



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020021562-7 A2



(22) Data do Depósito: 24/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 02/03/2021

(54) **Título:** CONJUGADOS DE PEPTÍDEO TIROSINA TIROSINA CÍCLICO ACOPLADO AO PEPTÍDEO DE FUSÃO SEMELHANTE AO PEPTÍDEO GLUCAGON-1 (GLP-1) E USOS DOS MESMOS

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

(30) **Prioridade Unionista:** 25/04/2018 US 62/662,313; 25/04/2018 US PCT/US2018/029284.

(71) **Depositante(es):** JANSSEN PHARMACEUTICA N.V..

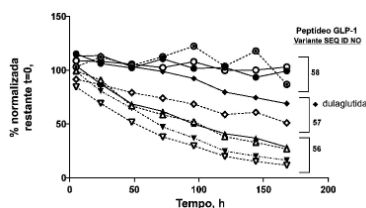
(72) **Inventor(es):** YUE-MEI ZHANG; RAUL CAMACHO; MARTIN A. CASE; ELLEN CHI; SUZANNE EDAVETAL; WILSON EDWARDS; LISA NORQUAY; MARK J. WALL; RUI ZHANG; SONGMAO ZHENG.

(86) **Pedido PCT:** PCT IB2019053384 de 24/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/207505 de 31/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 21/10/2020

(57) **Resumo:** CONJUGADOS DE PEPTÍDEO TIROSINA TIROSINA CÍCLICO ACOPLADO AO PEPTÍDEO DE FUSÃO SEMELHANTE AO PEPTÍDEO GLUCAGON-1 (GLP-1) E USOS DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a conjugados compreendendo um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico. A invenção também se refere a composições farmacêuticas e métodos para uso das mesmas. Os conjugados são úteis para prevenção, tratamento ou alívio de doenças e distúrbios apresentados na presente invenção.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CONJUGADOS DE PEPTÍDEO TIROSINA TIROSINA CÍCLICO ACOPLADO AO PEPTÍDEO DE FUSÃO SEMELHANTE AO PEPTÍDEO GLUCAGON-1 (GLP-1) E USOS DOS MESMOS"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

[0001] Este pedido reivindica a prioridade para o Pedido PCT US nº PCT/US2018/029284, depositado em 25 de abril de 2018 e para o pedido de patente provisório US nº 62/662.313 depositado em 25 de abril de 2018. Cada revelação é aqui integralmente incorporada a título de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção se refere, de modo geral, a conjugados de peptídeo tirosina tirosina cíclico (PYY) acoplado ao peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), que são moduladores do receptor de neuropeptídeo Y2 e do receptor de GLP-1. A invenção também se refere a composições farmacêuticas e métodos para uso das mesmas. Os conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 são úteis para prevenir, tratar ou aliviar doenças e distúrbios, como obesidade, diabetes tipo 2, síndrome metabólica, resistência à insulina e dislipidemia, entre outras.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS SUBMETIDA ELETRONICAMENTE

[0003] Este pedido contém uma listagem de sequências, que foi submetida eletronicamente via EFS-Web sob a forma de uma listagem de sequências em formato ASCII cujo nome de arquivo é "PRD3465 Sequence Listing" e que foi criada no dia 2 de abril de 2019, e com 409 kb de tamanho. A listagem de sequências submetida via EFS-Web faz parte do relatório descritivo e está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade. No caso de qualquer inconsistência em relação às estruturas para as SEQ ID NOs: 225 a 262 entre as informações

descritas aqui e a listagem de sequências submetida eletronicamente via EFS-Web com um nome de arquivo de "PRD3465 Sequence Listing", prevalecerão as informações aqui contidas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0004] Os receptores de Neuropeptídeo Y (NPY) são ativados por um grupo de agonistas do peptídeo intimamente relacionados denominado "família NPY" que têm diferentes afinidades por cada subtipo de receptor. O NPY, o peptídeo tirosina-tirosina (PYY) e o polipeptídeo pancreático (PP), todos com 36 aminoácidos de comprimento, são agonistas para a família de receptores de NPY. O NPY é um neurotransmissor, sintetizado, coarmazenado e liberado com norepinefrina e epinefrina. O NPY é um dos peptídeos mais abundantes e amplamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC) de seres humanos e roedores e é expresso em áreas do cérebro relacionadas à alimentação e estresse. No sistema nervoso periférico, os neurônios contendo NPY são predominantemente simpáticos. O PYY é predominantemente sintetizado e liberado pelas células endócrinas intestinais. A clivagem de NPY e PYY pela serina protease endotelial, dipeptidil-peptidase IV (DPP IV), gera NPY₃₋₃₆ e PYY₃₋₃₆ que são ligantes seletivos para os subtipos Y2 e Y5 da família de receptores de NPY. O PP é encontrado principalmente em células das ilhotas pancreáticas distintas daquelas que armazenam insulina, glucagon ou somatostatina.

[0005] Cinco receptores de NPY distintos foram identificados até o momento, quatro dos quais são entendidos como relevantes para a fisiologia humana. Os receptores Y1, Y2 e Y5 se ligam, de preferência, a NPY e PYY, enquanto que o receptor Y4 se liga, de preferência, a PP. Os receptores Y2 e Y5 são também potentemente ativados por NPY₃₋₃₆ e PYY₃₋₃₆. Em geral, a família NPY de ligantes possui seletividade variável para cada uma das isoformas de receptor NPY, sendo o PYY₃₋₃₆ anteriormente relatado por ter seletividade de modesta a robusta para a

isoforma de Y2. Cada um desses receptores é acoplado à inibição da adenilato ciclase via G α i sensível à toxina pertussis.

[0006] PYY é secretada de células L endócrinas em resposta a alimentos, e em particular após ingestão de gordura. PYY₁₋₃₆ predomina em jejum, com PYY₃₋₃₆ sendo a principal forma encontrada pós prandialmente em seres humanos, com concentrações plasmáticas negativamente correlacionadas com o número de calorias consumidas. Foi demonstrado que o PYY₃₋₃₆ reduz a ingestão de alimentos em seres humanos, macacos, ratos, coelhos e camundongos (Batterham et al., *Nature* 418(6898):650-4 (2002); Batterham et al. *N Engl J Med* 349(10):941-8 (2003); Challis et al., *Biochem Biophys Res Commun* 311(4):915-9 (2003)). Acredita-se que os efeitos anorexigênicos do PYY₃₋₃₆ sejam mediados por Y2, com base na ligação preferencial nesse receptor e na perda de eficácia de alimentação em camundongos com deficiência de Y2 (Batterham et al., *Nature* 418(6898): 650-4/2002)). A injeção intra-arqueada de PYY₃₋₃₆ reduz a ingestão de alimentos em ratos e camundongos (Batterham et al., *Nature* 418(6898):650-4 (2002)), sugerindo que o acoplamento dos receptores Y2 hipotalâmicos possa mediar esses efeitos. Foi demonstrado que os efeitos agudos sobre a alimentação também se traduzem em efeitos dose-dependentes sobre o peso corporal em camundongos ob/ob, camundongos DIO (DIO - "diet-induced obesity" - obesidade induzida por dieta) e camundongos Zucker fa/fa (Pittner et al., *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(8):963-71(2004)). Além disso, o PYY₃₋₃₆ também demonstrou melhorar a eliminação de glicose mediada por insulina e a sensibilidade à insulina em roedores sob DIO (Vrang et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(2); R367-75/2006)). A cirurgia bariátrica resulta em aumento da imunorreatividade ao PYY circulante (le Roux et al., *Ann Surg* 243(1):108-14 (2006)), que parece desempenhar uma função na perda de peso pós-operatória.

[0007] Dado o seu papel no controle do apetite e ingestão de alimentos bem como seus efeitos antissecretórios e de pró-absorção no trato gastrointestinal em mamíferos, o PYY₃₋₃₆ pode ser eficaz no tratamento da obesidade e condições associadas bem como em uma série de distúrbios gastrointestinais. Entretanto, a utilidade terapêutica do próprio PYY₃₋₃₆ como um agente de tratamento é limitada pelo seu rápido metabolismo e meia vida circulante curta resultante (Torang et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 310:R866 a R874 (2016)).

[0008] O hormônio incretina, GLP-1 e a ativação de seu receptor (GLP1R), têm uma série de efeitos benéficos sobre o metabolismo da glicose e o equilíbrio energético em seres humanos, incluindo a estimulação da secreção de insulina dependente de glicose (Kreymann et al., Lancet 2:1300-1304 (1987)), bem como a inibição da secreção de glucagon (Gutniak et al., N Engl J Med 326:1316-1322 (1992)), o esvaziamento gástrico (Wettergren et al., Digestive Diseases Sciences 38:665-673 (1993)), e a ingestão de alimentos (Flint et al., JCI 101:515-520 (1998)). Também foi demonstrado que os agonistas de GLP1R reduzem significativamente o risco de desfechos cardiovasculares e microvasculares (Marso et al., N Engl J Med 375(4):311-322 (2016)) e de doença renal (Mann et al., N Engl J Med 377(9):839-848 (2017)) em pacientes com diabetes tipo 2. O GLP-1 é caracterizado por uma meia-vida curta, o que torna impraticável seu uso como um potencial terapêutico. A meia-vida circulante é limitada tanto pela suscetibilidade proteolítica da dipeptidil peptidase IV (Zhu, L. et al., JBC 278:22418-22423 (2003)) quanto pela endopeptidase neutra (Hupe-Sodmann et al., Regul Pept 58(3): 149-156 (1995)), bem como pela filtração renal (Ruiz-Grande et al., Can J Physiol Pharmacol 68(12):1568-1573 (1990)).

[0009] Dessa forma, é desejável obter um análogo de PYY ou derivado do mesmo e/ou um análogo de GLP-1 ou derivado do mesmo com estabilidade metabólica e perfil farmacocinético otimizados em relação

ao PYY₃₋₃₆ e/ou ao GLP-1, respectivamente. Esses derivados, com uma meia-vida prolongada *in vivo*, proporcionariam a modulação do receptor de Y2 e/ou de GLP-1 com maior duração de ação, os tornando adequados como agentes terapêuticos para indivíduos que precisam dessa modulação.

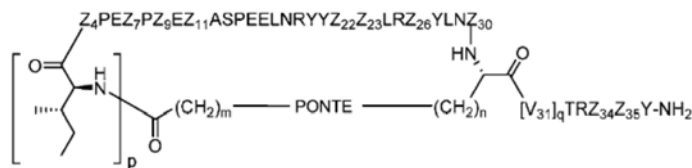
[0010] A discussão supracitada é apresentada apenas para fornecer uma melhor compreensão da natureza dos problemas enfrentados na técnica e não deve ser interpretada de qualquer forma como uma admissão de técnica anterior nem a citação de qualquer referência aqui deve ser interpretada como uma admissão de que tal referência constitui "técnica anterior" ao presente pedido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] Em um aspecto geral, a invenção se refere a conjugados de peptídeo tirosina tirosina (PYY) cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), que são moduladores do receptor de neuropeptídeo Y2 e do receptor de GLP-1.

[0012] São aqui fornecidos conjugados que compreendem um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende um GLP-1 ou um peptídeo variante de GLP-1, um primeiro peptídeo ligante, um peptídeo da região de dobradiça-Fc, e um segundo peptídeo ligante, em que o primeiro ligante está opcionalmente ausente.

[0013] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou um derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula I

em que:

p é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,
-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z₄ é K, A, E, S ou R;

Z₇ é A ou K;

Z₉ é G ou K;

Z₁₁ é D ou K;

Z₂₂ é A ou K;

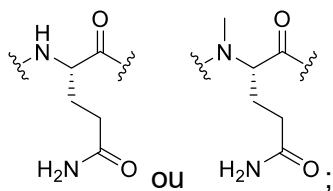
Z₂₃ é S ou K;

Z₂₆ é A ou H;

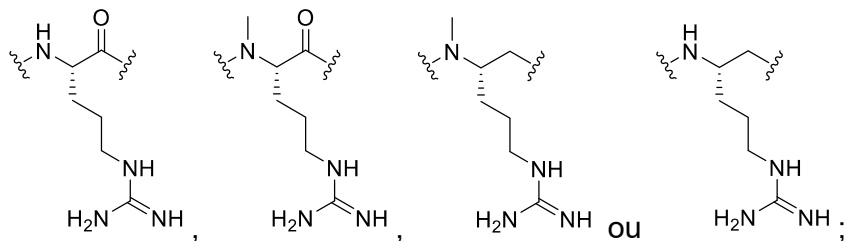
Z₃₀ é L, W, ou está ausente;

desde que Z₃₀ esteja ausente apenas quando q for 1;

Z₃₄ é



Z₃₅ é



em que o derivado é o composto de Fórmula I que é modificado por um ou mais processos selecionados do grupo que consiste em amidação, acilação e PEGuilação.

[0014] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

p é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

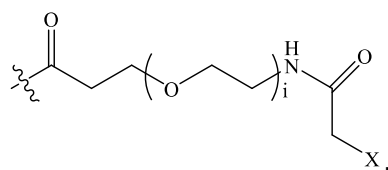
n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z₄ é K, A, E, S ou R;

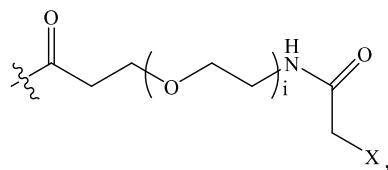
Z₇ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e X = Br, I ou Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I ou -C(O)CH₂Cl;

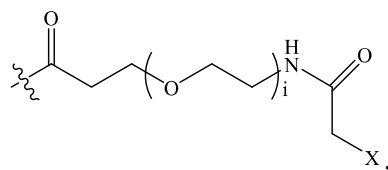
Z₉ é G ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e X = Br, I ou Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I ou -C(O)CH₂Cl;

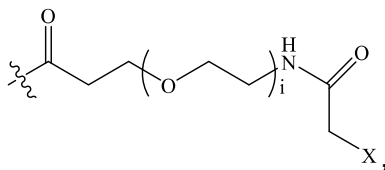
Z₁₁ é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

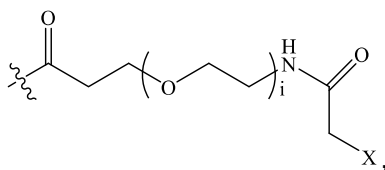
Z_{22} é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

Z_{23} é S ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



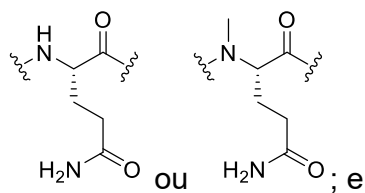
em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

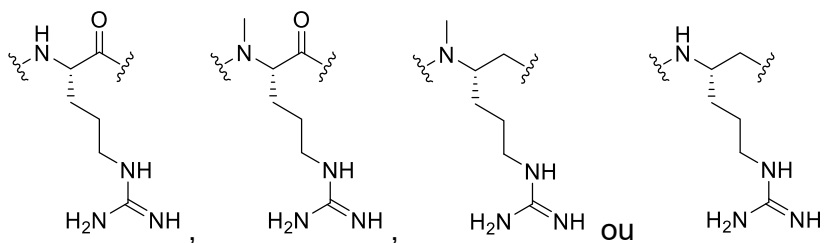
Z_{26} é A ou H;

Z_{30} é L;

Z_{34} é



Z_{35} é



[0015] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3 ou 5;

n é 1, 2 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q possa ser 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -
(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z₄ é K, A, E, S ou R;

Z₇ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por

-C(O)CH₂Br,

Z₉ é G ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por

-C(O)CH₂Br,

Z₁₁ é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por

-C(O)CH₂Br,

Z₂₂ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por

-C(O)CH₂Br,

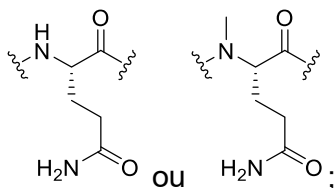
Z₂₃ é S ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por

-C(O)CH₂Br,

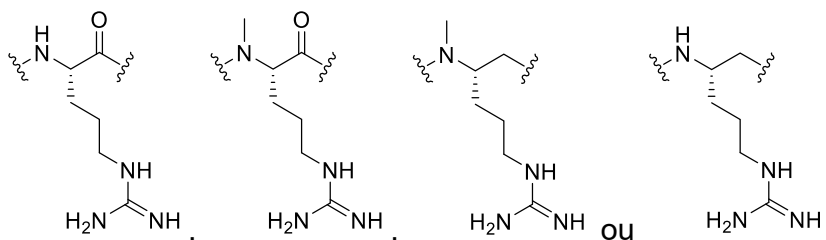
Z₂₆ é A ou H;

Z₃₀ é L,

Z₃₄ é



Z₃₅ é



[0016] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 54, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é selecionado dentre as SEQ ID NOs: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 ou 34.

[0017] Em certas modalidades, o peptídeo de fusão de GLP-1 está covalentemente ligado ao peptídeo PYY cíclico em um resíduo de lisina do peptídeo PYY cíclico. Em certas modalidades, apenas um dentre Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ e Z₂₃ na Fórmula I é lisina, e a lisina está covalentemente ligada a um resíduo de cisteína no segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1.

[0018] Em certas modalidades, o peptídeo GLP-1 do peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56 a 59. Em certas modalidades, o primeiro peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 60 a 83. Em certas modalidades, o peptídeo da região de dobradiça-Fc do peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 84 a 90. Em certas modalidades, o segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada

do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 91 a 112. Em certas modalidades, o segundo peptídeo ligante compreende uma sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 93, 94, 95, 106 ou 111.

[0019] Também são fornecidos conjugados compreendendo um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 113 a 224 e 267 a 274, e em que o peptídeo PYY cíclico compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre as SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33, ou 34. Em certas modalidades, o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113 ou da SEQ ID NO:136. Em certas modalidades, um resíduo de cisteína entre os resíduos de aminoácido 287 a 289 da SEQ ID NO:113 ou da SEQ ID NO:136, de preferência o resíduo de cisteína 288 da SEQ ID NO:113 ou da SEQ ID NO:136 está covalentemente ligado a um resíduo de lisina no resíduo 7, 9, 11, 22, ou 23 do peptídeo cíclico PYY, de preferência o resíduo de lisina 11 do peptídeo cíclico PYY, diretamente ou por meio de um ligante químico.

[0020] São também fornecidos conjugados que compreendem um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o conjugado compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 225 a 262 ou um seu sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[0021] Também são fornecidos métodos de produção dos conjugados da invenção. Os métodos compreendem reagir um eletrófilo, de preferência, bromoacetamida ou maleimida, introduzido em uma cadeia lateral do peptídeo PYY cíclico, de preferência, a cadeia lateral de um resíduo de lisina do peptídeo PYY cíclico, com o grupo sulfidrílico de um resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante (por exemplo, o peptídeo ligante com terminação carboxila) de um peptídeo de fusão

de GLP-1, criando desse modo uma ligação covalente entre o peptídeo PYY cíclico e o peptídeo de fusão de GLP-1.

[0022] São fornecidas aqui composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0023] Também são fornecidos métodos para o tratamento ou a prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que a dita doença ou distúrbio é obesidade, diabetes tipo I ou tipo II, síndrome metabólica, resistência à insulina, tolerância à glicose deficiente, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglicemia devido ao hiperinsulinismo congênito (CHI), dislipidemia, aterosclerose, nefropatia diabética, e outros fatores de risco cardiovascular como hipertensão e fatores de risco cardiovascular relacionados aos níveis de colesterol e/ou de lipídios não controlados, osteoporose, inflamação, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH), doença renal, e eczema. Os métodos compreendem a administração ao indivíduo em necessidade da mesma de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica da invenção.

[0024] Também são fornecidos métodos para reduzir ao menos um dentre a ingestão de alimentos ou o peso corporal em um indivíduo em necessidade do mesmo. Os métodos compreendem a administração ao indivíduo em necessidade da mesma de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica da invenção.

[0025] Também são fornecidos métodos de modulação da atividade do receptor Y2 ou do receptor de GLP-1 em um indivíduo em necessidade da mesma. Os métodos compreendem a administração ao indivíduo em necessidade da mesma de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica da invenção.

[0026] Em certas modalidades, a composição farmacêutica é administrada por meio de uma injeção.

[0027] Também são fornecidos kits compreendendo os compostos da invenção, de preferência, compreendendo adicionalmente uma liraglutida e um dispositivo para injeção.

[0028] Também são fornecidos métodos de produção das composições farmacêuticas da invenção. Os métodos compreendem combinar o conjugado com um veículo farmacêuticamente aceitável para obter a composição farmacêutica.

[0029] Aspectos, características e vantagens adicionais da presente invenção serão melhor apreciados mediante a leitura da seguinte descrição detalhada da invenção e das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0030] O sumário supracitado, bem como a descrição detalhada a seguir das modalidades preferenciais do presente pedido, serão mais bem entendidos quando lidos em conjunto com os desenhos em anexo. Deve-se compreender, no entanto, que o pedido de patente não se limita às modalidades precisas mostradas nos desenhos.

[0031] As Figuras 1A-1B mostram a estabilidade plasmática humana *ex vivo* de porções do peptídeo de fusão de GLP-1. A Figura 1A mostra um gráfico que demonstra a estabilidade plasmática humana *ex vivo* de peptídeos de fusão de GLP-1 GF32 (SEQ ID NO 144) (▲), GF36 (148) (△), GF33 (145) (▼), GF39 (151) (▽), GF34 (146) (⊙), GF35 (147) (●), GF37 (149) (○), GF40 (152) (◇), e de um controle de dula-glutida (◆) incubado em plasma humano a 37°C durante 7 dias. A Figura 1B mostra um gráfico que demonstra a estabilidade plasmática humana *ex vivo* de GF40 (SEQ ID NO:152) (▲) e GF34 (SEQ ID NO:146) (●), e seus correspondentes conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:248 (△) e SEQ ID NO:262 (○), e um outro peptídeo de fusão de GLP-1 GF41 (SEQ ID

NO:153) (▼) incubado em plasma humano *ex vivo* a 37°C durante 7 dias juntamente com um controle de dilaglutida (◇).

[0032] As **Figuras 2A-2B** mostram a ingestão de alimentos e a perda de peso corporal em camundongos DIO. As Figuras 2A e 2B mostram gráficos da ingestão de alimentos (Figura 2A) e da porcentagem de perda de peso corporal (Figura 2B) em camundongos DIO tratados com dulaglutida, composto 1 (GF1 (SEQ ID NO:113)) (0,3 nmol/kg), e composto 2 (SEQ ID NO:225) (0,3 nmol/kg). Os camundongos receberam injeção subcutânea de veículo (círculos brancos), dulaglutida (quadrados brancos), composto 1 (quadrados pretos), ou composto 2 (círculos pretos), e o peso corporal e a ingestão de alimentos foram registrados durante 3 dias.

[0033] As **Figuras 3A-3B** mostram a ingestão de alimentos e a perda de peso corporal em camundongos DIO. As Figuras 3A e 3B mostram gráficos de ingestão de alimentos (Figura 3A) e a porcentagem de perda de peso corporal (Figura 3B) em camundongos DIO tratados com dulaglutida, composto 3 (GF24 (SEQ ID NO:136)) (0,3 nmol/kg), e composto 4 (SEQ ID NO:229) (0,3 nmol/kg). Os camundongos receberam injeção subcutânea de veículo (círculos brancos), dulaglutida (quadrados brancos), composto 3 (quadrados pretos), ou composto 4 (círculos pretos), e o peso corporal e a ingestão de alimentos foram registrados durante 3 dias.

[0034] As **Figuras 4A a 4B** mostram IPGTT em camundongos DIO. A Figura 4A mostra um gráfico dos níveis de glicose ao longo do tempo em camundongos DIO tratados com dulaglutida, composto 4 (SEQ ID NO:229) e composto 2 (SEQ ID NO:225) a 0,3 nmol/kg e 1,0 nmol/kg. A Figura 4B mostra um gráfico da área sob a curva líquida (NET AUC) em relação à linha de base em camundongos DIO tratados com dulaglutida, composto 4 (SEQ ID NO:229) e composto 2 (SEQ ID NO:225) a 0,3 nmol/kg e 1,0 nmol/kg. Os camundongos receberam injeção subcutânea de veículo (círculos pretos), dulaglutida (quadrados brancos/preto), composto 4 (triângulos brancos/preto), ou composto 2

(círculos brancos/pretos, linha pontilhada). Todos os compostos foram dosados a 0,3 ou 1,0 nmol/kg. Após jejum de 18 horas, os camundongos receberam 1 g/kg de dextrose para um teste de tolerância à glicose (TTGIP).

[0035] As **Figuras 5A-5B** mostram a ingestão de alimentos e a perda de peso corporal em camundongos DIO. As Figuras 5A e 5B mostram gráficos de ingestão de alimentos (Figura 5A) e a porcentagem de perda de peso corporal (Figura 5B) em camundongos DIO tratados com dulaglutida, GF41 (SEQ ID NO:153) (0,3 nmol/kg), e GF40 (SEQ ID NO:152) (0,3 nmol/kg). Os camundongos receberam injeção subcutânea de veículo (círculos brancos), dulaglutida (quadrados brancos), SEQ ID NO:153 (quadrados pretos), ou SEQ ID NO:152 (círculos pretos), e o peso corporal e a ingestão de alimentos foram registrados durante 3 dias.

[0036] As **Figuras 6A-6B** mostram a ingestão de alimentos e a perda de peso corporal em camundongos DIO. As Figuras 6A e 6B mostram gráficos da ingestão de alimentos (Figura 6A) e a porcentagem de perda de peso corporal (Figura 6B) em camundongos DIO tratados com dulaglutida e GF19 (SEQ ID NO:131) (0,3 nmol/kg). Os camundongos receberam injeção subcutânea de veículo (círculos brancos), dulaglutida (quadrados brancos), ou SEQ ID NO:131 (quadrados pretos), e o peso corporal e a ingestão de alimentos foram registrados durante 3 dias.

[0037] As **Figuras 7A e 7B** mostram o IPGTT em camundongos DIO. A Figura 7A mostra um gráfico dos níveis de glicose ao longo do tempo em camundongos DIO tratados com dulaglutida, composto 4 (SEQ ID NO:229) e composto 3 (GR24 (SEQ ID NO:136)) a 0,3 nmol/kg. A Figura 7B mostra um gráfico da área sob a curva líquida (NET AUC) em relação à linha de base em camundongos DIO tratados com dulaglutida, composto 4 (SEQ ID NO:229) e composto 3 (GR24 (SEQ ID NO:136)) a 0,3 nmol/kg. Os camundongos receberam injeção subcutânea de veículo (círculos pretos), dulaglutida (quadrados brancos), composto 4 (círculos

brancos), ou composto 3 (quadrados pretos, linha pontilhada). Todos os compostos foram dosados a 0,3 nmol/kg. Após jejum de 18 horas, os camundongos receberam 1 g/kg de dextrose para um teste de tolerância à glicose (TTGIP).

[0038] As **Figuras 8A-8B** mostram a análise da resposta à exposição do composto 4 (SEQ ID NO:229) ou da dulaglutida na alteração da ingestão de alimentos e de peso após uma dose única em camundongos DIO. As Figuras 8A e 8B mostram gráficos de alteração na porcentagem de ingestão de alimentos (Figura 8A) e alteração na porcentagem de peso corporal (Figura 8B). Os quadrados abertos representam os dados individuais observados para a dulaglutida. Os quadrados sólidos representam os dados individuais observados para o composto 4. As linhas curvas representam as curvas de melhor ajuste com base na regressão não linear de resposta à exposição para dulaglutida (curva cinza) e para o composto 4 (curva preta). A linha vertical cinza representa a média de dulaglutida ($\pm$ desvio padrão) nas concentrações de HGE do dia 3 a 0,3 nmol/kg em todos os estudos analisados: $\approx 0,32 (\pm 0,15)$ nM.

[0039] As **Figuras 9A-9B** mostram a análise de resposta à exposição do composto 4 (símbolos pretos) ou de dulaglutida (quadrados brancos) para determinar o efeito sobre a ingestão calórica em macacos cynomolgus com sobrepeso no dia 9 (pré-dose) e no dia 12 (pré-dose) após dosagem subcutânea (SC) de repetição (4, Q3D) (Q3D = a cada 3 dias). As concentrações de GLP-1 ativo foram medidas tanto pelo ensaio de ligação de ligante (LBA) (Figura 9A) como por ensaios de LC/MS/MS HE (Figura 9B). As linhas curvas representam as curvas de melhor ajuste com base na regressão não linear de resposta à exposição para dulaglutida (curva cinza) e para o composto 4 (curva preta). Os dados do composto 4 dosado a 0,0074 mg/kg não foram

incluídos na análise de resposta à exposição, mas estão incluídos apenas no gráfico. A porcentagem de alteração da ingestão calórica diária foi calculada em relação à linha de base, que foi definida como a média dos dias -2 a 0.

[0040] As **Figuras 10A-10B** mostram a ingestão de alimentos (FI = "food intake") em gramas (Figura 10A) e porcentagem de alteração de peso corporal (BW = "body weight") (Figura 10B) em camundongos DIO tratados com veículo, dulaglutida (0,3 nmol/kg), ou SEQ ID NO:140 (0,3 nmol/kg). Um dia antes do estudo, os camundongos foram pesados e agrupados de acordo com o peso corporal. Os camundongos receberam injeção subcutânea (2 ml/kg) de veículo (círculos brancos), dulaglutida (quadrados brancos), ou SEQ ID NO 140 (quadrados pretos), e o peso corporal (BW) e a ingestão de alimentos (FI) foram registrados durante os 3 dias seguintes.

[0041] As **Figuras 11A-11B** mostram a ingestão de alimentos (FI) em gramas (Figura 11A) e a porcentagem de alteração de peso corporal (BW) (Figura 11B) em camundongos DIO tratados com veículo, dulaglutida (0,3 nmol/kg), SEQ ID NO:131 (0,3 nmol/kg), ou SEQ ID NO:251 (0,3 nmol/kg). Um dia antes do estudo, os camundongos foram pesados e agrupados de acordo com o peso corporal. Os camundongos receberam injeção subcutânea (2 ml/kg) de veículo (círculos brancos), dulaglutida (quadrados brancos), SEQ ID NO:131 (quadrados pretos), ou SEQ ID NO:251 (círculos pretos), e o BW e a FI foram registrados durante os 3 dias seguintes.

[0042] A **Figura 12** mostra um gráfico que demonstra os resultados de um ensaio de triagem primária de GLP-1R humano comparando o peptídeo GLP-1 (SEQ ID NO:58) com os primeiros peptídeos ligantes de comprimento diferente (peptídeos ligantes N-terminais). A SEQ ID NO:171 contendo o primeiro peptídeo ligante mais longo (SEQ ID NO:67) (▼), foi a mais potente, seguida por peptídeos de fusão de

GLP-1 com primeiros peptídeos ligantes mais curtos, isto é, a SEQ ID NO:169 com o primeiro peptídeo ligante SEQ ID NO 64 (▲) e a SEQ ID NO 168 com o primeiro peptídeo ligante SEQ ID NO 74 (■). A SEQ ID NO 167, que não tem um primeiro peptídeo ligante interveniente entre o peptídeo GLP e o peptídeo na dobradiça-Fc (●) foi a menos potente. O peptídeo GLP-1 (◆) foi incluído como um controle de ensaio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0043] Várias publicações, artigos e patentes são citados ou descritos em segundo plano e ao longo do relatório descritivo; cada uma dessas referências está aqui incorporada por referência em sua totalidade. A discussão de documentos, atos, materiais, dispositivos, artigos ou similares que tenha sido incluída no presente relatório descritivo tem o propósito de fornecer contexto para a invenção. Tal discussão não é uma admissão de que qualquer um ou todos esses assuntos façam parte da técnica anterior no que diz respeito a quaisquer invenções reveladas ou reivindicadas.

[0044] Exceto onde definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados na presente invenção têm o mesmo significado como comumente compreendido pelo versado na técnica à qual essa invenção pertence. De outro modo, certos termos utilizados na presente invenção têm os significados como definidos no relatório descritivo.

[0045] Deve-se observar que, conforme usado na presente invenção e nas reivindicações em anexo, as formas no singular "um/uma" e "o/a" incluem a referência no plural, salvo se o contexto claramente indicar o contrário.

[0046] Exceto onde especificado de outra forma, quaisquer valores numéricos, como uma concentração ou uma faixa de concentração aqui descrita, deve ser entendido como sendo modificado em todos os casos pelo termo "cerca de". Dessa forma, um valor numérico tipicamente inclui

$\pm 10\%$ do valor mencionado. Por exemplo, uma concentração de 1 mg/ml inclui 0,9 mg/ml a 1,1 mg/ml. De modo semelhante, uma faixa de concentração de 1% a 10% (p/v) inclui 0,9% (p/v) a 11% (p/v). Como usado na presente invenção, o uso de uma faixa numérica inclui expressamente todas as subfaixas possíveis, todos os valores numéricos individuais dentro dessa faixa, incluindo números inteiros dentro dessas faixas, e frações dos valores, a menos que o contexto indique claramente de outro modo.

[0047] Exceto onde indicado em contrário, o termo "ao menos" anterior a uma série de elementos deve ser entendido como se referindo a cada elemento na série. Os versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar com o uso de não mais que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descritas. Tais equivalentes se destinam a ser abrangidos pela invenção.

[0048] Para uso na presente invenção, entende-se que os termos "compreende", "compreendendo", "inclui", "incluindo", "tem", "tendo", "contém", ou "contendo" ou qualquer outra variação dos mesmos, serão destinados para implicar a inclusão de um número inteiro ou grupo de números inteiros declarados, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros e se destinam a ser não exclusivos e abertos. Por exemplo, uma composição, uma mistura, um processo, um método, um artigo ou um aparelho que compreende um grupo de elementos não é necessariamente limitado apenas àqueles elementos mas pode incluir outros elementos não expressamente listados ou inerentes a tal composição, mistura, processo, método, artigo ou aparelho. Exceto onde expressamente declarado em contrário, "ou" se refere a um "ou" inclusivo e não a um "ou" exclusivo. Por exemplo, uma condição A ou B é satisfeita por qualquer um dos seguintes: A é verdadeiro (ou está presente) e B é falso (ou não está presente), A é falso (ou não está presente) e B é verdadeiro (ou está presente), e tanto A como

B são verdadeiros (ou estão presentes).

[0049] Deve-se compreender, também, que os termos "cerca de", ou "aproximadamente", e "de modo geral", "substancialmente" e termos similares, usados na presente invenção quando se referem a uma dimensão ou característica de um componente da invenção preferencial, indicam que a dimensão/característica descrita não é um limite ou parâmetro estrito e não exclui variações menores da mesma que sejam funcionalmente iguais ou similares, como seria compreendido pelo versado na técnica. No mínimo, tais referências que incluem um parâmetro numérico podem incluir variações que, com o uso de princípios matemáticos e industriais aceitos na técnica (por exemplo, arredondamento, medição ou outros erros sistemáticos, tolerâncias de fabricação, etc.), não variariam o dígito menos significativo.

[0050] Os termos "idêntico" ou porcentagem de "identidade" no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou de polipeptídeos (por exemplo, sequências de peptídeo GLP-1, peptídeos ligantes, peptídeos de região de dobradiça-Fc, peptídeos PYY₃₋₃₆ cíclicos), se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou que têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido ou nucleotídeos que são iguais, quando comparadas e alinhadas para uma máxima correspondência, conforme medido usando um dos seguintes algoritmos de comparação de sequências ou por inspeção visual, usando métodos conhecidos na técnica em vista da presente revelação.

[0051] Para a comparação de sequências, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, à qual as sequências de teste são comparadas. Ao se usar um algoritmo de comparação de sequências, as sequências de teste e de referência são inseridas em um computador, as coordenadas de subsequência são designadas, se necessário, e os parâmetros de programa de algoritmo de sequência

são designados. O algoritmo de comparação de sequência então calcula a porcentagem de identidade de sequência para a sequência (ou sequências) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa designados.

[0052] O alinhamento de sequências ótimo para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. N° Math.* 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pela busca por método de similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 85:2.444 (1988), por implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou por inspeção visual (consulte, em geral, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., (1995 Suplemento) (Ausubel)).

[0053] Exemplos de algoritmos que são adequados para determinar a porcentagem de identidade de sequência e a similaridade de sequência são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, que são descritos em Altschul et al. *J. Mol. Biol.* 215: 403 a 410 (1990) e Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389 a 3402 (1997), respectivamente. O software para realizar análises de BLAST está disponível publicamente junto ao National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Informação de Biotecnologia).

[0054] Uma outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucleico é reativo de forma cruzada imunologicamente com o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucleico, conforme descrito abaixo. Dessa forma, um polipeptí-

deo é substancialmente tipicamente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, quando os dois peptídeos diferem apenas por substituições conservativas. Uma outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos são substancialmente idênticas é que as duas moléculas hibridizam entre si sob condições estridentes.

[0055] Para uso na presente invenção, "sujeito" significa qualquer animal, de preferência um mamífero, com a máxima preferência um ser humano. O termo "mamífero", como usado aqui, abrange qualquer mamífero. Exemplos de mamíferos incluem, mas não se limitam a, vacas, cavalos, ovelhas, porcos, gatos, cães, camundongos, ratos, coelhos, porquinhos da Índia, macacos, seres humanos, etc., com mais preferência, um ser humano.

[0056] O termo "administração" em relação aos métodos da invenção, significa um método para prevenir, tratar ou aliviar terapêutica ou profilaticamente uma síndrome, distúrbio ou doença, conforme descrito aqui, com o uso de um conjugado ou composto da invenção ou uma forma, composição ou medicamento do mesmo. Tais métodos incluem a administração de uma quantidade eficaz do dito conjugado, composto, uma forma, composição ou medicamento do mesmo, em diferentes momentos durante o curso de uma terapia ou concomitantemente em uma forma de combinação. Os métodos da presente invenção devem ser entendidos como abrangentes de todos os regimes de tratamento terapêutico.

[0057] O termo "quantidade eficaz" significa aquela quantidade de conjugado, composto ou agente farmacêutico ativo que provoca a resposta biológica ou medicinal em um sistema de tecido, animal ou humano, que esteja sendo procurada por um pesquisador, veterinário, médico, ou outro profissional de saúde, que inclui a prevenção, tratamento ou melhora dos sintomas de uma síndrome, distúrbio ou doença que esteja sendo tratada.

[0058] Como usado aqui, o termo "composição" tem por objetivo abranger um produto que compreende os ingredientes especificados nas quantidades especificadas, bem como qualquer produto, que resulte, direta ou indiretamente, de combinações dos ingredientes especificados nas quantidades especificadas.

