



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **113856**

(13) **C2**

(51) МПК

C07K 14/50 (2006.01)

A61K 47/50 (2017.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 02419	(72) Винахідник(и):	Беттхер Брайан Р. (US), Каплан Шарі Л. (US), Деніелс Дуглас С. (US), Хамаматсу Норіо (JP/US), Ліхт Стюарт (US), Уелдон Стівен Крейг (US)
(22) Дата подання заявки:	26.09.2012	(73) Власник(и):	НОВАРТИС АГ, Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	27.03.2017	(74) Представник:	Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/539,280	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2010129503 A1, 11.11.2010 WO 2010129600 A2, 11.11.2010 WO 2012066075 A1, 24.05.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	26.09.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.10.2014, Бюл.№ 19		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.03.2017, Бюл.№ 6		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2012/057384, 26.09.2012		

(54) ЗЛИТИЙ БІЛОК ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ

(57) Реферат:

Винахід належить до злитого білка, що містить варіант білка фактора росту фібробластів 21 (FGF21) та Fc область, фармацевтичної композиції, полінуклеотиду, вектора, клітини-хазяїна, способу одержання злитого білка та його застосування, способу лікування порушення метаболізму у пацієнта з його застосуванням.

UA 113856 C2

[0001] Цей винахід відноситься до нових злитих білків, що містять фактор росту фібробластів 21 (FGF21), відомий як поліпшуючий профілі метаболізму у суб'єктів, яким його вводять.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

[0002] Сімейство фактора росту фібробластів (FGF) характеризується 22 генетично різними, гомологічними лігандами, згрупованими в сім підродин. FGF-21 є найбільш близько спорідненим і формує підродину з FGF-19 і FGF-23. Ця підродина FGF регулює різні фізіологічні процеси, що не є загальнопоширеними для класичних FGF, а саме, гомеостаз енергії і жовчної кислоти, метаболізм глюкози і ліпідів, і гомеостаз фосфатів, так само як вітаміну D. Більше того, на відміну від інших FGF, ця підродина діє в ендокринний спосіб. (Moore, D.D. (2007) *Science* 316, 1436-8)(Beenken et al. (2009) *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 235).

[0003] FGF21 являє собою поліпептид з 209 амінокислот, що містить 28 амінокислотну лідерну послідовність (SEQ ID NO:5). FGF21 людини має приблизно 79 % ідентичність амінокислот з FGF21 миші і приблизно 80 % ідентичність амінокислот з FGF21 пацюка. Фактор росту фібробластів 21 (FGF21) описаний як лікарський засіб проти ішемічного захворювання судин, для загоєння ран і проти захворювань, асоційованих з втратою функцій клітин легенів, бронхів або альвеол. (Nishimura et al. (2000) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1492:203-206; публікація патенту WO01/36640; і публікація патенту WO01/18172) Хоча FGF-21 активує рецептори FGF і молекули нижчележачої передачі сигналу, включаючи FRS2a і ERK, безпосередня взаємодія FGFR і FGF-21 не була детектована. Дослідження ідентифікували β -klotho, на високому рівні експресований у печінці, адипоцитах і підшлунковій залозі, як детермінанту клітинної відповіді на FGF-21 і кофактора, що опосередковує передачу сигналу FGF-21 через FGFR (Kurosu, H. et al. (2007) *J Biol Chem* 282, 26687-95). FGF21 є сильним агоністом комплексів передачі сигналу FGFR1 (IIIc), FGFR2(IIIc) і FGFR3(IIIc) β -klotho.

[0004] Показано, що FGF-21 індукує інсулін-незалежне поглинання глюкози. Показано також, що FGF-21 полегшує гіперглікемію в ряді моделей діабету на пацюках. Крім того, виявлено, що трансгенні миші з надекспресією FGF-21 є стійкими до аномалій метаболізму, що індуковані дієтою, і мають зменшену масу тіла і жирову масу, і посиленням чутливості до інсуліну (Badman, M.K. et al., (2007) *Cell Metab* 5, 426-37). Введення FGF-21 приматам з діабетом, що не відноситься до людини, викликало зменшення рівнів у плазмі натще глюкози, тригліцеридів, інсуліну і глюкагону, і приводило до значних поліпшень профілів ліпопротеїнів, включаючи приблизно 80 % збільшення HDL холестерину (Kharitonov, A. et al. (2007) *Endocrinology* 148, 774-81). Недавні дослідження молекулярних механізмів дії FGF21 ідентифікували FGF21 як важливий ендокринний гормон, що допомагає контролювати адаптацію до стану голоду. (Badman et al., (2009) *Endocrinology* 150, 4931) (Inagaki et al. (2007) *Cell Metabolism* 5, 415). Це надає зв'язок нижче PPAR α , що раніше був відсутній, за допомогою якої печінка здійснює комунікацію з іншим організмом при регуляції біології гомеостазу енергії. (Galman et al. (2008) *Cell Metabolism* 8, 169)(Lundasen et al. (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 437).

[0005] FGF21 регулює гомеостаз адипоцитів за допомогою активації шляху AMPK/SIRT1/PGC1 для інгібування експресії PPAR γ і посилення функції мітохондрій. (Chau et al. (2010) *PNAS* 107, 12553) FGF21 також збільшує поглинання глюкози кістяковою мускулатурою, як виміряно в м'язових трубочках людини, що культивуються, і виділеній тканині миші. Обробка FGF21 інсулоцитів гризунів приводить до поліпшення функціонування і виживаності за допомогою активації шляхів ERK1/2 і Akt. (Wente et al. (2006) *Diabetes* 55, 2470) Обробка FGF21 приводить також до зміненої експресії генів ферментів ліпогенезу і окиснення жирних кислот у печінці пацюків, подібно передачі сигналу через HNF4a і Foxa2.

[0006] Складністю, пов'язаною з використанням FGF-21 безпосередньо як біотерапевтичним засобом, є те, що час його напівжиття є дуже коротким. (Kharitonov, A. et al. (2005) *Journal of Clinical Investigation* 115:1627-1635) У мишей час напівжиття FGF21 людини становить 0,5-1 годин, і у яванських макак час напівжиття становить 2-3 години. FGF21 можна використовувати у формі стерильної фармацевтичного складу для багаторазового використання. Однак визначили, що консерванти, тобто, м-крезол, чинять несприятливий ефект на її стабільність у цих умовах.

[0007] При розробці білка FGF21 для використання як лікарського засобу для лікування цукрового діабету типу 1 і типу 2 та інших станів порушення метаболізму, збільшення часу напівжиття і стабільності є бажаним. Білки FGF21, що мають збільшений час напівжиття і стабільність, можуть дозволяти менш часте дозування для пацієнтів, яким вводять білок. Зрозуміло, що існує необхідність розробки стабільної водного складу білка для терапевтичного білка FGF21.

[0008] Більше того, серйозним випробуванням при розробці FGF21 як білкового лікарського засобу є подолання його фізичної і хімічної нестабільності. Різноманітність і характеристики складу білків визначають специфічну поведінку, таку як згортання, конформаційна стабільність і розгортання/денатурація. До таких характеристик слід звертатися з метою стабілізувати білки в ході розробки умов для фармацевтичних складів з використанням водних розчинів білка (Wang, W., Int. J. of Pharmaceutics, 18, (1999)). Бажаним ефектом стабілізації терапевтичних білків, що цікавлять, наприклад, білків за цим винаходом, є збільшення стійкості до протеолізу і ферментативної деградації, таким чином, поліпшення стабільності білка та зменшення агрегації білка.

КОРОТКИЙ ВИКЛАД СУТІ ВИНАХОДУ

[0009] Винахід відноситься до ідентифікації нових злитих білків, які містять фактор росту фібробластів 21 (FGF21) і мають поліпшені фармацевтичні властивості у порівнянні з FGF21 дикого типу і його варіантами в умовах фармацевтичного складу, наприклад, є більш стабільними, мають здатність поліпшувати параметри метаболізму у суб'єктів, яким їх вводять, є менш чутливими до протеолізу і ферментативної деградації, і з меншою ймовірністю агрегують і утворюють комплекси. Злиті білки за винаходом містять усікання, мутації і варіанти FGF21.

[00010] Описані також способи лікування асоційованих з FGF21 порушень, так само як інших метаболічних, ендокринних і серцево-судинних порушень, таких як ожиріння, цукровий діабет типу 1 і типу 2, панкреатит, дисліпідемія, захворювання неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD), неалкогольний стеатогепатит (NASH), стійкість до інсуліну, гіперінсулінемія, нестерпність глюкози, гіперглікемія, метаболічний синдром, гострий інфаркт міокарда, гіпертензія, серцево-судинне захворювання, атеросклероз, хвороба периферичних артерій, інсульт, серцева недостатність, коронарна хвороба серця, захворювання нирок, ускладнення діабету, невропатія, гастропарез, порушення, асоційовані з серйозними інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну, та інші порушення метаболізму, і зменшення смертності і захворюваності пацієнтів у критичному стані.

[00011] Злиті білки за цим винаходом можна використовувати як такі, що піддаються ін'єкції раз на тиждень, або окремо, або в комбінації з пероральними засобами проти діабету, які можуть поліпшувати глікемічний контроль, масу тіла і профіль ліпідів пацієнтів з цукровим діабетом типу 1 і типу 2. Білки можна використовувати також для лікування ожиріння або інших асоційованих з FGF21 станів.

[00012] Злиті білки за винаходом долають значні труднощі фізичної нестабільності, асоційовані з білковими лікарськими засобами, включаючи, наприклад, введення FGF21 дикого типу, за допомогою надання білків, що є більш стабільними, менш чутливими до протеолізу і ферментативної деградації, і з меншою ймовірністю агрегуючими і утворюючими комплекси, ніж FGF21 дикого типу, в умовах фармацевтичного складу.

[00013] У першому аспекті винахід відноситься до злитих білків з фактором росту фібробластів 21 (FGF21), що містять одну або декілька з послідовностей, перерахованих у таблиці 1, і далі описаних у цьому документі. Послідовності FGF21, перераховані в таблиці 1, можуть являти собою варіанти послідовності FGF21 дикого типу, наприклад, послідовності FGF21 дикого типу з номером посилання в NCBI NP_061986.1, і виявлені в таких виданих патентах, як, наприклад, US 6716626B1, що належить Chiron Corporation.

[00014] Такі білки можуть бути злитими, наприклад, між варіантами послідовностей FGF21, наприклад, послідовностей з таблиці 1, та іншими молекулами (частина, що не відноситься до FGF21), наприклад, константний домен IgG або його фрагмент (наприклад, Fc-область), людський сироватковий альбумін (HSA), або альбумінзв'язувальні поліпептиди. У кращому варіанті здійснення частина молекули, що не відноситься до FGF21, являє собою Fc-область.

[00015] Інші варіанти здійснення відносяться до полінуклеотидів, що кодують злиті білки за винаходом, до вектора, що містить зазначені полінуклеотиди, і до клітини-хазяїна, що несе зазначений вектор.

