAAAILSRDRLLPR  
PGPYLGDQALALWNQALAAACRTAQIVTQYCVGANYTWLLVEGVYLHSLVLVGGSEE  
GHFRYYLLLWGAPALFVIPWVIVRYLYENTQCWERNEVKAIWWIIRTPILMTILINFLIF  
IRILGILLSKLRTRQMRCRDYRLRLARSTLTLVPLLGVHEVVFAPVTEEQARGALRFAKL  
GFEIFLSSFQGLVSVLYCFINKEVQSEIRRGWHHCRLRRSLGEEQRQLPERAFRALPSGS  
GPGEVPTSRGLSSGTLPGPGNEASRELESYC

[00383] SEQ ID NO:70 – проглюкагон человека

MKSIYFVAGLFVMLVQGSWQRSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNEDKRHSQGT  
TSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIAKRHDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAA  
KEFIAWLVKGRGRRDFPEEVAIVEELGRRHADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKI  
TDRK

[00384] SEQ ID NO:71 – GLP-1 человека

HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

[00385] SEQ ID NO:72 – GLP-1<sub>7-37</sub> человека

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

[00386] SEQ ID NO:73 – GLP-1<sub>7-36</sub> человека

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

[00387] SEQ ID NO:74 – рецептор GLP-1 человека

RPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTEDPPPATDLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFV  
NVSCPWYLPWASSVPQGHVYRFCTAEGLWLQKDNSSLPWRDLSECEESKRGERSSPEE  
QLLFLYIIYTVGYALSFSALVIASAILLGFRHLHCTRNYIHLNLFASFILRALSVFIKDAAL  
KWMYSTAAQQHQWDGLLSYQDSLSCRLVFLMQYCVAANYYWLLVEGVYLYTLLAF  
SVLSEQWIFRLYVSIGWGVPLLFFVVPWGIVKLYEDEGCWTRNSNMNYWLIIRLPILFAI  
GVNFLIFVRVICIVVSKLKANLMCKTDIKCRLAKSTLTLIPLLGTHEVIFAFVMDEHARGT  
LRFIKLFTELSFTSFQGLMVAILYCFVNNEVQLEFRKSWERWRLEHLHIQRDSSMKPLKC  
PTSSLSSGATAGSSMYTATCQASCS

[00388] SEQ ID NO:75 – proGDF15 человека

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGLSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELKRK  
YEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASR  
LHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQL  
ELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV  
TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQT  
YDDLAKDCHCI

[00389] SEQ ID NO:76 – GDF15 человека

ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM  
HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTGYDDLAKDCHCI

[00390] SEQ ID NO:77 – рецептор GDF15 (GFRAL) человека

MIVFIFLAMGLSLENEYTSQTNNCTYLREQCLRDANGCKHAWRVMEDACNDSDPGDPC  
KMRNSSYCNLSIQYLVESNFQFKECLCTDDFYCTVNKLLGKKCINKSDNVKEDKFKWN  
LTTRSHHGFKGMWSCLEVAEACVGDVVCNAQLASYLKACSAANGNPCDLKQCQAAIRF  
FYQNIPFNIAQMLAFCDCAQSDIPCQQSKEALHSKTCAVNMVPPPTCLSVIRSCQNDEL  
RRHYRTFQSKCWQRVTRKCHEDENCISTLSKQDLTCSGSDDCKAAYIDILGTVLQVQCT  
CRTITQSEESLCKIFQHMLHRKSCFNYP TLSNVKGMALYTRKHANKITLTGFHSPFNGEV  
IYAAMCMTVTCGILLVMVKLR TSRISSKARDPSSIQIPGEL