[0059] Para uso na presente invenção o termo "acoplado" se refere à união ou conexão de dois ou mais objetos juntos. Ao se referir a compostos químicos ou biológicos, acoplado pode se referir a uma ligação covalente entre os dois ou mais compostos químicos ou biológicos. A título de exemplo não limitador, um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon-1(GLP-1), da invenção pode ser acoplado a um peptídeo PYY cíclico de interesse para formar um conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1. Em certas modalidades, um peptídeo de fusão de GLP-1 da invenção pode ser covalentemente acoplado a um peptídeo PYY cíclico da invenção através de ao menos um ligante. Um conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 pode ser formado através de reações químicas específicas projetadas para conjugar o peptídeo de fusão de GLP-1 ao peptídeo PYY cíclico. A título de exemplo, o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 pode ser formado através de uma reação de conjugação. A reação de conjugação pode, por exemplo, compreender reagir um grupo eletrofílico (por exemplo, uma bromoacetamida ou uma maleimida) com o grupo sulfidril de um resíduo de cisteína em um peptídeo de interesse (por exemplo, o peptídeo de fusão de GLP-1). O grupo eletrofílico pode, por exemplo, ser introduzido em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido de um peptídeo PYY cíclico. A reação do grupo eletrofílico com o grupo sulfidril resulta na formação de uma ligação tioéter covalente.

[0060] Para uso na presente invenção, o termo "ligante de peptídeo" ou "peptídeo ligante" se refere a um módulo químico contendo um

ou mais aminoácidos que liga um peptídeo GLP-1 a um peptídeo de região de dobradiça-Fc ou que liga um peptídeo de região de dobradiça-Fc a um peptídeo PYY cíclico para formar um conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1. O peptídeo de fusão de GLP-1 pode, por exemplo, compreender um primeiro peptídeo ligante e um segundo peptídeo ligante.

[0061] Para uso na presente invenção, o termo "ligante químico" se refere a um módulo químico que não contém nenhum aminoácido que ligue o peptídeo PYY cíclico a um peptídeo de fusão de GLP-1. Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico compreende um ligante químico. O ligante químico para o peptídeo PYY cíclico pode, por exemplo, incluir, mas não se limita a, um ligante de hidrocarboneto, um ligante de polietileno glicol (PEG), um ligante de polipropilenoglicol, um ligante de polissacarídeo, um ligante de poliéster, um ligante contendo um grupo acila, um ligante híbrido que consiste em PEG e um heterociclo incorporado, e uma cadeia de hidrocarboneto. O ligante químico pode, por exemplo, ser primeiro ligado covalentemente ao peptídeo PYY cíclico e, então, covalentemente conectado ao peptídeo de fusão de GLP-1, de preferência ao segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1.

[0062] Para uso na presente invenção, o termo "conjugado" se refere a um peptídeo (por exemplo, um peptídeo de fusão de GLP-1) covalentemente acoplado a uma outra porção farmacologicamente ativa (por exemplo, um peptídeo PYY cíclico). O termo "conjugado a" se refere a um peptídeo da invenção covalentemente ligado ou covalentemente conectado a uma outra porção farmacologicamente ativa, de preferência, um peptídeo terapêutico, direta ou indiretamente por meio de um ligante. A título de exemplo não limitador, o peptídeo pode ser um peptídeo de fusão de GLP-1 da invenção e a outra porção farmacologicamente ativa pode ser um peptídeo terapêutico, como um peptídeo PYY cíclico de interesse.

[0063] As sequências de peptídeo aqui descritas são escritas de acordo com a convenção habitual de modo que a região N terminal do peptídeo está à esquerda e a região C terminal está à Direita. Embora formas isoméricas dos aminoácidos sejam conhecidas, é a forma L do aminoácido que é representado a menos que expressamente indicado de outro modo.

Peptídeos de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon-1(GLP-1)

[0064] Em um aspecto geral, a invenção se refere a um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1). Os peptídeos de fusão de GLP-1 compreendem um GLP-1 ou um peptídeo variante de GLP-1, um primeiro peptídeo ligante (por exemplo, um ligante amino (N)- terminal), um peptídeo da região de dobradiça-Fc e um segundo peptídeo ligante (por exemplo, um ligante carbóxi (C)-terminal).

Peptídeo semelhante ao glucagon-1 ou peptídeo variante de GLP-1

[0065] O peptídeo semelhante ao glucagon-1(GLP-1) é um secretagogo de insulina sintetizado no intestino e liberado em resposta à ingestão de alimentos. Ele é secretado principalmente de duas formas, GLP-1-(7-37) e GLP-1-(7-36)NH₂, em que ambos se ligam a um receptor de GLP-1 específico (GLP-1R) na célula beta pancreática e aumentam a secreção de insulina estimulada por glicose.

[0066] Vários análogos e derivados de GLP-1 são conhecidos e podem ser chamados na presente invenção de "variantes de GLP-1." Esses peptídeos variantes de GLP-1 podem incluir as exendinas, que são os peptídeos encontrados no veneno do lagarto monstro-de-gila. Essas exendinas têm homologia de sequência com o GLP-1 nativo e podem se ligar ao receptor de GLP-1 e iniciar a resposta em cascata de transdução de sinal para as atividades atribuídas ao GLP-1 (7-37).

[0067] Foi demonstrado que GLP-1 e os peptídeos variantes de GLP-1 atuam em uma variedade de formas, que podem incluir, mas não se limitam a, estimulação da liberação de insulina, redução da secreção

de glucagon, inibição do esvaziamento gástrico e aumento da utilização de glicose.

[0068] O GLP-1R pertence à classe B da família de receptores acoplados à proteína G heterotrimérica com sete domínios transmembranares e é expresso em uma ampla variedade de tecidos incluindo, mas sem limitação, células α , β e δ das ilhotas pancreáticas, coração, rim, estômago, intestino, neurônios do gânglio nodoso do nervo vago e várias regiões do sistema nervoso central (SNC) incluindo o hipotálamo e tronco cerebral. O GLP-1R pode se acoplar ao $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, e $G\alpha_o$ (Montrose-Rafizadeh et al., Endocrinology 140:1132-40 (1999); Hallbrink et al., Biochim Biophys Acta 1546: 79-86 (2001)) levando a aumentos no cálcio intracelular, adenilato ciclase e fosfolipase C, e ativação de PKA, PKC, PI-3K, Epac2, e das vias de transdução de sinal de MAPK (Drucker et al., PNAS 84:3434-8 (1987); Wheeler et al., Endocrinology 133:57-62 (1993); e Holz et al., JBC 270:17749-57 (1995)).

[0069] São aqui fornecidos peptídeos de fusão de GLP-1 que compreendem um primeiro componente, em que o primeiro componente é um GLP-1 ou um peptídeo variante de GLP-1. Como usado aqui, os termos "peptídeo GLP-1," "peptídeo variante de GLP-1", "variante de peptídeo GLP-1" e "GLP-1 ou peptídeo variante de GLP-1" são usados de forma intercambiável. O GLP-1 ou o peptídeo variante de GLP-1 pode compreender uma das sequências fornecidas na Tabela 1. A sequência de GLP-1 ou de peptídeo variante de GLP-1 pode ser escolhida com base em ao menos um dos seguintes critérios: (i) produtividade de expressão, (ii) estabilidade *in vitro*, (iii) potência *in vitro*, (iv) a retenção de potência *in vitro* após conjugação química com o peptídeo PYY cíclico, (v) falta de xilosilação de serina ou de potencial para xilosilação de serina, e (vi) propriedades do conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 (por exemplo, estabilidade *in vivo* e potência *in vivo* (isto é, se o GPL-1 ou o peptídeo variante de

GLP-1 e o peptídeo PYY cíclico são capazes de ter atividade agonista em relação ao receptor de GLP-1 e ao receptor Y2, respectivamente)).

[0070] O GLP-1 ou os peptídeos variantes de GLP-1 que compõem o primeiro componente do peptídeo de fusão de GLP-1 são destinados a abranger peptídeos que têm homologia e funcionalidade suficientes para o GLP-1 nativo. O GLP-1 ou os peptídeos variantes de GLP-1 são projetados para ter a capacidade de ligação ao receptor de GLP-1 nas β -células do pâncreas, resultando na mesma via de sinalização e apresentando atividade insulínica igual ou similar como quando o GLP-1 nativo se liga ao receptor de GLP-1 nas β -células do pâncreas.

Tabela 1: peptídeo semelhante ao glucagon-1 e variantes do mesmo

GLP-1 ou peptídeo variante de GLP-1	Sequência de peptídeo	SEQ ID NO:
(A8S, A30E) GLP-1(7-36)	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGR	56
(A8G, G22E, R36G) GLP-1 (7-37)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLVKGGG	57
Exendina 4 (1-39)	HGEGTFTSDLSQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	58
Exendina 4 (1-28)	HGEGTFTSDLSQMEEEEAVRLFIEWLKN	59

Primeiro peptídeo ligante: Ligante amino-terminal (ligante N-terminal)

[0071] São aqui fornecidos peptídeos de fusão de GLP-1 que compreendem um segundo componente, em que o segundo componente é um primeiro peptídeo ligante (isto é, um peptídeo ligante amino-terminal). O primeiro peptídeo ligante pode compreender uma das sequências fornecidas na Tabela 2. A sequência do primeiro peptídeo ligante pode ser escolhida com base em ao menos um dos seguintes critérios: (i) produtividade de expressão, (ii) potência *in vitro*, (iii) estabilidade *in vitro* (iv) falta de xililação de serina ou de potencial para xililação de serina, e (v) propriedades do conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 (por exemplo, estabilidade *in vivo* e potência *in vivo* (isto é, se o GLP-1 ou o peptídeo variante de GLP-1 e o peptídeo PYY cíclico são capazes de ter atividade agonista em relação ao receptor de GLP-1 e ao receptor Y2, respectivamente)).

[0072] Em certas modalidades, os peptídeos de fusão de GLP-1

não compreendem um segundo componente, em que o segundo componente é um primeiro peptídeo ligante.

Tabela 2: Primeiros peptídeos ligantes (peptídeo ligante N-terminal)

Ligante 1	Sequência de peptídeo	SEQ ID NO
1-1	GGGGAGGGGAGGGGAA	60
1-2	GGGGGGGGGGGGGGA	61
1-3	APAPAPAPAPAPAPAPAPA	62
1-4	APAPAPAPAPAPAPAPAPAPA	63
1-5	APAPAP	64
1-6	ASAPAPAPAPPGS	65
1-7	ASAPAPAPAPAPAPAPPGS	66
1-8	ASGGGSGGGGS	67
1-9	ASGGGSGGGSGGGSGGGGS	68
1-10	ASGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	69
1-11	GGGGAGGGGAGGGGA	70
1-12	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA	71
1-13	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAA	72
1-14	GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAA	73
1-15	GGGGGG	74
1-16	GGGGHGGGGHGGGGHA	75
1-17	GGGGHGGGGHGGGGHGGGGHA	76
1-18	GGGGHGGGGHGGGGHGGGGHGGGGHA	77
1-19	GGGGPGGGPGGGGPA	78
1-20	GGGGPGGGPGGGPGGGGPA	79
1-21	GGGGPGGGPGGGPGGGPGGGGPA	80
1-22	GGGGSGGGSGGGGSA	81
1-23	PAPAPAPAPAPAPAPAPAPA	82
1-24	PAPAPAPAPAPAPAPAPAPA	83

Peptídeo da região de dobradiça-Fc

[0073] Em certas modalidades, os peptídeos de fusão de GLP-1 compreendem um terceiro componente, em que o terceiro componente é um peptídeo da região de dobradiça-Fc. O peptídeo da região de dobradiça-Fc pode conferir maior meia-vida de circulação dos peptídeos terapêuticos através de aumento do peso molecular e redução da filtração glomerular, além de reciclagem do receptor FcRn. Em certas modalidades, o peptídeo da região de dobradiça-Fc pode ser derivado da região Fc de IgG4 humana. A região Fc de IgG4 humana tem capacidade reduzida de se ligar a FcγR e fatores de complemento em comparação com outros subtipos de IgG. De preferência, a região Fc contém a região Fc de IgG4 humana tendo substituições que eliminam a função efetora.

Dessa forma, um peptídeo de fusão de GLP-1 compreende adicionalmente uma região Fc que tem uma região Fc de IgG4 humana contendo uma ou mais das seguintes substituições: substituição de prolina por glutamato no resíduo 233, alanina ou valina por fenilalanina no resíduo 234 e alanina ou glutamato por leucina no resíduo 235 (EU numbering, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edição. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, Md., NIH Publication no. 91-3242(1991)). A remoção do sítio de glicosilação ligado a N na região Fc de IgG4 mediante a substituição de Ala por Asn no resíduo 297 (numeração EU) é uma outra forma de garantir que a atividade efetora residual é eliminada.

[0074] Em certas modalidades, os peptídeos de fusão de GLP-1 da invenção existem como um monômero ou um dímero. Em modalidades preferenciais, o peptídeo de fusão de GLP-1 existe como um dímero. Em certas modalidades, nas quais o peptídeo de fusão de GLP-1 existe como um dímero, o dímero é um homodímero, isto é, o dímero compreende dois peptídeos de fusão de GLP-1 que têm a mesma sequência. Em certas modalidades, nas quais o peptídeo de fusão de GLP-1 existe como um dímero, o dímero é um heterodímero, isto é, o dímero compreende dois peptídeos de fusão de GLP-1 que têm sequências diferentes.

[0075] De preferência, os peptídeos de fusão de GLP-1 da invenção existem como dímeros unidos por ligações de dissulfeto e várias interações não covalentes. Dessa forma, a porção Fc útil para o anticorpo da invenção pode ser a região Fc de IgG4 humana contendo uma substituição, como serina por prolina na posição 228 (numeração EU), que estabiliza a formação de dímero de cadeia pesada e evita a formação de cadeias Fc de meia IgG4. Em certas modalidades, a sequência nativa de aminoácidos da região N-terminal para os dissulfetos na região de dobraça pode ser incluída. A estrutura cristalina por difração de raios X da

IgG4 humana sugere que esses aminoácidos podem formar uma estrutura que predispõe as estruturas a montante a orientações opostas no espaço. Tal predisposição é vantajosa por manter a separação espacial de elementos a montante como os peptídeos de fusão de GLP-1. Em outras modalidades, os aminoácidos nativos em posição N-terminal aos dissulfetos da dobradiça podem ser omitidos.

[0076] Em certas modalidades, uma dobradiça de IgG2a humana híbrida fundida ao Fc de PAA humano foi usada para explorar o impacto sobre a potência e a estabilidade do peptídeo de fusão de GLP-1.

[0077] Em uma outra modalidade, o resíduo Lys C N-terminal da cadeia pesada é removido, como visto comumente em anticorpos monoclonais produzidos recombinantemente.

[0078] Os peptídeos da região de dobradiça-Fc podem compreender uma das sequências fornecidas na Tabela 3. A sequência de peptídeo na região de dobradiça-Fc pode ser escolhida com base em ao menos um dos seguintes critérios: (i) estabilidade *in vitro* (ii) potência *in vitro*, e (iii) propriedades do conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 (por exemplo, estabilidade *in vivo* e potência *in vivo* (isto é, se o GPL-1 ou o peptídeo variante de GLP-1 e o peptídeo PYY cíclico são capazes de ter atividade agonista em relação ao receptor de GLP-1 e ao receptor Y2, respectivamente)).

Tabela 3: Peptídeos da região de dobradiça-Fc

Região de dobradiça-Fc	Sequência de peptídeo	SEQ ID NO
Região 1 de dobradiça-Fc	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD-GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS-RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	84
Região 2 de dobradiça-Fc	GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD-GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS-RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	85
Região 3 de dobradiça-Fc	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD-GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS-RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	86

Região 4 de dobradiça-Fc	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD- GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS- RLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	87
Região 5 de dobradiça-Fc	GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD- GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS- RLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	88
Região 6 de dobradiça-Fc	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD- GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS- RLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	89
Região 7 de dobradiça-Fc	ERKCCVECPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD- GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS- RLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	90

[0079] Também são aqui fornecidos peptídeos de plataforma da região de dobradiça-Fc, em que os peptídeos de plataforma da região de dobradiça-Fc compreendem um peptídeo da região de dobradiça-Fc e ao menos um dentre um primeiro peptídeo ligante, que está conectado à extremidade amino-terminal do peptídeo da região de dobradiça-Fc, e um segundo peptídeo ligante, que está conectado à extremidade carboxi-terminal do peptídeo da região de dobradiça-Fc. O peptídeo da região de dobradiça-Fc pode, por exemplo, ser uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 84 a 90; o primeiro peptídeo ligante pode, por exemplo, ser uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 60 a 83; e o segundo peptídeo ligante pode, por exemplo, ser uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 91 a 112. Em certas modalidades, o peptídeo da região de dobradiça-Fc compreende a SEQ ID NO:84 e o primeiro peptídeo ligante compreende a SEQ ID NO:60. Em certas modalidades, o peptídeo da região de dobradiça-Fc compreende a SEQ ID NO:84 e o segundo peptídeo ligante compreende as SEQ ID Nos: 93, 94, 95, 106 ou 111. Em certas modalidades, o peptídeo da região de dobradiça-Fc compreende a SEQ ID NO:84; o primeiro peptídeo ligante compreende a SEQ ID NO: 60; e o segundo peptídeo ligante compreende as SEQ ID NOs: 93, 94, 95, 106 ou 111.

Segundo peptídeo ligante: Ligante carbóxi-terminal (ligante C-terminal)

[0080] São aqui fornecidos os peptídeos de fusão de GLP-1 que compreendem um quarto componente, em que o quarto componente é um segundo peptídeo ligante (isto é, um peptídeo ligante carbóxi-terminal). O segundo peptídeo ligante pode compreender uma das sequências fornecidas na Tabela 4. A segunda sequência de peptídeo ligante pode ser escolhida com base em ao menos um dos seguintes critérios: (i) produtividade de expressão, (ii) potência *in vitro*, (iii) estabilidade *in vitro* (iv) falta de xilosilação de serina ou de potencial para xilosilação de serina, e (v) produtividade de conjugação e (vi) propriedades do conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 (por exemplo, estabilidade *in vivo* e potência *in vivo* (isto é, se o GLP-1 ou o peptídeo variante de GLP-1 e o peptídeo PYY cíclico são capazes de ter atividade agonista em relação ao receptor de GLP-1 e ao receptor Y2, respectivamente)).

[0081] Além disso, a segunda sequência de peptídeo ligante pode ser escolhida com base em sua capacidade de ser submetida a uma conjugação eficaz e específica ao peptídeo PYY cíclico. Neste contexto, especificidade se refere à conjugação preferencial nos resíduos de cisteína manipulados na região C-terminal do segundo ligante em relação à conjugação em qualquer outra parte da proteína de fusão. Exemplos de estratégias para maximizar a especificidade incluem (i) a introdução de aminoácidos adjacentes aos resíduos de cisteína manipulados para aumentar a nucleofilicidade da cadeia lateral de sulfidril e intensificar sua reatividade, (ii) inclusão dos resíduos de cisteína manipulados em uma sequência de aminoácidos que demonstrou anteriormente ter seletividade aprimorada em conjugações tiol-eletrófilo, e (iii) a incorporação de aminoácidos com cadeias laterais aniônicas ou catiônicas que respectivamente atraem eletrostaticamente os agentes redutores de dissulfeto catiônico ou aniônico para a liberação específica de tióis reativos para con-

jugação. Exemplos de estratégias para maximizar a eficiência de conjugação incluem (i) a introdução de cargas iguais, sejam aniônicas ou catiônicas, em qualquer parte do segundo peptídeo ligante a fim de causar a repulsão eletrostática mútua dos segundos peptídeos ligantes, e, assim, reduzir a formação de dissulfeto entre os resíduos de cisteína manipulados, (ii) a incorporação de aminoácidos que intensificam a rigidez do ligante, (iii) a incorporação de aminoácidos que aumentam a flexibilidade do ligante, e (iv) a incorporação de aminoácidos com cadeias laterais aniônicas ou catiônicas que predisõem eletrostaticamente o peptídeo cíclico PYY a uma conjugação eficiente.

Tabela 4: Segundo peptídeo ligante (peptídeo ligante C-terminal)

Ligante 2	Sequência de peptídeo	SEQ ID NO
2-1	ASGSAPAPAEPEEPCA	91
2-2	GGGAPAPAEPEEPCA	92
2-3	APAPAPAPAPAPCPEEP	93
2-4	APAPAPAPAPAPCP	94
2-5	GGGGAGGGGAGGGGACA	95
2-6	GGGGAYCAKYDGCYGELDFWCQ	96
2-7	GGGGAYSAKYDGCYGELDFWGQ	97
2-8	AAACPEEE	98
2-9	AAAEPECA	99
2-10	APAPAPAPCAPRRR	100
2-11	APAEPEPCA	101
2-12	ASGSAPAPAPAPCEEE	102
2-13	ASGSAPAPAPAPCPEEP	103
2-14	ASGSGGGSGGGSCA	104
2-15	GGGGGGGGGGGGGGGCA	105
2-16	GGGGSGGGGSCA	106
2-17	ASGSPPPPPPEPEPCA	107
2-18	ASGSAPAPAPAPCPEPE	108
2-19	ASGSGGGSGGGGSCA	109
2-20	ASGSAPAPAPAPAEPEEPCA	110
2-21	GGGGSGGGSGGGGSCA	111
2-22	ASGSGGGSGGGGSEEEACA	112

Peptídeos de fusão de GLP-1

[0082] São aqui fornecidos peptídeos de fusão de GLP-1 que compreendem um primeiro, um segundo, um terceiro, e um quarto componente conforme descrito anteriormente, em que o segundo componente pode estar opcionalmente ausente. O primeiro componente é um GLP-1 ou um peptídeo variante de GLP-1, o segundo componente é um primeiro peptídeo ligante, o terceiro componente é um peptídeo da região de dobradiça-

Fc, e o quarto componente é um segundo peptídeo ligante. O peptídeo de fusão de GLP-1 pode compreender uma das sequências fornecidas na Tabela 5. A sequência do peptídeo de fusão de GLP-1 pode ser escolhida com base em ao menos um dos seguintes critérios: (i) produtividade de expressão, (ii) potência *in vitro*, (iii) estabilidade *in vitro* (iv) falta de xilosilação de serina (v) produtividade de conjugação e (vi) propriedades do conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 (por exemplo, estabilidade *in vivo* e potência *in vivo* (isto é, se o GLP-1 ou o peptídeo variante de GLP-1 e o peptídeo PYY cíclico são capazes de ter atividade agonista em relação ao receptor de GLP-1 e ao receptor Y2, respectivamente)).

Tabela 5: Peptídeos de fusão de GLP-1

Fusão de GLP-1 (GF)	Sequência de peptídeo	SEQ ID NO:
GF1	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPCCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCP	113
GF2	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPCCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCP	114
GF3	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIWLKGGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAG- PPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLA PAPAPAPAPAPCPGF	115
GF4	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPCCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCP	116
GF5	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGGGGGGGGAGGGGAAESKYGPCCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCP	117
GF6	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAESKYGPCCPPCAPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CP	118
GF7	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGPPCPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CP	119
GF8	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPCCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGGG GACA	120
GF9	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIWLKGGGGGGGGGGGGGGGGGAAESKYGPCCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG	121

	KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGGG GACA	
GF10	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAG- PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG GGGAGGGGAGGGGACA	122
GF11	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGGG GACA	123
GF12	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGGGGGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAGGG GACA	124
GF13	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAESKYGPPCPPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAG GGGACA	125
GF14	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGPPCPPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAGGGGAG GGGACA	126
GF15	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYCAKYDGCY GELDFWCQ	127
GF16	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGPPCPPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYCAKYD GCYGELDFWCQ	128
GF17	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYSAKYDGCY GELDFWCQ	129
GF18	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGPPCPPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGAYSAKYD GCYGELDFWCQ	130
GF19	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAEPEEPC A	131
GF20	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGGGGGGGGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAEPEEPC A	132
GF21	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAEPEEPC A	133
GF22	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGAGGGGAGGGGAAESKYG- PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL	134

	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG GGAPAPAEPEEPCA	
GF23	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSGGGGGGGGGGGGGAESKYG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG GGAPAPAEPEEPCA	135
GF24	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	136
GF25	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGGGGGGGGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	137
GF26	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAESKYG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLA PAPAPAPAPAPCPEEP	138
GF27	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLA PAPAPAPAPAPCPEEP	139
GF28	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	140
GF29	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGGGGGGGGGGGGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	141
GF30	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAESKYGPPCPPCPA-PEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CPEEP	142
GF31	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGPPCPPCPA-PEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAP CPEEP	143
GF32	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLKGASGGGGGGGGGSCPPCPAPEAAGG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEPC A	144
GF33	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLKGASAPAPAPAPAGSCPPCPAPEAAGG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEPC A	145
GF34	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSASGGGGGGGGGSCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEP CA	146
GF35	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSASAPAPAPAPAGSCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG	147

	KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEP CA	
GF36	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGSGPPCPPCAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEPC A	148
GF37	HSEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLVKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGSGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEP CA	149
GF38	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASGGGGSGGGSGGGSGGGSGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEP CA	150
GF39	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRASAPAPAPAPAPAPAPAGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEP CA	151
GF40	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGGGASGGGGSGGGSGPPCPPCAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEPC A	152
GF41	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGGGASGGGGSGGGSGGGSGGGSGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEEP CA	153
GF42	HSEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLVKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGSGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEPEP CA	154
GF43	HSEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLVKNGGPSSGAPPPSASAPAPAPAPAGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEPEP CA	155
GF44	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGGGASGGGGSGGGSGGGSGGGSGPPCPPCAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAEPEPEPC A	156
GF45	HSEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLVKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGSGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAPC EEE	157
GF46	HSEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLVKNGGPSSGAPPPSASAPAPAPAPAGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAPC EEE	158
GF47	HSEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLVKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGSGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAPC EEE	159
GF48	HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGGGASGGGGSGGGSGGGSGGGSGPPCPPCAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK	160

	CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPACEE E	
GF49	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAC PEEP	161
GF50	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASAPAPAPAPAGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAC PEEP	162
GF51	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGGSGPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPAC PEEP	163
GF52	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGASGGGGSGGGGSCPPCPAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPACPE EP	164
GF53	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGASAPAPAPAPAGSCPPCPAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEPC A	165
GF54	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGASAPAPAPAPAPAPAGSCPPCPA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPE EEPCA	166
GF55	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK- DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN- GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEPCA	167
GF56	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGSCPPCPAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEPC A	168
GF57	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPAPAPAPCPAPEAAGG- PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE- WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEPC A	169
GF58	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKAPAPEEPCA	170
GF59	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKAAAEPCA	171
GF60	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKAPAPAPACAPRR R	172
GF61	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGSGGGGSCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKAAACPEEE	173

GF62	HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSASGGGGGGGGSCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSGGGGGGG GSCA	174
GF63	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLKGGGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAESKYG- PPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK ASGSAPAPAPEEEEPCA	175
GF64	HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAE- ESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL LGKASGSAPAPAPEEEEPCA	176
GF65	HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAESKYGPPCPPCA- PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS- DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAE EEPCA	177
GF66	HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGGGGGGSAESKYG- PPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK ASGSAPAPAPEEEEPCA	178
GF67	HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGGGGGGGGGGGGGGSAESKYGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPAPEEEE CA	179
GF68	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLKGGGGGGGGGGGGGGGGGSAESKYGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAPEEEEPC A	180
GF69	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLKGGGGGGGGGGGGGGGGGSAESKYGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAPAPAPEEEEPCA	181
GF70	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLKGGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPPCPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAPAPAPEEEEPCA	182
GF71	HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGGGGGGGGGAESKYG- PPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK APAPAPEEEEPCA	183
GF72	HGEGTFTSLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGAGGGGAGGGGAAESKYG- PPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK APAPAPEEEEPCA	184
GF73	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLKGGGGGGGGGGGGGGGGGSAERKCCVECPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLAPAPAPAPAPAPCP	185
GF74	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLKGGGGGGGGAGGGGAGGGGAAERKCCVECPPCAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLAPAPAPAPAPAPCP	186
GF75	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLKGGGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGG- PPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLA	187

	PAPAPAPAPAPCP	
GF76	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGPGGGPGGGGGPGGGGPAESKYG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPCP	188
GF77	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGGHGGGGHGGGGHGAESKYG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPCP	189
GF78	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAAESKYG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPCP	190
GF79	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGAS- GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPEEEPCA	191
GF80	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSASGGGGSGGGSGGGSCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGSCA	192
GF81	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGGAESKYGPCCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGAPAPAPEEPC	193
GF82	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPCCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPEEPC	194
GF83	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGGGGGGGAESKYGPCCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASGSAPAPEEPC	195
GF84	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGGGGGGGAESKYGPCCPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGAPAPAPEEPC	196
GF85	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGGGGGGGGGGGAERKCCVECPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLAPAPAPAPAPCP	197
GF86	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGGHGGGGHGAERKCCVECPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLAPAPAPAPAPCP	198
GF87	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGPGGGPGGGGGPGGGGPGGGGPAG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPCP	199
GF88	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGHGGGGHGGGGHGGGGHGGGGHAG-PPCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPCP	200
GF89	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGGGSGGGSGGGGSAERKCCVECPPCPAPE-AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG	201

	KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	
GF90	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGPGGGGPGGGGAERKCCVECPPCAPE- AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	202
GF91	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGHHGGGGHGGGGAERKCCVECPPCAPE- AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	203
GF92	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGGAGGGGAAERKCCVECPPCAPE- AAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPE EP	204
GF93	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGPGGGGPGGGGPGGGGPGAG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	205
GF94	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGHHGGGGHGGGGHGGGGHAG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	206
GF95	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAAG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	207
GF96	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGPGGGGPGGGGPGGGGPAESKYG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	208
GF97	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGHHGGGGHGGGGHGGGHAESKYG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	209
GF98	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAAESKYG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	210
GF99	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGPAPAPAPAPAPAPAPAPAPESKYG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEP	211
GF100	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAAESKYG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	212
GF101	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPESKYG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLG APAPAPAPAPCPEEP	213
GF102	HGEGTFTSDVSSYLEEAAKEFIAWLVKGGGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAESKYG- PPCPPCAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL	214

	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS-LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAPEEEPCA	
GF103	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAPEEEPCA	215
GF104	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAPEEEPCA	216
GF105	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAPEEEPCA	217
GF106	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGGCA	218
GF107	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAGGGGAGGACACA	219
GF108	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCP	220
GF109	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGSGGGGSGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGAPAPAPAPAPAPCPPEP	221
GF110	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGAPAPAPEEEPCA	222
GF111	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGGCA	223
GF112	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGGGGCA	224
GF113	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSCA	267
GF114	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGGGAGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSCA	268
GF115	HGEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLKGGGGGGGAGGGGAGGGGAESKYGPPCPPCPAPE-AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA-VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSGGGGGSCA	269

GF116	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGGGGAGGGGAGGGGAAESKYGPCCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGGG GGSCA	270
GF117	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPCCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGGG GGSCA	271
GF118	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYG- PPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG GGGSGGGGGSCA	272
GF119	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGGGGSGGGGSGGGGSAESKYGPCCPPCPAPE- AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA- VEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGSGGGGGG GGSCA	273
GF120	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYG- PPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS- LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLG GGGSGGGGGGGGGSCA	274

Peptídeos PYY cíclicos

[0083] O PYY₃₋₃₆ é um hormônio endógeno secretado por células L no trato gastrointestinal distal que atua como um agonista do receptor Y2 para inibir a ingestão de alimento. Dado a sua função no controle do apetite e da ingestão de alimentos, bem como os seus efeitos antissecretores e pró-absorptivos no trato gastrointestinal em mamíferos, o PYY₃₋₃₆ pode ser eficaz no tratamento da obesidade e das condições associadas, bem como em uma série de distúrbios gastrointestinais. Entretanto, a utilidade terapêutica do próprio PYY₃₋₃₆ como um agente de tratamento é limitada por seu rápido metabolismo e meia-vida circulante curta. Dessa forma, a presente invenção é, de modo geral, direcionada a conjugados de PYY₃₋₃₆ modificado, que prolongam a meia-vida do peptídeo PYY₃₋₃₆ e reduzem o metabolismo do peptídeo *in vivo*.

[0084] Em certas modalidades da invenção, os peptídeos PYY₃₋₃₆ modificados são peptídeos PYY cíclicos. Os termos "peptídeo PYY cíclico", "análogo de PYY₃₋₃₆ cíclico", e "análogo de peptídeo PYY₃₋₃₆ cíclico" podem ser usados de forma intercambiável. Exemplos de peptídeos PYY cíclicos que podem ser usados nos conjugados da presente invenção são

descritos no pedido de patente US nº 15/794.231, depositado em 26 outubro de 2017, e no pedido de patente US nº 15/794.171, depositado em 26 de outubro de 2017, cujos conteúdos estão aqui incorporados a título de referência em suas totalidades.

[0085] Para uso na presente invenção, o termo "NTSC-PYY" se destina a descrever os análogos cíclicos de PYY do N terminal para a cadeia lateral.

[0086] As sequências de peptídeo aqui descritas são escritas de acordo com a convenção habitual de modo que a região N-terminal do peptídeo está à esquerda e a região carbóxi-terminal está à direita. Embora formas isoméricas dos aminoácidos sejam conhecidas, é a forma L do aminoácido que é representada exceto se expressamente indicado em contrário. Para conveniência na descrição das moléculas dessa invenção, abreviações convencionais e não convencionais para vários aminoácidos (códigos de letra única e de três letras) e porções funcionais são usadas. Essas abreviações são familiares aos versados na técnica, mas para maior clareza estão mencionadas da seguinte forma: A=Ala=alanina; R=Arg=arginina; N=Asn=asparagina; D = Asp = ácido aspártico; β A = β Ala = beta-alanina; C = Cys = cisteína; hC = hCys = homocisteína; E = Glu = ácido glutâmico; Q = Gln = glutamina; G = Gly = glicina; H = His = histidina; I = Ile = isoleucina; L = Leu = leucina; K = Lys = lisina; Nle = norleucina; F = Phe = fenilalanina; P = Pro = prolina; S = Ser = serina; T = Thr = treonina; W = Trp = triptofano; Y = Tyr = tirosina e V = Val = valina.

[0087] Por conveniência, a convenção de numeração do resíduo de aminoácido usada na nomeação dos peptídeos NTSC-PYY da presente invenção segue aquela de hPYY₃₋₃₆. Substituições de aminoácidos específicas que foram introduzidas nos peptídeos NTSC-PYY, em relação aos resíduos nativos nas posições correspondentes em hPYY₃₋₃₆, são indicadas pelo código de aminoácidos adequado, seguido pela posição da substituição. Dessa forma, "S4" no peptídeo NTSC-PYY se refere a

um peptídeo no qual a serina substituiu o resíduo lys4 nativo correspondente de hPYY₃₋₃₆. De modo similar, "hC31" no peptídeo NTSC-PYY se refere a um peptídeo no qual a homocisteína substituiu o resíduo val31 nativo correspondente de hPYY₃₋₃₆. Substituições de aminoácidos adicionais que ocorrem dentro dos peptídeos NTSC-PYY são descritas de acordo com esta convenção e serão reconhecidas como tal pelo versado na técnica.

[0088] Também por conveniência, a convenção de nomenclatura usada para os peptídeos NTSC-PYY da presente invenção incorpora os resíduos de aminoácidos envolvidos no ciclo juntamente com o grupo (ou grupos) de ligação entre eles em uma direção da esquerda para a direita, começando a partir do resíduo N-terminal envolvido no ciclo. Em todos os casos, o resíduo de aminoácido amino-terminal do ciclo se liga por meio de sua funcionalidade α -amino ao grupo de ligação, que por sua vez se conecta ao resíduo de cadeia lateral do aminoácido na posição 31 do peptídeo NTSC-PYY. Dessa forma, "ciclo-(l3-*m*-COPhCH₂-hC31)" é usado para descrever o ciclo de um peptídeo NTSC-PYY em que a funcionalidade α -amino de Ile3 é acilada com um resíduo de ácido *meta*-toluico, cujo grupo metila é adicionalmente ligado por meio de uma ligação tioéter à cadeia lateral de um resíduo hCys31. De modo similar, "ciclo-(K4-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31)" é usado para descrever o ciclo de um peptídeo NTSC-PYY, no qual o resíduo Ile3 nativo foi excluído e cuja funcionalidade α -amino (agora N-terminal) de lys4 é acilada por um grupo 3-acetamidopropanoíla, cujo carbono de acetamido metileno está conectado à cadeia lateral de um resíduo hCys31 por meio de uma ligação tioéter.

[0089] Resíduos de lisina podem ser incorporados em várias posições da sequência hPYY₃₋₃₆ para fornecer um manuseio funcional conveniente para derivatização adicional. Os resíduos de lisina podem ser modificados para serem acoplados ao peptídeo de fusão de GLP-1 indiretamente. Em um acoplamento indireto ao peptídeo de fusão de GLP-

1, o resíduo de lisina pode ser modificado de modo a compreender um ligante químico que permitirá que o peptídeo PYY cíclico seja acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1. O versado na técnica reconhecerá que ortólogos relacionados também poderiam ser empregados eficazmente como tal e são contemplados na presente invenção.

[0090] O termo "K(PEG24-AcBr)" representa um resíduo de lisinila cujo grupo ϵ -amino de cadeia lateral foi acilado pelo ácido N-bromoacetil-75-amino-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-tetracosaoxapenta-heptacontanoico através de sua funcionalidade de ácido 1-carboxílico.

[0091] O termo "K(PEG12-AcBr)" representa um resíduo de lisinila cujo grupo ϵ -amino de cadeia lateral foi acilado pelo ácido N-bromoacetil-39-amino-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-dodecaoxanonatriacontanoico através de sua funcionalidade de ácido 1-carboxílico.

[0092] O termo "K(PEG6-AcBr)" representa um resíduo de lisinila cujo grupo ϵ -amino de cadeia lateral foi acilado pelo ácido N-bromoacetil-3-[(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadec-1-il)oxi]-propanoico através de sua funcionalidade de ácido 1-carboxílico.

[0093] O termo "K(PEG8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG4-AcBr)" representa um resíduo de lisinila cujo grupo ϵ -amino de cadeia lateral foi acilado pelo ácido 27-[4-[2-[3-[2-[2-[3-(N-bromoacetilamino)propóxi]etóxi]etóxi]propilaminocarbonil]etil]tetrazol-1-il]-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-heptacosanoico através de sua funcionalidade de ácido 1-carboxílico.

[0094] Muitos dos compostos/conjugados da presente invenção incorporam uma ligação de amida reduzida entre o resíduo de C terminal da sequência, Y36, e seu resíduo adjacente, R35. Essa ligação de amida reduzida é representada pelo termo, "*psi*-(R35,Y36)".