[00016] У цьому документі представлені способи, що використовуються для одержання злитих білків за винаходом, де такі способи містять у собі модифікацію білка FGF21, за допомогою, наприклад, сайт-специфічного включення амінокислот у положеннях, що цікавлять, у білку FGF21 дикого типу, так само як злиття частини FGF21 молекули з іншими молекулами, наприклад, константним доменом IgG або його фрагментом (наприклад, Fc-областю), людським сироватковим альбуміном (HSA), або альбумінзв'язувальними поліпептидами. Зазначені модифікації і злиття поліпшують біологічні властивості злитих білків за винаходом у порівнянні з варіантами білків дикого типу, так само як, у деяких випадках, служать точками приєднання, наприклад, для міток і засобів для збільшення часу напівжиття білка, і з метою фіксації

зазначених варіантів на поверхні твердої основи. Спорідненні варіанти здійснення винаходу являють собою способи одержання клітин, здатних продукувати зазначені білки за винаходом, і одержання векторів, що містять ДНК, що кодує зазначені варіанти і злиті білки.

[00017] У різних варіантах здійснення злиті білки за винаходом, описані в цьому документі, можуть містити один або кілька фрагментів послідовностей FGF21 дикого типу, включаючи фрагменти, настільки малі, як довжиною 8-12 амінокислотних залишків, і де поліпептид є здатним знижувати рівень глюкози у крові ссавця. У різних варіантах здійснення злиті білки за винаходом, описані в цьому документі, можуть містити один або кілька варіантів послідовностей FGF21 дикого типу, наприклад, з делецією, вставкою, додаванням або заміною однієї або декількох амінокислот у порівнянні з їхніми послідовностями дикого типу.

[00018] У деяких варіантах здійснення злиті білки за винаходом, описані в цьому документі, можна ковалентно зв'язувати з одним або декількома полімерами, такими як поліетиленгліколь (PEG) або полісіалова кислота, або в положенні сайт-специфічних модифікацій амінокислот, внесених відносно FGF21 дикого типу, або в положенні амінокислот, спільних з варіантами цих білків дикого типу. Групу PEG приєднують таким чином, щоб створювати посилення, і/або не створювати перешкод для біологічної функції частин, що становлять злиті білки за винаходом, наприклад, варіантів білка FGF21. В інших варіантах здійснення поліпептиди за винаходом можна зливати з гетерологічною амінокислотою послідовністю, необов'язково, через лінкер, такий як GS, GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:6). Гетерологічна амінокислота послідовність може являти собою константний домен IgG або його фрагмент (наприклад, Fc-область), людський сироватковий альбумін (HSA), або альбумінзв'язувальні поліпептиди. Такі злиті білки, описані в цьому документі, можуть також формувати мультимери.

[00019] У деяких варіантах здійснення гетерологічну амінокислотну послідовність (наприклад, HSA, Fc і т.д.) зливають з аміно-кінцем злитих білків за винаходом. В інших варіантах здійснення гетерологічну амінокислотну послідовність, що зливається (наприклад, HSA, Fc і т.д.), зливають з карбокси-кінцем злитих білків за винаходом.

[00020] В іншому варіанті здійснення описані способи лікування пацієнта, що страждає одним або декількома асоційованими з FGF21 порушеннями, такими як ожиріння, цукровий діабет типу 2, цукровий діабет типу 1, панкреатит, дисліпідемія, захворювання неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD), неалкогольний стеатогепатит (NASH), стійкість до інсуліну, гіперінсулінемія, нестерпність глюкози, гіперглікемія, метаболічний синдром, гострий інфаркт міокарда, гіпертензія, серцево-судинне захворювання, атеросклероз, хвороба периферичних артерій, інсульт, серцева недостатність, коронарна хвороба серця, захворювання нирок, ускладнення діабету, невропатія, гастропарез, порушення, асоційовані з інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну, і інші порушення метаболізму, що включають у себе введення зазначеному пацієнтові, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості одного або декількох білків за винаходом або їх фармацевтичної композиції.

[00021] Винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, що містять злиті білки за винаходом, описані в цьому документі, і фармацевтически прийнятний засіб для складання. Такі фармацевтичні композиції можна використовувати у способі лікування порушення метаболізму, і спосіб містить у собі введення пацієнту, що потребує цього, фармацевтичної композиції за винаходом. Необмежуючі приклади порушень метаболізму, які можна лікувати, містять у собі цукровий діабет типу 1 і типу 2, і ожиріння.

[00022] Ці та інші аспекти винаходу пояснені в наступному докладному описі винаходу.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[00023] Фігури 1A-1D показують, що V188 має поліпшену ефективність у моделі діабету на мишах ob/ob у порівнянні з V76. Для V188 показані чудові результати при введенні 1 міліграм на кілограм (мрк), у порівнянні з 5 міліграм на кілограм, при яких вводили V76. На фігурі 1A показаний рівень глюкози в плазмі після їжі як зчитуваний результат (кола являють собою носій (PBS - фосфатно-сольовий буфер), квадрати являють собою V76 при 5 мрк, і трикутники являють собою V188 при 1 мрк. На фігурі 1B показаний рівень інсуліну в плазмі після їжі як зчитуваний результату (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк, і V188 при 1 мрк). На фігурі 1C показана маса тіла як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк, і V188 при 1 мрк). На фігурі 1D показаний вміст ліпідів у печінці як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк, і V188 при 1 мрк).

[00024] На фігурах 2A-2D показано, що V101 має поліпшену ефективність у моделі діабету на мишах ob/ob у порівнянні з V76. Для V101 показані чудові результати при введенні 1 міліграма на кілограм (мрк), у порівнянні з 5 міліграмами на кілограм, при яких вводили V76. На фігурі 2A показаний рівень глюкози в плазмі після їжі як зчитуваний результат (кола являють собою носій (PBS - фосфатно-сольовий буфер), квадрати являють собою V76 при 5 мрк, і

трикутники являють собою V101 при 1 мрк. На фігурі 2B показаний рівень інсуліну в плазмі крові після їжі як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк, і V101 при 1 мрк). На фігурі 2C показана маса тіла як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк, і V101 при 1 мрк). На фігурі 2D показаний вміст ліпідів у печінці як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк і V101 при 1 мрк).

[00025] На фігурах 3A-3D показано, що V103 має поліпшену ефективність у моделі діабету на мишах ob/ob у порівнянні з V76. Для V103 показані чудові результати при введенні 1 міліграма на кілограм (мрк), у порівнянні з 5 міліграмами на кілограм, при яких вводять V76. На фігурі 3A показаний рівень глюкози в плазмі крові після їжі як зчитуваний результат (кола являють собою носій (PBS - фосфатно-сольовий буфер), квадрати являють собою V76 при 5 мрк, і трикутники являють собою V103 при 1 мрк. На фігурі 3B показаний рівень інсуліну в плазмі крові після їжі як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк, і V103 при 1 мрк). На фігурі 3C показана маса тіла як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк, і V103 при 1 мрк). На фігурі 3D показаний вміст ліпідів у печінці як зчитуваний результат (ліворуч праворуч: носій, V76 при 5 мрк і V103 при 1 мрк).

[00026] На фігурах 4A-4D показані чудові фармакогенетичні і термодинамічні властивості, які мають злиті білки за винаходом у порівнянні зі злитими білками FGF21, описаними в даній галузі. На фігурі 4A показані концентрації в плазмі злитих білків за винаходом в Публікації PCT WO10/129600, описаних як Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G) і Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E), з наступною IV ін'єкцією зазначеного злитого білка мишам. На фігурі 4B показані фармакокінетичні властивості злитих білків за винаходом (V101, V103 і V188) після однократної IV дози у мишей, як аналізували за допомогою анти-Fc-ELISA у порівнянні з даними фармакокінетики, отриманими у мишей для V76 у попередньому дослідженні з використанням ELISA з анти-FGF21 антитілом. На фігурі 4C показана вибіркова перевірка злитих білків за винаходом на Вестерн-блоті з анти-FGF21, що узгоджується з даними анти-Fc-ELISA через 120 годин і 15 діб. Зразки на блоті є наступними: А представляє V101, В представляє V103 і С представляє V188. Контроль являє собою V101 і сироватку. На фігурі 4D показана значно збільшена термодинамічна стабільність злитих білків за винаходом у порівнянні з V76. Зверху вниз, на фігурі представлені V101, V103, і V188, всі з яких мають поліпшені температури плавлення (T_m) у порівнянні з V76 ($T_m < 50^\circ\text{C}$ (не показано)) і FGF21 дикого типу ($T_m = 46,5^\circ\text{C} \pm 0,3$ (не показано)).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[00027] Злиті білки за цим винаходом являють собою модифіковані варіанти повнорозмірного поліпептиду FGF21 дикого типу, як відомо в даній галузі. Послідовність FGF21 дикого типу може служити як контрольна послідовність (SEQ ID NO:1), наприклад, коли необхідні порівняння між послідовністю FGF21 дикого типу і варіантами білка. Послідовність FGF21 дикого типу має контрольну послідовність номер NP_061986.1 в NCBI і може бути виявлена в таких виданих патентах, як, наприклад, US 6716626B1, що належить Chiron Corporation (SEQ ID NO:1).

```

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1          5          10          15
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
          20          25          30
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
          35          40          45
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
          50          55          60
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65          70          75          80
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
          85          90          95
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
          100          105          110
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
          115          120          125
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
          130          135          140
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145          150          155          160
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
          165          170          175
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
          180          185          190
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
          195          200          205
Ser
209

```

[00028] Відповідна послідовність мРНК, що кодує повнорозмірний поліпептид FGF21 (контрольна послідовність номер NM_019113.2 в NCBI) показана нижче (SEQ ID NO:2).

```

1  ctgtcagctg aggatccagc cgaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc
61  acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc
121 ccggagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcagacac
181 tcaggactgt gggtttctgt gctggctggg cttctgctgg gagcctgccg ggcacacccc
241 atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac
301 acagatgatg cccagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg
361 ggcgctgctg accagagccc cgaaggtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt
421 attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg
481 tatggatcgc tccactttga cctgagggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac
541 ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac ggctcccgc tgcacctgcc aggaacaag
601 tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgct tctgccact accaggcctg
661 cccccgcac tccggagcc acccggaatc ctggccccc agcccccg tgtgggctcc
721 tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc cagggccgaa gcccagcta cgcttctga
781 agccagaggg tgtttactat gacatctcct ctttatttat taggttattt atcttattta
841 tttttttatt tttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa
901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

- 5 [00029] Зріла послідовність FGF21 позбавлена лідерної послідовності і може включати також інші модифікації поліпептиду, такі як протеолітичний процесінг аміно-кінця (з лідерною послідовністю або без) і/або карбокси-кінця, відщеплення меншого поліпептиду від більшого попередника, N-зв'язане і/або O-зв'язане глікозилювання, та інші пост-трансляційні модифікації, відомі фахівцям у даній галузі. Репрезентативний приклад зрілої послідовності FGF21 має
- 10 наступну послідовність (SEQ ID NO:3, яка являє собою амінокислоти положень 29-209 повнорозмірної білкової послідовності FGF21 (контрольна послідовність номер NP_061986.1 в NCBI)):

```

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
      5              10              15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
      20              25              30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
      35              40              45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
      50              55              60
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
      65              70              75              80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
      85              90              95
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
      100             105             110
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
      115             120             125
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
      130             135             140
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
      145             150             155             160
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
      165             170             175
Pro Ser Tyr Ala Ser
      180

```

[00030] Відповідна послідовність кДНК, що кодує зрілий поліпептид FGF21 (SEQ ID NO:3), показана нижче (SEQ ID NO:4):