[00391] SEQ ID NO:78 – proINS человека

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

[00392] SEQ ID NO:79 – цепь A INS человека

GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

[00393] SEQ ID NO:80 – цепь B INS человека

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

[00394] SEQ ID NO:81 –  $\alpha$ -субъединица рецептора INS человека

HLYPGEVCPGMDIRNNLTRLHELENCVIEGHLQILLMFKTRPEDFRDLSFPKLIMITDYL  
LLFRVYGLESLKDLFPNLTVIRGSRLFFNYALVIFEMVHLKELGLYNLMNITRGSVRIEK  
NNELCYLATIDWSRILDSVEDNYIVLNKDDNEECGDICPGTAKGKTNCPATVINGQFVE  
RCWTHSHCQKVCPTICKSHGCTAEGLCCHSECLGNCSQPDDPTKCVACRNFYLDGRCV  
ETCPPPYHYHFQDWRCVNFSCQDLHHKCKNSRRQGCHQYVIHNNKCIPECPSGYTMNSS  
NLLCTPCLGPCPKVCHLLEGEKTIDSVTSAQELRGCTVINGSLIINIRGGNNLAAELEANL  
GLIEEISGYLKIRRSYALVSLSFFRKLRLIRGETLEIGNYSFYALDNQNLRLQDWSKHNL  
TITQGKLFFHYNPKLCLSEIHKMEEVSGTKGRQERNDIALKTNGDQASCENELLKFSYIR  
TSFDKILLRWEPYWPPDFRDLLGFMLFYKEAPYQNVTEFDGQDACGSNSWTVVDIDPPL  
RSNDPKSQNHPPGWLMRGLKPWTQYAIFVKTLVTFSDERRTYGAKSDIIVQTDATNPVS  
PLDPISVSNSSSQILKWKPPSDPNGNITHYLVFWERQAEDSELFELDYCLKGLKLPSRTW  
SPPFESEDSQKHNSQSEYEDSAGECCSCPKTDSQILKELEESSFRKTFEDYLHNVVFPVPRKT  
SSGTGAEDPRPS

[00395] SEQ ID NO:82 –  $\beta$ -субъединица рецептора INS человека

SLGDVGNVTVAVPTVAAPNTSSTSVPTSPEEHRPFKVVNKESLVISGLRHFTGYRIELQ  
ACNQDTPEERCSVAAYVSARTMPEAKADDIVGPVTHEIFENNVVHLMWQEPKEPNGLI  
VLYEVSYRRYGDEELHLCVSRKHFALERGCLRLGLSPGNYSVRIRATSLAGNGSWTEPT  
YFYVTDYLDVPSNIAKIIIGPLIFVFLFSVVIGSIYFLRKRQPDGPLGPLYASSNPEYLSAS  
DVFPCSVYVPDEWEVSREKITLLRELQGQSGFMVYEGNARDIIKGEAETRVAVKTVNES  
ASLRERIEFLNEASVMKGFTCHHVRLLGVVSKGQPTLVVMELMAHGDLKSYLRSLRP  
EAENNPGRPPPTLQEMIQMAAEIADGMAYLNAKKFVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGD  
FGMTRDIYETDYRKGKGKGLLPVRWMAPESLKDGVFTTSSDMWSFGVVLWEITSLAEQ

PYQGLSNEQVLKFVMDGGYLDQPDNCPERVTDLMRMCWQFNPKMRPTFLEIVNLLKD  
DLHPSFPEVSFFHSEENKAPESSELEMEFEDMENVPLDRSSHQCREEAGGRDGGSSLGFK  
RSYEEHIPYTHMNGGKKNGRILTLPRSNPS

[00396] SEQ ID NO:83 – IL-2 человека

APTSSTTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL  
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR  
WITFCQSIISTLT

[00397] SEQ ID NO:84 –  $\alpha$ -субъединица рецептора IL-2 человека

ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQ  
CQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATER  
IYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPG  
EEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLL  
SGLTWQRRQRKSRRTI

[00398] SEQ ID NO:85 –  $\beta$ -субъединица рецептора IL-2 человека

AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQAS  
WACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVH  
VETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDT  
QYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFILV  
YLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEI  
SPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYF  
TYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPST  
APGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPD  
AGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[00399] SEQ ID NO:86 –  $\gamma$ -субъединица рецептора IL-2 человека

LNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDSLVSSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQP  
TNLTLHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHL YQTFVVQLQDPREPRRQ  
ATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWT  
EQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKENPFL  
FALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGL  
AESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET



[00400] SEQ ID NO:87 – proNRG1 человека

MSEKEGRGKGKGGKKKERGSGKKPESAAGSQSPALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLRCE  
 TSSEYSSLRFKWFKNGNELNRKNKPQNIKIQQKPGKSELRINKASLADSGEYMCKVISKL  
 GNDSASANITIVESNEIITGMPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTTGTSHLVK  
 CAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCQPGFTGARCTENVPMKVQNQEKAEEEL  
 YQKRVLTTIGICIALLVVGIMCVVAYCKTKKQRKKLHDRLRQSLRSERNMMNIANGP  
 HHPNPPPENVLVNQYVSKNVISSEHIVEREAETSFSTSHYTSTAHHSTTVTQTPSHSWS  
 NGHTESILSESHSVIVMSSVENSRHSSPTGGPRGRLNGTGGPRECNSFLRHARETPDSYR  
 DSPHSERYVSAMTTPARMSPVDFHTPSSPKSPPSEMSPPVSSMTVSMPSMAVSPFMEEER  
 PLLLVTPPRLREKKFDHHPQQFSSFHHPAHDSNSLPASPLRIVEDEEYETTQEYEPAQEP  
 VKKLANSRRAKRTKPNGHIANRLEVDSNTSSQSSNSESETEDERVGEDTPFLGIQNPLAA  
 SLEATPAFRLADSRTNPAGRFSTQEEIQARLSSVIANQDPIAV