[0095] Vários resíduos de aminoácidos compreendendo certas sequências da presente invenção contêm grupos α -amino que foram metilados. Dessa forma, os termos, "N-Me-Q34" ou "N-Me-R35" representam glutamina α -N-metilada na posição 34 de uma sequência, e arginina α -N-metilada na posição 35 de uma sequência, respectivamente.

[0096] O termo, "N-Me-Q34, *psi*-(R35,Y36)" em uma descrição de sequência se refere a uma sequência contendo um resíduo de α -metil glutamina na posição 34, bem como uma ligação de amida reduzida entre os resíduos R35 e Y36.

[0097] De modo similar, o termo, "N-Me-R35, *psi*-(R35,Y36)" em uma descrição de sequência se refere a uma sequência contendo um resíduo de α -metil arginina na posição 35, bem como uma ligação de amida reduzida entre esse resíduo e Y36.

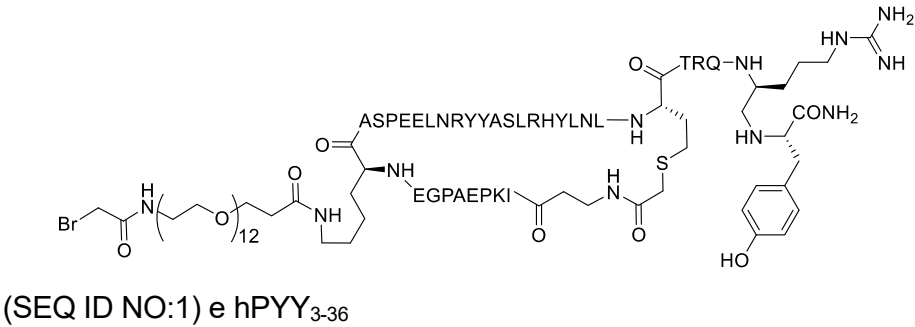
[0098] Exemplos de peptídeos PPY cíclicos são fornecidos na Tabela 6.

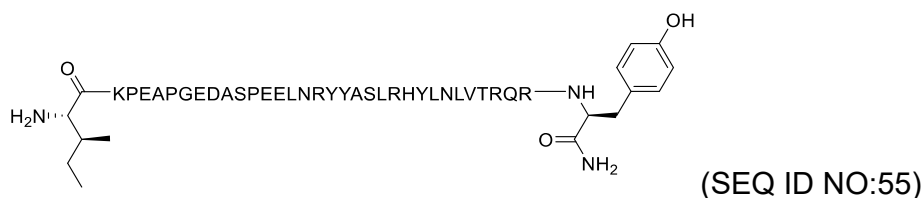
Tabela 6: Peptídeos PPY cíclicos

SEQ ID NO:	Nomenclatura do peptídeo PPY cíclico
1	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, <i>psi</i> -(35R,36Y)]-PYY2-36
2	[ciclo-(I3-CO(CH ₂) ₂ triazolil-Nle31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY3-36
3	[ciclo-(I3-CO(CH ₂) ₂ triazolil-Nle31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35Y36)]-PYY3-36
4	[ciclo-(G2-E31), S4, K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
5	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG6-AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
6	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
7	[ciclo-(I3-COCH ₂ -C31), K(PEG12-AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY3-36
8	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, (N-Me)Q34, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
9	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35, <i>psi</i> -(R35,36Y)]-PYY2-36
10	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), R4, K(PEG12-AcBr)11, W30, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
11	[ciclo-(I3-COCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCOCH ₂ -C31), R4, K(PEG12-AcBr)11, W30, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY3-36
12	[ciclo-(K4-OEG-COCH ₂ -C31), K(PEG12-AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY4-36
13	[ciclo-(I3-COCH ₂ CH ₂ triazolil-Nle31), K(PEG12-AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY3-36
14	[ciclo-(I3- <i>m</i> -CO-benzil-hC31), K(PEG8-triazolil-CH ₂ CH ₂ CO-PEG4-AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY3-36
15	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)23, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
16	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)22, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
17	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)7, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
18	[ciclo-(G2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
19	[ciclo-(G2-COCH ₂ -C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
20	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
21	[ciclo-(G2-COCH ₂ -hC30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
22	[ciclo-(β A2-COCH ₂ -hC31), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
23	[ciclo-(G2-COCH ₂ -hC30), K(PEG12-AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
24	[ciclo-(G2-E30), S4, K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36

25	[ciclo-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(PEG24-AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
26	[ciclo-(G2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35-Y36)]-PYY2-36
27	[ciclo-(G2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
28	[ciclo-(βA2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
29	[ciclo-(βA2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
30	[ciclo-(G2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
31	[ciclo-(βA2-COCH ₂ -hC31), <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
32	[ciclo-(βA2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
33	[ciclo-(G2-E30), S4, K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
34	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
35	[ciclo-(I3-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY3-36
36	[ciclo-(I3-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY3-36
37	[ciclo-(I3-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY3-36
38	[ciclo-(I3-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY3-36
39	[ciclo-(I3-COCH ₂ -hC30), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY3-36
40	[ciclo-(G2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
41	[ciclo-(G2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
42	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
43	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -C30), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
44	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
45	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
46	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
47	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
48	[ciclo-(δAva2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
49	[ciclo-(δAva2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
50	[ciclo-(δAva2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
51	[ciclo-(δAva2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
52	[ciclo-(βA2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
53	[ciclo-(βA2-COCH ₂ -C31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36
54	[ciclo-(γAba2-COCH ₂ -hC31), K(AcBr)11, <i>psi</i> -(R35,Y36)]-PYY2-36

[0099] Também são aqui fornecidos N-terminais para análogos cíclicos de cadeia lateral de PYY exibindo ao menos 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de identidade de sequência com PYY₃₋₃₆ (hPYY₃₋₃₆) humano. Como um exemplo de um método para determinação da identidade de sequência entre dois análogos, os dois peptídeos





são alinhados. A identidade de sequência do análogo em relação a hPYY₃₋₃₆ é dada pelo número total de resíduos alinhados menos o número de diferentes resíduos (isto é, o número de resíduos idênticos alinhados) dividido pelo número total de resíduos em hPYY₃₋₃₆. Neste exemplo diferentes resíduos são D11 que foram trocados por um K11 substituído, seguido de V31 que foi trocado por hC31, e finalmente R35 foi descarboxilado. Consequentemente, no dito exemplo a identidade de sequência é (34-3)/34 X 100.

Conjugados

[0100] Em um outro aspecto geral, a invenção se refere a um conjugado que compreende um peptídeo de fusão de GLP-1 da invenção conjugado covalentemente a um peptídeo PYY cíclico, de maneira sítio-específica, de modo que o peptídeo de fusão de GLP-1 acoplado ao peptídeo PYY cíclico tem uma meia-vida estendida/aumentada em comparação com o peptídeo GLP-1 ou o peptídeo variante de GLP-1 ou o peptídeo PYY cíclico sozinho. A invenção também se refere a composições farmacêuticas e métodos para uso das mesmas. Os conjugados são úteis para prevenir, tratar, ou aliviar doenças ou distúrbios, como obesidade, diabetes do tipo 2, síndrome metabólica (isto é, Síndrome X), resistência à insulina, tolerância à glicose deficiente (por exemplo, intolerância à glicose), hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglicemia devido a hiperinsulinismo congênito (CHI), dislipidemia, aterosclerose, nefropatia diabética, e outros fatores de risco cardiovascular como hipertensão e fatores de risco cardiovasculares relacionados aos níveis de colesterol e/ou de lipídios não controlados, osteoporose, inflamação, do-

ença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH), doença renal e eczema, entre outros.

[0101] Em certas modalidades, o peptídeo de fusão de GLP-1 da invenção compreende ao menos um resíduo de cisteína que é capaz de ser conjugado ao peptídeo PYY cíclico. Em certas modalidades, o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 113 a 224 e 267 a 274. Em certas modalidades, a fusão do GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 113 ou 136. Em certas modalidades, o ao menos um resíduo de cisteína é compreendido no segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1. Em determinadas modalidades, o resíduo de cisteína está situado entre os resíduos 287 e 289 do peptídeo de fusão de GLP-1 da SEQ ID NO:113 ou SEQ ID NO:136, de preferência o resíduo de cisteína está situado no resíduo 288 da fusão de GLP-1. Em certas modalidades, o peptídeo de fusão de GLP-1 está covalentemente ligado a um resíduo de lisina no resíduo 7, 9, 11, 22 ou 23 do peptídeo PYY cíclico, de preferência, no resíduo de lisina 11. Em certas modalidades, o peptídeo de fusão de GLP-1 está covalentemente ligado diretamente ao peptídeo PYY cíclico, ou indiretamente ao peptídeo PYY cíclico através de um ligante químico no peptídeo PYY cíclico.

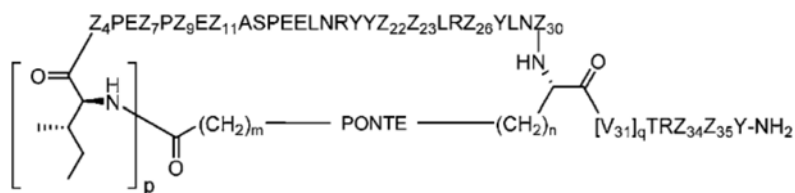
[0102] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico pode compreender um ligante químico. O ligante químico pode ser modificado quimicamente (por exemplo, um grupo eletrofílico pode ser adicionado ao ligante) para permitir a conjugação do peptídeo de fusão de GLP-1 ao ligante químico PYY cíclico. O ligante químico pode, por exemplo, incluir, mas não se limita a, um ligante de peptídeo, um ligante de hidrocarboneto, um ligante de polietileno glicol (PEG), um ligante de polipropileno glicol (PPG), um ligante de polissacarídeo, um ligante de poliéster, um ligante contendo um grupo acila, um ligante híbrido que

consiste em PEG e um heterociclo incorporado, ou uma cadeia de hidrocarboneto. Os ligantes de PEG podem, por exemplo, compreender de 2 a 24 unidades de PEG.

[0103] Os métodos de conjugação dos peptídeos de fusão de GLP-1 da invenção com os peptídeos PYY cíclicos da invenção são conhecidos na técnica. Em resumo, os peptídeos de fusão de GLP-1 da invenção podem ser reduzidos com um agente redutor (por exemplo, 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano (PTA)), purificados (por exemplo, por cromatografia de dessalinização), e conjugados com o peptídeo PYY cíclico (por exemplo, fornecendo o peptídeo de fusão de GLP-1 reduzido sob condições que possibilitem a conjugação). Durante a reação de conjugação, o grupo de saída eletrofílico do peptídeo PYY cíclico é deslocado e uma ligação covalente se forma entre o peptídeo de fusão de GLP-1 e o peptídeo PYY cíclico para formar um conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1. Após a reação de conjugação, o conjugado pode ser purificado por cromatografia de troca iônica ou cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) com uma etapa de purificação final de adsorção de proteína A. Em certas modalidades, os peptídeos de fusão de GLP-1 da invenção podem ser purificados antes de serem reduzidos com o uso de métodos de HIC. Para uma descrição mais pormenorizada dos métodos de conjugação, consultar, por exemplo, o Exemplo 2.

[0104] São aqui fornecidos conjugados que compreendem um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende um peptídeo GLP-1, um primeiro peptídeo ligante, um peptídeo da região de dobradiça-Fc, e um segundo peptídeo ligante, em que o primeiro peptídeo ligante está opcionalmente ausente.

[0105] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou um derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula I

em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

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

Z₄ é K, A, E, S ou R;

Z₇ é A ou K;

Z₉ é G ou K;

Z₁₁ é D ou K;

Z₂₂ é A ou K;

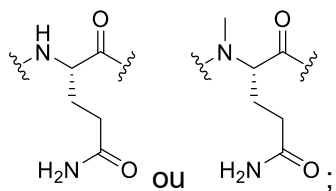
Z₂₃ é S ou K;

Z₂₆ é A ou H;

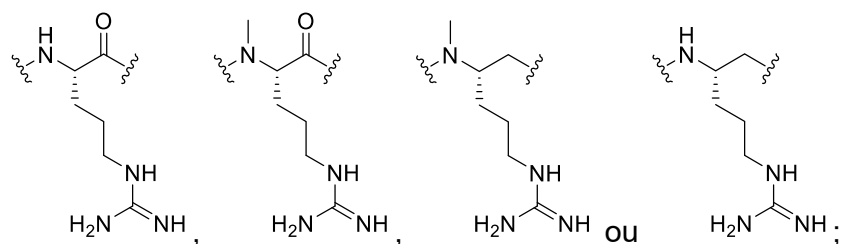
Z₃₀ é L, W, ausente;

desde que Z₃₀ esteja ausente apenas quando q for 1;

Z₃₄ é



Z₃₅ é



em que o derivado é o composto de Fórmula I que é modificado por um ou mais processos selecionados do grupo que consiste em amidação, acilação e PEGuilação.

[0106] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

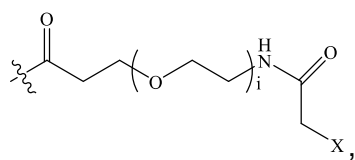
n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z₄ é K, A, E, S ou R;

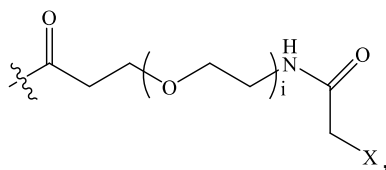
Z₇ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e X = Br, I ou Cl,

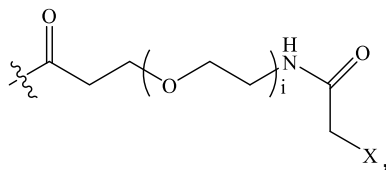
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I ou -C(O)CH₂Cl;

Z₉ é G ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



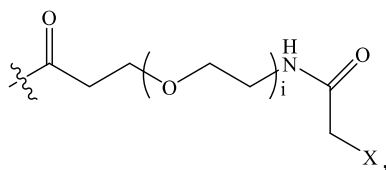
em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}$, I ou Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ ou $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{11} é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



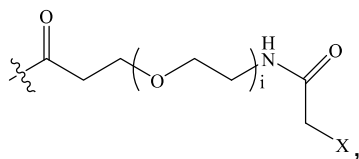
em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}$, I ou Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$ ou $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$;

Z_{22} é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}$, I ou Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ ou $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{23} é S ou K; em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por

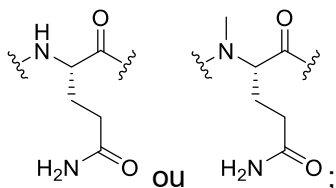


em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}$, I ou Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ ou $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

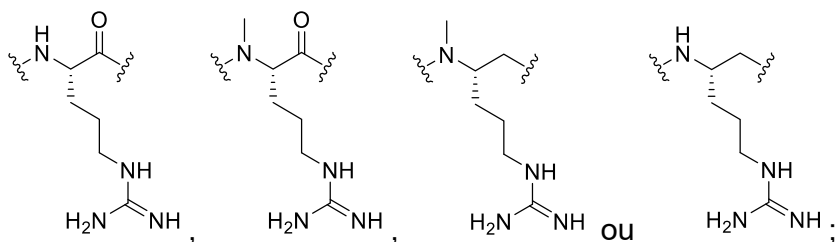
Z_{26} é A ou H;

Z_{30} é L, W ausente, contanto que Z_{30} esteja ausente apenas quando q for 1;

Z_{34} é



Z_{35} é



em que X é um grupo eletrofílico e o Br, Cl, ou Cl do grupo eletrofílico X é deslocado na reação de conjugação para formar o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1.

[0107] Em certas modalidades, o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3 ou 5;

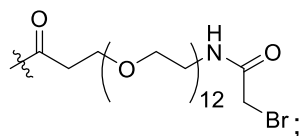
n é 1, 2 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z_{30} estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

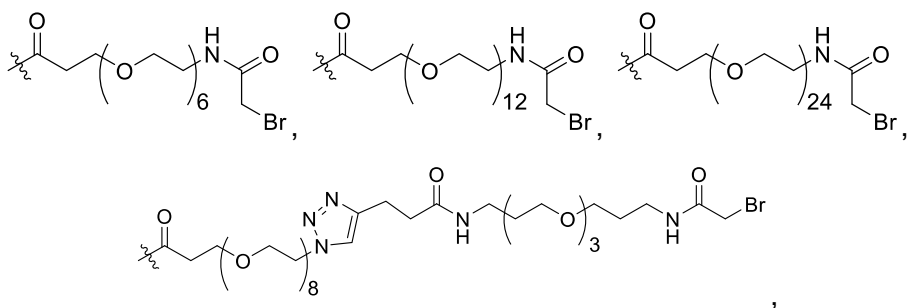
Z_4 é K, A, E, S ou R;

Z_7 é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por



Z_9 é G ou K;

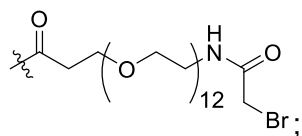
Z_{11} é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



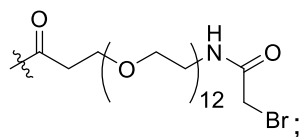
$\text{C(O)CH}_2\text{Br}$,

ou

Z₂₂ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por



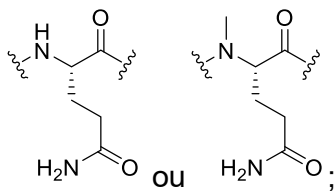
Z₂₃ é S ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por



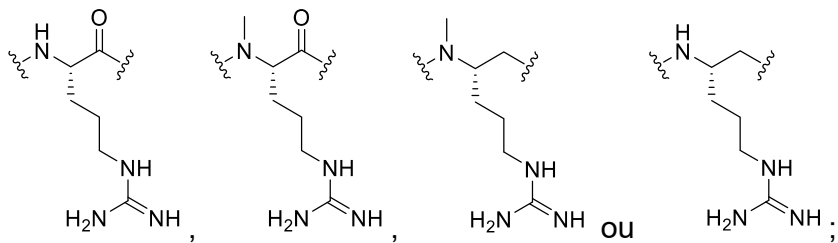
Z₂₆ é A ou H;

Z₃₀ é L;

Z₃₄ é



Z₃₅ é



em que o Br é deslocado na reação de conjugação para formar o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1.

[0108] Em certas modalidades, um conjugado compreende um peptídeo de fusão de GLP-1 conjugado a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo PYY cíclico é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 54. Em uma modalidade preferencial, o conjugado compreende um peptídeo de fusão de GLP-1 conjugado a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo PYY cíclico é selecionado dentre as SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 ou 34.

[0109] Em certas modalidades, o peptídeo de fusão de GLP-1 está covalentemente ligado ao peptídeo PYY cíclico em um resíduo de lisina do peptídeo PYY cíclico através de um ligante químico no resíduo de lisina. O ligante químico pode, por exemplo, compreender um ligante selecionado dentre C(O)CH₂, polietileno glicol (PEG)8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG4, uma cadeia de PEG de 2 a 24 unidades de PEG, um ligante contendo um grupo acila, ou uma cadeia de alquila contendo 2 a 10 átomos de carbono.

[0110] Um peptídeo de fusão de GLP-1, de acordo com uma modalidade da invenção, pode ser conjugado a um peptídeo PYY cíclico em uma ou mais posições de aminoácido do peptídeo PYY cíclico, como o resíduo de aminoácido 4, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 30 ou 31 do peptídeo PYY cíclico com o uso de métodos conhecidos na técnica. A numeração do resíduo de aminoácidos segue aquela do hPYY₃₋₃₆. Em certas modalidades, apenas um dentre Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ e Z₂₃ na Fórmula I é lisina, e a lisina está covalentemente ligada a um resíduo de cisteína no segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1. Em uma modalidade preferencial, um peptídeo de fusão de GLP-1, de acordo com uma modalidade da invenção, é conjugado a um peptídeo PYY cíclico no resíduo 11 do peptídeo PYY cíclico, em que o resíduo 11 é uma lisina. Em uma outra

modalidade preferencial, um eletrófilo, como bromoacetamida ou maleimida, é introduzido em uma cadeia lateral de um peptídeo PYY cíclico, como a cadeia lateral de amino de uma lisina no resíduo 11 do peptídeo PYY cíclico, e o eletrófilo reage de maneira sítio-específica com o grupo sulfidril do resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1, de preferência o segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1 é SEQ ID NO:93, 94, 95, 106, ou 111, criando assim uma ligação covalente entre o peptídeo PYY cíclico e o peptídeo de fusão de GLP-1. Com mais preferência, o peptídeo PYY cíclico é selecionado dentre as SEQ ID NO:24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 ou 34. Em uma modalidade, o eletrófilo é introduzido sobre a cadeia lateral de um PYY cíclico diretamente. Em uma outra modalidade, o eletrófilo é introduzido na cadeia lateral de um PYY cíclico indiretamente por meio de um ligante químico.

[0111] Em certas modalidades, o resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1 é reduzido colocando-se o peptídeo de fusão de GLP-1 em contato com um excesso de um agente redutor de azafosfina, por meio do qual o resíduo de cisteína reduzido é reagido com o eletrófilo. O agente redutor de azafosfina é 1,3,5-triaza-7 fosfatriciclo[3.3.1.1] decano (PTA) ou um derivado do mesmo.

[0112] São fornecidas aqui composições farmacêuticas que compreendem os conjugados da invenção e compreendem ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0113] Exemplos não limitadores de conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado a peptídeo de fusão de GLP-1 são fornecidos na Tabela 7.

Tabela 7: Conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado a peptídeo de fusão de GLP-1

Fusão de GLP-1 (GF)	Fusão de GLP-1 SEQ ID NO:	Peptídeo PYY cíclico	Conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado a peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:
GF1	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:225
GF1	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:226

GF1	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:227
GF1	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:228
GF24	SEQ ID NO:136	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:229
GF24	SEQ ID NO:136	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:230
GF24	SEQ ID NO:136	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:231
GF24	SEQ ID NO:136	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:232
GF70	SEQ ID NO:182	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:233
GF11	SEQ ID NO:123	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:234
GF28	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:235
GF67	SEQ ID NO:179	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:236
GF27	SEQ ID NO:139	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:237
GF23	SEQ ID NO:135	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:238
GF54	SEQ ID NO:166	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:239
GF63	SEQ ID NO:175	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:240
GF64	SEQ ID NO:176	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:241
GF22	SEQ ID NO:134	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:242
GF49	SEQ ID NO:161	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:243
GF34	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:244
GF35	SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:245
GF65	SEQ ID NO:177	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:246
GF45	SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:247
GF40	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:248
GF40	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:249
GF40	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:250
GF19	SEQ ID NO:131	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:251
GF8	SEQ ID NO:120	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:252
GF34	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:253
GF42	SEQ ID NO:154	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:254
GF59	SEQ ID NO:171	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:255
GF60	SEQ ID NO:172	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:256
GF61	SEQ ID NO:173	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:257
GF63	SEQ ID NO:175	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:258
GF63	SEQ ID NO:175	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:259
GF40	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:260
GF40	SEQ ID NO: 152 (monômero)	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:261
GF34	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:262

Porções que prolongam a meia-vida

[0114] Além do peptídeo de fusão de GLP-1, os conjugados da invenção podem incorporar uma ou mais outras porções para prolongar a meia-vida da porção farmacêutica ativa (por exemplo, o peptídeo PPY cíclico), por exemplo, através de interação covalente. Outras porções exemplificadoras que prolongam a meia vida, incluem, mas não se limitam a, albumina, variantes de albumina, proteínas e/ou domínios de ligação a albumina, transferrina e seus fragmentos e análogos dos mesmos. Outras porções que prolongam a meia-vida e que podem ser in-

corporadas aos conjugados da invenção incluem, por exemplo, moléculas de polietileno glicol (PEG), como PEG5000 ou PEG20.000, e similares, polilisina, octano, carboidratos (dextrano, celulose, oligo ou polissacarídeos) para obter as propriedades desejadas. Estas porções podem ser fusões diretas com as sequências que codificam a estrutura de proteína e podem ser geradas por técnicas padrão de expressão e clonagem. Alternativamente, métodos de acoplamento químico bem conhecidos podem ser usados para ligar as porções aos conjugados recombinante e quimicamente produzidos da invenção.

[0115] Uma porção peguilada pode ser, por exemplo, adicionada às moléculas de peptídeo da invenção pela incorporação de um resíduo de cisteína ao C-terminal da molécula e pela ligação de um grupo peguilado à cisteína com o uso de métodos bem conhecidos.

[0116] As moléculas de peptídeos da invenção que incorporam porções adicionais podem ser comparadas quanto à sua funcionalidade através de vários ensaios bem conhecidos. Por exemplo, as atividades farmacocinéticas ou biológicas de um peptídeo terapêutico de interesse, sozinho ou em um conjugado de acordo com a invenção, podem ser analisadas com o uso de ensaios *in vitro* ou *in vivo* conhecidos e comparadas.

Composições farmacêuticas

[0117] Em um outro aspecto geral, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende os conjugados e os compostos da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável. O termo "composição farmacêutica" para uso na presente invenção significa um produto que compreende um conjugado da invenção em conjunto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Os conjugados e os compostos da invenção e as composições que os compreendem também são úteis na fabricação de um medicamento para aplicações terapêuticas mencionadas na presente invenção.

[0118] Como usado na presente invenção, o termo "veículo" se refere a qualquer excipiente, diluente, carga, sal, tampão, estabilizante, solubilizante, óleo, lipídio, vesícula contendo lipídio, microesfera, encapsulação em lipossomas ou outro material bem conhecido na técnica para uso em formulações farmacêuticas. Deve-se compreender que as características do veículo, excipiente ou diluente dependerão da via de administração para uma aplicação específica. Como usado aqui, o termo "veículo farmaceuticamente aceitável" se refere a um material não tóxico que não interfere com a eficácia de uma composição de acordo com a invenção ou com a atividade biológica de uma composição de acordo com a invenção. De acordo com modalidades específicas, em vista da presente revelação, qualquer veículo farmaceuticamente aceitável adequado ao uso em uma composição farmacêutica de peptídeo conjugado pode ser usado na invenção.

[0119] Sais ácidos/aniônicos farmaceuticamente aceitáveis, para uso na presente invenção, incluem, porém não se limitam a, acetato, benzenossulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartarato, brometo, edetato de cálcio, cansilato, carbonato, cloreto, citrato, dicloridrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gliceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromidrato, cloridrato, hidróxi naftoato, iodeto, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbrometo, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartarato, teoclato, tosilato e trietiodeto. Ácidos orgânicos ou inorgânicos incluem também, e não se limitam a, ácido hidriódico, perclórico, sulfúrico, fosfórico, propiônico, glicólico, metanossulfônico, hidroxietanossulfônico, oxálico, 2-naftalenossulfônico, p-toluenossulfônico, ciclo-hexanossulfâmico, sacarínico ou trifluoro acético.

[0120] Sais básicos/catiônicos farmaceuticamente aceitáveis incluem, porém não se limitam a alumínio, 2-amino-2-hidróxi-metil-propano-1,3-diol (também conhecido como tris(hidróxi-metil)aminometano, trometano ou "TRIS"), amônia, benzatina, t-butilamina, cálcio, cloroprocaína, colina, ciclo-hexilamina, dietanolamina, etilenodiamina, lítio, L-lisina, magnésio, meglumina, N-metil-D-glucamina, piperidina, potássio, procaína, quinina, sódio, trietanolamina ou zinco.

[0121] Em algumas modalidades da invenção, são fornecidas formulações farmacêuticas que compreendem os conjugados da invenção em uma quantidade de cerca de 0,001 mg/ml a cerca de 100 mg/ml, de cerca de 0,01 mg/ml a cerca de 50 mg/ml, ou de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 25 mg/ml. A formulação farmacêutica pode ter um pH de cerca de 3,0 a cerca de 10, por exemplo, de cerca de 3 a cerca de 7, ou de cerca de 5 a cerca de 9. A formulação pode compreender adicionalmente ao menos um ingrediente selecionado dentre um sistema de tamponamento, conservante(s), agente(s) de tonicidade, agente(s) quelante(s), estabilizante(s) e tensoativo(s).

[0122] A formulação de ingredientes farmaceuticamente ativos com veículos farmaceuticamente aceitáveis é conhecida na técnica, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por exemplo, 21ª edição (2005), e quaisquer edições posteriores). Exemplos não limitadores de ingredientes adicionais incluem: tampões, diluentes, solventes, agentes reguladores de tonicidade, conservantes, estabilizantes e agentes quelantes. Um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis podem ser usados na formulação das composições farmacêuticas da invenção.

[0123] Em uma modalidade da invenção, a composição farmacêutica é uma formulação líquida. Um exemplo preferencial de uma formulação líquida é uma formulação aquosa, isto é, uma formulação que

compreende água. A formulação líquida pode compreender uma solução, uma suspensão, uma emulsão, uma microemulsão, um gel e similares. Uma formulação aquosa compreende tipicamente ao menos 50% em peso/peso de água, ou ao menos 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou ao menos 95% em peso/peso de água.

[0124] Em uma modalidade, a composição farmacêutica pode ser formulada como um injetável que pode ser administrado, por exemplo, por meio de um dispositivo de injeção (por exemplo, uma seringa ou uma bomba de infusão). A injeção pode ser administrada por via subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa, por exemplo.

[0125] Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica é uma formulação sólida, por exemplo, uma composição secada por congelamento ou secada por atomização, que pode ser usada na forma em que se encontra, ou à qual o médico ou o paciente adiciona solventes, e/ou diluentes antes do uso. As formas sólidas de dosagem podem incluir comprimidos, como comprimidos compactados, e/ou comprimidos revestidos, e cápsulas (por exemplo, cápsulas de gelatina duras ou moles). A composição farmacêutica pode também estar sob a forma de sachês, drágeas, pós, grânulos, pastilhas ou pós para reconstituição, por exemplo.

[0126] As formas de dosagem podem ser de liberação imediata, e neste caso elas podem compreender um veículo solúvel ou dispersível em água, ou podem ser de liberação retardada, liberação prolongada ou liberação modificada, e neste caso elas podem compreender polímeros insolúveis em água que regulam a taxa de dissolução da forma de dosagem no trato gastrointestinal.

[0127] Em outras modalidades, a composição farmacêutica pode ser administrada por via intranasal, intrabucal ou sublingual.

[0128] O pH em uma formulação aquosa pode estar entre pH 3 e pH 10. Em uma modalidade da invenção, o pH da formulação é de cerca de 7,0 a cerca de 9,5. Em uma outra modalidade da invenção, o pH da

formulação é de cerca de 3,0 a cerca de 7,0.

[0129] Em uma outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um tampão. Exemplos não limitadores de tampões incluem: arginina, ácido aspártico, bicina, citrato, hidrogenofosfato dissódico, ácido fumárico, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, ácido maleico, ácido málico, acetato de sódio, carbonato de sódio, di-hidrogenofosfato de sódio, fosfato de sódio, succinato, ácido tartárico, tricina e tris(hidroximetil)-aminometano, e misturas dos mesmos. O tampão pode estar presente individualmente ou em um agregado, a uma concentração de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, por exemplo, de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL. As composições farmacêuticas que compreendem cada um desses tampões específicos constituem modalidades alternativas da invenção.

[0130] Em uma outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um conservante. Exemplos não limitadores de conservantes incluem: cloreto de benzetônio, ácido benzoico, álcool benzílico, bronopol, 4-hidroxibenzoato de butila, clorobutanol, clorocresol, clorexidina, clorfenesina, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 4-hidroxibenzoato de etila, imidureia, 4-hidroxibenzoato de metila, fenol, 2-fenoxietanol, 2-feniletanol, 4-hidroxibenzoato de propila, desidroacetato de sódio, timerosal, e misturas dos mesmos. O conservante pode estar presente individualmente ou em um agregado, a uma concentração de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, por exemplo, de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL. As composições farmacêuticas que compreendem cada um desses conservantes específicos constituem modalidades alternativas da invenção.

[0131] Em outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um agente isotônico. Exemplos não limitadores de agentes isotônicos incluem um sal (como cloreto de sódio), um aminoácido (como glicina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico,

triptofano e treonina), um alditol (como glicerol, 1,2-propanodiol propileno glicol), 1,3-propanodiol e 1,3-butanodiol), polietileno glicol (por exemplo, PEG400) e misturas dos mesmos. Outro exemplo de um agente isotônico inclui um açúcar. Exemplos não limitadores de açúcares podem ser mono-, di-, ou polissacarídeos, ou glucanos solúveis em água, incluindo por exemplo frutose, glicose, manose, sorbose, xilose, maltose, lactose, sacarose, trealose, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa e beta- HPCD, amido solúvel, hidróxi etil amido e carboximetilcelulose de sódio. Um outro exemplo de um agente isotônico é um álcool de açúcar, em que o termo "álcool de açúcar" é definido como um C(4 a 8) hidrocarboneto que tem ao menos um grupo -OH. Exemplos não limitadores de álcoois de açúcar incluem manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol e arabitól. O agente isotônico pode estar presente individualmente ou em um agregado, a uma concentração de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, por exemplo, de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL. As composições farmacêuticas que compreendem cada um desses agentes isotônicos específicos constituem modalidades alternativas da invenção.

[0132] Em outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um agente quelante. Exemplos não limitadores de agentes quelantes incluem ácido cítrico, ácido aspártico, sais de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e misturas dos mesmos. O agente quelante pode estar presente individualmente ou em um agregado, a uma concentração de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, por exemplo, de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL. As composições farmacêuticas que compreendem cada um desses agentes quelantes específicos constituem modalidades alternativas da invenção.

[0133] Em uma outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um estabilizante. Exemplos não limitadores de estabilizantes incluem um ou mais inibidores de agregação, um ou

mais inibidores de oxidação, um ou mais tensoativos e/ou um ou mais inibidores de protease.

[0134] Em outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um estabilizante, em que o dito estabilizante é carbóxi-/hidroxixelulose e derivados do mesmo (como HPC, HPC-SL, HPC-I e HPMC), ciclodextrinas, 2-metiltioetanol, polietileno glicol (como PEG 3350), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, sais (tais como cloreto de sódio), substâncias contendo enxofre, como monotioglicerol) ou ácido tioglicólico. O estabilizante pode estar presente individualmente ou em um agregado, a uma concentração de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, por exemplo, de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL. As composições farmacêuticas que compreendem cada um desses estabilizantes específicos constituem modalidades alternativas da invenção.

[0135] Em modalidades adicionais da invenção, a composição farmacêutica compreende um ou mais tensoativos, de preferência, um tensoativo, ao menos um tensoativo, ou dois tensoativos diferentes. O termo "tensoativo" se refere a quaisquer moléculas ou íons que são compostos por uma parte solúvel em água (hidrofílica) e uma parte solúvel em gordura (lipofílica). O tensoativo pode, por exemplo, ser selecionado dentre tensoativos aniônicos, tensoativos catiônicos, tensoativos não iônicos, e/ou tensoativos zwitteriônicos. O tensoativo pode estar presente individualmente ou em um agregado, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL. As composições farmacêuticas que compreendem cada um desses tensoativos específicos constituem modalidades alternativas da invenção.

[0136] Em uma outra modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um ou mais inibidores da protease, como, por exemplo, EDTA e/ou ácido clorídrico (HCl) benzamidina. O inibidor de protease pode estar presente individualmente ou em um agregado, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL de. As

composições farmacêuticas que compreendem cada um desses inibidores de protease específicos constituem modalidades alternativas da invenção.

[0137] A composição farmacêutica da invenção pode compreender uma quantidade de uma base de aminoácido suficiente para diminuir a formação de agregado do polipeptídeo durante o armazenamento da composição. O termo "base de aminoácido" se refere a um ou mais aminoácidos (como metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano, treonina), ou análogos dos mesmos. Qualquer aminoácido pode estar presente em sua forma de base livre ou em sua forma de sal. Qualquer estereoisômero (isto é, L, D ou uma mistura dos mesmos) da base de aminoácido pode estar presente. A base de aminoácido pode estar presente individualmente ou em combinação com outras bases de aminoácido, a uma concentração de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, por exemplo, de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 20 mg/mL. As composições farmacêuticas que compreendem cada uma dessas bases de aminoácido específicas constituem modalidades alternativas da invenção.

[0138] Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos conjugados da invenção incluem os sais não tóxicos convencionais ou os sais de amônio quaternário que são formados a partir de bases ou ácidos inorgânicos ou orgânicos. Exemplos de tais sais de adição ácida incluem acetato, adipato, benzoato, benzenossulfonato, citrato, canforato, dodecilsulfato, cloridrato, bromidrato, lactato, maleato, metanossulfonato, nitrato, oxalato, pivalato, proprionato, succinato, sulfato e tartarato. Os sais de base incluem sais de amônio, sais de metais alcalinos, como sais de sódio e de potássio, sais de metais alcalinoterrosos, como sais de cálcio e magnésio, sais com bases orgânicas, como sais de díciclo-hexilamino e sais com aminoácidos, como arginina. Ademais, os grupos contendo nitrogênio básico podem ser quaternizados com haletos de alquila, por

exemplo.

[0139] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas por quaisquer meios que desempenhem seu propósito previsto. Exemplos incluem administração por via parenteral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, bucal ou ocular. A administração pode ser realizada por via oral. Formulações adequadas para a administração parenteral incluem soluções aquosas dos conjugados ativos em forma solúvel em água, por exemplo, sais solúveis em água, soluções ácidas, soluções alcalinas, soluções de dextrose-água, soluções isotônicas de carboidrato e complexos de inclusão de ciclodextrina. Em certas modalidades, os conjugados da invenção são administrados periféricamente.

[0140] A presente invenção abrange, também, um método de produção de uma composição farmacêutica que compreende a mistura de um veículo farmaceuticamente aceitável com qualquer um dos conjugados da presente invenção. Adicionalmente, a presente invenção inclui composições farmacêuticas produzidas através da mistura de um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis com qualquer um dos conjugados da presente invenção.

[0141] Além disso, os conjugados da presente invenção podem ter uma ou mais formas cristalinas polimorfas ou amorfas e, como tal, são destinados a serem incluídos no escopo da invenção. Além disso, os conjugados podem formar solvatos, por exemplo, com água (isto é, hidratos) ou solventes orgânicos comuns. Para uso na presente invenção, o termo "solvato" significa uma associação física dos conjugados da presente invenção com uma ou mais moléculas de solvente. Essa associação física envolve diferentes graus de ligação iônica e covalente, incluindo ligação ao hidrogênio. Em certos casos, o solvato será capaz de isolamento, por exemplo, quando uma ou mais moléculas de solvente forem incorporadas na rede de cristal do sólido cristalino. O termo

"solvato" destina-se a abranger ambos os solvatos isolável e de fase de solução. Exemplos não limitadores de solvatos adequados incluem etanolatos, metanolatos e similares.