```

1  caccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccagtccg gcagcgggtac
61 ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcaggga ggatgggacg
121 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg
181 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg
240 gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt
301 gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacaggcc tcccgtgca cctgccaggg
360 aacaagtccc cacaccggga cctgcaccc cgaggaccag ctcgcttctt gccactacca
421 ggctgcccc ccgactccc ggagccaccc ggaatcctgg ccccccagcc cccgatgtg
481 ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct
541 tcctga

```

5

[00031] Злиті білки за винаходом можуть містити варіанти білків або мутанти білків дикого типу, перерахованих у цьому документі, наприклад, варіанти FGF21. Як застосовують у цьому документі, терміни "варіант білка", "людський варіант", "варіант поліпептиду або білка", "варіант", "мутант", так само як будь-які подібні терміни або їх конкретні варіанти (наприклад, "варіант білка FGF21", "варіант", "мутант FGF21" і т.д.), визначають послідовності білка або поліпептиду, що містять модифікації, усікання, інші варіанти, що зустрічаються в природі (тобто, дикого типу) еквівалентів білка або поліпептиду або відповідних природних послідовностей. "Варіант FGF21" або "мутант FGF21", наприклад, описаний відносно білка FGF21 дикого типу (тобто такого, що зустрічається в природі), як описано в цьому документі.

10

[00032] Репрезентативні послідовності злитого білка за винаходом перераховано в таблиці 1. Описи зазначених злитих білків містять у собі варіант FGF21 і, де застосовно, лінкер. Зміни або заміни, що використовуються у варіанті FGF21, пронумеровані і описані відносно FGF21 дикого типу. Наприклад, "варіант 101 (V101)" (SEQ ID NO:10) являє собою злитий білок Fc-FGF21 з амінокислотним лінкером і наступними замінами, виконаними відносно FGF21 дикого типу: Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, P174L, S195A, P199G, G202A.

20

FGF21 Варіанти злитих з Fc білків

SEQ ID NO:	Послідовність	Найменування*
7	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGS <u>SSPLLQFGGQ</u> VRQRYLYTDD AQQTEAHLEI REDGTVGGA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGALYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPGNKSPH RDPAPRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSDDP LSMVGPSQGR SPSYAS	Повнорозмірний злитий білок з Fc на N-кінці з 2 ак лінкером (GS) і FGF21 WT
8	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG <u>GSGGGSGGG</u> <u>GSDSSPLLQF</u> GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS	Повнорозмірний злитий білок з Fc на N-кінці з 15 ак лінкером (GGGG×3) між Fc і FGF21 WT
9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD <u>DAQTEAHLE</u> IREDGTVGGA <u>AHQSPESLLE</u> LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL <u>CQKPDGALYG</u> SLHFDPEACS FRELLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGA RFLPLPGLPP <u>ALPEPPGILA</u> PQQPDVGSSD <u>PLAMVGPSQG</u> RSPSYAS	Варіант # 76 = Білок всього з 9 мутаціями відносно FGF21 дикого типу (як в WO01/018172)
10	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGS <u>SSPLLQFGGQ</u> VRQRYLYTDD <u>ACQTEAHLEI</u> REDGTVGGA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGTLYGS LHFDPACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSDDP <u>LAMVGGSQAR</u> SPSYAS	Варіант # 101 = злитий білок з Fc на N-кінці з 2 ак лінкером (GS) між Fc і FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

FGF21 Варіанти злитих з Fc білків

SEQ ID NO:	Послідовність	Найменування*
11	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QKPDGALYGS LHFDPEACSF RELLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPPH RDPASRGPAR FLPLPLGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LAMVGGSOAR SPSYAS	Варіант # 103 = V103 з 15 ак лінкером (GGGGS×3) між Fc і FGF21 = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
12	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGSGG GSGGGGSGGG GSDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQKPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPAASRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	Варіант # 188 = злитий білок з Fc на N-кінці з 2 ак лінкером (GS) = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
13	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKGSGG GSGGGGSGGG GSDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDACQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGTI YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPCNR SPHRDPAASRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	Варіант # 204 = V101 з 15 ак лінкером (GGGGS×3) між і FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

[00033] * - Слід зазначити, що послідовність FGF21 дикого типу в цій таблиці відноситься до контрольної послідовності номер NP_061986.1 в NCBI (SEQ ID NO:1), якщо не зазначено інакше. Усі мутації в групі FGF21 і відповідна нумерація амінокислот зазначених мутацій звертаються до (SEQ ID NO:1), а не до повнорозмірних послідовностей у цій таблиці, які можуть також включати області Fc і лінкера.

[00034] Варіанти або мутанти, що використовуються в злитих білків за винаходом, наприклад, варіанти FGF21 дикого типу, характеризуються щонайменше однією заміщеною, доданою, і/або вилученою амінокислотою відносно білка дикого типу. Крім того, варіанти можуть містити в собі N- і/або C-кінцеві усикання відносно білків дикого типу. Говорячи загалом, варіант має деякі модифіковані властивості, структурні або функціональні, білка дикого типу. Наприклад, варіант може мати посилену або поліпшену фізичну стабільність у концентрованих розчинах (наприклад, меншу агрегацію, опосередковану гідрофобністю), посилену або поліпшену стабільність у плазмі при інкубації з плазмою крові або посилену або поліпшену біоактивність зі збереженням у той же час переважного профілю біоактивності.

[00035] Прийнятні заміни і модифікації амінокислот, що становлять відмінності між частинами злитих білків за винаходом і їх порівняльних білків дикого типу, містять у собі, але без обмеження, одну або кілька замін амінокислот, включаючи заміни на аналоги амінокислот, що не зустрічаються в природі, і усікання. Таким чином, злиті білки за винаходом (наприклад, злиті білки за винаходом) містять у собі, але без обмеження, сайт-специфічні мутанти, усічені поліпептиди, стійкі до протеолізу мутанти, мутанти зі зменшенням агрегації комбіновані мутанти, і злиті білки, як описано в цьому документі.

[00036] Фахівцєві в галузі експресії білків зрозуміло, що послідовності метіонін або метіонін-аргінін можна вводити на N-кінці кожного зі злитих білків за винаходом для експресії в *E. coli*, і вони передбачені в контексті цього винаходу.

[00037] Злиті білки за винаходом можуть мати збільшену сумісність з фармацевтичними консервантами (наприклад, м-крезолом, фенолом, бензиловим спиртом), таким чином, забезпечуючи можливість одержання фармацевтичного складу, що містить консерванти, яка зберігає фізико-хімічні властивості і біологічну активність білка в ході зберігання. Відповідно, варіанти з посиленою фармацевтичною стабільністю у порівнянні з диким типом, мають поліпшену фізичну стабільність у концентрованих розчинах, як у фізіологічних умовах, так і в умовах фармацевтичного складу, що містить консерванти, зі збереженням у той же час біологічної активності. Як необмежуючий приклад, злиті білки за винаходом можуть бути більш стійкими до протеолізу і ферментативної деградації; можуть мати поліпшену стабільність; і можуть мати меншу ймовірність агрегації, у порівнянні з їхніми еквівалентами дикого типу або відповідною природною послідовністю. Як застосовують у цьому документі, ці терміни не є взаємовиключними або обмежувачими, цілком можливо, що даний варіант має одну або декілька модифікованих властивостей білка дикого типу.

[00038] Винахід відноситься також до молекул нуклеїнової кислоти, що кодують злиті білки за винаходом, включаючи, наприклад, амінокислотну послідовність FGF21, яка є щонайменше приблизно на 95 % ідентичній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:3, але в якій конкретні залишки, що надають бажану властивість варіанту білка FGF21, наприклад, поліпшену активність по відношенню до FGF21-рецепторам, стійкість до протеолізу, збільшений час напівжиття або властивості, що зменшують агрегацію, і їхні комбінації, не були додатково модифіковані. Іншими словами, за винятком залишків у мутантній послідовності FGF21, модифікованих для надання стійкості до протеолізу, зменшення агрегації або інших властивостей, приблизно 5 % (альтернативно 4 %, альтернативно 3 %, альтернативно 2 %, альтернативно 1 %) усіх інших амінокислотних залишків у мутантній послідовності FGF21 можуть бути модифікованими. Такі мутанти FGF21 мають щонайменше один вид активності поліпептиду FGF21 дикого типу.

[00039] Винахід відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка є щонайменше приблизно на 85 % ідентичною, і більш краще, щонайменше приблизно на 90-95 % ідентичною нуклеотидній послідовності SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4, але в якій нуклеотиди, що кодують амінокислотні залишки, які надають білку, що кодується, стійкість до протеолізу, зменшення агрегації або інші властивості, не були додатково модифіковані. Іншими словами, за винятком нуклеотидів, що кодують залишки в мутантних послідовностях FGF21, модифікованих для надання стійкості до протеолізу, зменшення агрегації або інших властивостей, приблизно 15 %, і більш краще, приблизно 10-5 % усіх інших нуклеотидів у мутантній послідовності можуть бути модифікованими. Такі молекули нуклеїнової кислоти кодують білки, що мають щонайменше один вид активності їх еквівалентів дикого типу.

[00040] У цьому документі представлені способи, що використовуються для одержання злитих білків за винаходом, де зазначені способи містять у собі сайт-специфічну модифікацію і модифікацію варіантів білків дикого типу, що не є сайт-специфічною (наприклад, білка FGF21 дикого типу, як описано в цьому документі), наприклад, усікання білків дикого типу, і сайт-специфічне включення амінокислот у положеннях, що цікавлять, у білках дикого типу. Зазначені модифікації поліпшують біологічні властивості злитих білків за винаходом у порівнянні з білками дикого типу, так само як, у деяких випадках, служать точками приєднання, наприклад, для міток і засобів для збільшення часу напівжиття білка, і з метою фіксації зазначених варіантів на поверхні твердої основи. Споріднені варіанти здійснення винаходу являють собою способи одержання клітин, здатних продукувати зазначені злиті білки за винаходом, і одержання векторів, що містять ДНК, що кодує зазначені варіанти.

[00041] У конкретних варіантах здійснення такі модифікації, наприклад, сайт-специфічні модифікації, використовують для приєднання кон'югатів, наприклад, груп PEG, до білків, поліпептидів і/або пептидів за винаходом, з метою, наприклад, збільшення часу напівжиття або