[00401] SEQ ID NO:88 – NRG1 человека

SGKKPESAAGSQSPALPPRLKEMKSQESAAGSKLVLRCE  
 TSSEYSSLRFKWFKNGNELNRKNKPQNIKIQQKPGKSELRINKASLADSGEYMCKVISKL  
 GNDSASANITIVESNEIITGMPASTEGAYVSSESPIRISVSTEGANTSSSTSTSTTGTSHLVK  
 CAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCQPGFTGARCTENVPMKVQNQEKAEEEL  
 YQK

[00402] SEQ ID NO:89 – рецептор NRG1 ErbB3 человека

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCE  
 VVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKF  
 AIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEI  
 VKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHDECA  
 GGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTFLQLEPNPHTKYQYGGVCVASC  
 PHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNI  
 DGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHN  
 FSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLN  
 WTKVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPGPQCLSCRNYSRGG  
 VCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPHC  
 VSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLT  
 MALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANKVLA  
 RIFKETELRKLKVLGSGVFGTVHKGVWIPEGESIKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVTDHML  
 AIGSLDHAHIVRLGLCPGSSLQLVTQYLPGLSLDHVRQHRGALGPQLLNWGVQIAK  
 GMYYLEEHGMVHRNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKW

MALESIHFGKYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRLAEVPDLLEKGERLAQPQI  
 CTIDVYVMVMVKCWMIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEPHG  
 LTNKKLEEVELEPELDDLDDLEAEEDNLATTTLGSAISLPVGTNLNRPRGSQSLLSPSSGY  
 MPMNQGNLGESCQESAVSGSSERCPRPVSLHPMPRGCLASESSEGHVTGSEAELQEKVS  
 MCRSRSRSRSPRPRGDSAYHSQRHSLTPVTPLSPPGLEEDVNGYVMPDTHLKGTPSSR  
 EGTLSVGLSSVLGTEEEDEDEEYEMNRRRRRHSPHPPRPSSLEELGYEYMDVGSDLSA  
 SLGSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDYEMNRQRDGGGPGGDYAAMGACPASEQGYEE  
 MRAFQGPQGHQAPHVHYARLKTLSLEATDSAFDNPDYWHSRLFPKANAQRT

[00403] SEQ ID NO:90 – рецептор NRG1 ErbB4 человека

MKPATGLWVWVSLVAAGTVQPSDSQSVCACTENKLSSLSDEQQYRALRKYENCE  
 VVMGNLEITSIEHNRDLSFLRSVREVTGYVLVALNQFRYLPLENLRIIRGTKLYEDRYAL  
 AIFLNIRKDGNGFGLQELGLKNLTELNGGVYVDQNKFLCYADTIHWQDIVRNPWPSNLT  
 LVSTNGSSGCGRCHKSGTGRGWPTENHCQTLTRTVCAEQCDGRCYGPYVSDCCHREC  
 AGGCSGPKDTCFACMNFNDSEGACVTQCPQTFVYNPTTFQLEHNFNAKYTYGAFCVK  
 KCPHNFVVDSSSCVRACPSKMEVEENGIMCKPCTDICPKACDGIGTGSLMSAQTVD  
 SNIDKFINCTKINGNLIFLVTGIHGDYPYNAIEAIDPEKLNVFRTVREITGFLNIQSWPPNMT  
 DFSVFSNLVTIGGRVLYSGLSLLILKQQGITSQFQSLKEISAGNIYITDNSNLCYYHTINW  
 TTLFSTINQRIVIRDNRKAENCTAEGMVCNHLCSDDGCWGPDPDQCLSCRRFSRGRICIES  
 CNLYDGEFREFENGSIQVECDPQCEKMEDGLLTCHGPGPDNCTKCSHFKDGPNCVEKCP  
 DGLQGANSFIFKYADPDRECHPCHPNCTQGCNGPTSHDCIYYPWTGHSTLPQHARTPLI  
 AAGVIGGLFILVIVGLTFVYVRRKSIKKKRALRRFLETVEPLTPSGTAPNQAQLRILK  
 ETELKRVKVLGSGAFGTVYKGIWVPEGETVKIPVAIKILNETTGPKANVEFMDEALIMAS  
 MDHPLVRLLGVCLSPTIQLVTQLMPHGCLLEYVHEHKDNIGSQLLLNWCVQIAKGMM  
 YLEERRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLEGDEKEYNADGGKMPIKWMAL  
 ECIHYRKFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGGKPYDGIPTRIPDLLEKGERLPQPPICTIDVY  
 MVMVKCWMIDADSRPKFKELAAEFMRMARDPQRYLVIQGDORMKLPSPNDSKFFQNL  
 LDEEDLEDMMDAEEYLVPQAFNIPPIYTSRARIDSNRSEIGHSPPPAYTPMSGNQFVYR  
 DGGFAAEQGVSPYRAPSTIPEAPVAQGATAEIFDDSCCNGTLRKPVAPHVQEDSSTQ  
 RYSADPTVFAPERSPRGELDEEGYMTMPMRDKPKQEYLNPEENPFVSRRKNGDLQALD  
 NPEYHNASNGPPKADEYVNEPLYLNTFANTLGKAEYLNKNNILSMPEKAKKAFDNPDY  
 WNHSLLPPRSTLQHPDYLQEYSTKYFYKQNGRIRPIVAENPEYLSEFSLKPGTVLPPPPYR  
 HRNTVV