[0142] Pretende-se que a presente invenção inclua em seu escopo os polimorfos e solvatos dos conjugados da presente invenção. Portanto, nos métodos de tratamento da presente invenção, o termo "administrar" deve abranger os meios de tratamento, o alívio ou prevenção de uma síndrome, distúrbio ou doença aqui descritos com os compostos da presente invenção ou um polimorfo ou solvato dos mesmos, o que estaria evidentemente no escopo da invenção, embora não especificamente apresentado.

[0143] Em outra modalidade, a invenção se refere a um conjugado da invenção para uso como um medicamento.

[0144] A presente invenção inclui, em seu escopo, pró-fármacos dos conjugados desta invenção. De modo geral, tais pró-fármacos serão derivados funcionais dos conjugados que são prontamente conversíveis *in vivo* no conjugado necessário. Assim, nos métodos de tratamento da presente invenção, o termo "administração" deve abranger o tratamento dos vários distúrbios descritos com o conjugado especificamente descrito ou um conjugado que pode não ter sido especificamente descrito, mas que se converte no conjugado especificado *in vivo* após a administração ao paciente. Os procedimentos convencionais para a seleção e preparação de derivados de pró-fármacos adequados são descritos, por exemplo, em "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

[0145] Além disso, entende-se que dentro do escopo da presente invenção, qualquer elemento, em particular, quando mencionado em relação aos conjugados da invenção, deve incluir todos os isótopos e misturas isotópicas do dito elemento, ocorrendo naturalmente ou produzidos sinteticamente, com abundância natural ou em uma forma enriquecida isotopicamente. Por exemplo, uma referência a hidrogênio inclui em seu

escopo ^1H , ^2H (D), e ^3H (T). De modo similar, referências a carbono e oxigênio incluem em seu escopo, respectivamente, ^{12}C , ^{13}C e ^{14}C e ^{16}O e ^{18}O . Os isótopos podem ser radioativos ou não radioativos. Os conjugados radiomarcados da invenção podem compreender um isótopo radioativo selecionado do grupo dentre ^3H , ^{11}C , ^{18}F , ^{122}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br e ^{82}Br . De preferência, o isótopo radioativo é selecionado do grupo de ^3H , ^{11}C e ^{18}F .

[0146] Alguns conjugados da presente invenção podem existir como atropisômeros. Atropisômeros são estereoisômeros que resultam da rotação articulada sobre ligações simples em que a barreira de cepa estérica contra a rotação é alta o suficiente para permitir o isolamento dos confômeros. Deve ser entendido que todos esses confômeros e misturas dos mesmos são abrangidos dentro do escopo da presente invenção.

[0147] Quando os conjugados têm, de acordo com a presente invenção, ao menos um centro estéreo, eles podem existir consequentemente sob a forma de enantiômeros ou diastereômeros. Deve ser entendido que todos esses isômeros e misturas dos mesmos são abrangidos dentro do escopo da presente invenção.

[0148] Quando os processos para a preparação dos conjugados, de acordo com a invenção, derem origem a uma mistura de estereoisômeros, esses isômeros poderão ser separados por meio de técnicas convencionais, como cromatografia preparatória. Os conjugados podem ser preparados de forma racêmica, ou os enantiômeros individuais podem ser preparados por meio de uma síntese enantioespecífica ou por resolução. Os conjugados podem, por exemplo, ser separados em seus enantiômeros componentes por técnicas padrão como a formação de pares diastereoméricos pela formação de sal com um ácido opticamente ativo como ácido (-)-di-p-toluoil-D-tartárico e/ou ácido (+)-

di-p-toluoil-L-tartárico seguido por cristalização fracionada e regeneração da base livre. Os conjugados podem, também, ser separados através da formação de ésteres ou amidas diastereoméricos, seguido por separação cromatográfica e remoção do auxiliar quiral. Alternativamente, os conjugados podem ser separados com o uso de uma coluna quiral através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou SFC. Em alguns casos, podem existir rotâmeros de conjugados que são observáveis por RMN de ^1H resultando em multipletos complexos e integração de picos no espectro de RMN de ^1H .

[0149] Durante qualquer um dos processos para a preparação dos conjugados da presente invenção, pode ser necessário e/ou desejável proteger os grupos sensíveis ou reativos em qualquer uma das moléculas relacionadas. Isso pode ser obtido por meio de grupos protetores convencionais, como aqueles descritos em *Protective Groups in Organic Chemistry*, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; e *TW Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 1991, cada um dos quais está aqui incorporado na íntegra, a título de referência, para todos os propósitos. Os grupos protetores podem ser removidos em um estágio subsequente conveniente com o uso de métodos conhecidos na técnica.

Métodos de uso

[0150] A presente invenção se refere a um método para a prevenção, o tratamento ou o alívio de uma síndrome, distúrbio ou doença mediada pelo receptor Y2 e/ou uma síndrome, distúrbio ou doença mediada pelo receptor de GLP-1 em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção.

[0151] A presente invenção também fornece um método para prevenção, tratamento, retardo do, ou alívio de um distúrbio, doença ou

condição ou qualquer um ou mais sintomas do dito distúrbio, doença ou condição em um indivíduo em necessidade do mesmo, que compreende administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção.

[0152] De acordo com as modalidades específicas, a doença, distúrbio, ou condição é selecionado dentre obesidade, diabetes do tipo I ou II, síndrome metabólica (isto é, Síndrome X), resistência à insulina, tolerância à glicose deficiente (por exemplo, intolerância à glicose), hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglicemia devido a hiperinsulinismo congênito (CHI), dislipidemia, aterosclerose, nefropatia diabética, e outros fatores de risco cardiovascular como hipertensão e fatores de risco cardiovascular relacionados aos níveis de colesterol e/ou de lipídios não controlados, osteoporose, inflamação, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH), doença renal e/ou eczema.

[0153] De acordo com as modalidades particulares, uma quantidade terapeuticamente eficaz se refere à quantidade de terapia que é suficiente para alcançar um, dois, três, quatro ou mais dos seguintes efeitos: (i) reduzir ou melhorar a gravidade da doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (ii) reduzir a duração da doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (iii) evitar a progressão da doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (iv) causar a regressão da doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (v) evitar o desenvolvimento ou o início da doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (vi) evitar a recorrência da doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (vii) reduzir a hospitalização de um indivíduo que

tem a doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (viii) reduzir o período de hospitalização de um indivíduo que tem a doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (ix) aumentar a sobrevida de um indivíduo com a doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo; (xi) inibir ou reduzir a doença, distúrbio ou condição a ser tratado, ou um sintoma associado ao mesmo em um indivíduo; e/ou (xii) aumentar ou melhorar o efeito profilático ou terapêutico (ou os efeitos profiláticos e terapêuticos) de outra terapia.

[0154] A quantidade terapeuticamente eficaz ou a dosagem pode variar de acordo com vários fatores, como a doença, distúrbio ou condição a ser tratada, os meios de administração, o sítio alvo, o estado fisiológico do indivíduo (incluindo, por exemplo, idade, peso corporal, saúde), se o indivíduo é um ser humano ou um animal, outros medicamentos administrados, e se o tratamento é profilático ou terapêutico. As dosagens de tratamento são idealmente tituladas para otimizar a segurança e a eficácia.

[0155] Para uso na presente invenção, os termos "tratar", "tratando" e "tratamento" destinam-se a referir a uma melhora ou reversão de ao menos um parâmetro físico mensurável relacionado à doença, distúrbio ou condição, que não é necessariamente discernível no indivíduo, mas que pode ser discernível no indivíduo. Os termos "tratar", "tratando" e "tratamento" também podem se referir a causar a regressão, evitar a progressão ou, pelo menos, diminuir a progressão da doença, distúrbio ou condição. Em uma modalidade particular, "tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se a um alívio, prevenção do desenvolvimento ou início, ou redução na duração de um ou mais sintomas associados à doença, distúrbio ou condição. Em uma modalidade particular, "tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se à prevenção da recorrência da doença, distúrbio ou condição. Em uma modalidade particular, "tratar", "tratando" e "tratamento" referem-

se a um aumento na sobrevida de um indivíduo que tem a doença, distúrbio ou condição. Em uma modalidade particular, "tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se à eliminação da doença, distúrbio ou condição no indivíduo.

[0156] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para evitar, tratar, retardar o início de, ou melhorar a obesidade, ou qualquer um ou mais sintomas de obesidade em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção.

[0157] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para reduzir o peso corporal em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção.

[0158] Em algumas modalidades, o peso corporal de um indivíduo é reduzido, por exemplo, entre cerca de 0,01% acerca de 0,1%, entre cerca de 0,1% a cerca de 0,5%, entre cerca de 0,5% a cerca de 1%, entre cerca de 1% a cerca de 5%, entre cerca de 2% a cerca de 3%, entre cerca de 5% a cerca de 10%, entre cerca de 10% a cerca de 15%, entre cerca de 15% a cerca de 20%, entre cerca de 20% a cerca de 25%, entre cerca de 25% a cerca de 30%, entre cerca de 30% a cerca de 35%, entre cerca de 35% a cerca de 40%, entre cerca de 40% a cerca de 45%, ou entre cerca de 45% a cerca de 50%, em relação ao peso corporal de um indivíduo antes de uma administração de qualquer um dos conjugados, compostos, composições farmacêuticas, formas, ou medicamentos da invenção aqui descritos, ou em comparação com indivíduos de controle que não recebem nenhum dos conjugados, compostos composições, formas, medicamentos, ou combinações da invenção aqui descrita.

[0159] Em algumas modalidades, a redução no peso corporal é mantida durante cerca de 1 semana, durante cerca de 2 semanas, durante cerca de 3 semanas, durante cerca de 1 mês, durante cerca de 2 meses, durante cerca de 3 meses, durante cerca de 4 meses, durante cerca de 5 meses, durante cerca de 6 meses, durante cerca de 7 meses, durante cerca de 8 meses, durante cerca de 9 meses, durante cerca de 10 meses, durante cerca de 11 meses, durante cerca de 1 ano, durante cerca de 1,5 ano, durante cerca de 2 anos, durante cerca de 2,5 anos, durante cerca de 3 anos, durante cerca de 3,5 anos, durante cerca de 4 anos, durante cerca de 4,5 anos, durante cerca de 5 anos, durante cerca de 6 anos, durante cerca de 7 anos, durante cerca de 8 anos, durante cerca de 9 anos, durante cerca de 10 anos, durante cerca de 15 anos ou durante cerca de 20 anos, por exemplo.

[0160] A presente invenção fornece um método para prevenção, tratamento, retardo do início, ou alívio de uma síndrome, distúrbio ou doença, ou de qualquer um ou mais sintomas da dita síndrome, distúrbio, ou doença em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que a dita síndrome, distúrbio ou doença é selecionada dentre obesidade, diabetes tipo I ou tipo II, síndrome metabólica (isto é, Síndrome X), resistência à insulina, tolerância deficiente à glicose (por exemplo, intolerância à glicose), hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglicemia devido a hiperinsulinismo congênito (CHI), dislipidemia, aterosclerose, nefropatia diabética, e outros fatores de risco cardiovascular como hipertensão e fatores de risco cardiovascular relacionados aos níveis de colesterol e/ou de lipídios não controlados, osteoporose, inflamação, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH), doença renal, e eczema, que compreende administrar ao indivíduo em necessidade da mesma uma quantidade eficaz de um conjugado, composto, ou composição farmacêutica da invenção.

[0161] Para uso na presente invenção, síndrome metabólica se refere

a um indivíduo que tem qualquer um ou mais dos seguintes: açúcar elevado no sangue (por exemplo, alto nível de açúcar no sangue em jejum), pressão arterial elevada, níveis de colesterol anormais (por exemplo, níveis de HDL baixo), níveis de triglicerídeo anormais (por exemplo, alto nível de triglicerídeos), uma grande linha da cintura (isto é, a circunferência da cintura), aumento de gordura no área abdominal, resistência à insulina, intolerância à glicose, níveis elevados de proteína C-reativa (isto é, um estado pró-inflamatório), e aumento dos níveis de inibidor ativador de plasminogênio plasmático 1 e de fibrinogênio (isto é, um estado pró-trombótico).

[0162] A presente invenção fornece um método para reduzir a ingestão de alimentos em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção. Em algumas modalidades, a ingestão de alimentos de um indivíduo é reduzida, por exemplo, entre cerca de 0,01% acerca de 0,1%, entre cerca de 0,1% a cerca de 0,5%, entre cerca de 0,5% a cerca de 1%, entre cerca de 1% a cerca de 5%, entre cerca de 2% a cerca de 3%, entre cerca de 5% a cerca de 10%, entre cerca de 10% a cerca de 15%, entre cerca de 15% a cerca de 20%, entre cerca de 20% a cerca de 25%, entre cerca de 25% a cerca de 30%, entre cerca de 30% a cerca de 35%, entre cerca de 35% a cerca de 40%, entre cerca de 40% a cerca de 45%, ou entre cerca de 45% a cerca de 50%, em relação à ingestão de alimentos de um indivíduo antes de uma administração de qualquer um dos conjugados, compostos, composições, formas, medicamentos ou combinações da invenção aqui descrita, ou em comparação com indivíduos de controle que não recebem qualquer um dos conjugados, compostos, composições, formas, medicamentos, ou combinações da invenção aqui descrita.

[0163] Em algumas modalidades, a redução na ingestão de alimentos é mantida durante cerca de 1 semana, 2 semanas para cerca de, durante cerca de 3 semanas, cerca de 1 por mês, durante cerca de 2 meses, durante cerca de 3 meses, durante cerca de 4 meses, durante cerca de 5 meses, durante cerca de 6 meses, durante cerca de 7 meses, durante cerca de 8 meses, durante cerca de 9 meses, durante cerca de 10 meses, durante cerca de 11 meses, durante cerca de 1 ano, cerca de 1,5 anos para, durante cerca de 2 anos, cerca de 2,5 anos para, durante cerca de 3 anos, cerca de 3,5 anos para, durante cerca de 4 anos, cerca de 4,5 anos para, durante cerca de 5 anos, cerca de 6 anos para, durante cerca de 7 anos, cerca de 8 anos para, durante cerca de 9 anos, cerca de 10 anos para, durante cerca de 15 anos ou durante cerca de 20 anos, por exemplo.

[0164] A presente invenção fornece um método para reduzir a hemoglobina glicada (A1C) em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção. Em algumas modalidades, a A1C de um indivíduo é reduzida, por exemplo, entre cerca de 0,001% e cerca de 0,01%, entre cerca de 0,01% e cerca de 0,1%, entre cerca de 0,1% e cerca de 0,2%, entre cerca de 0,2% e cerca de 0,3%, entre cerca de 0,3% e cerca de 0,4%, entre cerca de 0,4% e cerca de 0,5%, entre cerca de 0,5% e cerca de 1%, entre cerca de 1% e cerca de 1,5%, entre cerca de 1,5% e cerca de 2%, entre cerca de 2% e cerca de 2,5%, entre cerca de 2,5% e cerca de 3%, entre cerca de 3% e cerca de 4%, entre cerca de 4% e cerca de 5%, entre cerca de 5% e cerca de 6%, entre cerca de 6% e cerca de 7%, entre cerca de 7% e cerca de 8%, entre cerca de 8% e cerca de 9% ou entre cerca de 9% e cerca de 10% em relação ao A1C de um indivíduo antes de uma administração de qualquer um dos conjugados, compostos, composições, formas, medicamentos, ou combinações da invenção aqui

descrita, ou em comparação com indivíduos de controle que não recebem qualquer um dos conjugados, compostos, composições, formas, medicamentos, ou combinações da invenção aqui descrita.

[0165] Em outras modalidades, são fornecidos métodos para reduzir os níveis de glicose sanguínea em jejum em um indivíduo em necessidade do mesmo, os métodos compreendem administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção. Os níveis de glicose sanguínea em jejum podem ser reduzidos a menos que cerca de 140 a cerca de 150 mg/dl, menos que cerca de 140 a cerca de 130 mg/dl, menos que cerca de 130 a cerca de 120 mg/dl, menos que cerca de 120 a cerca de 110 mg/dl, menos que cerca de 110 a cerca de 100 mg/dl, menos que cerca de 100 a cerca de 90 mg/dl, ou menos que cerca de 90 a cerca de 80 mg/dl, em relação aos níveis de glicose sanguínea em jejum de um indivíduo antes de uma administração de qualquer um dos conjugados, compostos, composições, formas, medicamentos, ou combinações da invenção aqui descrita, ou em comparação com indivíduos de controle que não recebem qualquer um dos conjugados, compostos, composições, formas, medicamentos, ou combinações da invenção aqui descrita.

[0166] A presente invenção fornece um método de modulação da atividade do receptor Y2 e do receptor de GLP-1 em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção. Para uso na presente invenção, "modular" se refere a aumentar ou diminuir a atividade do receptor.

[0167] Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um conjugado ou composto da invenção ou uma forma, composição ou medicamento do mesmo é administrada a um indivíduo em necessidade do mesmo uma vez ao dia, duas vezes ao dia, três vezes ao dia,

quatro vezes ao dia, cinco vezes ao dia, seis vezes ao dia, sete vezes ao dia, ou oito vezes ao dia. Em outras modalidades, uma quantidade eficaz de um conjugado ou composto da invenção ou uma forma, composição ou medicamento do mesmo é administrada a um indivíduo em necessidade do mesmo uma vez a cada dois dias, uma vez por semana, duas vezes por semana, três vezes por semana, quatro vezes por semana, cinco vezes por semana, seis vezes por semana, duas vezes por mês, três vezes por mês, ou quatro vezes por mês.

[0168] Uma outra modalidade da invenção compreende um método para prevenção, tratamento, retardo de, ou alívio de uma doença, distúrbio ou síndrome, ou um ou mais sintomas de qualquer uma das ditas doenças, distúrbios ou síndromes em um indivíduo em necessidade do mesmo, o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto ou composição farmacêutica da invenção em uma terapia de combinação. Em certas modalidades, a terapia de combinação é um segundo agente terapêutico. Em certas modalidades, a terapia de combinação é uma terapia cirúrgica.

[0169] Como usado na presente invenção, o termo "em combinação", no contexto da administração de duas ou mais terapias a um indivíduo, se refere ao uso de mais de uma terapia.

[0170] Para uso na presente invenção, terapia de combinação se refere a administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo um ou mais agentes terapêuticos adicionais, ou uma ou mais terapias cirúrgicas, simultaneamente com uma quantidade eficaz de um conjugado ou composto da invenção ou uma forma, composição ou medicamento do mesmo. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes terapêuticos adicionais ou terapias cirúrgicas podem ser administrados no mesmo dia que uma quantidade eficaz de um conjugado da invenção, e em ou-

tras modalidades, o um ou mais agentes terapêuticos adicionais ou terapias cirúrgicas podem ser administrados na mesma semana ou no mesmo mês como uma quantidade eficaz de um conjugado ou composto da invenção.

[0171] A presente invenção também contempla evitar, tratar, retardar o início de, ou aliviar qualquer uma das doenças, distúrbios, síndromes, ou sintomas descritos na presente invenção em um indivíduo em necessidade do mesmo com uma terapia de combinação que compreende administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto, ou composição farmacêutica da invenção, em combinação com qualquer um ou mais dentre os seguintes agentes terapêuticos: um inibidor de dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) (por exemplo, a sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina, etc.); um agonista do receptor de GLP 1 (por exemplo, agonistas do receptor de GLP-1 de curta ação como exenatida e lixisenatida; agonistas do receptor de GLP-1 de ação intermediária como liraglutida; agonistas do receptor de GLP-1 de longa ação como exenatida de liberação prolongada, albiglutida, dulaglutida); inibidores de cotransportador de sódio-glicose 2 (SGLT-2) (por exemplo, canaglifozina, dapaglifozina, empaglifozina, etc.); sequestrantes de ácido biliar (por exemplo, colestevlam, etc.); agonistas do receptor de dopamina (por exemplo, bromocriptina de liberação rápida); biguanidas (por exemplo, metformina, etc.); insulina; oxintomodulina; sulfonilureias (por exemplo, clorpropamida, glimepirida, glipizida, gliburida, glibenclamida, glibornurida, glisoxepida, glicopiramida, tolazamida, tolbutamida, aceto-hexamida, carbutamida, etc.); e tiazolidinodionas (por exemplo, pioglitazona, rosiglitazona, lobeglitazona, ciglitazona, darglitazona, englitazona, netoglitazona, rivoglitazona, troglitazona, etc.). Em algumas modalidades, a dose do agente terapêutico adicional (ou agentes terapêuticos adicio-

nais) é reduzida quando administrada em combinação com um conjugado ou composto da invenção. Em algumas modalidades, quando usados em combinação com um conjugado ou composto da invenção, os agentes terapêuticos adicionais podem ser usados em doses mais baixas do que quando cada um é usado em dose única.

[0172] A presente invenção contempla evitar, tratar, retardar o início de, ou aliviar qualquer uma das doenças, distúrbios, síndromes, ou sintomas descritos na presente invenção em um indivíduo em necessidade do mesmo com uma terapia de combinação que compreende administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um conjugado, composto, ou composição farmacêutica da invenção, em combinação com terapia cirúrgica. Em certas modalidades, a terapia cirúrgica pode ser cirurgia bariátrica (por exemplo, cirurgia de desvio gástrico, como cirurgia de desvio gástrico em Y de Roux-en. gastrectomia em luva; cirurgia da banda gástrica ajustável; desvio biliopancreático com troca duodenal; Balão intragástrico; plicatura gástrica; e combinações dos mesmos).

[0173] Em modalidades em que o um ou mais agentes terapêuticos adicionais ou terapias cirúrgicas é administrado no mesmo dia como uma quantidade eficaz de um conjugado ou composto da invenção, o conjugado ou composto da invenção pode ser administrado antes, após, ou simultaneamente com o agente terapêutico adicional ou terapia cirúrgica. O uso do termo "em combinação" não restringe a ordem em que as terapias são administradas a um indivíduo. Por exemplo, uma primeira terapia (por exemplo, uma composição aqui descrita) pode ser administrada antes de (por exemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas antes), concomitantemente com, ou posteriormente a (por

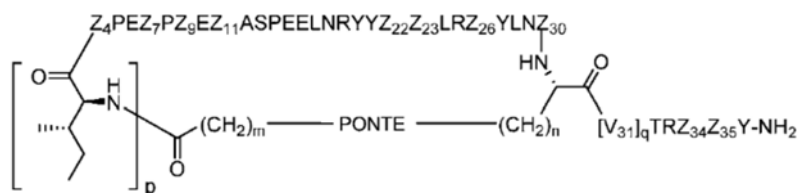
exemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas depois) da administração de uma segunda terapia a um indivíduo.

Modalidades

[0174] A revelação também fornece as seguintes modalidades não limitadoras.

[0175] A modalidade 1 é um conjugado que compreende um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende um peptídeo GLP-1, um primeiro peptídeo ligante, um peptídeo da região de dobradiça-Fc e um segundo peptídeo ligante, em que o primeiro peptídeo ligante está opcionalmente ausente.

[0176] A modalidade 2 é o conjugado de acordo com a modalidade 1, em que o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou um derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula I

em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z₄ é K, A, E, S ou R;

Z₇ é A ou K;

Z_9 é G ou K;

Z_{11} é D ou K;

Z_{22} é A ou K;

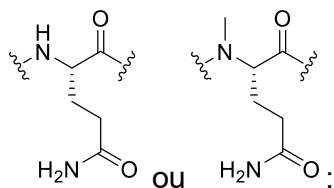
Z_{23} é S ou K;

Z_{26} é A ou H;

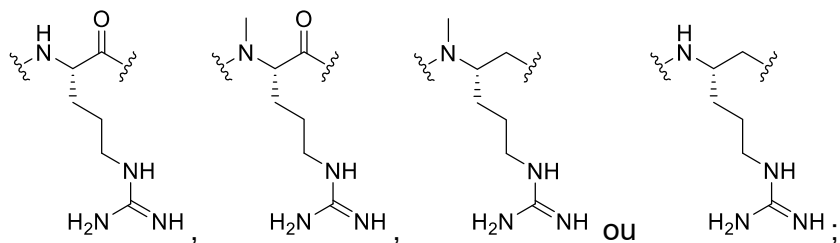
Z_{30} é L, W, ou está ausente;

desde que Z_{30} esteja ausente apenas quando q for 1;

Z_{34} é



Z_{35} é



em que o derivado é o composto de Fórmula I que é modificado por um ou mais processos selecionados do grupo que consiste em amidação, acilação e PEGuilação.

[0177] A modalidade 3 é o conjugado de acordo com a modalidade 2, em que o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

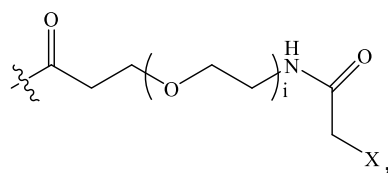
n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z_{30} estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z_4 é K, A, E, S ou R;

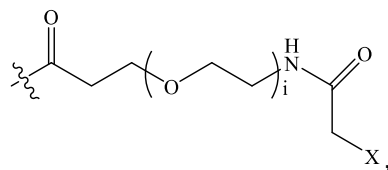
Z_7 é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

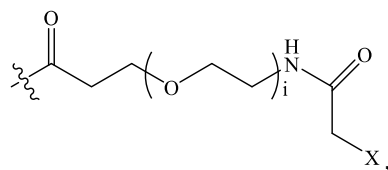
Z_9 é G ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

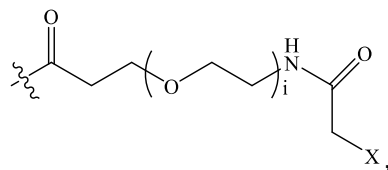
Z_{11} é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

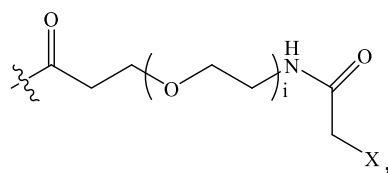
Z_{22} é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

Z₂₃ é S ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por

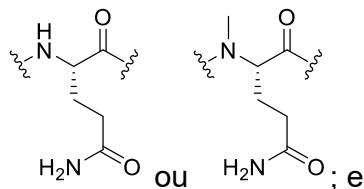


em que i é um número inteiro de 0 a 24, e X = Br, I ou Cl,
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I ou -C(O)CH₂Cl;

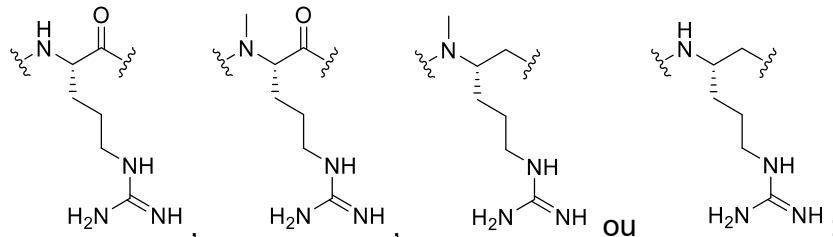
Z₂₆ é A ou H;

Z₃₀ é L;

Z₃₄ é



Z₃₅ é



em que X é um grupo eletrofílico e o Br, Cl, ou Cl do grupo eletrofílico X é deslocado na reação de conjugação para formar o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1.

[0178] A modalidade 4 é o conjugado de acordo com a modalidade 2, em que o peptídeo PYY cíclico é representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3 ou 5;

n é 1, 2 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q possa ser 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-,
 -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z₄ é K, A, E, S ou R;

Z₇ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída
 por

-C(O)CH₂Br,

Z₉ é G ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída
 por

-C(O)CH₂Br,

Z₁₁ é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída
 por

-C(O)CH₂Br,

Z₂₂ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída
 por

-C(O)CH₂Br,

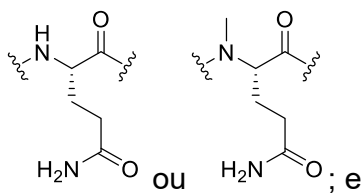
Z₂₃ é S ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída
 por

-C(O)CH₂Br,

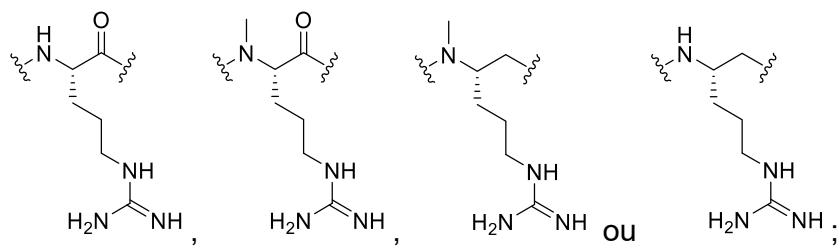
Z₂₆ é A ou H;

Z₃₀ é L;

Z₃₄ é



Z₃₅ é



em que o Br é deslocado na reação de conjugação para formar o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1.

[0179] A modalidade 5 é o conjugado de acordo com a modalidade 1 ou 2, em que o peptídeo PYY cíclico é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 54, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0180] A modalidade 6 é o conjugado de acordo com a modalidade 5, em que o peptídeo PYY cíclico é selecionado dentre as SEQ ID NO: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 ou 34, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0181] A Modalidade 7 é o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 6, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 está ligado covalentemente ao peptídeo PYY cíclico em um resíduo de lisina do peptídeo PYY cíclico através de um ligante.

[0182] A modalidade 8 é o conjugado de acordo com a modalidade 7, em que o peptídeo PYY cíclico compreende um ligante químico.

[0183] A modalidade 9 é o conjugado de acordo com a modalidade 8, em que o ligante químico compreende um ligante selecionado do grupo que consiste em $C(O)CH_2$, polietileno glicol (PEG)₈-triazolil- $CH_2CH_2CO-PEG_4$, uma cadeia de PEG contendo 2 a 24 unidades de PEG, um ligante contendo um grupo acila, e uma cadeia de alquila contendo de 2 a 10 átomos de carbono.

[0184] A modalidade 10 é o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 7 a 9, em que apenas um dentre Z_7 , Z_9 , Z_{11} , Z_{22} e Z_{23} na Fórmula I é lisina, e a lisina está covalentemente ligada a um resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1.

[0185] A modalidade 11 é o conjugado de acordo com a modalidade 10, em que Z_{11} na Fórmula I é lisina.

[0186] A modalidade 12 é o conjugado de acordo com qualquer

uma das modalidades 1 a 11, em que o peptídeo GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 56 a 59.

[0187] A modalidade 13 é o conjugado de acordo com a modalidade 12, em que o peptídeo GLP-1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:57.

[0188] A modalidade 14 é o conjugado de qualquer uma das modalidades 1 a 13, em que o primeiro peptídeo ligante compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 60 a 83.

[0189] A modalidade 15 é o conjugado da modalidade 14, em que o primeiro peptídeo ligante compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: NO:60.

[0190] A modalidade 16 é o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 15, em que o peptídeo da região de dobradiça-Fc compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 84 a 90.

[0191] A modalidade 17 é o conjugado da modalidade 16, em que o peptídeo da região de dobradiça-Fc compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84 ou da SEQ ID NO:85.

[0192] A modalidade 18 é o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 17, em que o segundo peptídeo ligante compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 93 a 112.

[0193] A modalidade 19 é o conjugado da modalidade 18, em que o segundo peptídeo ligante compreende a sequência de aminoácidos das SEQ ID NO:93, 94, 95, 106 ou 111.

[0194] A modalidade 20 é um conjugado que compreende um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a

um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 113 a 224 e 267 a 274, e em que o peptídeo PYY cíclico compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre as SEQ ID NOs: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33, ou 34.

[0195] A modalidade 21 é o conjugado da modalidade 20, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:113.

[0196] A modalidade 22 é o conjugado da modalidade 20, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:136.

[0197] A modalidade 23 é o conjugado da modalidade 21 ou 22, em que um resíduo de cisteína entre os resíduos 287 e 289 do peptídeo de fusão de GLP-1 está covalentemente ligado a um resíduo de lisina no resíduo 7, 9, 11, 22 ou 23 do peptídeo PYY cíclico.

[0198] A modalidade 24 é o conjugado da modalidade 23, em que o resíduo de cisteína está no resíduo 288 do peptídeo de fusão de GLP-1.

[0199] A modalidade 25 é o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 20 a 24, em que o resíduo de lisina está no resíduo 11 do peptídeo PYY cíclico.

[0200] A modalidade 26 é o conjugado de qualquer uma das modalidades 20 a 25, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 está covalentemente ligado ao peptídeo PYY cíclico por meio de um ligante químico no peptídeo PYY cíclico.

[0201] A modalidade 27 é o conjugado de acordo com a modalidade 26, em que o ligante químico é selecionado do grupo que consiste em C(O)CH₂, polietileno glicol (PEG)8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG₄, uma cadeia de PEG contendo 2 a 24 unidades de PEG, um ligante contendo um grupo acila, e uma cadeia de alquila contendo 2 a 10 átomos de

carbono.

[0202] A modalidade 28 é um conjugado que compreende um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o conjugado compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 225 a 262 ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[0203] A modalidade 29 é um conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 28, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 é um monômero.

[0204] A modalidade 30 é o conjugado, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 28, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 é um dímero.

[0205] A modalidade 31 é um método para produzir o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 30, que compreende reagir um eletrófilo, de preferência, bromoacetamida ou maleimida, introduzido em uma cadeia lateral do peptídeo PYY cíclico, de preferência, a cadeia lateral amino de um resíduo de lisina do peptídeo PYY cíclico, com o grupo sulfidril do resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1, criando assim uma ligação covalente entre o peptídeo PYY cíclico e o peptídeo de fusão de GLP-1.

[0206] A modalidade 32 é o método da modalidade 31, em que o resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1 é reduzido colocando-se o peptídeo de fusão de GLP-1 em contato com um excesso de um agente redutor de azafosfina, por meio do qual o resíduo de cisteína reduzido é reagido com o eletrófilo.

[0207] A modalidade 33 é o método da modalidade 32, em que o agente redutor de azafosfina é 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1] decano (PTA) ou um derivado do mesmo.

[0208] A modalidade 34 é uma composição farmacêutica que compreende o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 30, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0209] A modalidade 35 é um método para tratar ou evitar a obesidade em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica da modalidade 34.

[0210] A modalidade 36 é o método de acordo com a modalidade 35, em que a administração da quantidade eficaz da composição farmacêutica ao indivíduo em necessidade da mesma resulta em uma redução no peso corporal de cerca de 5% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 15%, cerca de 15% a cerca de 20%, ou de cerca de 20% a cerca de 25% em comparação com o peso corporal do indivíduo antes da administração da composição farmacêutica.

[0211] A modalidade 37 é um método para tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que a dita doença ou distúrbio é obesidade, diabetes tipo I ou tipo II, síndrome metabólica, resistência à insulina, tolerância à glicose deficiente, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglicemia devido a hiperinsulinismo congênito (CHI), dislipidemia, aterosclerose, nefropatia diabética, e outros fatores de risco cardiovascular como hipertensão e fatores de risco cardiovascular relacionados aos níveis de colesterol e/ou de lipídios não controlados, osteoporose, inflamação, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH), doença renal, e/ou eczema, o método compreendendo a administração ao indivíduo em necessidade da mesma de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica da modalidade 34.

[0212] A modalidade 38 é o método de acordo com a modalidade 37, em que a dita doença ou distúrbio é obesidade.

[0213] A modalidade 39 é o método de acordo com a modalidade 37, em que a dita doença ou distúrbio é diabetes tipo I.

[0214] A modalidade 40 é o método de acordo com a modalidade 37, em que a dita doença ou distúrbio é diabetes tipo II

[0215] A modalidade 41 é o método de acordo com a modalidade 37, em que a dita doença ou distúrbio é síndrome metabólica.

[0216] A modalidade 42 é o método de acordo com a modalidade 37, em que a dita doença ou distúrbio é uma doença renal.

[0217] A modalidade 43 é o método de acordo com a modalidade 37, em que a dita doença ou distúrbio é esteato-hepatite não alcoólica (NASH).

[0218] A modalidade 44 é o método de acordo com a modalidade 37, em que a dita doença ou distúrbio é doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD).

[0219] A modalidade 45 é um método para redução de ao menos um dentre ingestão de alimentos ou peso corporal em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade da mesma uma quantidade eficaz da composição farmacêutica da modalidade 34.

[0220] A modalidade 46 é o método de acordo com a modalidade 45, em que a administração da quantidade eficaz da composição farmacêutica ao indivíduo em necessidade da mesma resulta em uma redução na ingestão de alimentos de cerca de 5% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 15%, cerca de 15% a cerca de 20%, cerca de 20% a cerca de 25%, cerca de 25% a cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 35%, cerca de 35% a cerca de 40%, cerca de 40% a cerca de 45% ou cerca de 45% a cerca de 50% em comparação com a ingestão de alimentos do indivíduo antes da administração da composição farmacêutica.

[0221] A modalidade 47 é um método de modulação da atividade do

receptor Y2 e da atividade do receptor de GLP-1 em um indivíduo em necessidade da mesma, em que o método compreende administrar ao indivíduo em necessidade uma quantidade eficaz da composição farmacêutica da modalidade 34.

[0222] A modalidade 48 é o método de acordo com qualquer uma das modalidades 35 a 47, em que a composição farmacêutica é administrada através de uma injeção.

[0223] A modalidade 49 é o método de acordo com a modalidade 48, em que a injeção é aplicada por via subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa.

[0224] A modalidade 50 é o método de acordo com qualquer uma das modalidades 35 a 49, em que a composição farmacêutica é administrada em combinação com um segundo agente terapêutico.

[0225] A modalidade 51 é o método de acordo com qualquer uma das modalidades 35 a 50, em que a composição farmacêutica é administrada diariamente, semanalmente ou mensalmente ao indivíduo em necessidade da mesma.

[0226] A modalidade 52 é o método de acordo com a modalidade 51, em que a composição farmacêutica é administrada uma, duas, três, quatro, cinco ou seis vezes por dia.

[0227] A modalidade 53 é o método de acordo com a modalidade 51, em que a composição farmacêutica é administrada uma, duas, três, quatro, cinco ou seis vezes por semana.

[0228] A modalidade 54 é o método de acordo com a modalidade 51, em que a composição farmacêutica é administrada uma, duas, três, ou quatro vezes por mês.

[0229] A modalidade 55 é um kit que compreende o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 30 ou uma composição farmacêutica da modalidade 34, de preferência, o kit compreendendo adicionalmente um dispositivo de injeção.