іншим способом поліпшення біологічних властивостей зазначених білків, поліпептидів і/або пептидів. Такі способи описані далі в цьому документі.

[00042] В інших варіантах здійснення такі модифікації, наприклад, сайт-специфічні модифікації, використовують для приєднання інших полімерів, малих молекул і послідовностей рекомбінантних білків, що збільшують час напівжиття білка за винаходом. Один з таких варіантів здійснення містить у собі приєднання жирних кислот або специфічних альбумінів зв'язувальних сполук до білків, поліпептидів і/або пептидів. В інших варіантах здійснення модифікації виконують для конкретного типу амінокислот, і їх можна приєднувати в одному або декількох ділянках у білку.

[00043] В інших варіантах здійснення такі модифікації, наприклад, сайт-специфічні модифікації, використовують як засоби для приєднання для одержання мультимерів білка дикого типу і/або варіантів, наприклад, димерів (гомодимерів або гетеродимерів) або тримерів, або тетрамерів. Ці мультимерні молекули білка можуть, крім того, мати такі групи, як PEG, цукри і/або кон'югати PEG-холестерин, приєднані або злиті по аміно-кінцю або карбокси-кінцю з іншими білками, такими як Fc, людський сироватковий альбумін (HSA) і т.д.

[00044] В інших варіантах здійснення зазначені сайт-специфічні модифікації використовують для одержання білків, поліпептидів і/або пептидів, у яких положення сайт-специфічно введеного піролізину або аналога піролізину або амінокислот, що не зустрічаються в природі (пара-ацетил-Phe, пара-азидо-Phe) дозволяє контрольовану орієнтацію і приєднання таких білків, поліпептидів і/або пептидів на поверхні твердої основи або наявності таких приєднаних груп, як PEG, цукри і/або кон'югати PEG-холестерин.

[00045] В інших варіантах здійснення такі сайт-специфічні модифікації використовують для сайт-специфічного зшивання білків, поліпептидів і/або пептидів, таким чином, формуючи гетеро-олігомери, включаючи, але без обмеження, гетеродимери і гетеротримери. В інших варіантах здійснення такі сайт-специфічні модифікації використовують для сайт-специфічного зшивання білків, поліпептидів і/або пептидів, таким чином, формуючи кон'югати білок-білок, кон'югати білок-поліпептид, кон'югати білок-пептид, кон'югати поліпептид-поліпептид, кон'югати поліпептид-пептид або кон'югати пептид-пептид. В інших варіантах здійснення сайт-специфічна модифікація може містити в собі точку розгалуження, щоб дозволяти приєднання більше одного типу молекул в окремій ділянці білка, поліпептиду або пептиду.

[00046] В інших варіантах здійснення модифікації, перераховані в цьому документі, можна здійснювати не сайт-специфічним способом, і вони приводять до кон'югатів білок-білок, кон'югатів білок-поліпептид, кон'югатів білок-пептид, кон'югатів поліпептид-поліпептид, кон'югатів поліпептид-пептид або кон'югатів пептид-пептид за винаходом.

Визначення

[00047] Різні визначення використовують протягом цього документа. Більшість слів мають значення, що приписуються цим словам фахівцем у даній галузі. Слова, конкретно визначені або нижче, чи то або де-небудь ще в цьому документі, мають значення, представлене в контексті цього винаходу в цілому і як правило, як розуміють фахівці в даній галузі.

[00048] Як застосовують у цьому документі, термін "FGF21" відноситься до члена сімейства білків факторів росту фібробластів (FGF). Амінокислотна послідовність FGF21 (номер доступу в GenBank NP_061986.1) позначений як SEQ ID NO:1, полінуклеотидна послідовність, що відповідає йому, позначена як SEQ ID NO:2 (контрольна послідовність номер NM_019113.2 в NCBI). "Варіант FGF21", "мутант FGF21" і подібні терміни описують модифікований варіант білка FGF21, наприклад, зі складовими амінокислотними залишками делетованими, доданими, модифікованими або заміненіми.

[00049] Як застосовують у цьому документі, термін "рецептор FGF21" відноситься до рецептора для FGF21 (Kharitonov, A, et al. (2008) Journal of Cellular Physiology 215:1-7; Kurosu, Het al. (2007) JBC 282:26687-26695; Ogawa, Yet al. (2007) PNAS 104:7432-7437).

[00050] Термін "поліпептид FGF21" відноситься до поліпептиду, що зустрічається в природі, який експресується у людини. Для цілей по цьому опису, термін "поліпептид FGF21" можна використовувати взаємозамінно для позначення будь-якого повнорозмірного поліпептиду FGF21, наприклад, SEQ ID NO:1, який складається з 209 амінокислотних залишків і який кодує нуклеотидна послідовність SEQ ID NO:2; будь-якої зрілої форми поліпептиду, яка складається зі 181 амінокислотного залишку і в якому 28 амінокислотних залишків на аміно-кінці повнорозмірного поліпептиду FGF21 (тобто, що складають сигнальний пептид) вилучені.

[00051] "Варіант 76", як застосовують у цьому документі, являє собою варіант білка FGF21, що характеризується 40 кДа розгалуженим PEG, зв'язаним через Cys154, і вісьмома точковими мутаціями у порівнянні з білком дикого типу зі 177 амінокислот. Синтез варіанта описаний більш докладно в цьому документі, і білкова послідовність представлена в таблиці 1 і SEQ ID NO:9.

[00052] Термін "виділена молекула нуклеїнової кислоти" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти за цим винаходом, яка (1) відділена від щонайменше приблизно 50 відсотків білків, ліпідів, вуглеводів або інших матеріалів, з якими вона зустрічається в природі, коли тотальну нуклеїнову кислоту виділяють з клітин-джерел, (2) не зв'язана з усім або з частиною полінуклеотиду, з яким "виділена молекула нуклеїнової кислоти" зв'язана в природі, (3) функціонально зв'язана з полінуклеотидом, з яким не зв'язана в природі, або (4) не зустрічається в природі у формі частини більшої полінуклеотидної послідовності. Краще, виділена молекула нуклеїнової кислоти за цим винаходом є по суті вільною від будь-яких інших забруднюючих молекул нуклеїнової кислоти або інших забруднень, виявлених у її природному оточенні, які можуть заважати її використанню для одержання поліпептиду або її терапевтичному, діагностичному, профілактичному або дослідницькому використанню.

[00053] Термін "вектор" використовують для позначення будь-якої молекули (наприклад, нуклеїнової кислоти, плазміди або вірусу), що використовується для перенесення кодованої інформації в клітину-хазяїна.

[00054] Термін "вектор експресії" відноситься до вектора, який є придатним для трансформації клітини-хазяїна і містить послідовності нуклеїнової кислоти, що управляють експресією і/або контролюють експресію вставлених гетерологічних послідовностей нуклеїнової кислоти. Експресія містить у собі, але без обмеження, такі процеси, як транскрипція, трансляція і сплайсинг РНК, якщо присутні інтрони.

[00055] Термін "функціонально зв'язаний" застосовують у цьому документі для позначення розташування фланкуючих послідовностей, де описані в такий спосіб фланкуючі послідовності скомпановані або зібрані так, щоб виконувати їхню звичайну функцію. Елементи злитих білків можуть бути функціонально зв'язаними один з одним, так щоб дозволяти злитому білку функціонувати, як якщо він являв собою ендегенний білок, що зустрічається в природі, і/або для об'єднання несумісних елементів зазначених злитих білків у синергічний спосіб.

[00056] На рівні нуклеотидів, фланкуюча послідовність, функціонально зв'язана з кодуючою послідовністю, може бути здатною впливати на реплікацію, транскрипцію і/або трансляцію кодуючої послідовності. Наприклад кодуюча послідовність є функціонально зв'язаною з промотором, коли промотор є здатним управляти транскрипцією кодуючої послідовності. Фланкуюча послідовність не обов'язково є суміжною з кодуючою послідовністю, поки вона функціонує коректно. Таким чином, наприклад, вставка послідовності, що не транслюється, а транскрибується, може бути присутня між промоторною послідовністю і кодуючою послідовністю, і промоторну послідовність ще можна вважати "функціонально зв'язаною" з кодуючою послідовністю.

[00057] Термін "клітина-хазяїн" використовують для позначення клітини, яка є трансформованою або є послідовністю нуклеїнової кислоти, що піддається трансформації, і потім є здатною експресувати обраний ген, що цікавить. Термін містить у собі потомство батьківської клітини, є чи ні потомство ідентичним за морфологією або за генетичним складом вихідному батькові, за умови, що присутній обраний ген.

[00058] Термін "амінокислота", як застосовують у цьому документі, відноситься до природних амінокислот, неприродних амінокислот, аналогів амінокислот і міметиків амінокислот, що функціонують подібним чином з природними амінокислотами, усім у їх D- і L-стереоізомерах, якщо їх структура дозволяє такі стереоізомерні форми. Амінокислоти позначені в цьому документі за їхніми найменуваннями, їхніми загальновідомим трибуквеними символами або однокуквеними символами, рекомендованими Комісією біохімічної номенклатури IUPAC-IUB.

[00059] Термін "природний" при використанні у зв'язку з біологічними матеріалами, такими як молекули нуклеїнової кислоти, поліпептиди, клітини-хазяї і т.п., відноситься до матеріалів, виявлених у природі і не модифікованих людиною. Подібним чином, "неприродний", як застосовують у цьому документі, відноситься до матеріалу, не виявленого в природі або структурно модифікованого або синтезованого людиною. При використанні у зв'язку з нуклеотидами, термін "природний" відноситься до основ аденіну (A), цитозину (C), гуаніну (G), тиміну (T) і урацилу (U). При використанні у зв'язку з амінокислотами, термін "природний" відноситься до 20 загальноприйнятих амінокислот (тобто, аланіну (A), цистеїну (C), аспарагінової кислоти (D), глутамінової кислоти (E), фенілаланіну (F), гліцину (G), гістидину (H), ізолейцину (I), лізину (K), лейцину (L), метіоніну (M), аспарагіну (N), проліну (P), глутаміну (Q), аргініну (R), серину (S), треоніну (T), валіну (V), триптофану (W) і тирозину (Y)), так само як до селеноцистеїну, піролізину (Pyl, або O) і піролін-карбоксилізіну (Pel або Z).

[00060] Піролізин (Pyl) являє собою амінокислоту, виявлену в природі у складі метиламінметилтрансфераз метаногенних археобактерій сімейства Methanosarcina. Піролізин

являє собою аналог лізину, котрансляційно введений у кодони UAG, що перебувають у рамці, у відповідній мРНК, і його розглядають як 22-у природну амінокислоту.

[00061] Як описано щонайменше в патентній публікації PCT WO2010/48582 (заявник IRM, LLC), спроби біосинтезу піролізину (Pyl) в *E. coli* приводили до утворення "деметильованого піролізину", позначеного в цьому документі як піролін-карбоксилізін, або Pcl. "Pcl", як застосовують у цьому документі, відноситься до Pcl-A або Pcl-B.