[00404] SEQ ID NO:91 – proRLN2 человека

MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVADSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQ  
EDAPQTPRPVAEIVPSFINKDTETINMMSEFVANLPQELKLTLEMQPALPQLQQHVPVL  
KDSSLLFEEFKKLIRNRQSEAADSSPSELKYLGLDTHSRKKRQLYSALANKCCHVGCTK  
RSLARFC

[00405] SEQ ID NO:92 – цепь A RLN2 человека  
QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[00406] SEQ ID NO:93 – цепь B RLN2 человека  
DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[00407] SEQ ID NO:94 – рецептор RXFP1 человека  
MTSGSVFFYILIFGKYFSHGGGQDVKCSLGYFPCGNITKCLPQLLHCNGVDDCGNQADE  
DNCGDNNGWSLQFDKYFASYKMTSQYPFEAETPECLVGSVPVQCLCQGLELDCDET  
LRAVPSVSSNVTAMSLQWNLIRKLPPDCFKNYHDLQKLYLQNNKITSISIYAFRGLNSLT  
KLYLSHNRITFLKPGVFEDLHRLEWLIIEDNHLSRISPTFYGLNSLILLVMNNVLTRLPD  
KPLCQHMPRLHWLDLEGNHIIHNLRLNLTFIGSCSNLTVLVMRKNKINHLNENTFAPLQKLD  
ELDLGSNKIENLPPLIFKDLKELSQLNLSYNPIQKIQANQFDYLVKLKSLSLEGIEISNIQQ  
RMFRPLMNLSHIYFKKFQYCGYAPHVRSCKPNTDGISSLENLLASIIQRVFVWVVSATC  
FGNIFVICMRPYIRSENKLYAMSIISLCCADCLMGIYLFVIGGFDLKFRGEYNKHAQLWM  
ESTHCQLVGSLAILSTEVSVLLLTFLTLEKYICIVYPFRCVRPGKCRITITVLILIWITGFIVA  
FIPLSNKEFFKNYYGTNGVCFPLHSEDTESIGAQIYSVAIFLGINLAAFIIVFSYGSMFYSV  
HQSAITATEIRNQVKKEMILAKRFFIFVFTDALCWIPFVVKFLSLLQVEIPGTITSWVIFI  
LPINSALNPILYTLTTRPFKEMIHRFWYNYRQRKSMDSKGQKTYAPSFIWVEMWPLQEM  
PPELMKPDLFITYPCEMSLISQSTRLNSYS

[00408] SEQ ID NO:95 – AKTГ человека  
SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYPNGAEDESAEAPLEF

[00409] SEQ ID NO:96 – рецептор AKTГ человека (ACTHR, MC2R)  
MKHIINSYENINNTARNNSDCPRVVLPEEIFFTISIVGVLENLIVLLAVFKNKNLQAPMYF  
FICSLAISDMLGSLYKILENIIILRNMGYLKPRGSFETTADDIISLFLVLSLLGSIFSLSVIA  
ADRYITIFHALRYHSIVTMRRTVVVLTVIWTFTCTGTGTMVIFSHHVPTVITFTSLFPLML  
VFILCLYVHMFLLARSHTRKISTLPRANMKGAITLTILLGVFIFCWAPFVLHVLLMTFCPS  
NPYCACYMSLQVNGMLIMCNAVIDPFIYAFRSPELRDAFKKMIFCSRYW

[00410] SEQ ID NO:97 – CNTF человека

MAFTEHSPLTPHRRDLCRSIWLARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVA  
STDQWSELTEAERLQENLQAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTPTEGDFHQAIHTLLLQVAA  
FAYQIEELMILLEYKIPRNEADGMPINVGDGGLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLR  
FISSHOTGIPARGSHYIANNKKM