[0230] A modalidade 56 é um método de produção de uma composição farmacêutica que compreende o conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 30, que compreende combinar o conjugado com um veículo farmaceuticamente aceitável para obter a composição farmacêutica.

[0231] A modalidade 57 é um peptídeo de plataforma isolado da região de dobradiça-Fc, em que o peptídeo de plataforma da região de dobradiça-Fc compreende um peptídeo da região de dobradiça-Fc que, de preferência, compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 84 a 90, um primeiro peptídeo ligante que, de preferência, compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 60 a 83 e o primeiro peptídeo ligante está opcionalmente ausente, e um segundo peptídeo ligante compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada das SEQ ID NOs: 91 a 112, em que o primeiro peptídeo ligante está conectado à extremidade amino-terminal do peptídeo da região de dobradiça-Fc e o segundo peptídeo ligante está conectado à extremidade carbóxi-terminal do peptídeo da região de dobradiça-Fc.

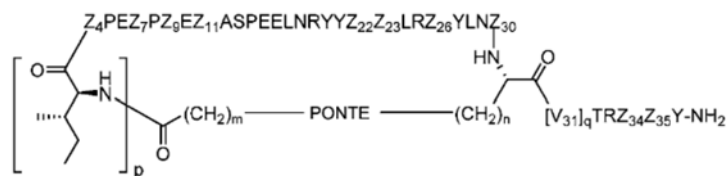
[0232] A modalidade 58 é o peptídeo de plataforma isolado da região de dobradiça-Fc da modalidade 57, em que o peptídeo da região de dobradiça-Fc compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:84.

[0233] A modalidade 59 é o peptídeo de plataforma isolado da região de dobradiça-Fc de acordo com a modalidade 57 ou 58, em que o primeiro peptídeo ligante compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: NO:60.

[0234] A modalidade 60 é o peptídeo de plataforma isolado da região de dobradiça-Fc das modalidades 57 a 59, em que o segundo peptídeo ligante compreende uma sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs:93, 94, 95, 106 ou 111.

[0235] A modalidade 61 é um conjugado que compreende o peptídeo de plataforma da região de dobradiça-Fc covalentemente ligado a um peptídeo alvo no segundo peptídeo ligante.

[0236] A modalidade 62 é o conjugado de acordo com a modalidade 61, em que o peptídeo alvo é um peptídeo PYY cíclico representado pela Fórmula I ou um derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula I

em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,
-(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z₄ é K, A, E, S ou R;

Z₇ é A ou K;

Z₉ é G ou K;

Z₁₁ é D ou K;

Z₂₂ é A ou K;

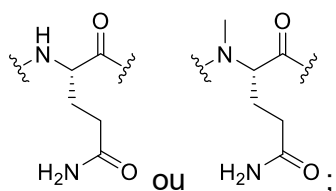
Z₂₃ é S ou K;

Z₂₆ é A ou H;

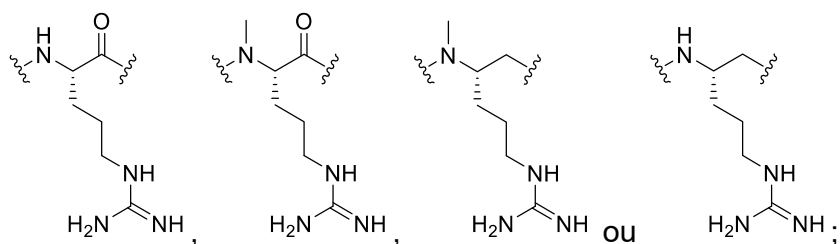
Z₃₀ é L, W, ou está ausente;

desde que Z₃₀ esteja ausente apenas quando q for 1;

Z₃₄ é



Z₃₅ é



em que o derivado é o composto de Fórmula I que é modificado por um ou mais processos selecionados do grupo que consiste em amidação, acilação e PEGuilação.

[0237] A modalidade 63 é um método de produção de um conjugado do peptídeo de plataforma da região de dobradiça-Fc com um peptídeo alvo, que compreende criar uma ligação covalente entre o segundo peptídeo ligante e o peptídeo alvo.

Exemplos

Síntese

[0238] Compostos ou conjugados da presente invenção podem ser sintetizados de acordo com os métodos gerais de síntese conhecidos pelos versados na técnica. A descrição a seguir da síntese é para propósitos exemplificadores e não se destina, de modo algum, a ser um limite da invenção.

[0239] Os análogos ou derivados de NTSC-PYY cíclicos (NTSC-PYY) da presente invenção podem ser sintetizados por uma variedade de procedimentos convencionais conhecidos para a formação de ligações de peptídeos sucessivas entre aminoácidos, e são de preferência realizados por síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS), conforme descrito, de modo geral, por Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 85:2149-

2154 (1963)), com o uso de um sintetizador de peptídeos automatizado, síntese em bancada tradicional, ou uma combinação de ambas as abordagens. Os procedimentos convencionais para síntese de peptídeos envolvem a condensação entre o grupo amino livre de um resíduo de aminoácido, cujas outras funcionalidades reativas foram adequadamente protegidas, e o grupo carboxila livre de um outro aminoácido, cujas funcionalidades reativas também foram adequadamente protegidas. Exemplos de agentes de condensação tipicamente utilizados para formação de ligação de peptídeo incluem di-isopropilcarbodiimida (DIC) com ou sem 1-hidróxi-benzotriazol (HOBT) ou ciano(hidróxi-imino)acetato de etila (Oxima Pura), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio hexafluorofosfato (HBTU), 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio hexafluorofosfato (HATU), 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio hexafluorofosfato (HCTU), 1-ciano-2-etóxi-2-oxoetilidenoamino-óxi-tris-pirrolidino-fosfônio hexafluorofosfato (PyOxim), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio tetrafluoroborato (TBTU) bromo-tris-pirrolidino-fosfônio hexafluorofosfato (PyBroP), e similares.

[0240] A metodologia sintética de peptídeo automatizada pode ser executada à temperatura ambiente (rt), ou a temperaturas elevadas, de preferência, através da aplicação de aquecimento por micro-ondas, conforme descrito por Yu (J. Org. Chem., 57:4781-4784 (1992)) e como mais recentemente refinado por Palasek (J. Pept. Sci., 13:14 3-148 (2007)).

[0241] Os compostos da presente invenção (amidas C terminais) podem ser convenientemente preparados com o uso de metodologia de aminoácido protegido com N- α -Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil), de modo que o terminal carbóxi de um aminoácido protegido com N- α -Fmoc adequadamente protegido é acoplado em uma resina de fase sólida convencional com o uso de um agente de acoplamento adequado. Resinas de

fase sólida convencionais comercialmente disponíveis adequadas incluem resina de Rink amida MBHA, resina Rink amida AM, resina Tentagel S RAM, resina FMOC-PAL-PEG PS, resina Rink amida SpheriTide, resina ChemMatrix Rink, resina TG Sieber e similares. O aminoácido-FMOC ligado à resina pode, então, ser desprotegido mediante exposição à piperidina a 20%, tanto em N,N-dimetilformamida (DMF) como em 1-metil-2-pirrolidona (NMP), cujo tratamento serve para remover seletivamente o grupo protetor de FMOC. Os aminoácidos protegidos por FMOC adicionais são, então, subsequentemente acoplados e desprotegidos sequencialmente, gerando assim o peptídeo protegido ligado à resina desejado. Em certos casos, pode ser necessário utilizar um grupo protetor ortogonalmente reativo para outra amina na sequência de peptídeo que iria suportar as condições de desproteção de FMOC. Os grupos protetores como 4-metiltritol (Mtt) ou 4-metóxi-tritol (Mmt), ambos removíveis por tratamento com 1% de ácido trifluoro-acético (TFA)/diclorometano (DCM), ou, de preferência, alilóxi-carbonil (alloc; removível por $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (tratamento com tetraquis(trifenilfosfina)paládio(0))/PhSiH₃ (fenilsilano)), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etil (Dde; removível por tratamento com 2 a 3% de hidrazina/DMF) e 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil (ivDde; removível por tratamento com 2 a 3% de hidrazina/DMF) podem ser usados de maneira eficaz nesses casos.

[0242] Em metodologias sintéticas de peptídeo convencionais, as cadeias laterais reativas de alfa aminoácidos são geralmente protegidas por toda a síntese com grupos protetores adequados para torná-las inertes aos protocolos de acoplamento e desproteção. Apesar de múltiplos grupos protetores para cadeias laterais de aminoácidos serem conhecidos na técnica, aqui os seguintes grupos protetores são da máxima preferência: terc-butila (t-Bu) para serina, treonina, ácido glutâmico, ácido aspártico e tirosina; tritila (Trt) para asparagina, glutamina, cisteína, homocisteína e histidina; terc-butoxicarbonila (Boc) para triptofano e o

grupo ϵ -amino de lisina; e 2,2,4,6,7-pentametildi-hidrobenzofuran-5-sulfonila (Pbf) para arginina. Estes grupos protetores são removidos após tratamento com ácido forte, como com altas concentrações de ácido trifluoro acético (TFA).

[0243] Após a conclusão do SPPS, o peptídeo protegido de cadeia lateral ligado à resina é desprotegido e concomitantemente clivado a partir da resina com o uso de um coquetel de clivagem que consiste predominantemente em (TFA) juntamente com várias combinações de sequestrantes de carbocátion, como tri-isopropilsilano (TIPS), água, fenol e anisol. O peptídeo sólido bruto é então isolado por precipitação do peptídeo/coquetel filtrado com éter gelado. No caso especial de peptídeos protegidos ligados à resina Sieber, a clivagem do peptídeo protegido a partir da resina pode ser vantajosamente realizada mediante tratamentos repetidos com 1 a 2% TFA em DCM sem causar desproteções da cadeia lateral. Uma vez isolado, outras manipulações do peptídeo protegido podem ser realizadas em reações de fase em solução. Finalmente, o peptídeo protegido pode ser inteiramente desprotegido com o uso de um tratamento separado com o coquetel de clivagem e precipitado conforme descrito acima. O peptídeo bruto assim obtido é então dissolvido em baixa concentração (cerca de, < 4 mg/ml) em um sistema solvente em grande parte aquoso (aq) contendo um cossolvente orgânico como acetonitrila ou etanol. Após aumentar o pH da solução para um > 5, o peptídeo então passa por uma reação de ciclização intramolecular para formar os análogos de NTSC-PYY brutos correspondentes da presente invenção. Os análogos de NTSC-PYY assim formados podem ser purificados com o uso de técnicas de purificação em geral bem conhecidas na técnica. Um método preferencial de purificação de peptídeo usado na presente invenção é cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC). Os peptídeos purificados são então caracterizados por cromatografia líquida/espectrometria de massa (LC/MS).

[0244] Esquemas e métodos gerais para produzir os peptídeos PYY cíclicos da invenção são descritos no pedido de patente US n° 15/794.231, depositado em 26 de outubro de 2017 e no pedido de patente US n° 15/794.171, depositado em 26 de outubro de 2017. Os conteúdos de ambos os pedidos de patente são aqui incorporados a título de referência na sua totalidade.

[0245] É entendido que os exemplos e modalidades a seguir aqui descritos são para propósitos de ilustração apenas e que várias modificações ou alterações à luz dos mesmos ficarão sugestivas aos versados na técnica e devem ser incluídas dentro do espírito e alcance deste pedido de patente e do escopo das reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados aqui acima estão aqui incorporados na presente invenção em sua totalidade, a título de referência.

Exemplo 1: Expressão e purificação dos peptídeos de fusão de peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) a partir de células de mamíferos transientemente transfectadas

[0246] Os construtos de DNA para os peptídeos de fusão de GLP-1 foram gerados por clonagem de fragmentos gênicos sintetizados no vetor de expressão de mamíferos derivado de pCDNA3.1 com o uso de diferentes enzimas de restrição de endonuclease projetadas. Os fragmentos gênicos sintetizados foram projetados para compreender as sequências de DNA que codificam um ou todos os seguintes componentes da proteína de fusão (do N-terminal ao C-terminal): peptídeo GLP-1 ou peptídeo variante de GLP-1, um primeiro peptídeo ligante, um peptídeo da região de dobradiça-Fc e um segundo peptídeo ligante que contém o Cys para conjugação ao peptídeo PYY cíclico.

[0247] As proteínas de fusão de GLP-1 foram expressas em células ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, n° Cat A29127) por transfecção transiente das células com DNA plasmidial purificado

de um construto de expressão de proteína de fusão de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, as células ExpiCHO-S™ foram mantidas em suspensão em meio de expressão ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, nº Cat A29100) em uma incubadora com agitação ajustada a 37 °C, 8% CO² e 125 RPM. As células foram transferidas e diluídas a 6,0 x 10⁶ células por ml, mantendo-se a viabilidade celular em 98% ou mais. As transfecções transientes foram feitas com o uso do kit de transfecção de CHO ExpiFectamine™ (ThermoFisher Scientific nº Cat A29131). Para cada ml de células diluídas a serem transfectadas, um micrograma de DNA plasmidial foi usado e diluído em meio de complexação OptiPRO™ SFM. O reagente CHO ExpiFectamine™ foi usado a uma razão de 1:3 (v/v, DNA:reagente) e também diluído em OptiPRO™. O DNA diluído e o reagente de transfecção foram combinados durante um minuto, permitindo a formação de complexos de DNA/lipídio, e então adicionados às células. Após incubação de um dia para outro, a alimentação de ExpiCHO™ e o intensificador de CHO ExpiFectamine™ foram adicionados às células. As células foram cultivadas com agitação a 37 °C durante cinco dias antes da coleta dos sobrenadantes de cultura.

[0248] Os sobrenadantes de cultura das células ExpiCHO-S™ transientemente transfectadas foram coletados por clarificação através de centrifugação (30 min, 6.000 rpm) seguido de filtração (membrana PES de 0,2 µ, Corning). Corning, NY, EUA). As transfecções em larga escala (5 a 20 litros) foram primeiro concentradas 10 vezes com o uso de um sistema de filtração de fluxo tangencial Pall Centramate. DPBS 10x (solução salina tamponada com fosfato da Dulbecco), pH 7,2 foi adicionada ao sobrenadante até uma concentração final de 1X antes de carregamento sobre uma coluna de Proteína A equilibrada (DPBS, pH 7,2) Hi-Trap MabSelect Sure (GE Healthcare; Little Chalfont, Reino Unido) a uma concentração relativa de ~20 mg de proteína por ml de resina, com

o uso de um sistema de cromatografia FPLC AKTA. Após o carregamento, a coluna foi lavada sequencialmente com 10 volumes de coluna de DPBS, pH 7,2. Em alguns casos, lavagens adicionais de 20 volumes de coluna de 100 mM Tris, 2,5 M NaCl, 50 mM caprilato de sódio, pH 9 e 10 volumes de coluna de DPBS, pH 7,2 foram incluídas. A proteína foi eluída com 10 volumes de coluna de acetato de sódio 0,1 M, pH 3. As frações de proteína foram imediatamente neutralizadas através de eluição em tubos contendo Tris 2,0 M, pH 7 a 20% de volume de fração de eluição. As frações de pico foram agrupadas e o pH foi ajustado para ~7 com tampão Tris adicional, se necessário. A proteína purificada foi filtrada (0,2 μ) e a concentração foi determinada por absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro BioTek Synergy™ HTM. A qualidade da proteína purificada foi avaliada por SDS-PAGE e HPLC de exclusão de tamanho analítico (sistema HPLC Dionex™). O nível de endotoxina foi medido com o uso de um ensaio LAL turbidométrico (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod). Falmouth, MA, EUA).

[0249] Alternativamente, as proteínas de fusão de GLP-1 foram expressas em células Expi293F (ThermoFisher Scientific, Cat n° A14527) por transfecção transiente das células com DNA plasmídico purificado de um construto de proteína de fusão de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, as células Expi293F foram mantidas em suspensão em meio de expressão Expi293™ (ThermoFisher Scientific, n° Cat A1435101) em uma incubadora com agitação ajustada a 37 °C, 8% CO² e 125 RPM. As células foram transferidas e diluídas a 2,5 x 10⁶ células por ml, mantendo-se a viabilidade celular em 95% ou mais. As transfecções transientes foram feitas com o uso do kit de transfecção ExpiFectamine™ 293 (ThermoFisher Scientific n° Cat A14525). Para cada ml de células diluídas a serem transfectadas, um micrograma de DNA plasmidial foi usado e diluído em meio de complexação OptiMEM™ SFM. Reagente ExpiFectamine™ 293 foi usado a uma razão de 1:2,6 (v/v, DNA:reagente), diluído

em OptiMEM™, e deixado em incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente. O DNA diluído e o reagente de transfecção foram combinados durante vinte minutos, possibilitando a formação do complexo DNA/lipídio, e então adicionados às células. Após incubação de um dia para outro, a alimentação de Expi293™ e o intensificador ExpiFectamine™ 293 foram adicionados às células. As células foram cultivadas sob agitação a 37 °C durante quatro dias antes da coleta dos sobrenadantes de cultura.

[0250] Os sobrenadantes de cultura das células Expi293F transiente-mente transfectadas foram coletados por clarificação através de centrifugação (30 min, 6.000 rpm) seguido de filtração (membrana PES de 0,2 µ, Corning). DPBS 10x, pH 7,2 foi adicionada ao sobrenadante até uma concentração final de 1X antes do carregamento sobre uma coluna de Proteína A (DPBS, pH 7,2) HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) equilibrada a uma concentração relativa de ~20 mg de proteína por ml de resina, com o uso de um sistema de cromatografia FPLC AKTA. Após o carregamento, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de DPBS, pH7,2. A proteína foi eluída com 10 volumes de coluna de acetato de sódio 0,1 M, pH 3. As frações de proteína foram imediatamente neutralizadas através de eluição em tubos contendo Tris 2,0 M, pH 7 a 20% de volume de fração de eluição. As frações de pico foram agrupadas e o pH foi ajustado para ~5,5 com tampão Tris adicional, se necessário. A proteína purificada foi filtrada (0,2 µ) e a concentração foi determinada por absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro BioTek Synergy™ HTM. A qualidade da proteína purificada foi avaliada por SDS-PAGE e HPLC de exclusão de tamanho analítico (sistema HPLC Dionex™). O nível de endotoxina foi medido com o uso de um ensaio de LAL turbidométrico (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

[0251] As proteínas de fusão de GLP-1 com um primeiro peptídeo ligante compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:61, que é um ligante de poliglicina, foram expressas em um nível

baixo e apresentaram baixas produtividades de purificação. Dessa forma, o uso de poliglicina para os primeiros peptídeos ligantes foi desaprovado neste experimento na manipulação de proteínas de fusão de GLP-1.

[0252] As proteínas de fusão de GLP-1 com um segundo peptídeo ligante que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:100 foram truncadas e determinadas como não tendo o peso molecular esperado quando analisadas por espectrometria de massa. Dessa forma, o uso de um segundo peptídeo ligante da SEQ ID NO:100 foi desaprovado neste experimento ao manipular proteínas de fusão de GLP-1.

[0253] Adicionalmente, na preparação de construtos de peptídeo de fusão de GLP-1, a lisina carbóxi-terminal do peptídeo da região de dobradiça-Fc (isto é, a IgG4 humana) foi excluída do construto final para evitar a potencial suscetibilidade proteolítica.

Exemplo 2: Produção de conjugados de peptídeo PYY cíclicos acoplados ao peptídeo de fusão de GLP-1

Redução de proteínas de fusão de GLP-1

Método A

[0254] As proteínas de fusão de GLP-1 purificadas são uma mistura das proteínas recombinantes com os segundos peptídeos ligantes manipulados contendo ao menos um resíduo de cisteína em cada ligante, dos quais é dissulfeto intramolecularmente ligado à outra cisteína ou a resíduos de cisteína adventícios no citosol ou no meio de crescimento. A essa solução heterogênea de proteína de fusão de GLP-1 (5 a 12 mg/ml em TrisOAc, pH 5,4 a 6,4) adicionou-se uma quantidade em excesso de um reagente redutor de fosfina 1,3,5-triaza-7-fosfa-adamantano (PTA, 15 a 40 equiv.) seguido da adição de EDTA 100 mM (concentração final 1 a 2 mM). A mistura de reação resultante foi levemente agitada à temperatura ambiente até que a redução dos resíduos de cisteína alvo estivesse completa

(4 a 16h). As cisteínas liberadas e o PTA restante foram removidos por cromatografia de dessalinização.

Método B

[0255] A uma solução heterogênea de proteína de fusão de GLP-1 (5 a 15 mg/mL em TrisOAc, pH 5,0 a 6,5) adicionou-se uma quantidade em excesso de um reagente redutor de fosfina Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 4 a 25 equiv.) seguido da adição de EDTA 100 mM (concentração final 1 a 2 mM). A mistura de reação resultante foi levemente agitada à temperatura ambiente de um dia para outro e então aplicada a uma coluna de dessalinização equilibrada com TrisOAc (pH 7,0). A proteína de fusão de GLP-1 completamente reduzida (ligações de dissulfeto de dobradiça rompidas) foi tratada com ácido desidroascórbico (DHAA, 10 eq.) durante horas, período após o qual o peptídeo de fusão de GLP-1 reduzido foi oxidado resultando em um peptídeo de fusão de GLP-1 completo com cisteínas manipuladas no segundo peptídeo ligante totalmente sem terminação.

Preparação de conjugados de peptídeo PYY cíclicos acoplados ao peptídeo de fusão de GLP-1

[0256] Uma solução de peptídeos de fusão de GLP-1 reduzidos em TrisOAc (3 a 10 mg/ml, pH 5,5) foi adicionada a uma solução de peptídeo PYY cíclico (2,6 a 3,0 eq. 10 a 15 mg/ml) em água desionizada. Para proteger os tióis reativos contra a oxidação catalisada com metal, uma solução de 100 mM EDTA foi adicionada à mistura até que a concentração de EDTA atingisse 1 mM. O pH da solução de reação foi elevado para 8,0 a 8,2 mediante a adição por gotejamento de tampão Tris (1M, pH 9,1). A reação prosseguiu por 3 a 7 horas à temperatura ambiente e então por 18 horas a 5°C. A cromatografia LCMS indicou que a conjugação estava completa e que a formação do conjugado de peptídeo PYY cíclico com fusão de GLP-1 foi maior que 95%. A reação foi diretamente submetida à purificação de proteína A para remover o

excesso de peptídeos PYY cíclicos ou bruscamente arrefecida mediante a adição de 5 equivalentes de cisteína (para conferir terminação aos peptídeos PYY cíclicos reativos restantes). O conjugado bruto resultante foi purificado através de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) imediatamente seguido por adsorção em proteína A. A eluição do conjugado (acetato de sódio, pH 3,5) e a subsequente neutralização com tampão Tris a um pH 7 a 7,5 resultou no produto final. Alternativamente, o conjugado purificado através de HIC pode ter o tampão trocado pelo tampão desejado através da coluna PD-10 sem polimento adicional da proteína A, caso isso tenha sido feito antes da purificação por HIC.

[0257] A reação de conjugação pode também ser executada à baixa temperatura (5°C) e monitorada por LCMS (~48 h).

[0258] Em alguns casos, as cisteínas reativas nos segundos peptídeos ligantes de proteínas de fusão de GLP-1 são terminadas com bromoacetamidas para formar ligações tioéter estáveis. Essas proteínas de fusão de GLP-1 modificadas com acetamida foram preparadas da seguinte forma: A uma solução de proteína de fusão de GLP-1 (5 a 12 mg/mL em TrisOAc, pH 5,4 a 6,4) adicionou-se uma quantidade em excesso de um reagente redutor de fosfina 1,3,5-triaza-7-fosfa-adamantano (PTA, 15 a 20 equiv.) seguido da adição de EDTA 100 mM (concentração final 1 a 2 mM). A mistura de reação resultante foi levemente agitada à temperatura ambiente durante 18 horas. 15 a 20 equivalentes de bromoacetamidas foram adicionados à solução de peptídeo de fusão de GLP-1 e o valor de pH da mistura de reação foi ajustado para pH 7,5 a 8,1 através de tampão Tris (1M, pH 9,1). Após 2 horas, a mistura de reação foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) imediatamente seguido de polimento da proteína A.

[0259] A Tabela 8 fornece rendimentos isolados de conjugados de peptídeo PYY cíclicos acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1. Foi

observado que quando o primeiro peptídeo ligante era um ligante AP, como no peptídeo de fusão de GLP-1 64 (GF64), e o segundo peptídeo ligante era um ligante G₄A, como no peptídeo de fusão de GLP-1 8 (GF8), os rendimentos isolados de conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado a GLP-1 eram insatisfatórios.

Tabela 8: Rendimentos isolados de conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1

SEQ ID NO	Fusão de GLP-1	Rendimento isolado
241	GF64	8%
238	GF23	11%
234	GF70	9%
229	GF24	35%
225	GF1	30%
248	GF40	17%
252	GF8	7%
246	GF65	9%
254	GF42	10%
235	GF28	8%
251	GF19	5%

Exemplo 3: Caracterização do conjugado de peptídeo PYY acoplado a peptídeo de fusão de GLP-1

[0260] A caracterização analítica dos conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 foi realizada com o uso de (i) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), (ii) medição de massa intacta por LC-ESIMS, (iii) cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os resultados da caracterização analítica dos conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 e o método de conjugação são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Dados analíticos para conjugados de peptídeo PYY cíclicos acoplados a GLP-1.

SEQ ID NO:	Método de redução	MS (Da)		% pureza aHIC	% de pureza aSEC
		Calculado	Encontrado:		
SEQ ID NO:229	Método A	74002	74000	100	100

SEQ ID NO:225	Método A	73292	73291	100	100
SEQ ID NO:227	Método A	73261	73261	100	100
SEQ ID NO:228	Método A	73233	73231	99,5	98,4
SEQ ID NO:252	Método A	73014	73012	99,3	100
SEQ ID NO:235	Método A	73964	73068	100	100
SEQ ID NO:251	Método A	73541	73547	100	100
SEQ ID NO:228	Método B	73233	73231	100	97,2
SEQ ID NO:232	Método A	73942	73962	100	100
SEQ ID NO:244	Método A	73926	73926	100	100
SEQ ID NO:253	Método A	74010	74010	100	100
SEQ ID NO:249	Método A	71978	71983	95	95
SEQ ID NO:239	Método A	74571	74573	100	100
SEQ ID NO:238	Método A	75203	75205	90	96
SEQ ID NO:242	Método A	75287	75290	95	100
SEQ ID NO:236	Método A	74117	74119	95	97
SEQ ID NO:252	Método A	73016	73013	97	100
SEQ ID NO:234	Método A	72978	72974	100	90
SEQ ID NO:226	Método A	73319	73327	100	100
SEQ ID NO:248	Método B	72180	72182	100	100
SEQ ID NO:260	Método B	72034	72038	100	100
SEQ ID NO:247	Método A	73926	73927	100	100
SEQ ID NO:254	Método A	73978	73978	100	96
SEQ ID NO:258	Método A	75656	75656	98	100
SEQ ID NO:241	Método A	77374	77376	100	100
SEQ ID NO:246	Método A	75590	75594	92	100
SEQ ID NO:234	Método A	72860	72866	100	100
SEQ ID NO:230	Método A	74044	74042	100	100
SEQ ID NO:245	Método A	74636	74625	96	100
SEQ ID NO:244	Método A	76212	76201	86	98
SEQ ID NO:243	Método A	74057	74049	NA	NA
SEQ ID NO:259	Método A	75600	75604	100	100
SEQ ID NO:240	Método A	75627	75630	100	100
SEQ ID NO:261 (monômero)	Método B	67976	67976	80	NA

Exemplo 4: Ensaios *in vitro*

[0261] Os conjugados foram triados quanto à atividade funcional e potência *in vitro* em ensaios baseados em células que medem o cAMP intracelular com o uso do imunoensaio de cAMP competitivo Lance (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do kit. Células HEK293 clonais estavelmente expressando os receptores de GLP-1R ou NPY2 (Y2R) foram usadas nos ensaios. Células expressando GLP1R foram descongeladas e suspensas em HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, 0,5 mM IBMX. As células foram misturadas com o kit de anticorpo anti-cAMP e adicionadas aos conjugados diluídos serialmente com HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA em optiplacas brancas de 384 poços. Após uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente,

a mistura de detecção de imunensaio foi adicionada. A placa de ensaio foi lida como um ensaio TR-FRET em um leitor de placas Envision (excitação 320 nm, emissão de 615 nm e 665 nm) e os dados foram usados para calcular os valores EC_{50} do composto usando o software estatístico Prism (GraphPad Software San Diego).

[0262] Para determinar a atividade do composto no receptor Y2R, as células HEK293 expressando Y2R foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta glicose (Cellgro) suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% L-glutamina, 1% piruvato de sódio, 1% penicilina/estrepomicina e 600 µg/ml de G418 e colocadas de um dia para o outro em placas de 384 poços em meio de cultura sem G418. No dia do ensaio, o meio de crescimento celular foi removido das células e 6 µl do conjugado (2X) em 5 mM HEPES, 500 µM IBMX e 0,1% BSA em HBSS foram adicionados. Em seguida, 6 µl de tampão de estimulação contendo forskolina (2X, concentração final de 5 µM) e o anticorpo cAMP LANCE (1:100) foi adicionado às células. Após incubação durante 25 minutos à temperatura ambiente, 12 µl de mistura de detecção foram adicionados, e as concentrações de cAMP foram quantificadas no imunensaio cAMP LANCE.

Análise dos dados

[0263] Os dados do leitor de placa Envision foram expressos como unidades de fluorescência relativas (RFU) e calculados como $(615 \text{ nm}/665 \text{ nm}) \times 10.000$. Todas as amostras foram medidas em triplicata. As concentrações de cAMP desconhecidas dentro de cada cavidade foram interpoladas a partir dos padrões de referência de concentrações de cAMP conhecidas incluídas dentro de cada placa. Parâmetros como EC_{50} , $\text{Log}(EC_{50})$, HillSlope (nH), topo e fundo, foram derivados mediante a plotagem dos valores de concentração de cAMP em relação às concentrações logarítmicas do composto ajustadas com o mo-

delo 4-P usando uma aplicação não linear de quadrados mínimos ponderados.

Tabela 10: Dados *in vitro* para conjugados de PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1.

Conjugado		GLP1R humano	Y2R humano
Composto 4 (SEQ ID NO:229)	EC ₅₀ média	0,069	0,014
	MEV	0,007	0,001
	95% CL da média	(0,051, 0,087)	(0,010, 0,017)
Composto 2 (SEQ ID NO:225)	EC ₅₀ média	0,078	0,009
	MEV	0,009	0,001
	95% CL da média	(0,054, 0,102)	(0,006, 0,012)
Dulaglutida	EC ₅₀ média	0,035	--
	MEV	0,003	
	95% CL da média	(0,028, 0,042)	
GLP 7-36	EC ₅₀ média	0,013	--
	MEV	0,001	
	95% CL da média	(0,012, 0,014)	
Exendina 4	EC ₅₀ média	0,008	--
	MEV	0,001	
	95% CL da média	(0,007, 0,009)	
PYY3-36	EC ₅₀ média	--	0,021
	MEV		0,001
	95% CL da média		(0,017, 0,024)

Tabela 11: Potência *in vitro* de GLP-1R e NPYR2 para conjugados de peptídeos de fusão de GLP-1 e de PYY cíclicos de fusão de GLP-1

SEQ ID NO	EC ₅₀ de GLP1R humano (nM)	EC ₅₀ de Y2R humano (nM)
113	0,062	na

120	0,066	na
123	0,167	na
131	0,050	na
131	0,106	na
134	0,076	na
134	0,142	na
135	0,079	na
135	0,138	na
136	0,068	na
136	0,126	na
139	0,054	na
140	0,144	na
140	0,202	na
146	0,130	na
152	0,207	na
153	0,049	na
166	0,035	na
166	0,053	na
175	0,042	na
176	0,052	na
176	0,069	na
177	0,051	na
177	0,054	na
179	0,171	na
179	0,301	na
225	0,078	0,009
226	0,064	0,014
227	0,061	0,005
228	0,051	0,004
229	0,069	0,014
230	0,043	0,023
232	0,058	0,065
233	0,103	0,010
234	0,140	0,009
235	0,193	0,010

236	0,229	0,009
238	0,523	0,019
239	0,042	0,006
240	0,036	0,007
241	0,121	0,006
242	0,285	0,011
262	0,985	0,012
246	0,078	0,003
247	0,350	0,040
248	0,264	0,018
249	0,148	0,143
250	0,213	0,010
251	0,062	0,015
252	0,080	0,009
253	0,567	0,077
254	0,39	0,022
258	0,036	0,007
259	0,059	0,004
Exendina 4	0,008	na
GLP-1 7-36	0,013	na
Dulaglutida	0,035	na
PYY3-36	na	0,021

[0264] A comparação das potências de GLP-1R das SEQ ID NOs 135, 134, 146 e 176 com as SEQ ID NOs 238, 242, 262, 253, e 241 mostraram que os peptídeos de fusão de GLP-1 com Exendina 4 (1 a 39) (SEQ ID NO:58) perderam a potência GLP-1R após a conjugação com os peptídeos PYY. O trabalho com peptídeos de fusão de GLP-1 com Exendina 4 (1 a 39) (SEQ ID NO:58) foi desaprovado neste experimento com base nesses resultados.

[0265] Ensaio de triagem primária de NPY2R humano: O método usado para triagem da potência de NPY2R dos conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 *in vitro* foi um en-

saio baseado em células projetado para medir a inibição de cAMP induzida por forskolina produzida por adenilato ciclase através da modulação do receptor acoplado à proteína Gi NPY2R humana. A produção de cAMP induzida por forskolina em células CHO-K1 (DiscoverX) transfectadas com NPY2R humano foi reduzida através da ativação do NPY2R por análogos de PYY e controles de maneira dependente da dose e medida em um imunoensaio de cAMP competitivo baseado em FRET.

[0266] As células foram removidas da criopreservação e descongeladas em banho de água a 37°C, adicionadas a 40 ml de 1xDPBS, pH7,2 (Gibco), e filtradas através de um filtro de células. As células foram centrifugadas a 450xg por 5 minutos, e os sobrenadantes foram aspirados. O pélete de células foi ressuspensão em DMEM/alta glicose, 10% HIFBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 1% piruvato de sódio a uma densidade de $0,125 \times 10^6$ células/ml. As células foram dispensadas em 40 µL/poço em uma placa branca de 384 poços revestida com colágeno até obter finalmente 5000 células/poço, e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 16 a 24 horas. As células na placa de ensaio foram lavadas duas vezes mediante adição de 80 µL/poço de 1xDPBS e decantação do sobrenadante. As diluições das amostras e controles foram preparadas em 1x HBSS, 5 mM HEPES, 0,002 mM de forskolina, 0,1% BSA, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), e 20 µL/poço de cada amostra foram adicionados aos poços designados e incubados com agitação à temperatura ambiente durante 30 minutos. Então, 20 µL/poço de mistura de reagente de detecção de cAMP foram adicionados a cada placa de ensaio e incubados com agitação à temperatura ambiente durante 2 a 24 horas. As placas foram lidas em um leitor de placas. Todas as amostras foram medidas em quadruplicata. Os dados foram analisados por plotagem dos valores brutos de cAMP LANCE em relação às concentrações do composto para log ajustadas com o modelo 4-P usando

uma aplicação não linear de quadrados mínimos ponderados no ambiente R.

[0267] Ensaio de triagem primária de GLP-1R humano: O método usado para a triagem da potência de GLP-1R das proteínas de fusão de GLP-1 e dos conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 *in vitro* foi um ensaio baseado em células projetado para medir a produção de cAMP através da modulação do receptor acoplado à proteína Gs GLP-1R humana. Após a ativação dependente de concentração de GLP-1R pelos peptídeos de fusão de GLP-1 e os conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1, o acúmulo de cAMP nas células HEK humanas transfectadas com GLP-1R foi medido em um ensaio de cAMP competitivo baseado em TRFRET.

[0268] As células HEK humanas transfectadas com GLP-1R foram descongeladas no dia do ensaio, ressuspensas em 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, e 1 mM IBMX a $0,5 \times 10^6$ células/ml, e 10 µl foram adicionados em cada poço de uma placa de 384 poços (5000 células/poço). As amostras foram diluídas em 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA e adicionadas a 10 µl/poço da placa de ensaio e incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos. O reagente de detecção de cAMP foi adicionado a 20 µL/poço. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas, e então lidas em um leitor de placas. Todas as amostras foram medidas em quadruplicata. Os dados foram analisados por plotagem dos valores brutos de cAMP LANCE em relação às concentrações do composto para log ajustadas com o modelo 4-P usando uma aplicação não linear de quadrados mínimos ponderados no ambiente R.

Exemplo 5: Análise de xilose em peptídeos de fusão de GLP-1 e conjugados de PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1

[0269] Preparação da amostra: Para preparar amostras para mapeamento de peptídeos, cada molécula de proteína (1 mg/ml): conjugado de PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 (SEQ ID NO:244), GF40 (SEQ ID NO:152), e GF34 (SEQ ID NO:146) foi diluída à razão de 1:4 em 8 M de guanidina/HCl tamponada em pH 8,0. A essas amostras adicionou-se uma alíquota de 1 M DTT (Sigma 43816 10 ml, BioUltra) para atingir uma concentração final de 25 mM; as amostras foram incubadas durante 1 hora a 37°C. A alquilação foi realizada com o uso de iodoacetamida (Sigma, A3221-10VL) ou N-metilmaleimida (NEM) (Sigma, E3876). 1M de agente alquilante recentemente preparado foi adicionado para alcançar aproximadamente 50 mM, e as amostras foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação de alquilação foi então bruscamente arrefecida pela adição de 15 µl de 1M DTT para cada 400µl de mistura de reação (Sigma 43816-10 ml, BioUltra). A amostra foi dessalinizada com o uso de colunas de dessalinização Zeba Spin (Thermo, n° cat. 89833) de acordo com o protocolo do fabricante em 50 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH=8,0. As amostras foram digeridas com tripsina (grau de sequenciamento Promega, V511A) durante 4 horas a 37°C após a adição de 1 µl de 1 µg/µl de tripsina reconstituída em 50 mM de ácido acético (fornecido com a tripsina liofilizada). A digestão de tripsina foi bruscamente arrefecida mediante a adição de 0,6 µl de 100% TFA a uma alíquota de 60 µl da proteína digerida. As amostras foram ressuspensas em microfrascos e colocadas em um autoamostrador ajustado em 4°C para análise de LC/MS.