[00062] Терміни "не-природна амінокислота" і "неприродна амінокислота", як застосовують у цьому документі, взаємозамінно призначені для представлення структур амінокислот, які неможливо одержати біосинтетично в якому-небудь організмі з використанням немодифікованих або модифікованих генів з якого-небудь організму, однакових або різних. Терміни відносяться до амінокислотного залишку, що не присутній в природній (дикого типу) білкової послідовності FGF21 або послідовності за цим винаходом. Вони містять у собі, але без обмеження, модифіковані амінокислоти і/або аналоги амінокислот, що не є однією з 20 природних амінокислот, селеноцистеїном, піролізином (Pyl) або піролін-карбоксилізином (Pcl, наприклад, як описано в патентній публікації PCT WO2010/48582). Такі неприродні амінокислотні залишки можна вводити за допомогою заміни природних амінокислот і/або за допомогою вставки неприродних амінокислот у природну (дикого типу) білкову послідовність FGF21 або послідовності за винаходом. Можна включати також неприродний амінокислотний залишок, такий що бажану функціональність надають молекулі FGF21, наприклад, здатність зв'язувати функціональну групу (наприклад, PEG). При використанні у зв'язку з амінокислотами, символ "U" повинен означати "не-природну амінокислоту" і "неприродну амінокислоту", як застосовують у цьому документі.

[00063] Крім того, зрозуміло, що такі "неприродні амінокислоти" потребують модифікованої тРНК і модифікованої тРНК-синтетази (RS) для включення в білок. Ці "відібрані" ортогональні пари тРНК/RS одержують за допомогою способу відбору, як розроблено Schultz et al. або за допомогою випадкової або спрямованої мутації. Наприклад, піролін-карбоксилізін є "природною амінокислотою", оскільки її одержують біосинтетично за допомогою генів, перенесених від одного організму в клітини-хазяї і оскільки її включають у білки з використанням природних генів тРНК і тРНК-синтетази, у той час як п-амінофенілаланін (див. Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9) є "неприродною амінокислотою", оскільки, хоча й утворюється біосинтетично, її включають у білки за допомогою "відібраної" ортогональної пари тРНК/тРНК-синтетаза.

[00064] Модифіковані амінокислоти, що кодуються, містять у собі, але без обмеження, гідроксипролін, γ -карбоксиглутамат, О-фосфосерин, азетидинкарбонову кислоту, 2-аміноадипінову кислоту, 3-аміноадипінову кислоту, бета-аланін, амінопропіонову кислоту, 2-аміноноліїну кислоту, 4-аміноноліїну кислоту, 6-амінокапронову кислоту, 2-аміногептанову кислоту, 2-аміноізоноліїну кислоту, 3-аміноізоноліїну кислоту, 2-амінопімелінову кислоту, третинний-бутилгліцин, 2,4-діаміноізоноліїну кислоту, десмозин, 2,2'-діамінопімелінову кислоту, 2,3-діамінопропіонову кислоту, N-етилгліцин, N-метилгліцин, N-етиласпарагін, гомопрролін, гідроксилізін, алло-гідроксилізін, 3-гідроксипролін, 4-гідроксипролін, ізодесмозин, ало-ізолейцин, N-метилаланін, N-метилгліцин, N-метилізолейцин, N-метилпентилгліцин, N-метилвалін, нафталанін, норвалін, норлейцин, орнітин, пентилгліцин, піпеколінову кислоту і тіопролін. Термін "амінокислота" містить у собі природні амінокислоти, які є метаболітами в конкретних організмах, але не є кодованими генетичним кодом для включення в білки. Такі амінокислоти включають у себе, але без обмеження, орнітин, D-орнітин, і D-аргінін.

[00065] Термін "аналог амінокислоти", як застосовують у цьому документі, відноситься до сполук, що мають таку ж основну хімічну структуру, як природна амінокислота, тільки як приклад, α -атом вуглецю, пов'язаний з воднем, карбоксильна група, аміногрупа і R-група. Аналоги амінокислот містять у собі природні і неприродні амінокислоти, що є хімічно блокованими, оборотно або необоротно або їх С-кінцева карбокси-група, їх N-кінцева аміногрупа і/або функціональні групи їх бічних ланцюгів є хімічно модифікованими. Такі аналоги містять у собі, але без обмеження, метіонінсульфоксид, метіонінсульфон, S-(карбоксиметил)-цистеїн, S-(карбоксиметил)-цистеїнсульфоксид, S-(карбоксиметил)-цистеїнсульфон, (бета-метиловий складний ефір)- аспарагінової кислоти, N-етилгліцин, аланінкарбоксамід, гомосерин, норлейцин і метіонінметилсульфоній.

[00066] Термін "міметики амінокислот", як застосовують у цьому документі, відноситься до хімічних сполук, що мають структуру, відмінну від загальної структури амінокислоти, але які функціонують у подібний спосіб з природною амінокислотою.

[00067] Термін "біологічно активний варіант" відноситься до будь-якого поліпептиду, що використовується в злитих білках за винаходом, наприклад, як складова білка злитих білків, що має активність еквівалентного йому білка або поліпептиду дикого типу (наприклад, природного), наприклад, здатністю модулювати рівні в крові глюкози, HbA1c, інсуліну, тригліцериду або холестерину; підсилювати функціонування підшлункової залози; зменшувати рівні ліпідів у печінці; зменшувати масу тіла; і поліпшувати стійкість до глюкози, споживання енергії або чутливість до інсуліну, незалежно від типу або кількості модифікацій, введених у варіант поліпептиду. Варіанти поліпептиду, що мають дещо знижений рівень активності у порівнянні з їхніми варіантами дикого типу, проте розглядають як біологічно активні варіанти поліпептиду. Необмежуваним репрезентативним прикладом біологічно активного поліпептиду за винаходом є варіант FGF21, згодом модифікований і який має подібні або поліпшені біологічні властивості у порівнянні з FGF21 дикого типу.

[00068] Кожний з термінів "ефективна кількість" і "терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості злитого білка за винаходом, що використовується для підтримки рівня одного або декількох видів біологічної активності еквівалентів поліпептиду або білка дикого типу, що піддається спостереженню, наприклад, здатності зменшувати рівні в крові глюкози, інсуліну, тригліцериду або холестерину; зменшувати рівні тригліцеридів або ліпідів у печінці; зменшувати масу тіла; або поліпшувати стійкість до глюкози, споживання енергії або чутливість до інсуліну. Наприклад, "терапевтично ефективна кількість", введена пацієнту, що має, страждає або, як доведено, що страждає асоційованому з FGF21 порушеннями (такими як цукровий діабет типу 1 або типу 2, ожиріння або метаболічний синдром), у такій кількості, яка індукує, полегшує або іншим способом викликає поліпшення патологічних симптомів, прогресування захворювання, фізіологічних станів або стійкості до смертності через вищезгадані порушення. Для цілей за цим винаходом, "суб'єкт" або "пацієнт" краще являє собою людину, але може також являти собою тварину, більш конкретно, свійських тварин (наприклад, собак, кішок і т.п.), сільськогосподарських тварин (наприклад, корів, овець, свиней, коней і т.п.) і лабораторних тварин (наприклад, пацюків, мишей, морських свинок і т.п.).

[00069] Термін "фармацевтично прийнятний носій" або "фізіологічно прийнятний носій", як застосовують у цьому документі, відноситься до одного або декількох матеріалів для одержання складу, придатного для здійснення або поліпшення доставки злитого білка за винаходом.

[00070] Термін "антиген" відноситься до молекули або частини молекули, здатної бути зв'язаною антитілом, і крім того, здатної до використання у тварини для одержання антитіл, здатних зв'язуватися з епітопом цього антигену. Антиген може мати один або декілька епітопів.

[00071] Термін "природний Fc" відноситься до молекули або послідовності, що містить послідовність фрагмента, що не зв'язує антиген, які отримані розщепленням повнорозмірного антитіла або отримані іншими способами, у мономерній або мультимерній формі, і може містити шарнірну область. Вихідне імуноглобулінове джерело природного Fc краще людського походження і може відноситься до будь-якого імуноглобуліну, хоча IgG1 і IgG2 є кращими. Природні Fc складаються з мономерних поліпептидів, які можуть бути зв'язані в димерні або мультимерні форми за допомогою ковалентної (тобто, дисульфідних зв'язків) і нековалентної асоціації. Кількість міжмолекулярних дисульфідних зв'язків між мономерними субодиницями природних молекул Fc лежить у діапазоні від 1 до 4 залежно від класу (наприклад, IgG, IgA і IgE) або підкласу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 і IgA2). Одним із прикладів природного Fc є димер з дисульфідними зв'язками, що утворюються в результаті розщеплення папаїном IgG (див. Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). Термін "природний Fc", як застосовують у цьому документі, є загальним для мономерних, димерних і мультимерних форм.

[00072] Термін "варіант Fc" відноситься до молекули або послідовності, яка є модифікованою у порівнянні з природним Fc, але усе ще містить ділянку зв'язування рецептора порятунку, FcRn (неонатальний Fc рецептор). У міжнародних публікаціях No. WO 97/34631 і WO 96/32478 описані ілюстративні варіанти Fc, так само як взаємодія з рецептором порятунку, і в такий спосіб вони наведені як посилання. Таким чином, термін "варіант Fc" може містити в собі молекулу або послідовність, гуманізовану з природного Fc, що не відноситься до людини. Більше того, природний Fc містить області, які можна видаляти, оскільки вони забезпечують структурні властивості або біологічну активність, які не є необхідними для злитих молекул злитих білків за винаходом. Таким чином, термін "варіант Fc" містить у собі молекулу або послідовність, у якій відсутні одна або кілька ділянок або залишків природного Fc, або в якій одна або кілька ділянок або залишків Fc модифіковано, що впливає на: (1) формування дисульфідного зв'язку, (2) несумісність з обраною клітиною-хазяїном, (3) гетерогенність N-кінця при експресії в обраній клітині-хазяїні, (4) глікозилювання, (5) взаємодія з комплементом, (6)

зв'язування з Fc рецептором, відмінним від рецептора порятунку або (7) антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) або залучено в них. Варіанти Fc більш докладно описані в цьому документі нижче.

[00073] Термін "домен Fc" включає у себе природний Fc і варіанти і послідовності Fc, як визначено вище. Як для варіантів Fc, так і для природних молекул Fc, термін "домен Fc" містить у собі молекули в мономерній або мультимерній формі, відщеплені від повнорозмірного антитіла або отримані іншими способами. У деяких варіантах здійснення цього винаходу домен Fc може бути злитим з FGF21 або з мутантом FGF21 (включаючи вкорочену форму FGF21 або мутант FGF21) за допомогою, наприклад, ковалентного зв'язку між доменом Fc і послідовністю FGF21. Такі злиті білки можуть формувати мультимери за допомогою асоціації доменів Fc, і як ці злиті білки, так і їх мультимери, являють собою аспект цього винаходу.

[00074] Термін "модифікований Fc-фрагмент", як застосовують у цьому документі, повинен позначати Fc-фрагмент антитіла, що містить модифіковану послідовність. Fc-фрагмент являє собою частину антитіла, що містить CH2, CH3 і частину шарнірної області. Модифікований Fc-фрагмент може походити, наприклад, з IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. FcLALA являє собою модифікований Fc-фрагмент з мутацією LALA (L234A, L235A), який запускає ADCC з більш низькою ефективністю і зв'язує та активує комплемент людини слабо. Hessel et al. 2007 Nature 449:101-104. Додаткові модифікації Fc-фрагмента описані, наприклад, у Патенті США No. 7217798.