[00411] SEQ ID NO:98 – рецептор CNTF альфа человека

QRHSPQEA PHVQYERLGSDVTLP CGTANWDAAVTWRVNGTDLAPDLLNGSQLVLHGL  
ELGHSGLYACFHRDSWHLRHQVLLHVGLPPREPVLSCRSNTYPKGFYCSWHLPTPTYIP  
NTFNVTVLHGSKIMVCEKDPALKNRCHIRYMHLFSTIKYKVSISVSNALGHNATAITFDE  
FTIVKPDPPENVVARPVPSNPRRLEVTWQTPSTWPDPE SFPLKFFLRYP LILDQWQHVE  
LSDGTAHTITDAYAGKEYIIQVAAKDNEIGTWSDWSVA AHATPWTEEP RHLTTEAQA A  
ETTTSTTSSLAPPPTTKICDPGELGS

[00412] SEQ ID NO:99 – стандарт GLP1

HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPA  
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
RLTVDKSRWOEGNVFSCSVMHEALHNHYTOKLSLSLGL

[00413] SEQ ID NO:100 – слитая молекула 1 на основе VHH (CNTF-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-MC6.1C22.43)

MAFTEHSPLTPHRRDLASRSIWLARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVA  
STDRWSELTEAERLQENLQAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTPTEGDFHQAHTLLLQVAA  
FAYQIEELMILLEYKIPRNEADGMPINVGDDGGLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDR  
FISSHQTGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA  
SGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM  
NSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGOGTLVTVSSPP

[00414] SEQ ID NO:101 – слитая молекула 2 на основе VHH (MC6.1C22-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-CNTF)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQMAFTEHSPLTPHRRDLASRSIWL  
ARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADGMPVASTDRWSELTEAERLQENLQAYR

TFHVLLARLLEDQQVHFTPTGDFHQAIHTLLLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPRNEADG  
MPINVGDGGLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLRFISSHQTG

[00415] SEQ ID NO:102 – слитая молекула 3 на основе VHH (NRG1-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-MC6.1C22.43)  
SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHL  
GIEFMEAEELYQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRL  
SCAASGRYIDETA VAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTL  
YLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

[00416] SEQ ID NO:103 – слитая молекула 4 на основе VHH (MC6.1C22-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-NRG1)  
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETA VAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFM  
VKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKHLGIEFMEAEELYQ

[00417] SEQ ID NO:104 – слитая молекула 5 на основе VHH (MC6.1C22-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-GDF15)  
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETA VAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLE  
DLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASY  
NPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

[00418] SEQ ID NO:105 – слитая молекула 6 на основе VHH (IL2-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-MC6.1C22.43)  
APQSSSTQQTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL  
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR  
WITFAQSIISTLTGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRL  
SCAASGRYIDETA VAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTL  
YLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

[00419] SEQ ID NO:106 – слитая молекула 7 на основе VHH (MC6.1C22-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-IL2)  
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETA VAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQAPQSSSTQQTQLQLEHLLLDLQ  
MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR  
PRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[00420] SEQ ID NO:107 – слитая молекула 8 на основе VHH (GLP1-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-MC6.1C22.43)  
HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
OGTLVTVSSPP

[00421] SEQ ID NO:108 – HC-VHH (AdaFab VHCH<sub>1</sub>-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-MC6.1C22.43)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI  
DYADSVGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGGGGQG  
GGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFR  
QAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA  
ARPGRPLITSKVADLYPYWGOGTLVTVSSPP

[00422] SEQ ID NO:109 – LC (AdaFabVLCL)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPS  
RFGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL  
TLISKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

[00423] SEQ ID NO:110 – HC (AdaFabVHCH<sub>1</sub>)

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI  
DYADSVGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD

[00424] SEQ ID NO:111 – LC-VHH (AdaFabVLCL-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-MC6.1C22.43)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQSGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGG  
GGGOEVOLLESGGGLVOPGGSRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGG

VDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLY  
PYWGQGTLLTVSSPP

[00425] SEQ ID NO:112 – VHH-HC (MC6.1C22-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-AdaFabVHCH<sub>1</sub>)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETA VAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSC  
AASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDN AKNSLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST  
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD

[00426] SEQ ID NO:113 – LC (AdaFabVLCL)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPS  
RFGSGSGGTDFLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

[00427] SEQ ID NO:114 – HC (AdaFabVHCH<sub>1</sub>)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHI  
DYADSVETRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGQTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD

[00428] SEQ ID NO:115 – VHH-LC (MC6.1C22-(G<sub>4</sub>Q)<sub>5</sub>-AdaFabVLCL)

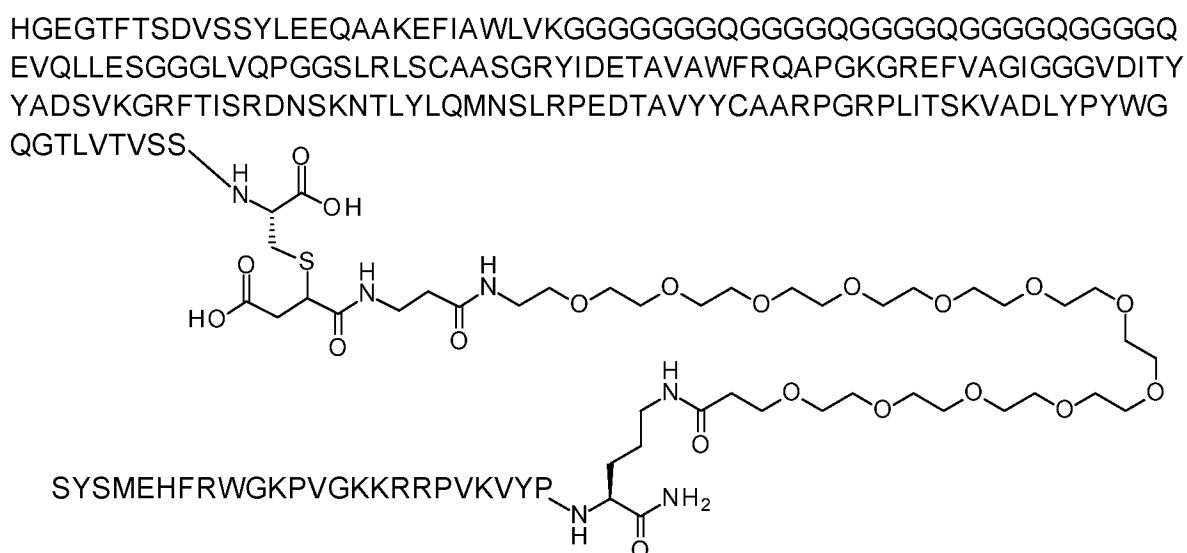
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAFAVAFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC  
RASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDV  
ATYYCQRYNRAPYTFGQG TKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLN NFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC

[00429] SEQ ID NO:116 – слитая молекула 13 на основе VHH (GLP1-MC6.1C80Cys)

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSSC

[00430] SEQ ID NO:117 – слитый конъюгат 1 на основе VHH (конъюгат GLP1-C80Cys-AKTГ)

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSSC-МАЛЕИМИД-(PEG)<sub>12</sub>-АКТГ (в направлении от С-конца к N-концу)

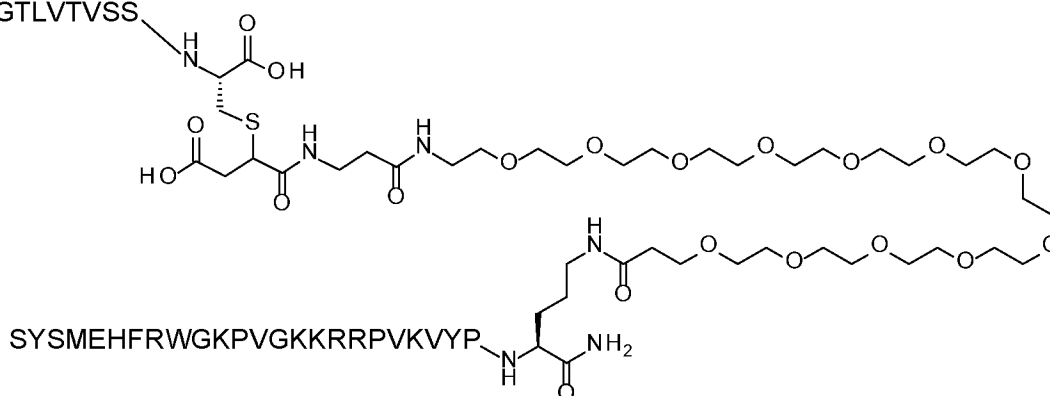


[00431] SEQ ID NO:118 – слитый конъюгат 2 на основе VHH (конъюгат MC6.1C80Cys-AKTГ)