[0270] Cromatografia líquida e espectrometria de massa: 2 µg (~10 µl) de proteína digerida foram injetados em uma coluna de resolução rápida AdvanceBio MicroBore para mapeamento de peptídeos da Agilent (1x150 mm, 2,7 µm, peça n°: 863600-911) com o uso de uma UHPLC Agilent Infinity 1290 (Agilent Technologies, peça nos: G1330B, G4226A, G4220A, G4212A) a uma vazão de 0,1 ml/min. A temperatura da coluna foi mantida

a 65°C. Solventes grau HPLC para espectrometria de massa (0,1% de ácido fórmico e B: 100% ACN em 0,1% de ácido fórmico) foram adquiridos junto à VWR (peça n°: LC 452-1, LC 441-1). Os peptídeos proteolíticos foram eluídos da coluna com o uso de um gradiente de 50 minutos de 2 a 40% ACN em 0,1% FA. O efluente de coluna foi introduzido em um espectrômetro de massa Orbitrap Q-Exactive (ThermoFisher Scientific) por meio de uma sonda de ionização por eletrospray aquecido (HESI) usando uma tensão de spray positiva de 3,5 kV, gás de bainha de 20 (unidades arb.), gás auxiliar de 7 (unidades arb.), tubo de transferência de íons a 299°C e vaporizador 100°C. Uma captura dependente de dados foi realizada mediante dissociação sequencial dos 5 primeiros íons de peptídeo mais abundantes na varredura completa de MS. A análise de massa foi realizada com varredura do precursor ajustada para detecção pelo Orbitrap, potência de resolução 70.000, intervalo de massas 150 a 2000 m/z, alvo de controle de ganho automático (AGC - "Automatic Gain Control") de 1,0e6, tempo máximo de injeção 50 milissegundos. 1 espectro de microvarredura foi capturado no modo de perfil. Os critérios de decisão do precursor foram os peptídeos de seleção de precursor monoisotópico, estado de carga: 2-7, exclusão dinâmica: 6,0 segundos e limite de intensidade de precursor de 5e4. Os peptídeos precursores foram isolados pelo quadrupolo com uma janela de isolamento de 1,6 m/z enviada para a célula de colisão. Um resultado de energia de colisão normalizada de 28 (unidades arb.) foi usado para dissociação colisional de alta energia (HCD) dos íons de peptídeo. Os íons do produto foram transferidos para o Orbitrap para análise de massa com as seguintes configurações do Orbitrap: potência de resolução de 17.500, intervalo de 200 a 2000 m/z, alvo AGC de 5e5, tempo de injeção máximo de 100 milissegundos, 1 microvarredura de espectros capturada no modo centroide.

[0271] Análise de dados: Os dados brutos de LC-MS/MS foram

submetidos a buscas em bancos de dados com o uso do software Byonic (Versão 2.15.7) (Métricas de proteína). Os parâmetros a seguir foram usados para buscas de dados: tolerância de massa do íon precursor, 8 ppm; tolerância de massa de íon do produto, 20 ppm para espectros HCD; a modificação variável inclui carbamidometilação de cisteína, ou *N*-metilmaleimida (NEM), formação de aduto DTT de cisteína, conjugados de peptídeo YY (PYY) de cisteína foram incluídos quando presentes, desamidação de asparagina, serina xilose, e O-glicosilação de serina e treonina de 78 glicanos O-ligados de mamífero da biblioteca de glicanos Byonic. Uma busca de especificidade totalmente triptica com no máximo duas clivagens perdidas foi escolhida para todas as buscas. A taxa de falsa descoberta (FDR) de proteína foi ajustada em 1%. A base de dados de proteínas continha a sequência de aminoácidos de cada proteína. Todos os resultados de busca no Byonic foram processados no software Bylogic (versão 2.15.296) (métricas de proteína), os peptídeos foram filtrados com um escore Byonic mínimo de 15, escore de corrida alt máximo/escore de classificação primária de 0,99, com um erro *m/z* de precursor máximo de 8 ppm e janela de área XIC de 2 minutos. O nível de xilosilação de serina foi relatado levando em conta todas as áreas de pico XIC de peptídeo das isoformas que constituem a região ligante. A xilosilação em cada resíduo de serina foi então calculada como uma soma de fração da área de pico XIC total. Buscas no banco de dados foram então realizadas com o uso do mecanismo de busca Andromeda no software MaxQuant versão 1.6.1 (MaxPlank Institute) para obter probabilidades de localização do sítio PTM. As massas que correspondem a um PYY totalmente ciclizado e estruturas de PYY clivadas com tripsina foram obtidas com o uso do software de desenho BIOVIA. Os dados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12: Modificação de xilose

Posição da serina na molécula**	Localização do sítio por MS/MS			% xilosilação		
	NO: 244	NO: 146	NO: 152	NO: 244	NO: 146	NO: 152
41 (33)	SIM	SIM	SIM	9	5*	0,12
46 (38)	SIM	SIM	ND	7,4*	5*	NQ
51 (43)	SIM	SIM	ND	7,4*	5*	NQ

Modificação de xilose em serinas ligantes: identificação de sítios e níveis de modificação

ND = não detectado por MS/MS; NQ = não quantificado; NA = a posição de serina ligante não é aplicável para molécula; ** NO: SEQ ID NO: Os parênteses indicam numeração de sítio para a SEQ ID NO:152.

[0272] A Tabela 12 resume a xilosilação sítio-específica identificada e quantificada com o uso de integração de pico em Byologic onde a % baseada em XIC do pico/picos de interesse (modificações putativas, isto é, xilosilação de serina) foi normalizada para a soma de todas as espécies que contribuem para a xilosilação sítio-específica, de acordo com a equação descrita a seguir:

$$\% \text{ XIC de modificação} = (\text{XIC de peptídeo modificado} / \Sigma \text{XIC de homólogos de peptídeo}) \times 100$$

[0273] Todas as três moléculas investigadas consistem no mesmo primeiro peptídeo ligante, AS(G₄S)₂, que conecta o peptídeo GLP-1 e o peptídeo da região de dobradiça-Fc. Entretanto, devido às diferenças no peptídeo de fusão de GLP-1 encontradas na SEQ ID NO:152 (GF40) e no peptídeo de fusão de GLP-1 encontradas tanto na SEQ ID NO:244 quanto na 146 (GF34), a posição de três resíduos de serina na SEQ ID NO:152 difere da SEQ ID NO:244 e 146, conforme mostrado na Tabela 12. A análise dos peptídeos demonstrou três eventos de xilosilação de resíduo de serina sítio-específica em Ser-41, Ser-46, Ser-51 nas SEQ ID NO:244 e 146 e um evento de xilosilação de resíduo de serina em Ser-33 na SEQ ID NO:152. A quantificação da xilosilação sítio-específica foi viável apenas numa extensão limitada já que a maioria das espécies de peptídeos xilosilados coeluíram durante a cromatografia líquida de fase reversa. Por exemplo, na SEQ ID NO:244, a Ser-41 foi de ~9%, enquanto a Ser-46 e a

Ser-51 foi de ~7%. De modo similar, todos os três sítios da SEQ ID NO:146 foram xilosilados a ~5%. Descobriu-se que a xilosilação da SEQ ID NO:152 ocorre em uma extensão menor de ~0,1%.

[0274] As regiões de proteínas terapêuticas do ligante G₄S demonstraram ser suscetíveis à xilosilação com níveis de xilosilação variando com base no comprimento do ligante (Wen et al., "The propensity for xylosylation in (G₄S)_n linkers occurs when n > 2," Anal. Chem. 85:4805-12, 2013); Sphar et al., Protein Sci. 22:1739-53 (2013), Sphar et al., mAbs 6:904-14 (2014)). O primeiro peptídeo ligante, o ligante AS(G₄S)₂, encontrado em todas as três moléculas mostra xilosilação em alguns ou em todos os resíduos de serina e, com base nesses dados, o uso de serina contendo os primeiros peptídeos ligantes foi desaprovado neste experimento na preparação de construtos de peptídeo de fusão de GLP-1.

Exemplo 6: estabilidade plasmática humana ex vivo do peptídeo de fusão de GLP-1

[0275] Sangue total fresco de 4 doadores humanos normais com anticoagulante heparina de sódio foi recebido no dia da preparação das amostras para estabilidade. O sangue integral fresco foi processado para obtenção de plasma por centrifugação a 3500 RPM durante 15 minutos e o plasma foi então isolado. O plasma de todos os quatro doadores foi combinado, filtrado através de um filtro 0,2 µ e aquecido até 37°C. As amostras foram reforçadas com peptídeos de fusão de GLP-1 e análogos de agonista dual (DA) a 20 nM de conjugado de PYY cíclico acoplado com peptídeo de fusão de GLP-1, e a amostra em tempo zero foi imediatamente coletada e armazenada a -80°C até ser analisada. As amostras foram incubadas a 37°C e coletadas em pontos no tempo designados e armazenadas a -80°C até serem analisadas. No dia da análise, as amostras em tempo zero e em pontos no tempo subsequentes

foram descongeladas e analisadas em conjunto em um bioensaio funcional baseado em células.

[0276] O método usado para detectar e quantificar os níveis de peptídeo de fusão de GLP-1 bioativo e análogos de DA do conjugado de PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 em amostras de plasma humano foi um bioensaio baseado em células projetado para medir a produção de cAMP através da modulação do receptor acoplado à proteína G de GLP-1R humano. Após a ativação dependente de concentração de GLP-1R por proteínas de fusão de GLP-1 e conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1, o acúmulo de cAMP nas células HEK humanas transfectadas com GLP-1R foi medido em um ensaio de cAMP competitivo baseado em TRFRET. As células HEK humanas transfectadas com GLP-1R foram descongeladas no dia do ensaio, ressuspensas em 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, e 1 mM IBMX a $0,5 \times 10^6$ células/ml, e 10 µl foram adicionados em cada poço de uma placa de 384 poços (5000 células/poço). As amostras para estabilidade foram descongeladas e diluídas a 20% de plasma em tampão de ensaio compreendendo 1X HBSS, 5 mM HEPES, 0,1% BSA, 5 mM EDTA, inibidor de protease e as diluições subsequentes foram feitas em tampão de ensaio com 20% de plasma humano normal. Os padrões de referência de concentrações conhecidas para cada composto foram preparados em tampão de ensaio com 20% de plasma humano normal. Os padrões e as amostras foram adicionados a 10 µL/poço para cada placa de ensaio e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. O reagente de detecção de cAMP foi adicionado a 20 µL/poço. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas, e então lidas em um leitor de placas.

[0277] Todas as amostras foram medidas em quadruplicata. As curvas padrão de referência do composto foram geradas com concentração transformada para log, ajuste não linear, com log v. resposta (coeficiente

angular variável), e os valores EC₁₀ e EC₉₀ foram determinados para os limites superior e inferior do ensaio quantitativo. As concentrações das amostras para estabilidade para cada composto foram extrapoladas a partir da curva padrão de referência correspondente. A porcentagem de bioatividade restante de cada amostra de estabilidade foi determinada em relação à amostra em tempo zero correspondente e relatada como % de concentração plasmática inicial ao longo de um curso de tempo de 168 horas. % de concentração plasmática inicial = [média da amostra de estabilidade] / [média tempo zero] x100.

[0278] Resultados: Os peptídeos de fusão de GLP-1 das SEQ ID NOs:144 (GF32), 148 (GF36), 145 (GF33), 151 (GF39), 146 (GF34), 147 (GF35), 149 (GF37), 152 (GF40), e um controle de dulaglutida foram incubados em plasma humano *ex vivo* a 37°C durante 7 dias e a estabilidade funcional foi medida em um ensaio funcional de cAMP de GLP-1R *in vitro* (Figura 1A). As proteínas de fusão com o peptídeo GLP-1 SEQ ID NO:58 (Exendina 4 (1 a 39)) mostraram a maior estabilidade seguido pda SEQ ID NO:57 ((A8G, G22E, R36G) GLP-1 (7 a 37) e o controle de dulaglutida, com a SEQ ID NO:56 ((A8S, A30E) GLP-1 (7 a 36) tendo sido a menos estável. O trabalho com as proteínas de fusão de Fc com o peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:56 foi desaprovado neste experimento com base nesses resultados.

[0279] Os peptídeos de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:152 (GF40) e 146 (GF34), e seus correspondentes conjugados de peptídeo PYY acoplado a peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:248 e 262, e um outro peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:153 (GF41) foram incubados em plasma humano *ex vivo* a 37°C durante 7 dias juntamente com um controle de dulaglutida. A estabilidade funcional foi medida em um ensaio funcional de cAMP de GLP-1R *in vitro* (Figura 1B). A estabilidade dos conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado a peptídeo de fusão de

GLP-1 foram comparáveis às proteínas de fusão não conjugadas correspondentes, demonstrando que a conjugação do peptídeo PYY não afetou a estabilidade do peptídeo GLP-1. O peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:146 (GF34) e o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:262 tiveram a maior estabilidade, e as SEQ ID NOs:152 (GF40), 248, e 153 (GF41) tiveram estabilidade semelhante à do controle de dulaglutida.

Exemplo 7: Ensaio de estabilidade de camundongo *in vivo*

Métodos

[0280] Método LCMS: As amostras de plasma foram processadas através de captura por imunoafinidade com o uso de um anticorpo anti-Fc humana, seguido por digestão com tripsina e analisadas através de LC-MS/MS de fase reversa em um espectrômetro de massa de triplo quadrupolo. O peptídeo no N-terminal de GLP-1, especificamente HGE (HGEG-TFTSDVSSYLEEQAQK (SEQ ID NO:263) para GLPD30 e HGEGTFTSDLSK (SEQ ID NO:264) para GLPD31) foi monitorado como um substituto de moléculas contendo GLP1 ativo. Um peptídeo localizado em Fc, especificamente VVS (VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO:265)), foi monitorado como um substituto do nível de Fc total. Um peptídeo localizado no peptídeo PYY cíclico, YYA (YYASLR (SEQ ID NO:266)), foi monitorado como um substituto do nível de PYY. A curva padrão de calibração e as amostras de controle de qualidade foram preparadas mediante reforço do padrão de referência no plasma e processadas com o mesmo procedimento ao mesmo tempo que as amostras de teste.

Resultados

[0281] Os níveis de exposição plasmática da porção de peptídeo de fusão de GLP-1 N-terminal intacto após 72 horas de administração em camundongos foram medidos em um ensaio de LCMS e relatados como a porcentagem do nível de sequência da porção de peptídeo de fusão de GLP-1 N-terminal de HGE em relação ao nível Fc (% HGE de Fc).

Os resultados na Tabela 13 demonstram que o primeiro peptídeo ligante das SEQ ID Nos: 62 e 66, que compreendem uma repetição AP, foram menos estáveis que o primeiro peptídeo ligante da SEQ ID NO:60, que compreende uma repetição G₄A. O trabalho com peptídeos de fusão de GLP-1 com os primeiros peptídeos ligantes que compreendem repetições AP foi desaprovado neste experimento com base nesses resultados.

Tabela 13: Estabilidade de peptídeos de fusão de GLP-1 e de conjugados de peptídeo PYY acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 em camundongos *in vivo*.

SEQ ID NO	GLP-1 ou peptídeo variante de GLP-1 SEQ ID NO:	Primeiro peptídeo ligante SEQ ID NO:	Região de dobra- diça-Fc SEQ ID NO	camundongo in vivo 72 horas % HGE de Fc
135	58	60	84	36
134	58	60	84	36
176	58	62	89	14
241	58	62	89	17
140	59	60	84	60,56
177	59	62	89	9
246	59	62	89	7
233	57	60	89	6
131	57	60	84	12,12,14
136	57	60	84	12,12
120	57	60	84	9
113	57	60	84	10,9
259	57	62	89	3
258	57	62	89	3
175	57	62	89	3
240	57	62	89	BQL
166	57	66	86	4
239	57	66	86	BQL

BQL=Abaixo de limites quantitativos

Estudos farmacodinâmicos em nível agudo e crônico em camundongos DIO

[0282] Todos os roedores usados nesses estudos foram mantidos de conformidade com os protocolos aprovados pelo Institutional Animal Care & Use Committee (IACUC) (Comissão institucional de ética no cuidado e uso de animais) na Janssen R&D, Spring House, PA, EUA. Os animais foram alojados em um ciclo de 12 horas de luz/12 horas no escuro sob

condições padrão de temperatura e umidade com acesso à alimentação e água *ad libitum* (exceto se especificado em contrário). Foram utilizados camundongos machos C57BL/6T (Taconic Laboratory) com vinte semanas de vida sob DIO (dieta com alto teor de gordura 60% kcal durante 15 dias) que foram alojados individualmente. Os animais foram selecionados aleatoriamente em grupos com base no peso corporal. Para os testes de tolerância à glicose intraperitoneal (IPGTT), os camundongos receberam veículo, dulaglutida (Eli Lilly; adquirido junto à Myoderma, Norristown, PA, EUA, ou os compostos 1 a 4 (SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:229, respectivamente) (n=8/grupo). Vinte e quatro horas depois (após um jejum de um dia para o outro), os camundongos receberam dextrose por via intraperitoneal (1 g/kg). A glicose sanguínea foi medida nos tempos indicados com um glicosímetro One Touch Ultra (LifeScan), e a insulina plasmática (Meso Scale Delivery) foi medida em 0 e 10 minutos. Para os estudos de ingestão de alimentos (FI) e perda de peso (WL) em nível agudo, os camundongos DIO individualmente alojados receberam veículo, dulaglutida ou compostos, e a ingestão de alimentos e pesos corporais foram medidos durante 3 dias (n=8/grupo). Os dados são mostrados nas Figuras 2A-2B, 3A-3B e 4A-4B. Os dados nas Figuras 2A-2B, 3A-3B e 4A-4B demonstram que os peptídeos de fusão de GLP-1 têm eficácia desejável de GLP-1R e apresentam eficácia otimizada quando conjugados com o peptídeo PYY cíclico SEQ ID NO:27. A partir dos dados nas Figuras 5A-5B e 6A-6B, determinou-se que a dobradiça superior do peptídeo de fusão de GLP-1 contribui para a potência do GLP-1R.

Exemplo 8: Estudos *in vivo* com macacos *cynomolgus*

Métodos

Estudo de eficácia

[0283] Macacos foram escolhidos e selecionados aleatoriamente em grupos para tratamento com o composto com base em sua ingestão de alimentos (primária - 80% ponderada) e peso corporal (secundária - 20%

ponderada) de linha de base (média de 3 dias antes do dia 0) medidos durante a inclusão e tratamento com o veículo. O estudo durou 9 semanas, 2 semanas de aclimação/treinamento, 3 semanas de tratamento com veículo a cada 3 dias (Q3D) e medição de ingestão de alimentos de linha de base, 12 dias de tratamento (5 doses, Q3D) e 2 semanas de descanso farmacológico. Os animais foram dosados 7 vezes com veículo e 5 vezes com um dos artigos de teste (a 0,5 ml/kg de volume de dosagem) Q3D aproximadamente às 8 horas da manhã. As doses de cada grupo foram as seguintes: dulaglutida (0,0125 mg mg/kg, n=11), composto 4 (dose alta; 0,0148 mg/kg, n=11), composto 4 (dose baixa; 0,0074 mg/kg, n=6). O consumo calórico foi medido diariamente e o peso corporal foi medido a cada três dias (Q3D).

Análise da resposta à exposição

[0284] Dois métodos analíticos foram usados para medir as concentrações do composto 4 e dulaglutida a partir de amostras de plasma *in vivo* em macaco Cynomolgus.

[0285] A análise de exposição ao ensaio de ligação de ligante (LBA) para o composto 4 e dulaglutida em macaco Cynomolgus foi através de um método de imunoenensaio eletroquimioluminescente (ECLIA) adequado à sua finalidade com o uso de um imageador Sector S600 Meso Scale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD USA). O formato para medir o GLP-1 ativo tanto para o composto 4 quanto para a dulaglutida é descrito da seguinte forma: o analito foi capturado com um mAb específico para o N-terminal (7-17) de GLP-1 (mAb Biotina-anti-GLP1) (7-37, 7-36, amida, NT livre)) e detectado com um mAb anti- Fc humana específico (Sulfo Tag-R10). A regressão de dados brutos foi realizada no software Watson LIMS™ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA EUA) com o uso de um ajuste logístico de 5 parâmetros com ponderação de curva padrão 1/F2.

[0286] A análise de LC-MS/MS para o composto 4 e dulaglutida no

macaco *Cynomolgus* também foi feita por um ensaio de tripsina "bottom-up" para a quantificação de partes individuais das moléculas. Para o ensaio de tripsina, o analito foi purificado a partir das amostras de plasma usando captura por imunoafinidade através de um anticorpo Fc anti-humano, seguido por digestão e análise de tripsina através de LC-MS/MS de fase reversa em um sistema LC-MS/MS SCIEX Triple Quad™ 5500 (CIEX, Concord, Ontario, Canadá). Um isótopo estável [¹³C6, ¹⁵N4-arginina] e [¹³C6, ¹⁵N2-lisina] IgG4 humana marcada (Sigma, número de catálogo MSQC7) foram usados como um padrão interno e adicionados no início da etapa de captura por imunoafinidade. O peptídeo no N-terminal de GLP-1, a saber, HGE (HGEGTFTS-DVSSYLEEQAAK) (SEQ ID NO:263), foi monitorado como um substituto de moléculas contendo GLP-1 ativo, uma vez que o peptídeo HGE é essencial para sua atividade.

Resultados

[0287] Os agonistas duais de acordo as modalidades da aplicação contêm um peptídeo de fusão de GLP-1 (GF) covalentemente ligado a um peptídeo PYY cíclico. Os agonistas duais são compreendidos de um peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) recombinante ou um peptídeo variante de GLP-1 fundido a uma região de dobradiça-Fc através de um primeiro peptídeo ligante (peptídeo ligante N-terminal) e um peptídeo PYY cíclico quimicamente conjugado a uma cisteína alvo contida no segundo peptídeo ligante (peptídeo ligante C-terminal) do peptídeo de fusão de GLP-1 (GF) recombinante. Cada componente do agonista dual foi selecionado empiricamente com base em vários parâmetros chave, que incluem, mas não se limitam a, potência em cada receptor, estabilidade, modificações pós-translacionais, produtividades de produção de conjugação, e propriedades biofísicas.

[0288] A variante de peptídeo de GLP-1 SEQ ID NO:57 foi seleci-

onada como uma variante de peptídeo de GLP-1. A variante de peptídeo-1 de GLP-1 SEQ ID NO:56 foi menos potente *in vivo* e menos estável *ex vivo* em estudos de estabilidade plasmática humana (Figura 1A), e assim desaprovado nesse experimento. A variante de peptídeo de GLP-1 SEQ ID NO:58 perdeu inesperadamente a potência de GLP-1R quando conjugada a peptídeos PYY cíclicos (Tabela 11), consulte, por exemplo, que as potências de GLP-1R das SEQ ID Nos: 135, 134, 146, e 176 com a SEQ ID NO:238, 242, 262, 253, e 241 mostraram que peptídeos de fusão de GLP-1 com Exendina 4 (1 a 39) (SEQ ID NO:58) perderam ou reduziram significativamente a potência de GLP-1R após a conjugação com alguns peptídeos PYY cíclicos (Tabela 11). O trabalho com peptídeos de fusão de GLP-1 com Exendina 4 (1 a 39) (SEQ ID NO:58) foi desaprovado neste experimento com base nesses resultados. A variante de peptídeo de GLP-1 SEQ ID NO:58 contém adicionalmente um motivo com suscetibilidade à desamidação de NG. A SEQ ID NO:59 formou um motivo com suscetibilidade à desamidação de NG na interface peptídeo GLP-1/primeiro peptídeo ligante quando a glicina era o primeiro aminoácido no primeiro peptídeo ligante. Adicionalmente, o GF28 (SEQ ID NO:140), que continha o peptídeo GLP-1 SEQ ID NO:59, apresentou menos potência do que a dulaglutida tanto para a ingestão de alimentos (FI) quanto para a porcentagem de alteração no peso corporal (BW) (Figura 10A e Figura 10B, respectivamente).

[0289] A SEQ ID NO:60 foi selecionada como o primeiro peptídeo ligante (peptídeo ligante N-terminal). As proteínas de fusão de GLP-1 contendo o primeiro ligante de peptídeo, SEQ ID NO:61, apresentaram baixas produtividades de expressão e de purificação e foram desaprovadas nesse experimento para a produção da quantidade desejada do conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de

GLP-1. Os primeiros peptídeos ligantes contendo repetições AP apresentaram produtividades insatisfatórias quando o segundo peptídeo terminal era uma repetição G₄A (consulte, por exemplo, o Exemplo 2 e a Tabela 8) e foram menos estáveis *in vivo* em comparação com a SEQ ID NO:60 (consulte, por exemplo, a Tabela 13). O trabalho com os ligantes contendo repetição AP foi desaprovado nesse experimento com base nesses resultados. Os ligantes mais curtos resultaram em potência reduzida (consulte, por exemplo, a SEQ ID NO:152 na Figura 5, SEQ ID NO:140 nas Figuras 10A e 10B, e a Figura 12 comparando as potências para os peptídeos de fusão de GLP-1 compreendendo o mesmo peptídeo GLP-1 (SEQ ID NO:58) com primeiros peptídeos ligantes de comprimento diferente). Dessa forma, o trabalho com ligantes mais curtos foi desaprovado nesse experimento com base nesses resultados. O uso de ligantes contendo serina foi desaprovado nesse experimento com base na propensão à xilosilação que os resíduos de serina apresentam (consulte, por exemplo, a Tabela 12).

[0290] O peptídeo de fusão de GLP-1, GF19 (SEQ ID NO:131), que continha o peptídeo variante de GLP-1, SEQ ID NO:57, o primeiro peptídeo ligante, SEQ ID NO:60, e o peptídeo da região de dobradiça-Fc, SEQ ID NO:84, demonstraram uma potência que foi comparável à dulaglutida tanto para a ingestão de alimentos (FI) quanto para a porcentagem de alteração de peso corporal (BW) (consulte, por exemplo, a Figura 6A e Figura 6B, respectivamente).

[0291] Os peptídeos de fusão de GLP-1 GF1 (SEQ ID NO:113, composto 1), GF19 (SEQ ID NO:131), e GF24 (SEQ ID NO:136, composto 3) demonstraram eficácia comparável à dulaglutida quanto à ingestão de alimentos e à porcentagem de alteração no peso corporal (consulte, por exemplo, as Figuras 2A-2B, Figuras 6A-6B e as Figuras 3A-3B, respectivamente). O GF1 (SEQ ID NO:113, composto 1) e o GF24 (SEQ ID

NO:136, composto 3) também demonstraram eficácia comparável à dulaglutida na tolerância à glicose (Figuras 4A-4B e Figuras 7A-7B).

[0292] Entretanto, quando um conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1, SEQ ID NO:251, foi preparado mediante a conjugação de um peptídeo PYY cíclico (SEQ ID NO:27) ao segundo peptídeo ligante, SEQ ID NO:92, de GF19 (SEQ ID NO:131), não houve farmacologia adicional para a ingestão de alimentos ou para a alteração na porcentagem de peso corporal em comparação com a dulaglutida (Figura 11A e Figura 11B, respectivamente). Os segundos peptídeos ligantes adicionais foram testados mas desaprovados nesse experimento, ao menos pelas seguintes razões: (a) a SEQ ID NO:95 apresentou baixas produtividades de produção quando o primeiro peptídeo ligante tinha uma repetição AP, (b) a SEQ ID NO:100 foi truncada durante a expressão recombinante, (c) os peptídeos da região de dobradiça-Fc sem o segundo peptídeo ligante, que compreendem a cisteína alvo para a conjugação do peptídeo PYY na extremidade C-terminal do peptídeo da região de dobradiça-Fc, foram truncados durante a expressão de proteína, indicando que um segundo peptídeo ligante era necessário para produzir proteína intacta propensa à conjugação de peptídeo PYY, (d) os segundos peptídeos ligantes contendo serina tinham potencial para serem xilosilados, e (e) os segundos peptídeos ligantes mais curtos tiveram conjugação menos eficiente e com menor pureza.

[0293] Embora o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1, SEQ ID NO:225 (composto 2), com o segundo peptídeo ligante, SEQ ID NO:94, tenha demonstrado potência significativamente maior do que a dulaglutida tanto para FI (ingestão de alimentos) quanto para a porcentagem de alteração de BW (peso corporal) (consulte, por exemplo, as Figuras 2A e 2B, respectivamente), ele surpreendentemente teve perda significativa de proteína

durante 2 semanas de armazenamento a 4°C em uma formulação líquida de alta concentração. O conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 comparável, SEQ ID NO:229, com o segundo peptídeo ligante, SEQ ID NO:93, era estável e manteve os níveis de proteína na formulação líquida de alta concentração durante 2 semanas de armazenamento a 4°C e 40°C (Tabela 14). O segundo peptídeo ligante foi a única diferença entre essas duas moléculas, e, dessa forma, a SEQ ID NO:93 foi selecionada como o segundo peptídeo ligante neste experimento.

Tabela 14: Estabilidade de proteína em formulação líquida de alta concentração durante duas semanas de armazenamento a 4°C e 40°C

SEQ ID NO:	Tempo de concentração final = 0 a 4°C	Tempo de concentração final = 2 semanas a 4°C	Tempo de concentração final = 2 semanas a 40°C
225	52,6 mg/mL	14,0 mg/mL	52,8 mg/mL
229	51,4 mg/mL	48,5 mg/mL	52,9 mg/mL

[0294] Várias modificações são necessárias para a atividade funcional do peptídeo PYY cíclico, para conferir a estabilidade *in vivo* necessária para um agente com meia-vida estendida, e para possibilitar a ligação aos peptídeos de fusão de GLP-1, mantendo, ao mesmo tempo, a potência. A química de peptídeos sintéticos foi empregada para preparar peptídeos PYY cíclicos que incorporam essas modificações, e peptídeos PYY cíclicos quando quimicamente conjugados aos peptídeos de fusão de GLP-1 para gerar conjugados de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1.

[0295] Os peptídeos PYY cíclicos foram selecionados para serem conjugados aos peptídeos de fusão de GLP-1 para explorar e comparar as modificações na potência e estabilidade do peptídeo PYY. O peptídeo PYY foi ciclizado para estabilizar os múltiplos sítios de proteólise ao longo da cadeia principal do peptídeo.

[0296] Os peptídeos PYY cíclicos foram selecionados para serem

conjugados aos peptídeos de fusão de GLP-1 para explorar o espaçamento e tamanho da ligação do amino terminal ao C-terminal dos peptídeos PYY cíclicos, e para determinar os efeitos sobre a potência e estabilidade. Esses peptídeos cíclicos PYY continham variações no número de carbonos no ciclo e variações nas posições da cisteína e homocisteínas usadas para seletivamente ligar o N-terminal ao C-terminal.

Consulte, por exemplo:

- | | | |
|----|-------------------------------|--------------------|
| a) | β A2 ligado à hCys31 | SEQ ID NO:25 |
| b) | β A2 ligado à Cys30 | SEQ ID NOs:28 e 29 |
| c) | G2 ligado à Cys30 | SEQ ID NOs:27 e 30 |
| d) | γ Aba2 ligado à hCys31 | SEQ ID NO:34 |

[0297] Arginina N-ME substituída na posição 35 (N-MeR35) (SEQ ID NOs:27, 28, 33, e 34) e uma ligação de amida reduzida entre as posições 35 e 36 (psi35, 36) (SEQ ID NOs: 24, 25, 29, e 30) foram comparadas quanto a sua capacidade de estabilizar a tirosina C-terminal amidada na posição 36 no peptídeo PYY cíclico e de reter a potência (consulte, por exemplo, a publicação de patente US n° 2018/0117170, que está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade). Em certos casos, a modificação N-Me35 resultou em redução da potência em comparação com a modificação psi35,36, (consulte, por exemplo, a publicação de patente US n°. 2018/0117170), Tabela 3, que mostra que a SEQ ID NO:102 com a modificação psi35,36 foi aproximadamente 12 vezes mais potente para o receptor Y2 humano do que a SEQ ID NO: 122 com a modificação N-Me35).

[0298] De forma imprevisível, a potência da modificação N-MeR35 no conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1, SEQ ID 229, que contém o peptídeo PYY cíclico, SEQ ID 27, foi igual ou maior em comparação com a modificação psi35,36 na SEQ ID NO:232, que contém o peptídeo PYY cíclico, SEQ ID NO:30 (Tabela 11).

[0299] O peptídeo PYY cíclico, SEQ ID NO:27, foi selecionado

como o peptídeo PYY neste experimento com base em potência e estabilidade, juntamente com a determinação de que a combinação de componentes resultasse em menor custo das mercadorias e facilidade de obtenção do reagente. O aminoácido natural glicina no N-terminal ligado à cisteína na posição 30 próxima ao C-terminal tinha potência e estabilidade comparável aos mais altos níveis de potência e estabilidade alcançados para qualquer peptídeo PYY cíclico testado quando o peptídeo PYY cíclico foi conjugado com o peptídeo de fusão de GLP-1. A cisteína na posição 30 foi selecionada em vez da homocisteína na posição 31 porque o peptídeo PYY cíclico SEQ ID NO:27 tinha potência e estabilidade suficientes. Portanto, os aminoácidos não naturais mais caros e não prontamente disponíveis não foram necessários neste experimento. O N-MeR35 usado para estabilizar a tirosina amidada no C-N-terminal na posição 36 é um reagente menos caro e mais prontamente disponível do que a modificação psi35,36 de alto custo. Isso elimina a necessidade de um componente personalizado e fornece a mesma estabilidade e potência.

[0300] Adicionalmente, determinou-se que um espaçador PEG não era necessário para a potência e, também inesperadamente, que um espaçador PEG não era necessário para a estabilidade de PYY *in vivo*. Isto foi inesperado, por ter sido determinado que os conjugados de peptídeo PYY cíclico mAb com o espaçador PEG apresentava aumento na estabilidade *in vivo* (consulte, por exemplo, a publicação de patente US n° 2018/0117170, Tabela 4, que mostra a porcentagem restante do composto intacto em relação à quantidade dos níveis de mAb humano total nas amostras de sangue de camundongos coletadas 48 horas após a administração. Composto 1, contendo um espaçador 12xPEG, tinha 90,8% restantes em 48 horas; composto 2, contendo um espaçador 6xPEG, tinha 65,6% restantes em 48 horas; e o composto 3, sem um

espaçador PEG, tinha apenas 51% restantes em 48 horas). Este resultado eliminou a necessidade do componente PEG que teria aumentado o custo de fabricação das mercadorias.

[0301] SEQ ID NO:229, que continha o peptídeo de fusão de GLP-1 SEQ ID NO:136 com a adição de dois peptídeos PYY cíclicos estáveis, SEQ ID NO:27, foi selecionado como o conjugado de peptídeo PYY cíclico acoplado ao peptídeo de fusão de GLP-1 neste experimento. A SEQ ID NO:229 apresentou eficácia farmacodinâmica adicional a partir do acoplamento de Y2R em relação à SEQ ID NO:136 (apenas com o acoplamento de GLP1R) tanto para FI quanto para BW (Figuras 3A-3B), apresentando, ao mesmo tempo, potência de GLP1R comparável à dulaglutida e a SEQ ID NO:136 sobre a tolerância à glicose (Figuras 4A-4B e 7A-7B).

[0302] Os efeitos da dulaglutida e SEQ ID NO:229 (composto 4) sobre FI e BW foram comparados em camundongos DIO. Com base na análise de regressão não linear integrada de resposta à exposição de estudos disponíveis (6 estudos para o composto e 7 estudos para a dulaglutida; as doses de 0,03 a 1,0 nmol/kg), a uma dose resultando em exposições ao GLP-1 (HGE) ativo clinicamente relevante no dia 3 (dose subcutânea única de 0,3 nmol/kg), composto 4 demonstraram farmacologia adicional em relação à dulaglutida, através do acoplamento de Y2R pelos peptídeos PPY cíclicos do conjugado, na redução de FI e BW (Figuras 8A-8B) em exposições ao GLP1 (HGE) ativo correlacionadas. Em concentrações HGE de dulaglutida correlacionadas a 0,3 nmol/kg (dose SC única), com base na regressão não linear de resposta à exposição pelo composto 4 (SEQ ID NO:229), a FI e a porcentagem de alteração de BW calculadas foram cerca de 2,1 e 1,5 vezes maior que a dulaglutida, respectivamente.

[0303] Em macacos cynomolgus com sobrepeso, a análise de res-

posta à exposição baseada em PK e consumo calórico individuais (Figuras 9A-9B) sugeriu em exposições clinicamente relevantes à dulaglutida (1 - 2 nM agrupando $C_{\text{mínima}}$ e $C_{\text{máxima}}$ no estado de equilíbrio após a administração por via subcutânea (SC) uma vez por semana (QW) de 1,5 mg em pacientes T2DM [Geiser et al, *Clin Pharmacokinet* 55(5): (2016)]], o composto 4 resultou em ~1,7 a 2 vezes (95% de intervalo de confiança: 1,3 a 3,3, PK baseado no ensaio de ligação de ligante [LBA], (Figura 9A), ou ~1,5 a 1,6 vezes (95% de intervalo de confiança: 1,0 a 2,8, PK baseado em LC-MS/MS HE, Figura 9B) maior redução da porcentagem de consumo calórico em comparação com a dulaglutida em exposições de GLP-1 ativo correlacionadas, demonstrando farmacologia adicional dos peptídeos PYY cíclicos do composto 4.

[0304] Será entendido pelos versados na técnica que podem ser feitas alterações nas modalidades descritas acima sem que se desvie do amplo conceito da invenção. Entende-se, portanto, que esta invenção não é limitada às modalidades específicas reveladas, mas tem por objetivo cobrir modificações dentro do espírito e escopo da presente invenção, como definido pela presente invenção.

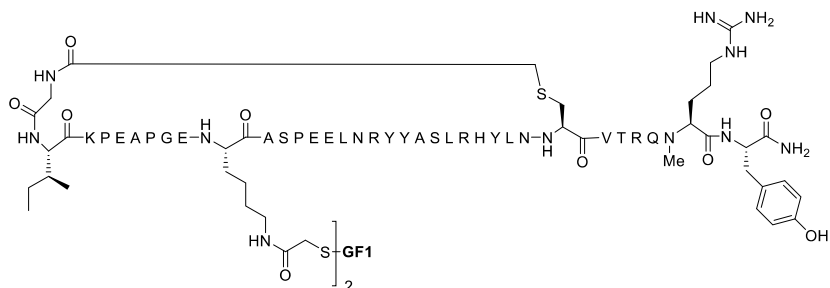
[0305] Todos os documentos citados na presente invenção estão aqui incorporados a título de referência.