[00075] Термін "гетерологічний" означає, що ці домени не виявляють у природі асоційованими з константними областями антитіла. Зокрема, такі гетерологічні зв'язувальні домени не мають типової структури варіабельного домена антитіла, що складається з 4 каркасних областей, FR1, FR2, FR3 і FR4, і 3 областей (CDR), що визначають комплементарність, між ними. Кожне плече злитого антитіла в такий спосіб містить перший однокланцюговий поліпептид, що містить зв'язувальний домен, ковалентно зв'язаний з N-кінцевою частиною константної області C_H1 важкого ланцюга антитіла, і другий однокланцюговий поліпептид, що містить другий зв'язувальний домен, ковалентно зв'язаний з N-кінцевою частиною константної C_L легкого ланцюга антитіла. Ковалентний зв'язок може бути прямим, наприклад, за допомогою пептидного зв'язку, або опосередкованою, за допомогою лінкера, наприклад, пептидного лінкера. Два гетеродимера злитого антитіла є ковалентно зв'язаними, наприклад, за допомогою щонайменше одного дисульфідного містка в їхній шарнірній області, подібно структурі антитіла. Приклади молекул зі структурою злитого антитіла описані в даній галузі, зокрема, злиті антитіла, що містять область гетеродимерного рецептора, що зв'язує ліганд (див., наприклад, міжнародні публікації патентів WO01/46261 і WO11/076781).

[00076] Термін "поліетиленгліколь" або "PEG" відноситься до сполуки поліалкіленгліколя або її похідному, у присутності або під час відсутності зв'язувальних засобів або дериватизації за допомогою зв'язувальних або активуючих груп.

[00077] Термін "асоційовані з FGF21 порушення", і терміни, що у подібний спосіб застосовуються у цьому документі, містять у собі ожиріння, цукровий діабет типу 1 і типу 2, панкреатит, дисліпідемію, захворювання неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD), неалкогольний стеатогепатит (NASH), стійкість до інсуліну, гіперінсулінемію, нестерпність глюкози, гіперглікемію, метаболічний синдром, гострий інфаркт міокарда, гіпертензію, серцево-судинне захворювання, атеросклероз, хворобу периферичних артерій, інсульт, серцеву недостатність, коронарну хворобу серця, захворювання нирок, ускладнення діабету, невропатію, гастропарез, порушення, асоційовані з серйозними інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну та інші порушення метаболізму.

[00078] Термін "порушення, асоційовані з серйозними інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну", і терміни, що у подібний спосіб застосовуються в цьому документі, описують стани у суб'єктів, уражених мутаціями в рецепторі інсуліну (або можливо, у білках безпосередньо нижче за рангом після нього), які викликають серйозну стійкість до інсуліну, але які часто (хоча не завжди) спостерігають під час відсутності ожиріння, загальнопоширеного при цукровому діабеті типу 2. У багатьох випадках, у суб'єктів, уражених цими станами, проявляються комбіновані симптоми цукрового діабету типу 1 і цукрового діабету типу 2. Суб'єкти, уражені таким чином, потрапляють у кілька категорій, загалом по збільшенню ваги, включаючи: стійкість до інсуліну типу А, стійкість до інсуліну типу С (відому також як синдром HAIR-AN), синдром Рабсона-Менденхолла і, нарешті, синдром Донахью або Лепречаунізм. Ці порушення асоційовані з дуже високими рівнями ендогенного інсуліну, і дуже часто, гіперглікемією. У суб'єктів, уражених таким чином, присутні також різні клінічні ознаки, асоційовані з "токсичністю інсуліну", включаючи гіперандрогенізм, синдром полікістоza яєчників (PCOS), гірсутизм і акантокератодермію (надлишковий ріст і пігментацію) у складках шкіри.

[00079] "Цукровий діабет типу 2" являє собою стан, що характеризується надлишковою продукцією глюкози незважаючи на доступність інсуліну, і рівні глюкози в кровотоці залишаються надлишково високими в результаті неадекватного виведення глюкози.

5 [00080] "Цукровий діабет типу 1" являє собою стан, що характеризується високими рівнями глюкози, що викликані повною відсутністю інсуліну. Це відбувається, коли імунна система організму атакує бета-клітини, що продукують інсулін, в підшлунковій залозі і руйнує їх. Потім підшлункова залоза продукує мало інсуліну або не продукує інсулін.

10 [00081] "Нестерпність глюкози" або порушена стійкість до глюкози (IGT) являє собою преддіабетичний стан дисглікемії, асоційований зі збільшеним ризиком Серцево-судинної патології. Преддіабетичний стан запобігає у суб'єкта ефективне просування глюкози в клітини і її використання як ефективного джерела палива, приводячи до збільшених рівнів глюкози в крові і деякого ступеня стійкості до інсуліну.

[00082] "Гіперглікемію" визначають як надлишок цукру (глюкози) у крові.

15 [00083] "Гіпоглікемія", що також називається низьким рівнем цукру в крові, виникає, коли рівень глюкози в крові людини падає занадто низько для забезпечення достатньої енергії для активності організму людини.

[00084] "Гіперінсулінемію" визначають як більш високий, ніж нормальний, рівень інсуліну в крові.

20 [00085] "Стійкість до інсуліну" визначають як стан, при якому нормальна кількість інсуліну викликає аномальну біологічну відповідь.

[00086] "Ожиріння", відносно суб'єкта-людини, можна визначати, як масу тіла, що більш ніж на 20 відсотків перевищує ідеальну масу тіла для даної популяції (R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p. 904-916).

25 [00087] "Діабетичні ускладнення" являють собою проблеми, викликані високими рівнями глюкози в крові, в інших функціях організму, таких як нирки, нерви (невропатії), ноги (виразки стопи і поганий кровообіг) і ока (наприклад, ретинопатії). Діабет також збільшує ризик захворювання серця і порушень кісток і суглобів. Інші тривалі ускладнення діабету містять у собі проблеми шкіри, проблеми травлення, сексуальну дисфункцію і проблеми із зубами та яснами.

30 [00088] "Метаболічний синдром" можна визначати як кластер щонайменше з трьох наступних ознак: абдомінальне ожиріння - у більшості чоловіків, талія 40 дюймів (1,016 м) або більше; високий рівень цукру в крові - щонайменше 110 міліграм на децилітр (мг/дл) після голодування; високий рівень тригліцеридів - щонайменше 150 мг/дл у кровотоці; низький рівень HDL - менше 40 мг/дл; і кров'яний тиск 130/85 мм рт.ст. або вище.

[00089] "Панкреатит" являє собою запалення підшлункової залози.

35 [00090] "Дисліпідемія" являє собою порушення метаболізму ліпопротеїнів, включаючи надпродукцію або недостатність ліпопротеїнів. Дисліпідемії можуть проявлятися підвищенням загального рівня холестерину, концентрацій ліпопротеїнів низької щільності (LDL) холестерину і тригліцеридів і зниженням концентрації ліпопротеїну високої щільності (HDL) холестерину в крові.

40 [00091] "Захворювання неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD)" являє собою захворювання печінки, не асоційоване з вживанням алкоголю, що характеризується жировим переродженням гепатоцитів.

45 [00092] "Неалкогольний стеатогепатит (NASH)" являє собою захворювання печінки, не асоційоване з вживанням алкоголю, що характеризується жировим переродженням гепатоцитів, що супроводжуються інтралобулярним запаленням і фіброзом.

[00093] "Гіпертензія" або високий кров'яний тиск, який являє собою тимчасове або постійне підвищення системного артеріального кров'яного тиску до рівня, що з імовірністю індукціює серцево-судинне ушкодження або інші несприятливі наслідки. Гіпертензію умовно визначають як систолічний кров'яний тиск вище 140 мм рт.ст. або диастолічний кров'яний тиск вище 90 мм рт.ст.

50 [00094] "Серцево-судинні захворювання" являють собою захворювання, що відносяться до серця або кровоносних судин.

55 [00095] "Гострий інфаркт міокарда" виникає, коли присутнє переривання кровопостачання частини серця. Ішемія і нестача кисню, що виникли в результаті, якщо залишені без лікування протягом достатнього періоду часу, можуть викликати ушкодження або загибель (інфаркт) тканини серцевого м'язу (міокарда).

60 [00096] "Захворювання периферичних артерій" виникає, коли бляшка формується в артеріях, що переносять кров до голови, органів і кінцівок. З часом, бляшки можуть отверджуватися і звужувати артерії, які обмежують приплив багатої киснем крові до органів і інших частин організму.

[00097] "Атеросклероз" являє собою судинне захворювання, що характеризується нерівномірно розподіленими відкладаннями ліпідів в інтимі великих і середніх артерій, що викликають звуження просвітів артерій і приводять, в кінцевому підсумку, до фіброзу і кальцифікації. Бляшки звичайно є фокальними і прогресують повільно та періодично.

5 Обмеження кровотоку відповідальне за більшість клінічних проявів, що міняються з розподілом і тяжкістю осередків.

[00098] "Інсульт" являє собою будь-яку гостру клінічну подію, що відноситься до порушення мозкового кровообігу, який триває довше 24 годин. Інсульт містить у собі необоротне ушкодження головного мозку, де тип і тяжкість симптомів залежить від локалізації і об'єму

10 тканини головного мозку, кровообіг якої порушено.

[00099] "Серцева недостатність", що також називається застійною серцевою недостатністю, являє собою стан, при якому серце не може далі перекачувати достатньо крові до іншої частини організму.

[000100] "Коронарна хвороба серця", що також називається хворобою коронарних артерій,

15 являє собою звуження невеликих кровоносних судин, що поставляють кров і кисень до серця.

[000101] "Захворювання нирок" або нефропатія являє собою будь-яке захворювання нирок. Діабетична нефропатія є основною причиною захворюваності і смертності у людей з цукровим діабетом типу 1 або типу 2.

[000102] "Невропатії" являють собою будь-які захворювання, що залучають черепні нерви або периферичну або автономну нервову систему.

20 [000103] "Гастропарез" являє собою слабкість перистальтики шлунку, що призводить до затримки спорожнювання кишечника.

[000104] Пацієнти в критичному стані, включені в цей винахід, як правило, випробовують нестабільний гіперметаболічний стан. Цей нестабільний метаболічний стан обумовлений

25 змінами в метаболізмі субстрату, які можуть призводити до відносної недостатності деяких живильних речовин. Як правило, присутнє збільшене окиснення як жиру, так і м'язів.

[000105] Більше того, пацієнти в критичному стані краще являють собою пацієнтів, що випробовують синдром системної запальної відповіді або дихальної недостатності. Зниження захворюваності позначає зниження ймовірності того, що у пацієнта в критичному стані можуть

розвитися додаткові захворювання, стани або симптоми, або зниження тяжкості додаткових захворювань, станів або симптомів. Наприклад, зниження захворюваності може відповідати

зниженню частоти виникнення бактеріємії або сепсису або ускладнень, асоційованих з поліорганною недостатністю.