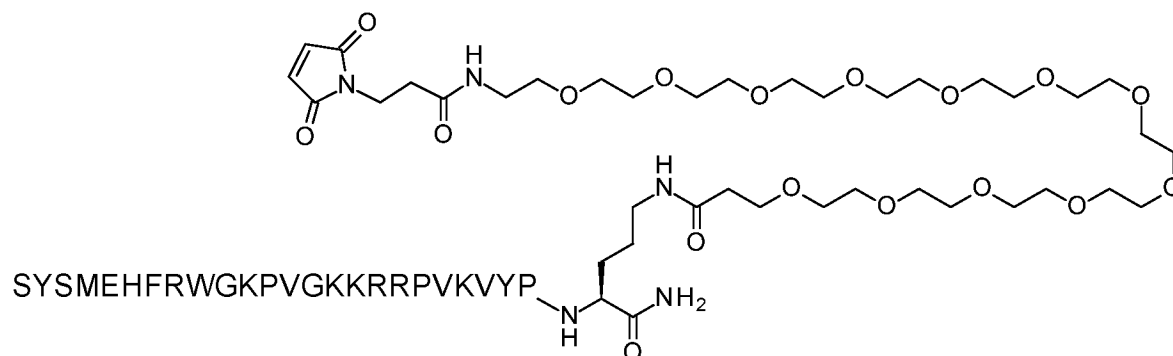
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSSC-малеимид-(PEG)<sub>12</sub>-АКТГ (в направлении от С-конца к N-концу)



EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVD  
ITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLY  
PYWGQGTLVTVSS



[00432] SEQ ID NO:119 – промежуточное вещество 1 (конъюгат АКТГ-(PEG)<sub>12</sub>-малеимид)  
SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYPK-(PEG)<sub>12</sub>-малеимид-NH<sub>2</sub>



[00433] SEQ ID NO:120 – Fab HC (AdaFabVHCH<sub>1</sub>)

EVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVS AITWNSGHI  
DYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVS YLSTASSLDYWGQGT  
LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD

[00434] SEQ ID NO:121 –Fab LC (AdaFabVLCL)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA AASTLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTL  
TL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00435] SEQ ID NO:122 – Полноразмерный GTR человека (без сигнального пептида)

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGD  
 PCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCTQFGFLT  
 V FPGNKTHNAVCPVPGSPPAEPLGWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPR  
 ETQLLLEVPPSTEDARSCQFP EEER GERSAEEKGRLGDLWV

[00436] SEQ ID NO:123 – ECD G1TR человека (без сигнального пептида)

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGD  
 PCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCTQFGFLT  
 V FPGNKTHNAVCPVPGSPPAE

[00437] SEQ ID NO:124 – фрагмент VHH 38 (MC6.1C90Cys)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGARPGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSSC

[00438] SEQ ID NO:125 – фрагмент VHH 39 (MC6.1C90.43)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGARPGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSSPP

[00439] SEQ ID NO:126 – фрагмент VHH 40 (MC6.1C95.43)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGTRPGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSSPP

# ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-37 и 124-126, или обладающую по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ними.

2. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

3. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:2) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

4. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:3) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

5. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:4) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

6. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREF TAGIGGSVDITY YLDSVKGRFTISKDNTKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG QGTQVTVSS (SEQ ID NO:5) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

7. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:6) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

8. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:7) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

9. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:8) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

10. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:9) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

11. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDET  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW  
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

12. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDQT  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW

GQGLTLTVSS (SEQ ID NO:11) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

13. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITA  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGLTLTVSS (SEQ ID NO:12) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

14. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGV3DIT  
EYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW  
GQGLTLTVSS (SEQ ID NO:13) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

15. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITQ  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGLTLTVSS (SEQ ID NO:14) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

16. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITS  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGLTLTVSS (SEQ ID NO:15) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

17. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITT  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGLTLTVSS (SEQ ID NO:16) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

18. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:17) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

19. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:18) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

20. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:19) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

21. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:20) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

22. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRQLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:21) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

23. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:22) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

24. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:23) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

25. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:24) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

26. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:25) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

27. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:26) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

28. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:27) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

29. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATRPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:28) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

30. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARQGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSS (SEQ ID NO:29) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
 сходством с ней.

31. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATRQGRPLITSKVADLYPYWG  
 QGTLVTVSS (SEQ ID NO:30) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
 сходством с ней.

32. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSQVADLYPYWG  
 QGTLVTVSS (SEQ ID NO:31) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
 сходством с ней.

33. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQADLYPYWG  
 QGTLVTVSS (SEQ ID NO:32) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
 сходством с ней.

34. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVAELYPYWG  
 QGTLVTVSS (SEQ ID NO:33) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
 сходством с ней.

35. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVASLYPYWGQ



GTLVTVSS (SEQ ID NO:34) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

36. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQAE LYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:35) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

37. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKQAS LYPYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO:36) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

38. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVAD LYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:37) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

39. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGARPGRPLITSKVAD LYPYWG  
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:124) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

40. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGARPGRPLITSKVAD LYPYWG  
QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:125) или обладает по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ней.

41. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность представляет собой:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCGTRPGRPLITSKVADLYPYWG  
QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:126) или обладает по меньшей мере приблизительно 90%  
сходством с ней.

42. Соединение, содержащее структуру:

M-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-M,  
M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M,  
X<sub>1</sub>-M-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-M-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,  
X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,  
M-L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>,  
M-L<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>,  
X<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-M или  
X<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-M,

где M представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 124, 125 и 126, или обладающую по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ними,

где X<sub>1</sub> представляет собой первое биотерапевтическое средство,

где X<sub>2</sub> (если присутствует) представляет собой второе биотерапевтическое средство,

где L<sub>1</sub> (если присутствует) представляет собой первый линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GGGGQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:38), (GGGQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:39), (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:40), (PGPQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:41), (PGPA)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:42), (GGGG(AP)<sub>n</sub>GGGG) (SEQ ID NO:43), (GGE)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:44), (GGGGGE)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:45), (GGK)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:46), (GGGGK)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:47), (GGGG(EP)<sub>n</sub>GGGG) (SEQ ID NO:48), (GGGG(KP)<sub>n</sub>GGGG) (SEQ ID NO:49), (PGPE)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:50) и (PGPK)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:51), где n может составлять от 1 до 10, и

где  $L_2$  (если присутствует) представляет собой второй линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:64 и 65, или обладающую по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ними.

43. Соединение по п. 42, где первое биотерапевтическое средство представляет собой пептид, белок или олигомер.

44. Соединение по п. 42 или п. 43, где второе биотерапевтическое средство представляет собой пептид, белок или олигомер.

45. Соединение по любому из пп. 42-44, где первое биотерапевтическое средство и второе биотерапевтическое средство отличаются друг от друга.

46. Соединение по любому из пп. 42-45, где  $L_1$  имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:52-63, или обладающую по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ними.

47. Соединение по любому из пп. 42-46, где первое биотерапевтическое средство и/или второе биотерапевтическое средство представляет собой пептид или белок, такой как антитело (Ab) или его фрагмент, аденокортикотропный гормон (АКТГ), фактор роста/дифференцировки 15 (GDF15), инкретин (INC), инсулин (INS), интерлейкин (IL), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейрегулин (NRG) или релаксин (RLN).

48. Соединение по п. 47, где пептид или белок представляет собой INC.

49. Соединение по п. 48, где INC выбран из группы, состоящей из глюкозозависимого инсулиноотропного пептида (GIP), глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и GIP/GLP-1.

50. Соединение по п. 47, где пептид или белок представляет собой IL, и где IL представляет собой IL-2.

51. Соединение по п. 47, где пептид или белок представляет собой NRG, и где NRG представляет собой нейрегулин-1 (NRG1) или нейрегулин-4 (NRG4).

52. Соединение по п. 47, где пептид или белок представляет собой RLN, и где RLN представляет собой релаксин-2 (RLN2).
53. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 42-52 и фармацевтически приемлемый буфер.
54. Фармацевтическая композиция по п. 53, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент.
55. Способ лечения индивидуума, включающий этап введения указанному индивидууму эффективного количества соединения по любому из пп. 42-52 или фармацевтической композиции по п. 53 или п. 54.
56. Соединение по любому из пп. 1-41 для применения для увеличения  $t_{1/2}$  биотерапевтического средства.
57. Соединение по любому из пп. 42-52 для применения в терапии.
58. Соединение по любому из пп. 42-52 для применения при лечении сердечно-сосудистых, неврологических, иммунологических, метаболических, онкологических, психологических, легочных и/или почечных состояний, заболеваний и/или нарушений.
59. Применение соединения по любому из пп. 42-52 для производства лекарственного средства.
60. Соединение, содержащее любую из последовательностей SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 или 118, или последовательность, обладающую по меньшей мере приблизительно 90% сходством с ними.
61. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 60 и фармацевтически приемлемый буфер.
62. Фармацевтическая композиция по п. 61, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент.

63. Способ лечения индивидуума, включающий этап введения указанному индивидууму эффективного количества соединения по п. 60 или фармацевтической композиции по п. 61 или п. 62.
64. Соединение по п. 60 для применения в терапии.
65. Соединение по п. 60 для применения при лечении сердечно-сосудистых, неврологических, иммунологических, метаболических, онкологических, психологических, легочных и/или почечных состояний, заболеваний и/или нарушений.
66. Применение соединения по п. 60 для производства лекарственного средства.