[0306] Os conjugados de peptídeo PYY cíclico de fusão de GLP-1 exemplificadores da invenção incluem:

SEQ ID NO:225

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

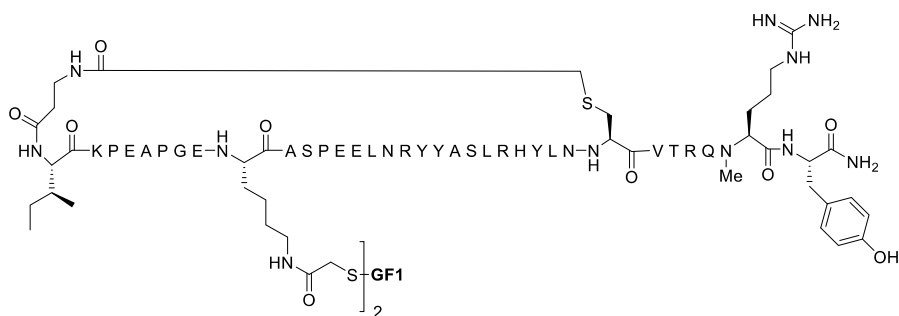
Estrutura



SEQ ID NO:226

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[[ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

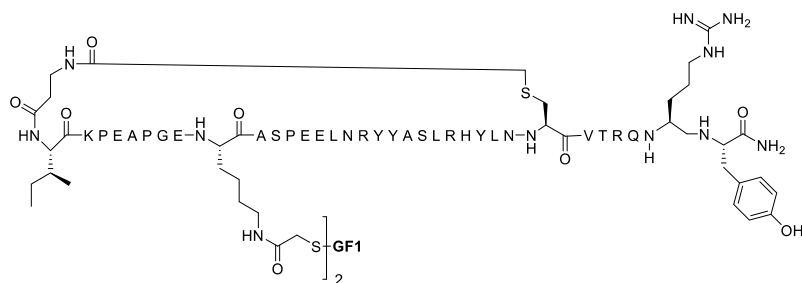
Estrutura



SEQ ID NO:227

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[Ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36

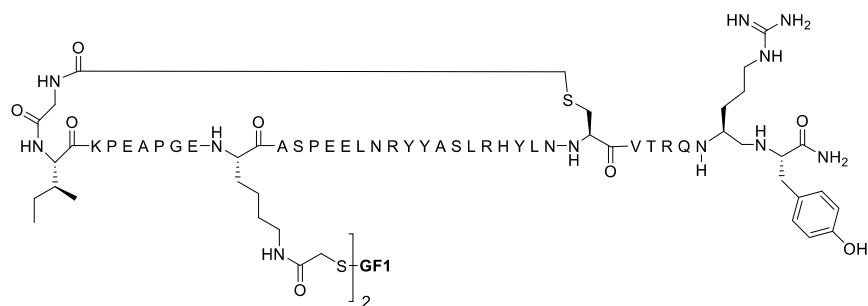
Estrutura



SEQ ID NO:228

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[Ciclo-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, *psi*-(R35, Y36)]-PYY2-36

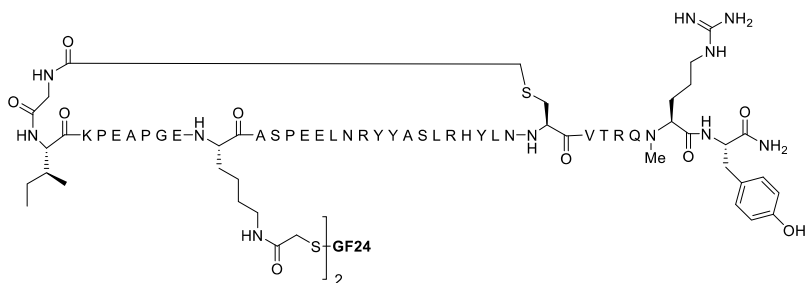
Estrutura



SEQ ID NO:229

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

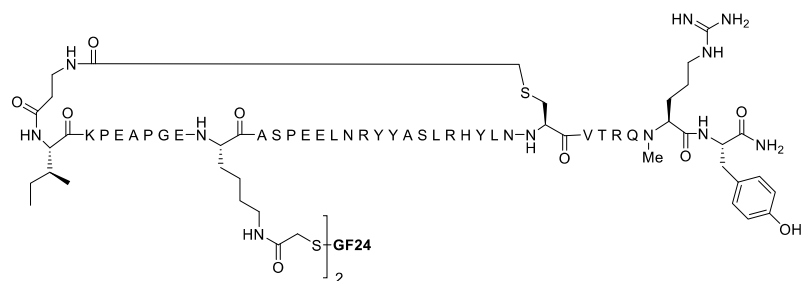
Estrutura



SEQ ID NO:230

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[[ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

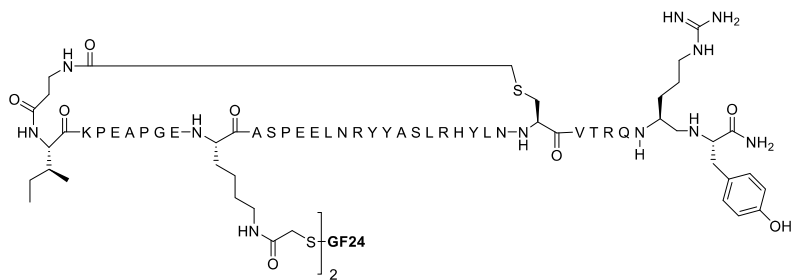
Estrutura



SEQ ID NO:231

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[Ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36

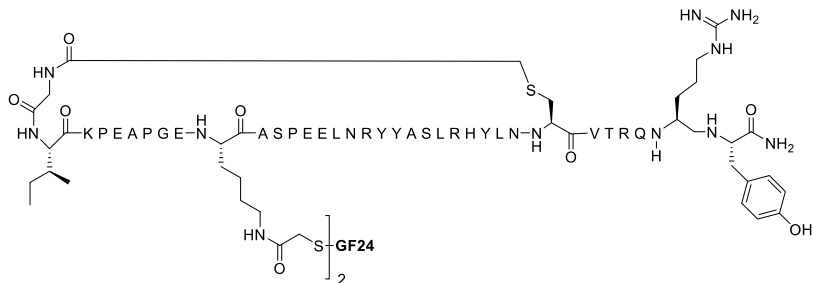
Estrutura



SEQ ID NO:232

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[Ciclo-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, *psi*-(R35, Y36)]-PYY2-36

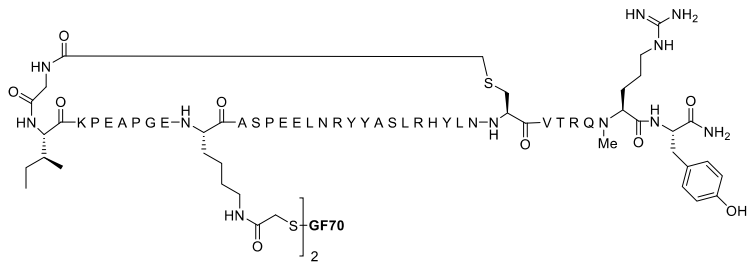
Estrutura



SEQ ID NO:233

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

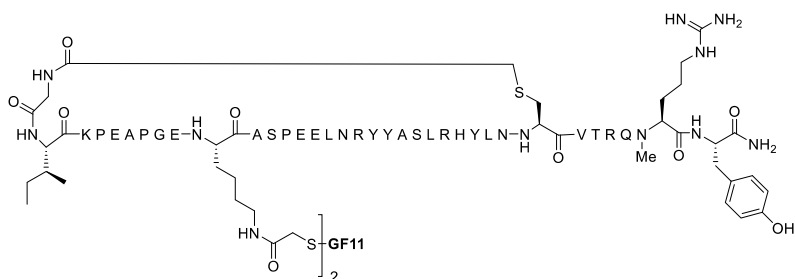
Estrutura



SEQ ID NO:234

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

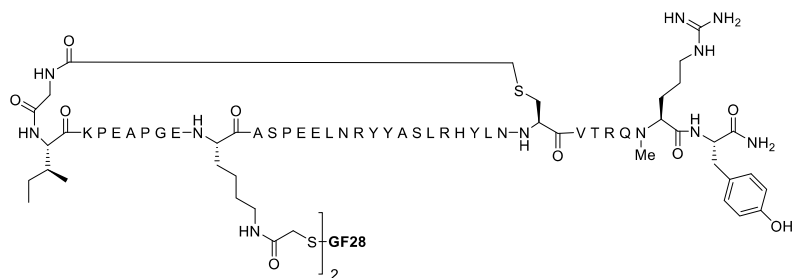
Estrutura



SEQ ID NO:235

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

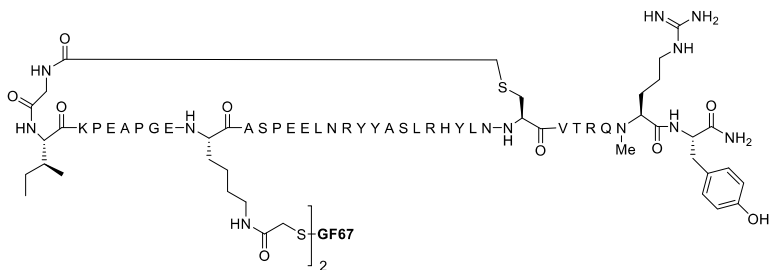
Estrutura



SEQ ID NO:236

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

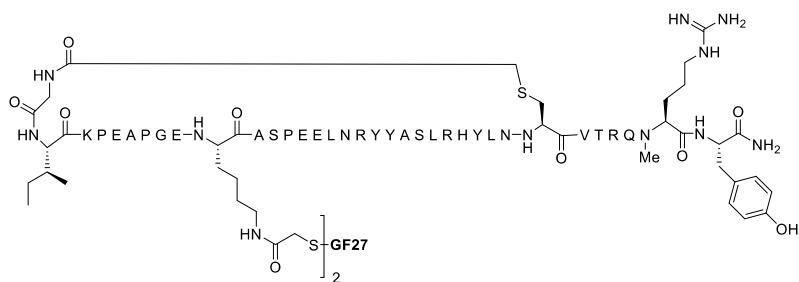
Estrutura



SEQ ID NO:237

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

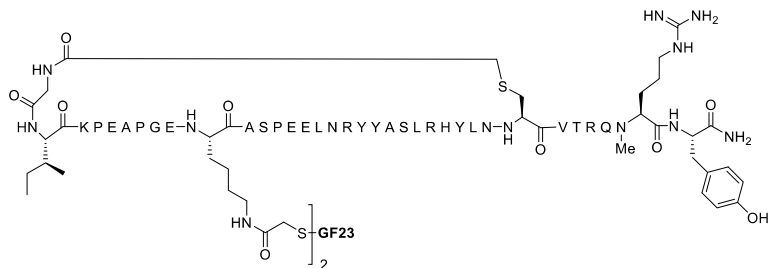
Estrutura



SEQ ID NO:238

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

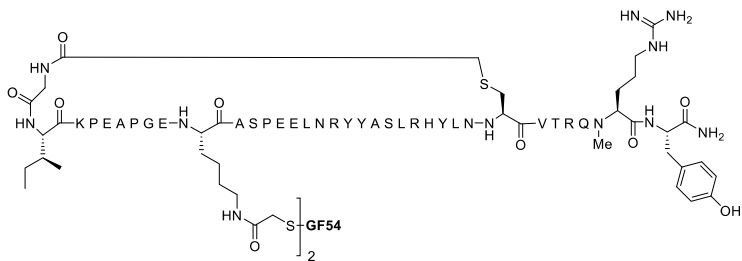
Estrutura



SEQ ID NO:239

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

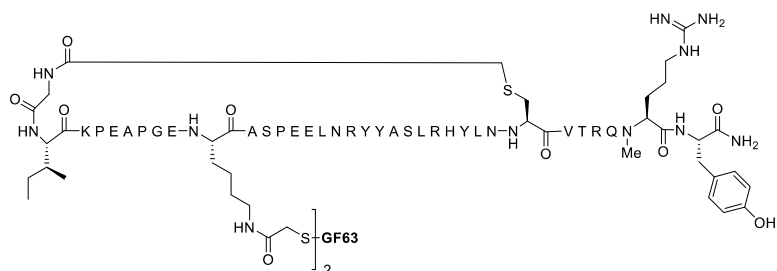
Estrutura



SEQ ID NO:240

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

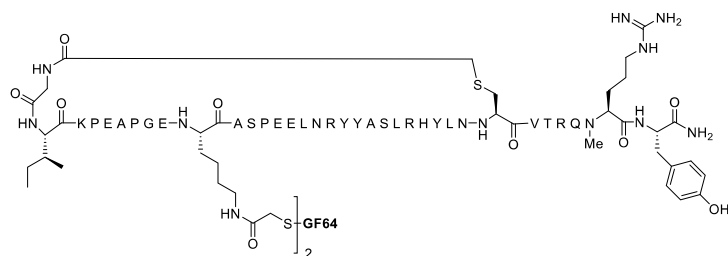
Estrutura



SEQ ID NO:241

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

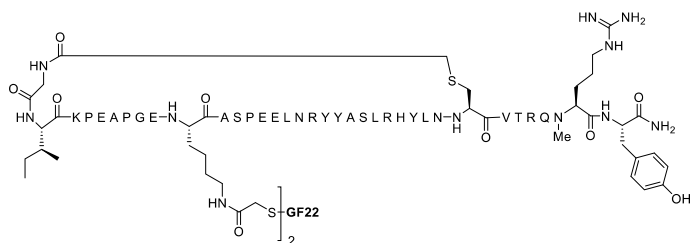
Estrutura



SEQ ID NO:242

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

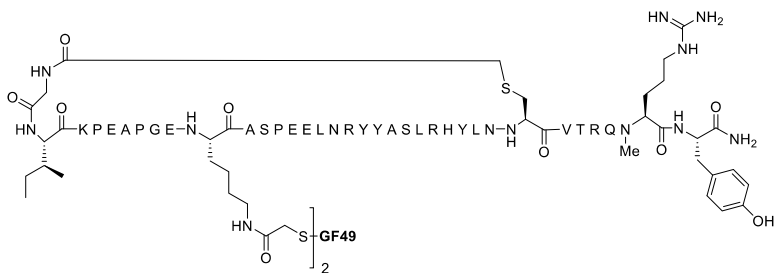
Estrutura



SEQ ID NO:243

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

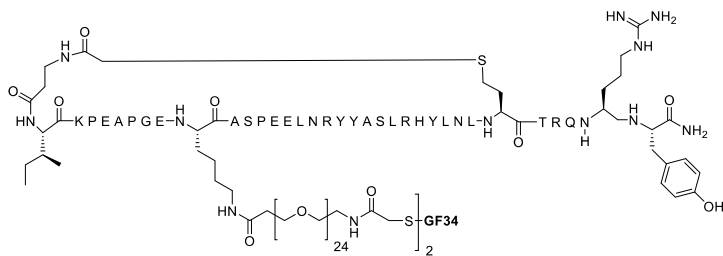
Estrutura



SEQ ID NO:244

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-hC31), K(PEG24Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

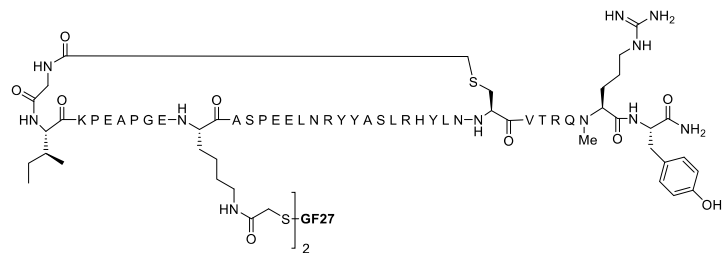
Estrutura



SEQ ID NO:245

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

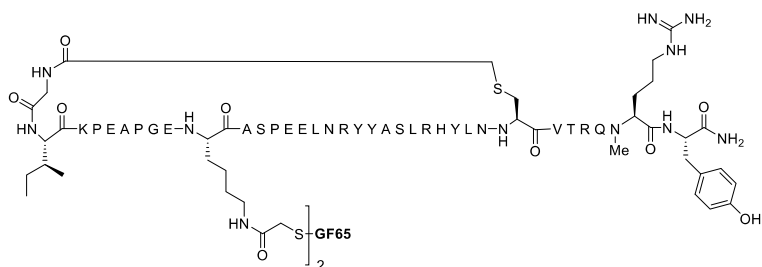
Estrutura



SEQ ID NO:246

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

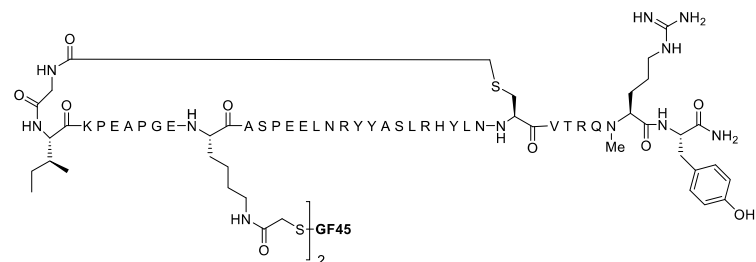
Estrutura



SEQ ID NO:247

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

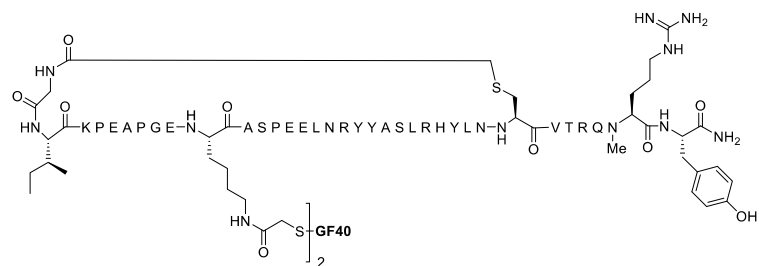
Estrutura



SEQ ID NO:248

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

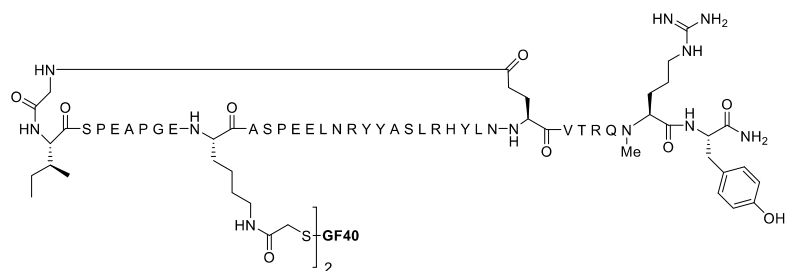
Estrutura



SEQ ID NO:249

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[[ciclo-(G2-E30), S4, K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

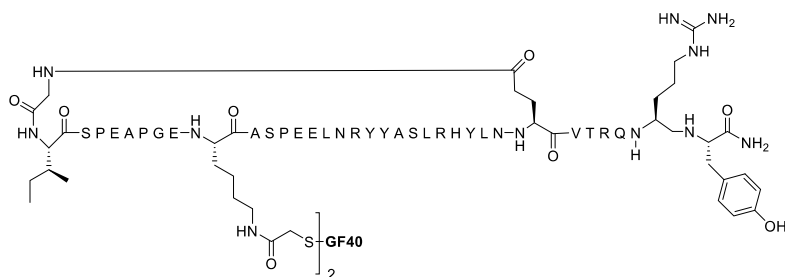
Estrutura



SEQ ID NO:250

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[ciclo-(G2-E30), S4, K(Ac)11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

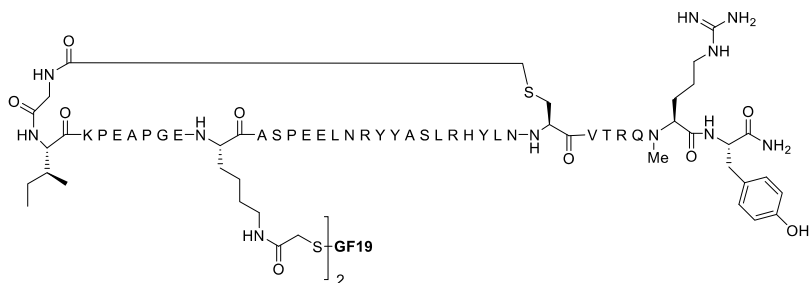
Estrutura



SEQ ID NO:251

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

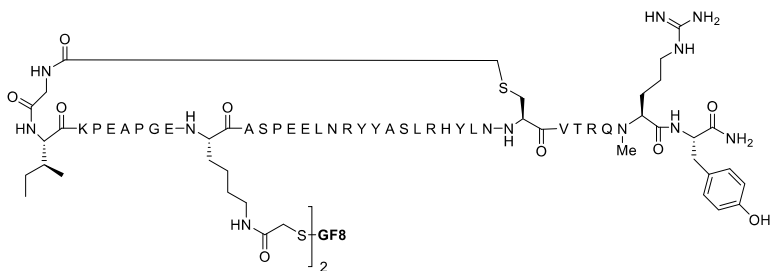
Estrutura



SEQ ID NO:252

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

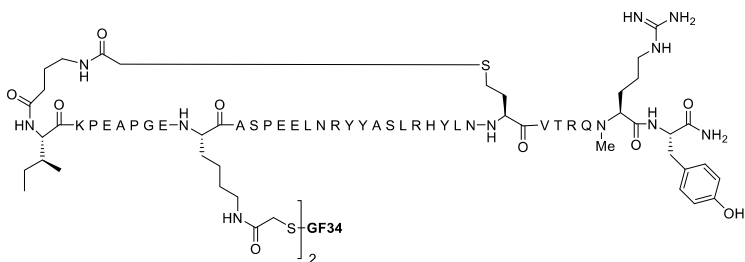
Estrutura



SEQ ID NO:253

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[ciclo-(gAba2-COCH₂-hC30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

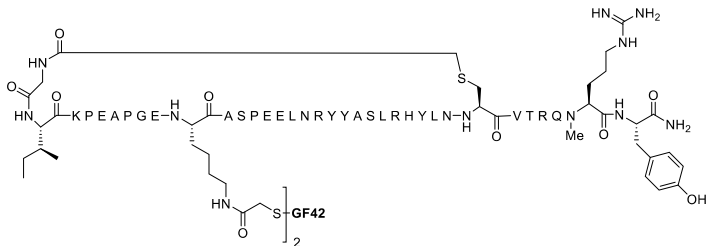
Estrutura



SEQ ID NO:254

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

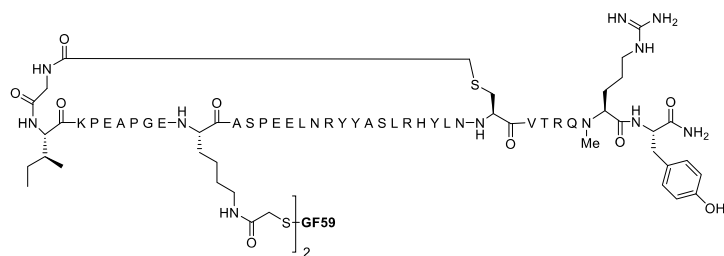
Estrutura



SEQ ID NO:255

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

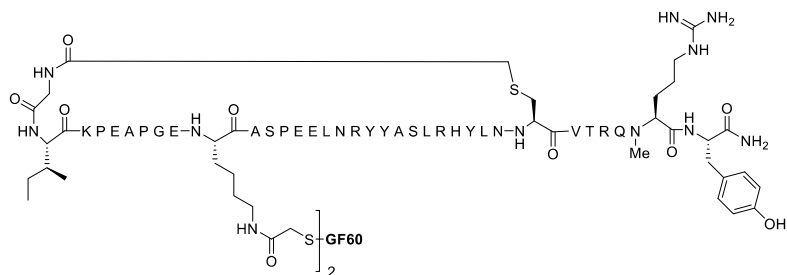
Estrutura



SEQ ID NO:256

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

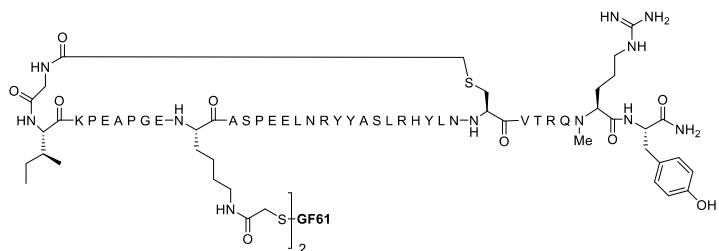
Estrutura



SEQ ID NO:257

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

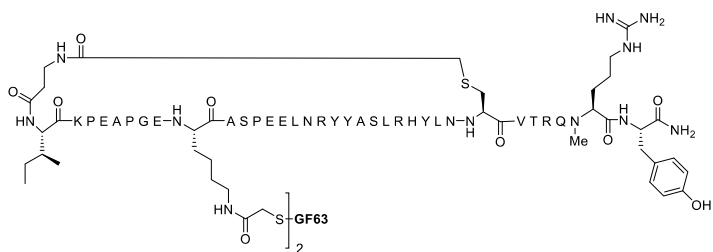
Estrutura



SEQ ID NO:258

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

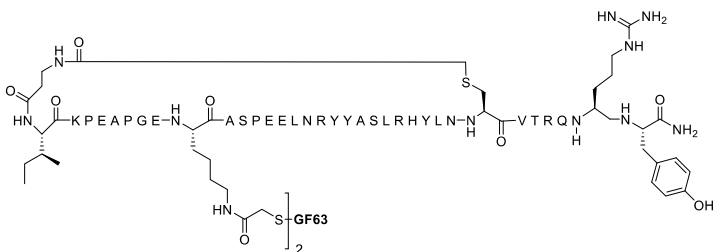
Estrutura



SEQ ID NO:259

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

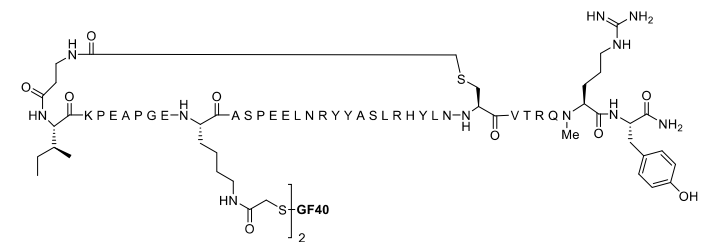
Estrutura



SEQ ID NO:260

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1-[[ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

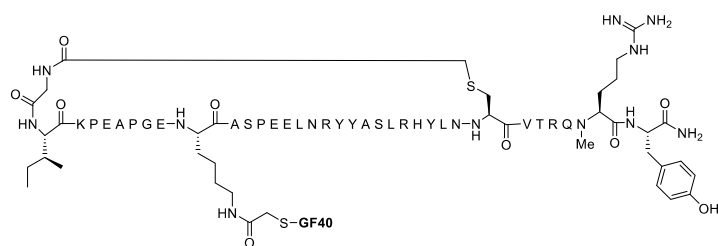
Estrutura



SEQ ID NO:261

Nome: Conjugado de monômero de fusão de GLP-1[ciclo-(G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

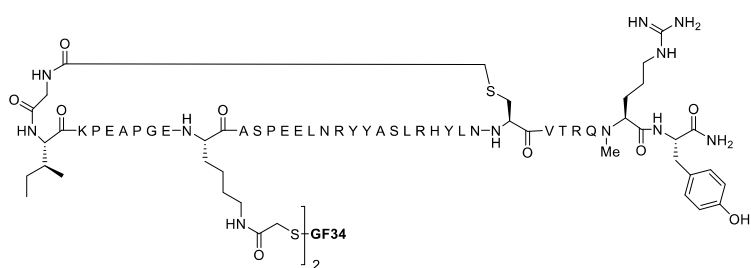
Estrutura



SEQ ID NO:262

Nome: Conjugado de homodímero de fusão de GLP-1[Ciclo - (G2-COCH₂-C30), K(Ac)11, N-Me-R35]-PYY2-36

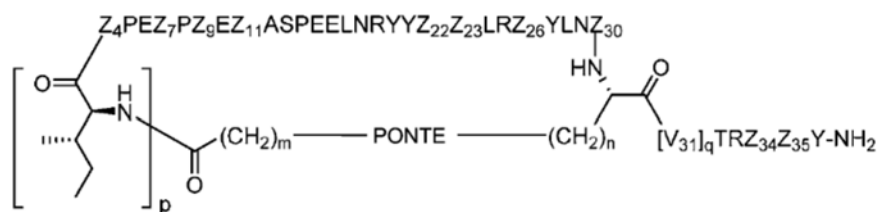
Estrutura



REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado caracterizado por compreender um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende um peptídeo GLP-1, um primeiro peptídeo ligante, um peptídeo da região de dobradiça-Fc, e um segundo peptídeo ligante, em que o primeiro peptídeo ligante está opcionalmente ausente.

2. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o peptídeo PYY cíclico ser representado pela Fórmula 1 ou um derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula I

em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z₃₀ estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-,

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

Z₄ é K, A, E, S ou R;

Z₇ é A ou K;

Z₉ é G ou K;

Z₁₁ é D ou K;

Z₂₂ é A ou K;

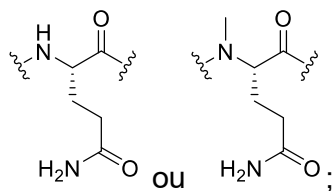
Z₂₃ é S ou K;

Z₂₆ é A ou H;

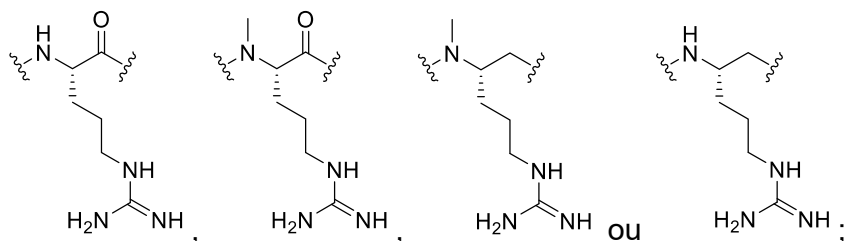
Z₃₀ é L, W, ou está ausente;

desde que Z_{30} esteja ausente apenas quando q for 1;

Z_{34} é



Z_{35} é



em que o derivado é o composto de Fórmula I que é modificado por um ou mais processos selecionados do grupo que consiste em amidação, acilação e PEGuilação.

3. Conjugado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o peptídeo PYY cíclico ser representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5;

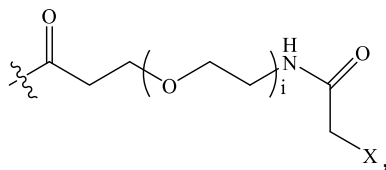
n é 1, 2, 3 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q seja 1 apenas quando Z_{30} estiver ausente;

PONTE é -Ph-CH₂-S-, -triazolila-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- ou -CH₂S-;

Z_4 é K, A, E, S ou R;

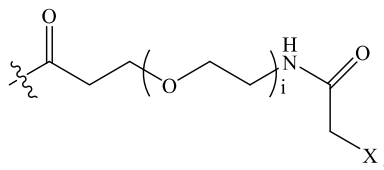
Z_7 é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

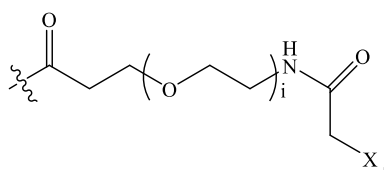
Z_9 é G ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

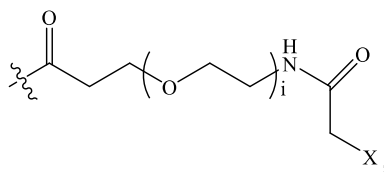
Z_{11} é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

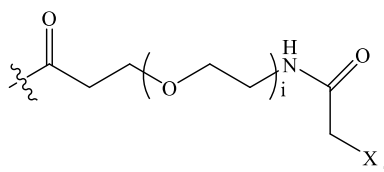
Z_{22} é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

Z_{23} é S ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é opcionalmente substituída por



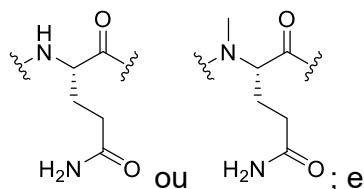
em que i é um número inteiro de 0 a 24, e $X = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl ,

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

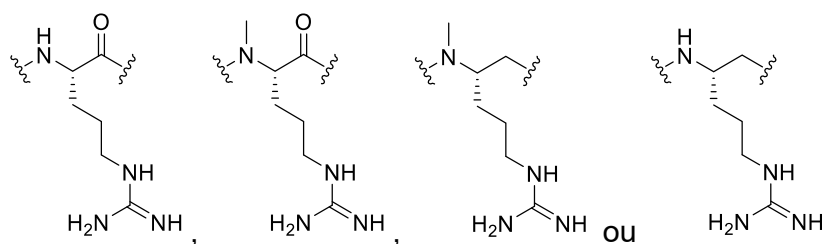
Z_{26} é A ou H;

Z_{30} é L;

Z_{34} é



Z_{35} é



4. Conjugado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o peptídeo PYY cíclico ser representado pela Fórmula I ou o derivado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

P é 0 ou 1;

m é 0, 1, 2, 3 ou 5;

n é 1, 2 ou 4;

q é 0 ou 1; desde que q possa ser 1 apenas quando Z_{30} estiver ausente;

PONTE é $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{triazolila}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ ou $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 é K, A, E, S ou R;

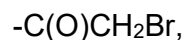
Z_7 é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por

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

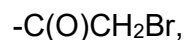
Z_9 é G ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por

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

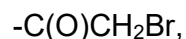
Z₁₁ é D ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por



Z₂₂ é A ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por



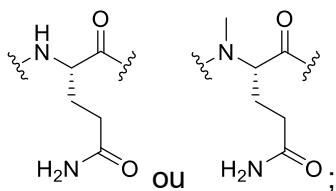
Z₂₃ é S ou K, em que a cadeia lateral de amino do dito K é substituída por



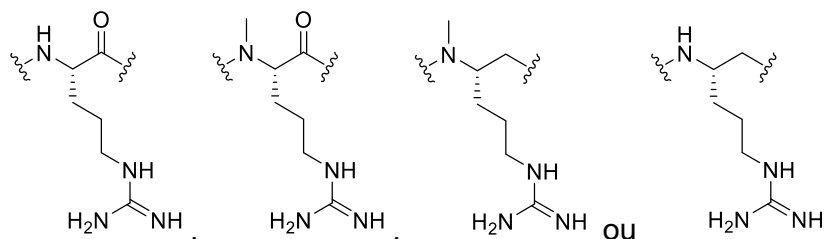
Z₂₆ é A ou H;

Z₃₀ é L;

Z₃₄ é



Z₃₅ é



5. Conjugado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o peptídeo PYY cíclico ser selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 54, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

6. Conjugado, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o peptídeo PYY cíclico ser selecionado dentre as SEQ ID NOs: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33 ou 34, ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

7. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 6, caracterizado por o peptídeo de fusão de GLP-1 estar covalentemente ligado ao peptídeo PPY cíclico em um resíduo de lisina do peptídeo PPY cíclico.

8. Conjugado, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por apenas um dentre Z_7 , Z_9 , Z_{11} , Z_{22} e Z_{23} na Fórmula I ser lisina, e a lisina estar covalentemente ligada a um resíduo de cisteína no segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1.

9. Conjugado, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por Z_{11} na Fórmula I ser lisina.

10. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por o peptídeo GLP-1 compreender uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 56 a 59.

11. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado por o primeiro peptídeo ligante estar presente e compreender uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 60 a 83.

12. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por o peptídeo da região de dobradiça-Fc compreender uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 84 a 90.

13. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado por o segundo peptídeo ligante compreender uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 93 a 112.

14. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado por o segundo peptídeo ligante compreender a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 93, 94, 95, 106 ou 111.

15. Conjugado, caracterizado por compreender um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado

a um peptídeo PYY cíclico, em que o peptídeo de fusão de GLP-1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 113 a 224 e 267 a 274, e em que o peptídeo PYY cíclico compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre as SEQ ID NOs: 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33, ou 34, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

16. Conjugado, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o resíduo de cisteína entre os resíduos de aminoácidos 287 a 289, de preferência o resíduo de cisteína 288, do peptídeo de fusão de GLP-1 estar covalentemente ligado a um resíduo de lisina no resíduo 7, 9, 11, 22 ou 23 do peptídeo PYY cíclico, de preferência o resíduo de lisina 11 do peptídeo PYY cíclico, por meio de um ligante químico.

17. Conjugado, caracterizado por compreender um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico, em que o conjugado compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 225 a 262 ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

18. Método para produzir o conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado por compreender reagir um eletrófilo, de preferência, bromoacetamida ou maleimida, introduzido em uma cadeia lateral do peptídeo PYY cíclico, de preferência, a cadeia lateral de um resíduo de lisina do peptídeo PYY cíclico, com o grupo sulfidril de um resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1, criando assim uma ligação covalente entre o peptídeo PYY cíclico e o peptídeo de fusão de GLP-1.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por o resíduo de cisteína do segundo peptídeo ligante do peptídeo de fusão de GLP-1 ser reduzido colocando-se o peptídeo de fusão

de GLP-1 em contato com um excesso de um agente redutor de azafosfina, e o resíduo de cisteína reduzido ser reagido com o eletrófilo.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o agente redutor de azafosfina ser 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1] decano (PTA) ou um derivado do mesmo.

21. Composição farmacêutica caracterizada por compreender o conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

22. Método para tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que a dita doença ou distúrbio é obesidade, diabetes tipo I ou tipo II, síndrome metabólica, resistência à insulina, tolerância à glicose deficiente, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglicemia devido a hiperinsulinismo congênito (CHI), dislipidemia, aterosclerose, nefropatia diabética, e outros fatores de risco cardiovascular como hipertensão e fatores de risco cardiovascular relacionados aos níveis de colesterol e/ou de lipídios não controlados, osteoporose, inflamação, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH), doença renal, e/ou eczema, sendo o método caracterizado por compreender administrar ao indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 21.

23. Método para redução de ao menos um dentre ingestão de alimentos ou peso corporal em um indivíduo em necessidade do mesmo, sendo o método caracterizado por compreender administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 21.

24. Método de modulação da atividade do receptor Y2 e/ou da atividade do receptor de GLP-1 em um indivíduo em necessidade do mesmo, sendo o método caracterizado por compreender administrar ao

dito indivíduo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 21.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizado por a composição farmacêutica ser administrada através de uma injeção.

26. Kit caracterizado por compreender o conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, compreendendo adicionalmente um dispositivo para injeção.

27. Método de produção de uma composição farmacêutica compreendendo o conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado por compreender combinar o conjugado com um veículo farmaceuticamente aceitável para obter a composição farmacêutica.