[000106] Як застосовують у цьому документі, форми однини "a", "an" і "the" включають у себе посилання на множину, якщо контекст явно не вимагає іншого. Таким чином, наприклад,

35 посилання на "антитіло" містить у собі суміш двох або більше таких антитіл.

[000107] Як застосовують у цьому документі, термін "приблизно" відноситься до $\pm 20\%$, ще краще, $\pm 10\%$, або ще краще, $\pm 5\%$ від значення.

[000108] Терміни "поліпептид" і "білок" використовують взаємозамінно, і вони відносяться до полімерної форми амінокислот будь-якої довжини, яка може містити в собі амінокислоти, що

40 кодуються і не кодуються, природні і неприродні амінокислоти, хімічно або біохімічно модифіковані або дериватизовані амінокислоти, і поліпептиди, що мають модифіковані пептидні кістяки. Термін містить у собі злиті білки, включаючи, але без обмеження, злиті білки з

гетерологічною амінокислотою послідовністю, злиті білки з гетерологічними і гомологічними

45 лідерними послідовностями, з N-кінцевими залишками метіоніну або без них; білки з імунологічною міткою; і т.п.

[000109] Терміни "індивідуум", "суб'єкт", "хазяїн" і "пацієнт" використовують взаємозамінно, і вони відносяться до будь-якого суб'єкта, для якого є бажаними діагностика, лікування або

терапія, зокрема, до людей. Інші суб'єкти можуть містити в собі велику рогату худобу, собак,

50 кішок, морських свинок, кроликів, пацюків, мишей, коней і т.п. У деяких кращих варіантах здійснення суб'єкт являє собою людину.

[000110] Як застосовують у цьому документі, термін "зразок" відноситься до біологічного матеріалу від пацієнта. Зразок, що аналізується за цим винаходом, не є обмеженим яким-

небудь конкретним типом. Зразки містять у собі, як необмежуючі приклади, окремі клітини,

55 множинні клітини, тканини, пухлини, біологічні рідини, біологічні молекули, або супернатанти або екстракти кожного з вищевказаного. Приклади включають у себе зразки тканини, вилученої для біопсії, тканини, вилученої в ході резекції, крові, сечовини, лімфатичної тканини, лімфатичної рідини, спинномозкової рідини, слизу і випорожнення. Використовуваний зразок може мінятися на основі формату аналізу, способу детекції і природи пухлин, тканин, клітин або

екстрактів, що підлягають аналізу. Способи одержання зразків добре відомі в даній галузі і можуть бути легко адаптовані для одержання зразка, сумісного з використанням способом.

[000111] Як застосовують у цьому документі, термін "біологічна молекула" включає в себе, але без обмеження, поліпептиди, нуклеїнові кислоти і сахариди.

5 [000112] Як застосовують у цьому документі, термін "модуляція" відноситься до зміни якості або кількості гена, білка або будь-якої молекули, яка перебуває всередині, зовні або на поверхні клітин. Зміна може являти собою збільшення або зменшення експресії або рівня молекули. Термін "модулює" включає в себе також зміну якості або кількості біологічної функції/активності, включаючи, без обмеження, здатність знижувати рівні в крові глюкози, інсуліну, тригліцеридів або холестерину; знижувати рівні ліпідів у печінці або тригліцеридів у печінці; знижувати масу тіла; і поліпшувати стійкість до глюкози, споживання енергії або чутливість до інсуліну.

10 [000113] Як застосовують у цьому документі, термін "модулятор" відноситься до композиції, що модулює одну або кілька фізіологічних або біохімічних подій, асоційованих з FGF21-асоційованим порушенням, таким як цукровий діабет типу 1 або типу 2 або метаболічний стан, подібний ожирінню. Зазначені події включають у себе, але без обмеження, здатність знижувати рівні в крові глюкози, інсуліну, тригліцеридів або холестерину; знижувати рівні ліпідів у печінці або тригліцеридів у печінці; знижувати масу тіла; і поліпшувати стійкість до глюкози, споживання енергії або чутливість до інсуліну.

15 [000114] "Продукт гена" являє собою біополімерний продукт, що експресується або продукується геном. Продукт гена може являти собою, наприклад, несплайсовану РНК, мРНК, варіант сплайсинга мРНК, поліпептид, пост-трансляційно модифікований поліпептид, варіант сплайсинга поліпептиду і т.д. Цей термін включає в себе також біополімерні продукти, отримані з використанням продукту гена - РНК як матриці (тобто кДНК з РНК). Продукт гена можна одержувати ферментативно, рекомбінантно, хімічно або всередині клітини, для якої ген є природним. У деяких варіантах здійснення, якщо продукт гена є білковим, він має біологічну активність. У деяких варіантах здійснення, якщо продукт гена являє собою нуклеїнову кислоту, її можна транслювати в білковий продукт гена, що має біологічну активність.

20 [000115] "Модуляція активності FGF21", як застосовують у цьому документі, відноситься до збільшення або зменшення активності FGF21, яке може бути результатом, наприклад, взаємодії засобу з полінуклеотидом або поліпептидом FGF21, інгібування транскрипції і/або трансляції FGF21 (наприклад, за допомогою антисмислової або міРНК з геном FGF21 або транскриптом FGF21, за допомогою модуляції факторів транскрипції, що полегшують експресію FGF21), і т.п. Наприклад, модуляція біологічної активності відноситься до збільшення або зменшення біологічної активності. Активність FGF21 можна оцінювати способами, що включають у себе, без обмеження, аналіз рівнів глюкози, інсуліну, тригліцеридів або холестерину в крові суб'єкта, аналіз рівнів поліпептиду FGF21, або аналіз рівнів транскрипції FGF21. Порівняння активності FGF21 можна здійснювати також, наприклад, за допомогою вимірювання рівнів біомаркера, що стоїть нижче FGF21, і вимірювання посилення передачі сигналів FGF21. Активність FGF21 можна оцінювати також за допомогою вимірювання: передачі сигналу в клітині; активності кінази; поглинання глюкози адипоцитами; коливань рівнів у крові інсуліну, тригліцеридів або холестерину; змін рівнів ліпідів у печінці або тригліцеридів у печінці; взаємодій між FGF21 і рецептором FGF21; або фосфорилування рецептора FGF21. У деяких варіантах здійснення фосфорилування рецептора FGF21 може являти собою фосфорилування тирозину. У деяких варіантах здійснення модуляція активності FGF21 може викликати модуляцію пов'язаного з FGF21 фенотипу.

30 [000116] Порівняння активності FGF21 можна здійснювати також, наприклад, за допомогою вимірювання рівнів біомаркера, що стоїть нижче FGF21, і вимірювання посилення передачі сигналів FGF21. Активність FGF21 можна оцінювати також за допомогою вимірювання: передачі сигналу в клітині; активності кінази; поглинання глюкози адипоцитами; коливань рівнів у крові інсуліну, тригліцеридів або холестерину; змін рівнів ліпідів у печінці або тригліцеридів у печінці; взаємодій між FGF21 і рецептором (FGFR-1с, FGFR-2с або FGFR-3с); або фосфорилування рецептора FGF21. У деяких варіантах здійснення фосфорилування рецептора FGF21 може являти собою фосфорилування тирозину. У деяких варіантах здійснення модуляція активності FGF21 може викликати модуляцію пов'язаного з FGF21 фенотипу.

45 [000117] "Біомаркер, що стоїть нижче FGF21", як застосовують у цьому документі, являє собою ген або продукт гена, або ознаки гену або продукту гену, що піддаються вимірюванню. У деяких варіантах здійснення ген або активність, що є маркером, що стоїть нижче FGF21, мають змінений рівень експресії або в судинній тканині. У деяких варіантах здійснення активність маркера, що стоїть нижче, змінюється в присутності модулятора FGF21. У деяких варіантах здійснення маркери, що стоять нижче, мають змінені рівні експресії, коли на FGF21 впливають

за допомогою модулятора FGF21 за цим винаходом. Маркери, що стоять нижче FGF21, включають у себе, без обмеження, поглинання глюкози або 2-дезоксиглюкози, рівні pERK та інших фосфорильованих або ацетильованих білків, або NAD.

[000118] Як застосовують у цьому документі, термін "підвищувальна регуляція" відноситься до збільшення, активації або стимуляції активності або кількості. Наприклад, у контексті цього винаходу, модулятори FGF21 можуть збільшувати активність рецептора FGF21. В одному з варіантів здійснення, один або декілька з FGFR-1с, FGFR-2с або FGFR-3с можна піддавати підвищувальній регуляції у відповідь на модулятор FGF21. Підвищувальна регуляція може відноситися також до пов'язаної з FGF21 активності, наприклад, такої як здатність знижувати рівні в крові глюкози, інсуліну, тригліцеридів або холестерину; знижувати рівні ліпідів у печінці або тригліцеридів у печінці; знижувати масу тіла; поліпшувати стійкість до глюкози, споживання енергії або чутливості до інсуліну; або викликати фосфорилування рецептора FGF21; або збільшувати рівень маркера, що стоїть нижче FGF21. Рецептор FGFR21 може являти собою один або декілька з FGFR-1с, FGFR-2с або FGFR-3с. Підвищувальна регуляція може становити щонайменше 25 %, щонайменше 50 %, щонайменше 75 %, щонайменше 100 %, щонайменше 150 %, щонайменше 200 %, щонайменше 250 %, щонайменше 400 %, або щонайменше 500 % у порівнянні з контролем.

[000119] Як застосовують у цьому документі, термін "N-кінець" відноситься щонайменше до перших 20 амінокислот білка.

[000120] Як застосовують у цьому документі, терміни "N-кінцевий домен" і "N-кінцева область" використовують взаємозамінно, і вони відносяться до фрагмента білка, який починається на першій амінокислоті білка і закінчується на будь-якій амінокислоті в N-кінцевій половині білка. Наприклад, N-кінцевий домен FGF21 перебуває від амінокислоти 1 SEQ ID NO:1 до будь-якої амінокислоти приблизно між амінокислотами 10 і 105 SEQ ID NO:1.

[000121] Як застосовують у цьому документі, термін "C-кінець" відноситься щонайменше до останніх 20 амінокислот білка.

[000122] Як застосовують у цьому документі, терміни "C-кінцевий домен" і "C-кінцева область" використовують взаємозамінно, і вони відносяться до фрагмента білка, який починається на будь-якій амінокислоті в C-кінцевій половині білка і закінчується на останній амінокислоті білка. Наприклад, C-кінцевий домен FGF21 починається на будь-якій амінокислоті від амінокислоти 105 до приблизно амінокислоти 200 SEQ ID NO:1 і закінчується на амінокислоті 209 SEQ ID NO:1.

[000123] Термін "домен", як застосовують у цьому документі, відноситься до структурної частини біомолекули, яка вносить вклад у відому або передбачувану функцію біомолекули. Домени можуть мати однакове просторове розташування з областями або їх частинами і можуть включати також частину біомолекули, віддалену від конкретної області, на додаток до всієї або частини цієї області.

[000124] Як застосовують у цьому документі, термін "сигнальний домен" (що також називається "сигнальна послідовність" або "сигнальний пептид") відноситься до пептидного домену, який перебуває в безперервному відрізку амінокислотної послідовності в N-кінцевій області білка-попередника (часто пов'язаного з мембраною або білка, що секретується) і є залученим у пост-трансляційний транспорт білка. У багатьох випадках сигнальний домен видаляють з повнорозмірного білка за допомогою спеціалізованих сигнальних пептидаз після завершення процесу відбору. Кожний сигнальний домен визначає конкретне місце призначення в клітині для білка-попередника. Сигнальний домен FGF21 являє собою амінокислоти 1-28 з SEQ ID NO:1.