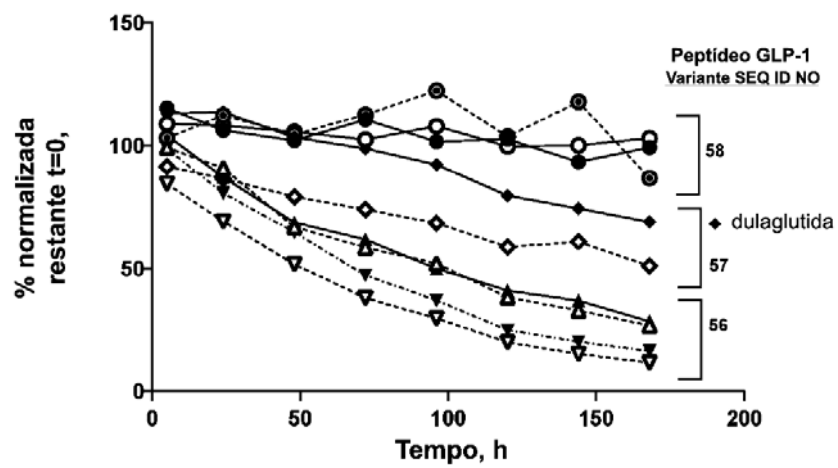


FIG. 1A

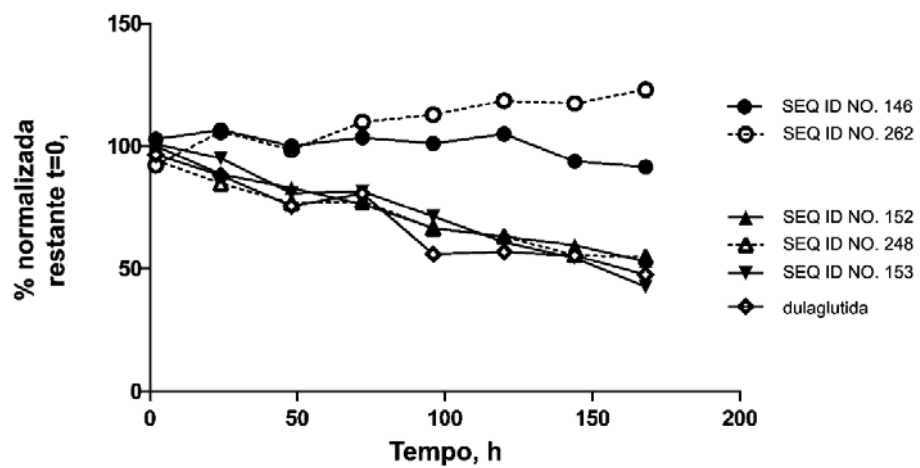


FIG. 1B

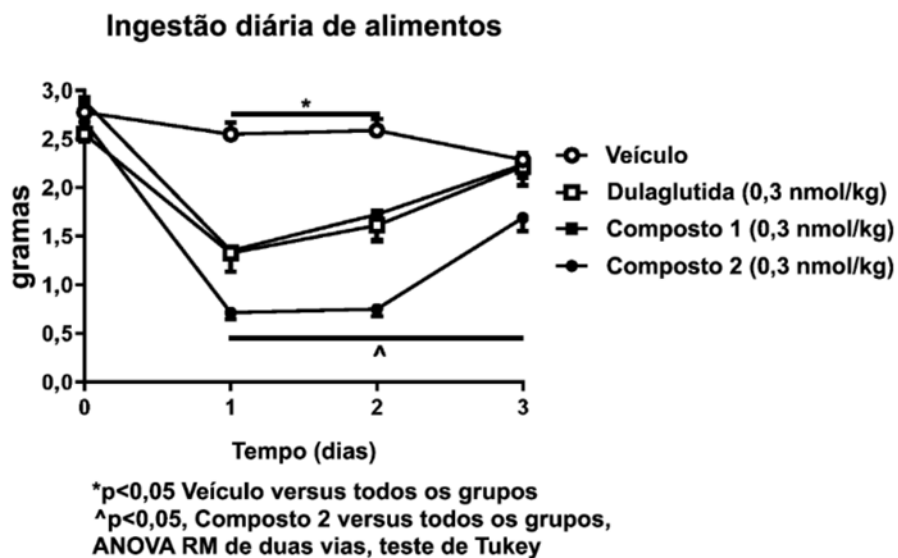


FIG. 2A

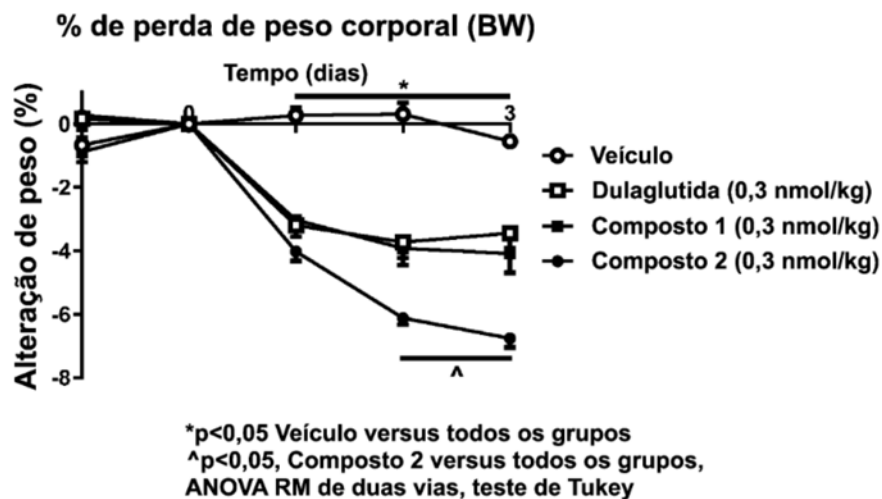


FIG. 2B

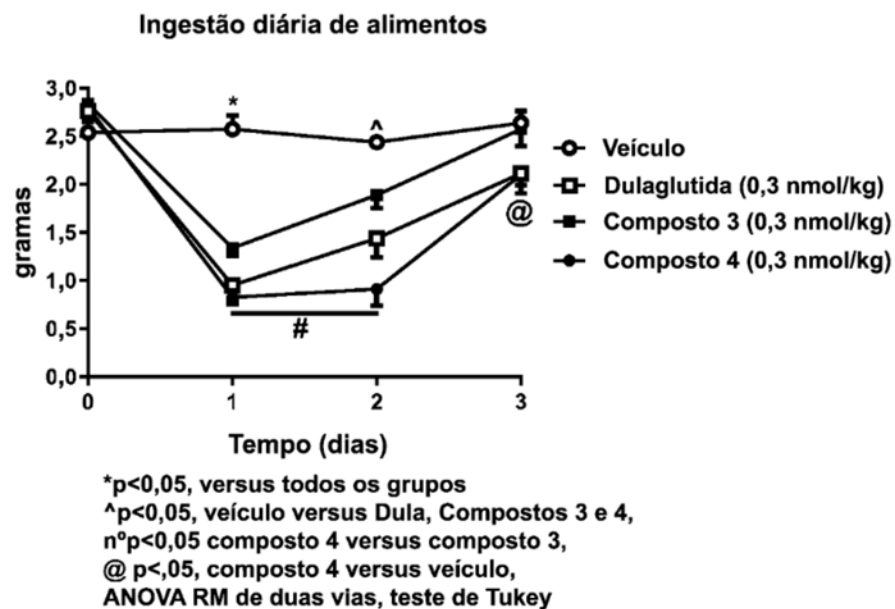


FIG. 3A

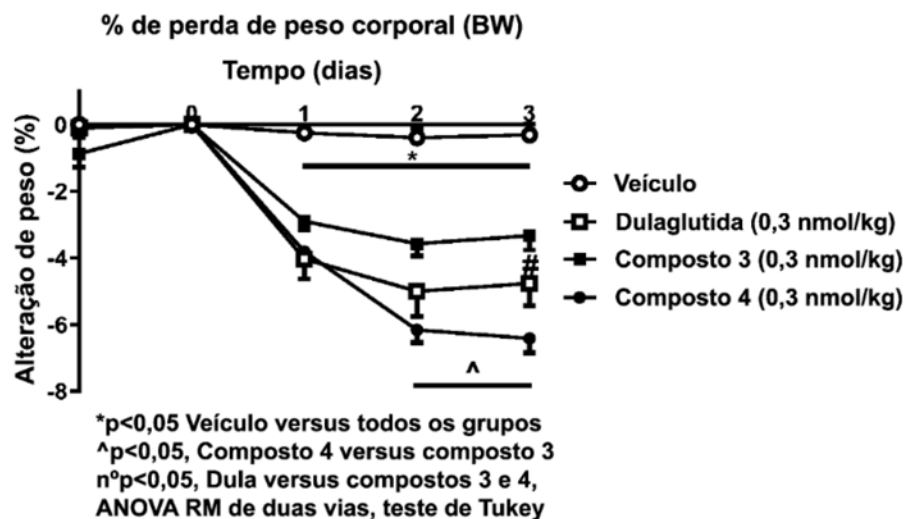


FIG. 3B

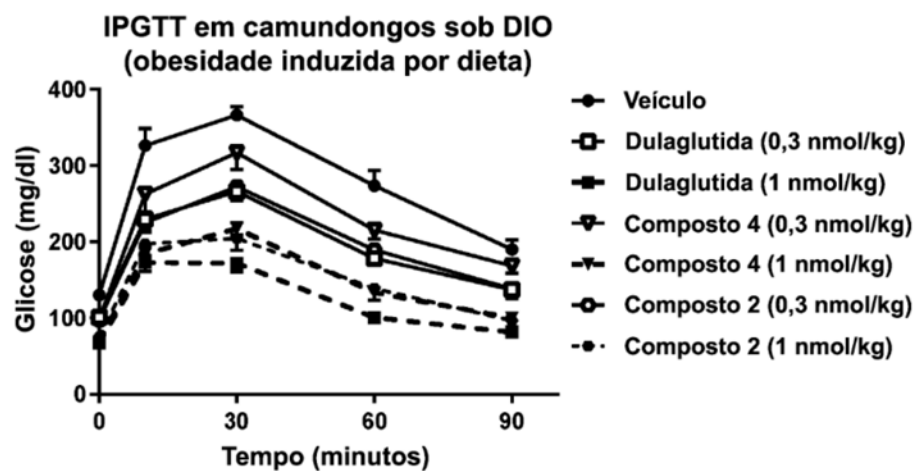


FIG. 4A

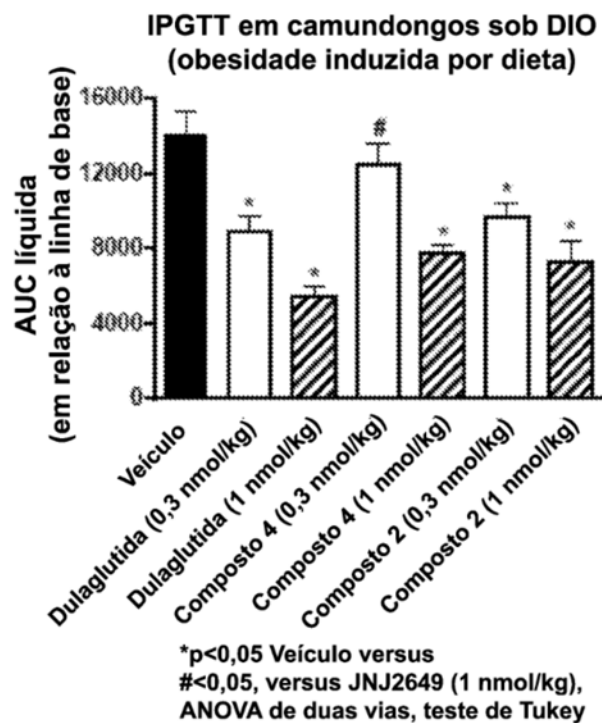


FIG. 4B

Ingestão diária de alimentos

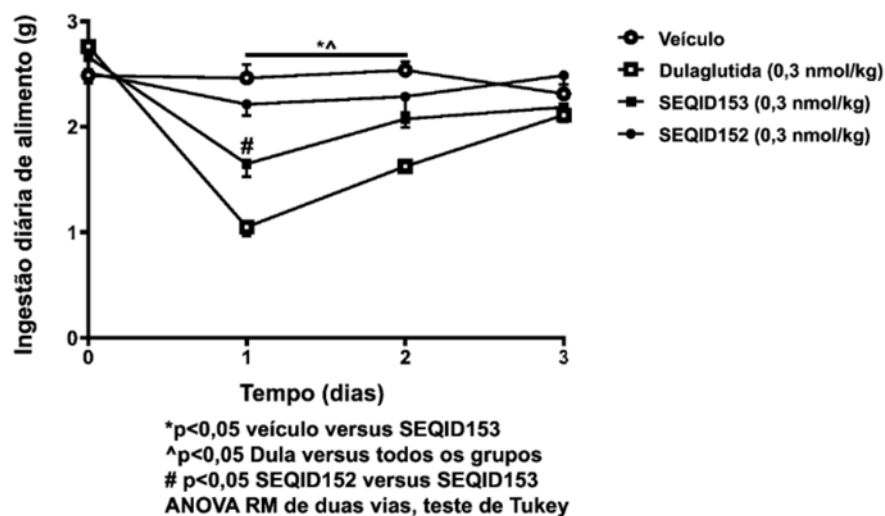


FIG. 5A

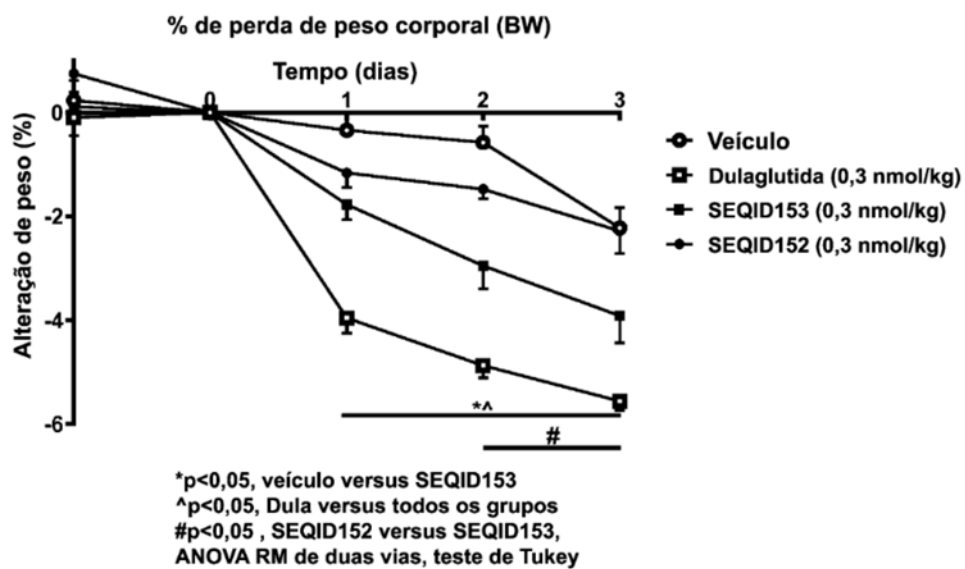


FIG. 5B

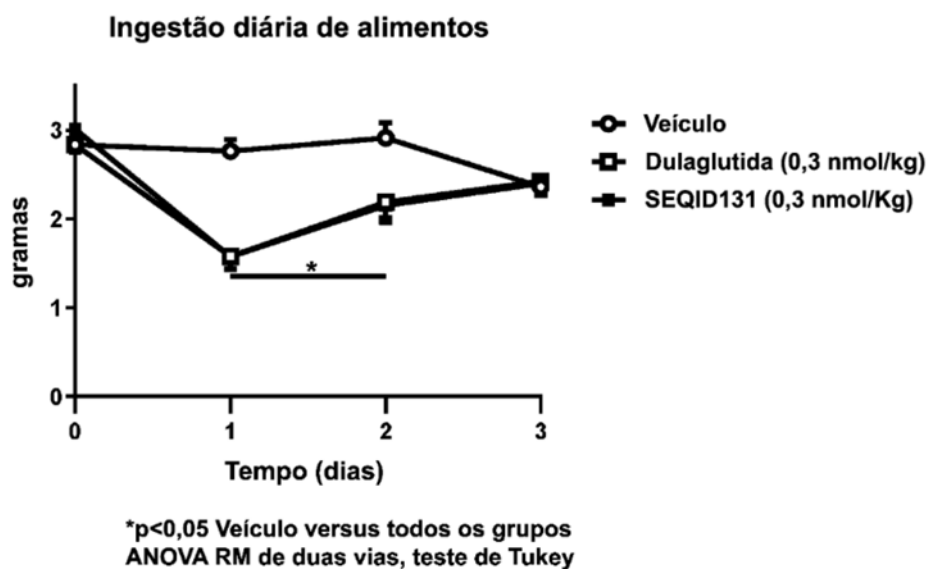


FIG. 6A

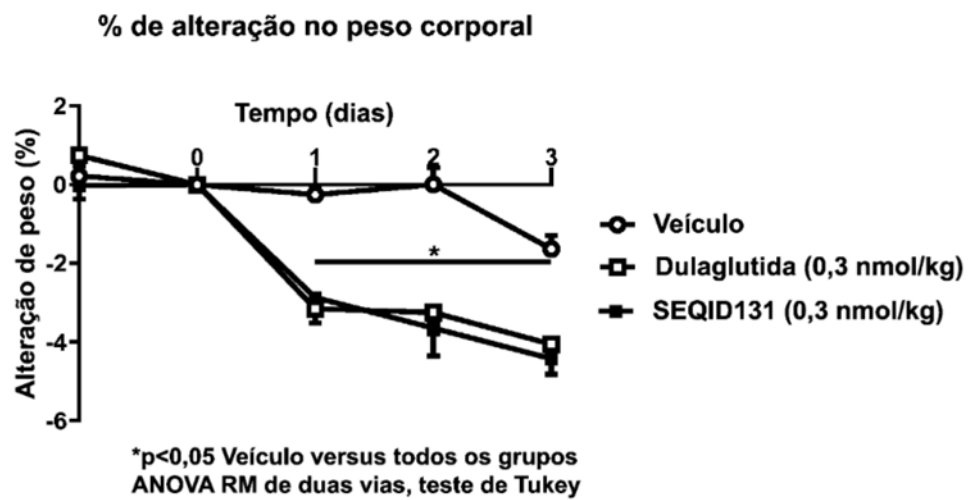


FIG. 6B

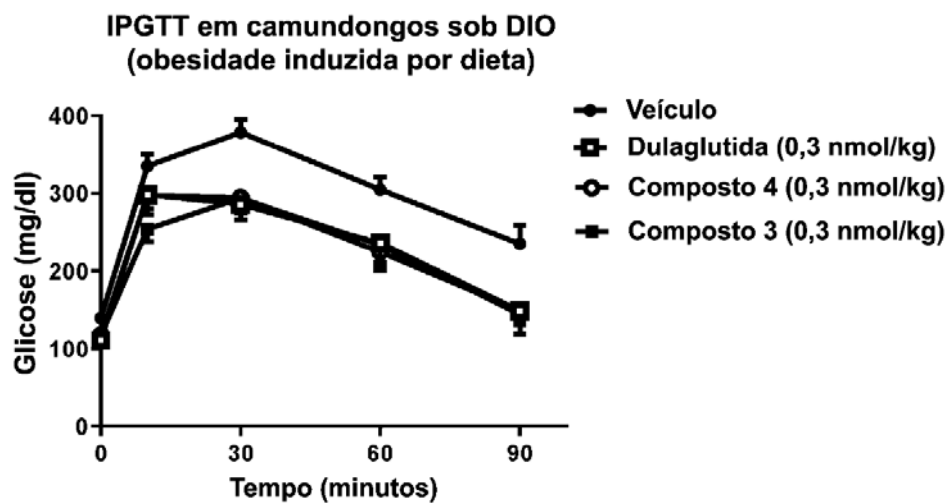


FIG. 7A

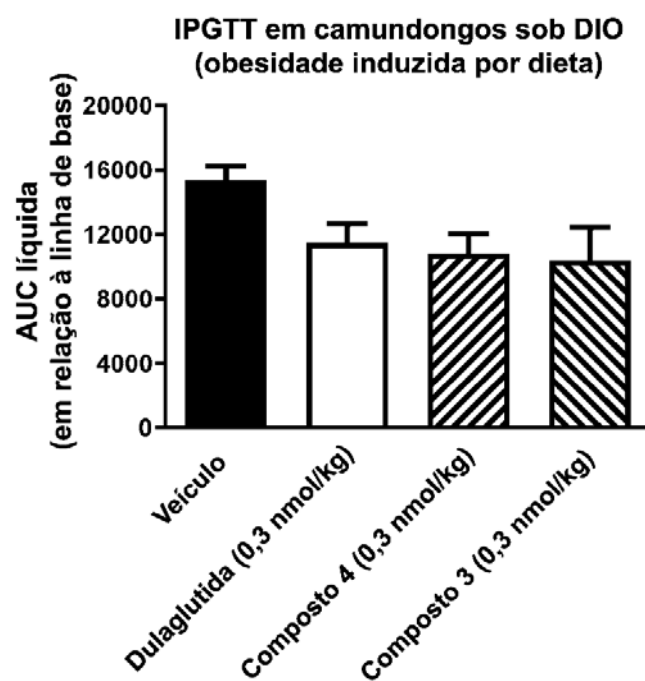


FIG. 7B

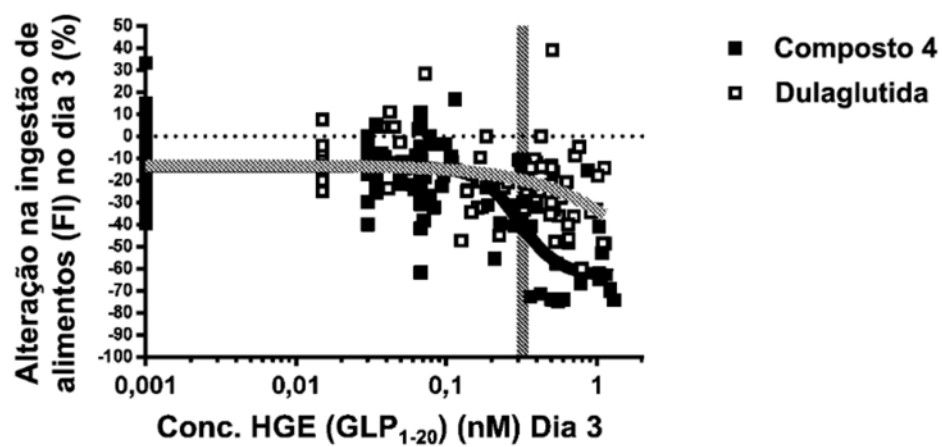


FIG. 8A

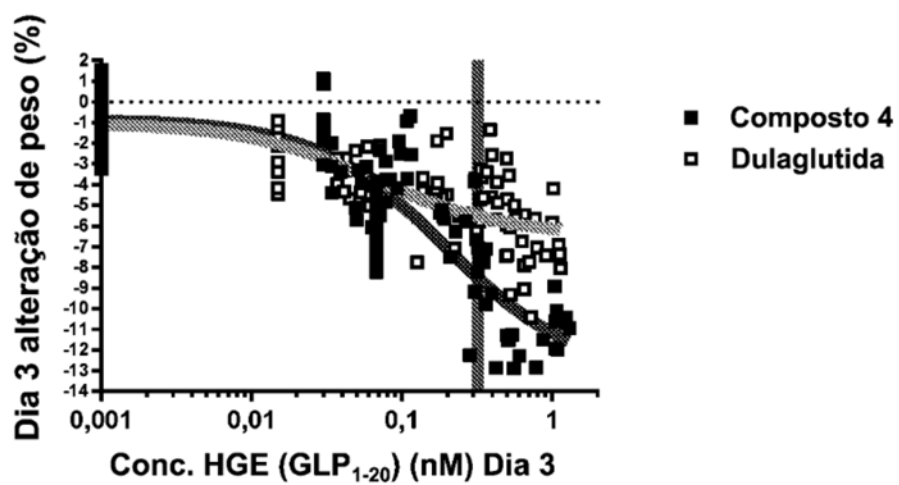


FIG. 8B

Dia 9 (pré-dose) e dia 12 (pré-dose), LBA

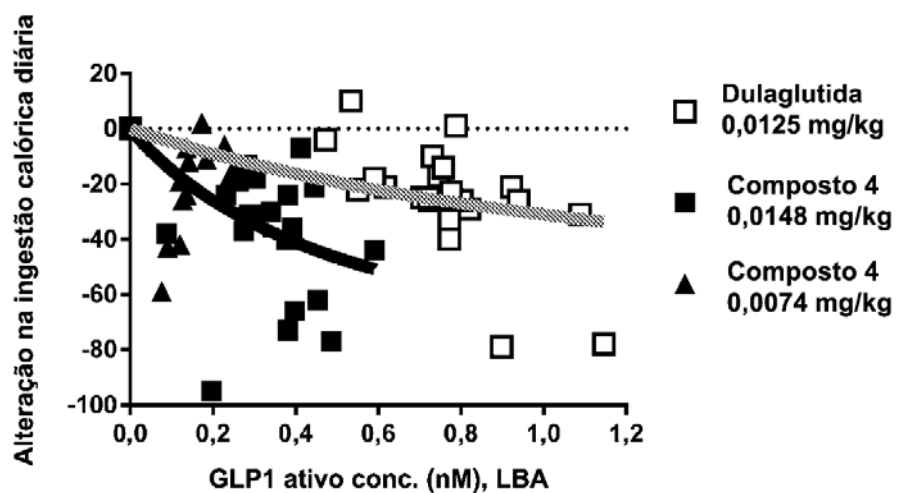


FIG. 9A

Dia 9 (pré-dose) e dia 12 (pré-dose), LC-MS/MS (HGE)

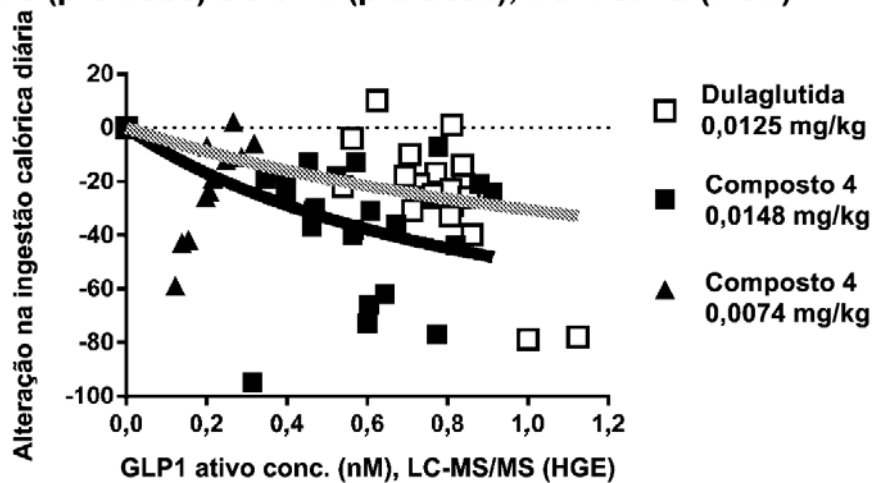


FIG. 9B

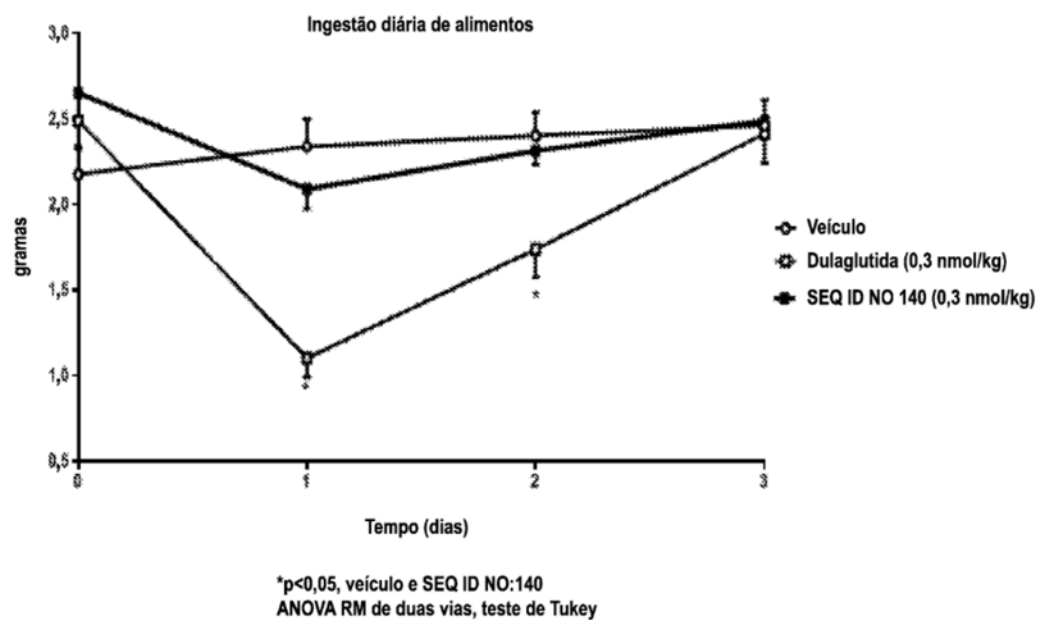


FIG. 10A

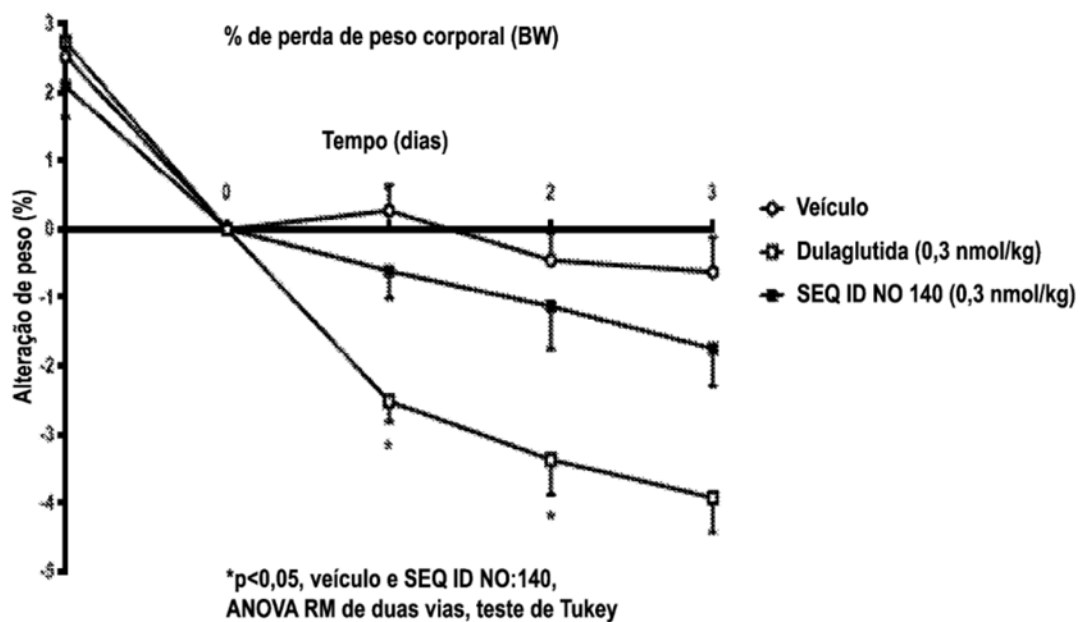


FIG. 10B

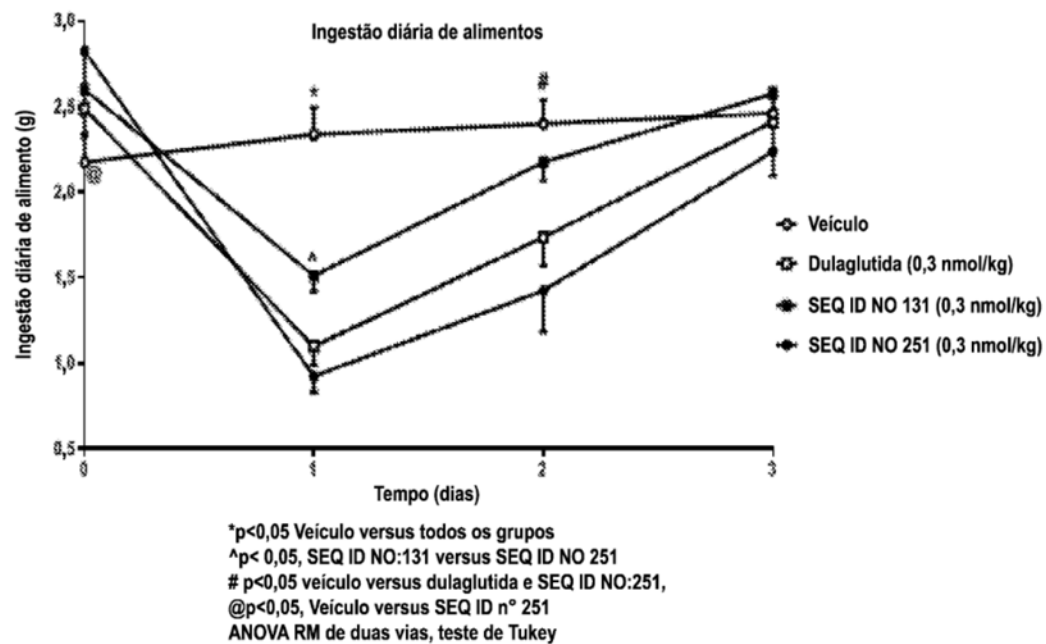


FIG. 11A

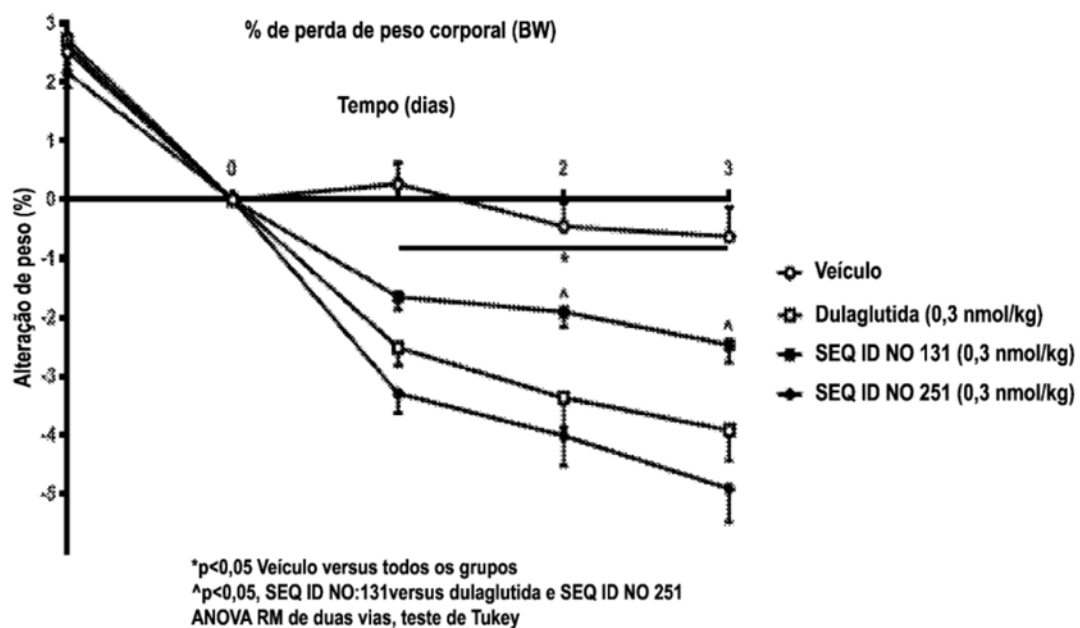


FIG. 11B

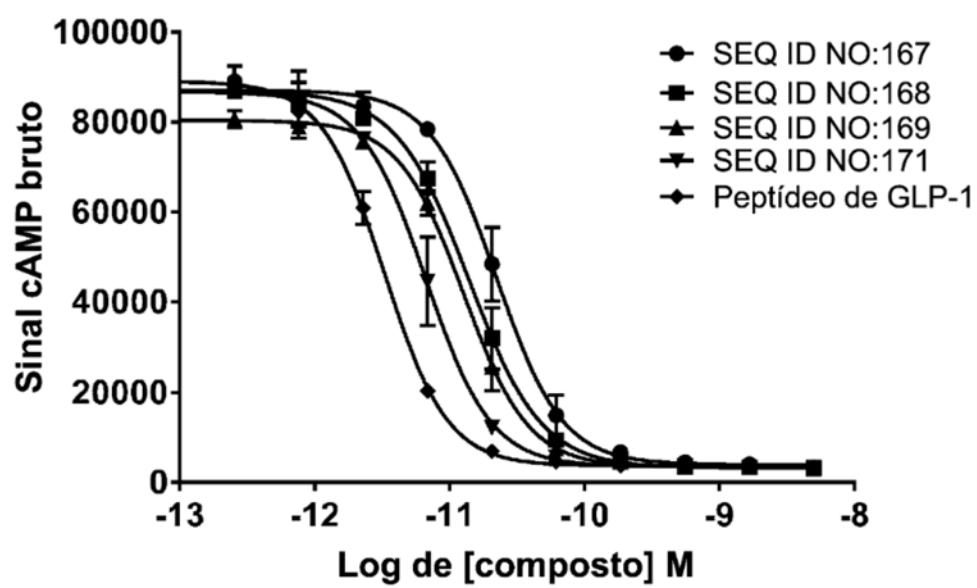


FIG. 12

RESUMO

Patente de Invenção: **"CONJUGADOS DE PEPTÍDEO TIROSINA TIROSINA CÍCLICO ACOPLADO AO PEPTÍDEO DE FUSÃO SEMELHANTE AO PEPTÍDEO GLUCAGON-1 (GLP-1) E USOS DOS MESMOS"**.

A presente invenção refere-se a conjugados compreendendo um peptídeo de fusão de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) acoplado a um peptídeo PYY cíclico. A invenção também se refere a composições farmacêuticas e métodos para uso das mesmas. Os conjugados são úteis para prevenção, tratamento ou alívio de doenças e distúrbios apresentados na presente invenção.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p249458.TXT
- Data de Geração do Código: 21/10/2020
- Hora de Geração do Código: 14:30:34
- Código de Controle:
 - Campo 1: 75AD7B9B285DCF1F
 - Campo 2: AC0A10458A9A0266