[000125] Як застосовують у цьому документі, термін "домен, що зв'язує рецептор" відноситься до будь-якої частини або області білка, що контактує з пов'язаним з мембраною білком-рецептором, що приводить до клітинної відповіді, такої як подія передачі сигналу.

[000126] Як застосовують у цьому документі, термін "домен, що зв'язує ліганд" відноситься до будь-якої частини або області злитого білка за винаходом, що зберігає щонайменше одну якісну зв'язувальну активність відповідної природної послідовності.

[000127] Термін "область" відноситься до фізично безперервної області первинної структури біомолекули. У випадку білків, область визначають за безперервною частиною амінокислотної послідовності цього білка. У деяких варіантах здійснення "область" є асоційованою з функцією біомолекули.

[000128] Термін "фрагмент", як застосовують у цьому документі, відноситься до фізично безперервної області первинної структури біомолекули. У випадку білків, частину визначають як безперервну частину амінокислотної послідовності цього білка, і вона відноситься до щонайменше 3-5 амінокислот, щонайменше до 8-10 амінокислот, щонайменше до 11-15

амінокислот, щонайменше до 17-24 амінокислот, щонайменше до 25-30 амінокислот, і щонайменше до 30-45 амінокислот. У випадку олігонуклеотидів, частину визначають як безперервну частину послідовності нуклеїнової кислоти цього олігонуклеотида, і вона відноситься щонайменше до 9-15 нуклеотидів, щонайменше до 18-30 нуклеотидів, щонайменше до 33-45 нуклеотидів, щонайменше до 48-72 нуклеотидів, щонайменше до 75-90 нуклеотидів і щонайменше до 90-130 нуклеотидів. У деяких варіантах здійснення, частини біомолекул мають біологічну активність. У контексті цього винаходу, фрагменти поліпептиду FGF21 не містять повну послідовність поліпептиду FGF21, зазначену в SEQ ID NO:1.

[000129] Поліпептид з "природною послідовністю" являє собою поліпептид, що має ту ж саму амінокислотну послідовність, що й поліпептид, отриманий з природних джерел. Такі поліпептиди з природною послідовністю можна виділяти з природних джерел або можна одержувати рекомбінантними або синтетичними способами. Таким чином, поліпептид з природною послідовністю може мати амінокислотну послідовність природного поліпептиду людини, поліпептиду миші або поліпептиду з будь-яких інших видів ссавців.

[000130] Як застосовують у цьому документі, фраза "гомологічна нуклеотидна послідовність" або "гомологічна амінокислотна послідовність", або їх варіанти, відноситься до послідовностей, що характеризуються гомологією, на рівні нуклеотидів або на рівні амінокислот, щонайменше на зазначений відсоток, і її використовують взаємозамінно з "ідентичністю послідовності". Гомологічні нуклеотидні послідовності включають у себе послідовності, що кодують ізоформи білків. Такі ізоформи можуть експресуватися в різних тканинах того самого організму в результаті, наприклад, альтернативного сплайсингу РНК. Альтернативно, ізоформи можуть бути кодовані різними генами. Гомологічні нуклеотидні послідовності включають у себе нуклеотидні послідовності, що кодують білок з видів, відмінних від людини, включаючи, але без обмеження, ссавців. Гомологічні нуклеотидні послідовності включають у себе також, але без обмеження, алельні варіанти, що зустрічаються в природі, і мутації нуклеотидних послідовностей, зазначених у цьому документі. Гомологічні амінокислотні послідовності включають у себе амінокислотні послідовності, які містять консервативні амінокислотні заміни, і поліпептиди яких мають однакове зв'язування і/або активність. У деяких варіантах здійснення, нуклеотидна або амінокислотна послідовність є гомологічною, якщо вона має щонайменше 60 % або більше, аж до 99 %, ідентичність з порівняльною послідовністю. У деяких варіантах здійснення нуклеотидна або амінокислотна послідовність є гомологічною, якщо вона розділяє одне або декілька, аж до 60, замін, додавань або делецій нуклеотидів/амінокислот з порівняльною послідовністю. У деяких варіантах здійснення гомологічні амінокислотні послідовності мають не більше 5 або не більше 3 консервативних амінокислотних замін.

[000131] Відсоток гомології або ідентичності можна визначати, наприклад, за допомогою програми Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI), з використанням установок за замовчуванням, з використанням алгоритму Сміта і Уотермана (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489). У деяких варіантах здійснення, гомологія між зондом і мішенню становить між приблизно 75 % і приблизно 85 %. У деяких варіантах здійснення, нуклеїнові кислоти мають нуклеотиди, щонайменше приблизно на 95 %, приблизно на 97 %, приблизно на 98 %, приблизно на 99 % і приблизно на 100 % гомологічні SEQ ID NO:2 або його частини.

[000132] Гомологія може бути присутня також на рівні поліпептиду. У деяких варіантах здійснення поліпептиди, що становлять злиті білки за винаходом, можуть бути щонайменше на 95 % гомологічними їх повнорозмірним еквівалентам дикого типу або відповідним природним послідовностям, або їх частинам. Ступінь або відсоток ідентичності злитих білків за винаходом, або їх частин, і різних амінокислотних послідовностей розраховують як кількість точних збігів при вирівнюванні двох послідовностей, ділене на довжину "послідовності за винаходом" або "чужорідної послідовності", залежно від того, яка з них коротше. Результат виражають як відсоток ідентичності.

[000133] Як застосовують у цьому документі, термін "змішування" відноситься до процесу об'єднання однієї або декількох сполук, клітин, молекул і т.п. разом у тому самому місці. Це можна здійснювати, наприклад, у пробірці, чашці Петрі або будь-якому контейнері, що дозволяє змішувати одну або декілька сполук, клітин або молекул.

[000134] Як застосовують у цьому документі, термін "по суті очищений" відноситься до сполуки (наприклад, до полінуклеотиду або поліпептиду, або антитіла), яка вилучена з його природного оточення і є щонайменше на 60 % вільною, щонайменше на 75 % вільною, і щонайменше на 90 % вільною від інших компонентів, з якими вона асоційована в природі.

[000135] Термін "фармацевтично прийнятний носій" відноситься до носія для введення лікарського засобу, такого як антитіла або поліпептид, гени та інші лікарські засоби. Термін

відноситься до будь-якого фармацевтичного носія, який сам не індукує продукцію антитіл, несприятливих для індивідуума, якому вводять композицію, і який можна вводити без неспецифічної токсичності. Придатні носії можуть являти собою великі макромолекули, що повільно піддаються метаболізму, такі як білки, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, співполімери амінокислот, ліпідні агрегати і неактивні вірусні частинки. Такі носії добре відомі звичайним фахівцям у даній галузі. Фармацевтично прийнятні носії в терапевтичних композиціях можуть містити в собі рідини, такі як вода, сольовий розчин, гліцерин і етанол. Допоміжні речовини, такі як зволожуючі засоби або емульгатори, забуферені рН речовини і т.п., також можуть бути присутні у таких носіях.

Збільшення фізичної стабільності злитих білків за винаходом

[000136] Природні дисульфідні зв'язки, забезпечені залишками цистеїну, як правило, збільшують термодинамічну стабільність білків. Успішними прикладами збільшеної термодинамічної стабільності, як виміряно по збільшенню температури плавлення, є мутанти з множинними дисульфідними зв'язками ферментів лізоциму T4 (Matsumura et al., PNAS 86:6562-6566 (1989)) і барнази (Johnson et al., J. Mol. Biol. 268:198-208 (1997)). Аспектом цього винаходу є збільшення фізичної стабільності FGF21 у присутності консерванту, що досягається присутністю у варіантах дисульфідних зв'язків, що утруднює гнучкість FGF21 дикого типу і у такий спосіб обмежуючих доступ консерванту до гідрофобного кору білка.

[000137] Другий аспект цього винаходу в такий спосіб відноситься до варіантів FGF21 людини, або його біологічно активного пептиду зі збільшеною фармацевтичною стабільністю, викликаною включенням додаткових дисульфідних зв'язків, наприклад, за допомогою вставки або заміни залишків цистеїну в білку FGF21 дикого типу або у варіантах поліпептиду і білка за винаходом. Фахівцям в даній галузі зрозуміло, що природні залишки цистеїну, цистеїн 103 і цистеїн 121, можна використовувати як локуси для введення нового дисульфідного зв'язку, який може надавати поліпшені властивості, на додаток до запропонованих варіантів здійснення, описаних у цьому документі.

[000138] Це включає в себе злиті білки, що містять FGF-21 дикого типу із заміною на цистеїн двох або більше з наступного: глутамін 46, аргінін 47, тирозин 48, лейцин 49, тирозин 50, треонін 51, аспартат 52, аспартат 53, аланін 54, глутамін 55, глутамін 56, треонін 57, глутамат 58, аланін 59, гістидин 60, лейцин 61, глутамат 62, ізолейцин 63, валін 69, гліцин 70, гліцин 71, аланін 72, аланін 73, лейцин 144, гістидин 145, лейцин 146, пролін 147, гліцин 148, аспарагін 149, лізин 150, серин 151, пролін 152, гістидин 153, аргінін 154, аспартат 155, пролін 156, аланін 157, пролін 158, аргінін 159, гліцин 160, пролін 161, аланін 162, аргінін 163, фенілаланін 164, де нумерація амінокислот заснована на повнорозмірній послідовності FGF21 з 209 амінокислот з SEQ ID NO: 1.

[000139] Крім того, злиті білки за винаходом можуть містити варіанти людського FGF21 дикого типу або його біологічно активного пептиду, поліпшені за допомогою сконструйованих дисульфідних зв'язків, на додаток до природного зв'язку Cys103-Cys121, які є наступними: Gln46Cys-Ala59Cys, Gln46Cys-His60Cys, Gln46Cys-Leu61Cys, Gln46Cys-Glu62Cys, Gln46Cys-Ile63Cys, Arg47Cys-Ala59Cys, Arg47Cys-His60Cys, Arg47Cys-Leu61Cys, Arg47Cys-Glu62Cys, Arg47Cys-Ile63Cys, Tyr48Cys-Ala59Cys, Tyr48Cys-His60Cys, Tyr48Cys-Leu61Cys, Tyr48Cys-Glu62Cys, Tyr48Cys-Ile63Cys, Leu49Cys-Ala59Cys, Leu49Cys-His60Cys, Leu49Cys-Leu61Cys, Leu49Cys-Glu62Cys, Leu49Cys-Ile63Cys, Tyr50Cys-Ala59Cys, Tyr50Cys-His60Cys, Tyr50Cys-Leu61Cys, Tyr50Cys-Glu62Cys, Tyr50Cys-Ile63Cys, Leu144Cys-Gly160Cys, Leu144Cys-Pro161Cys, Leu144Cys-Ala162Cys, Leu144Cys-Arg163Cys, Leu144Cys-Phe164Cys, His145Cys-Gly160Cys, His145Cys-Pro161Cys, His145Cys-Ala162Cys, His145Cys-Arg163Cys, His145Cys-Phe164Cys, Leu146Cys-Gly160Cys, Leu146Cys-Pro161Cys, Leu146Cys-Ala162Cys, Leu146Cys-Arg163Cys, Leu146Cys-Phe164Cys, Pro147Cys-Gly160Cys, Pro147Cys-Pro161Cys, Pro147Cys-Ala162Cys, Pro147Cys-Arg163Cys, Pro147Cys-Phe164Cys, Gly148Cys-Gly160Cys, Gly148Cys-Pro161Cys, Gly148Cys-Ala162Cys, Gly148Cys-Arg163Cys, Gly148Cys-Phe164Cys, Thr57Cys-Val69Cys, Thr57Cys-Gly70Cys, Thr57Cys-Gly71Cys, Thr57Cys-Ala72Cys, Thr57Cys-Ala73Cys, Glu58Cys-Val69Cys, Glu58Cys-Gly70Cys, Glu58Cys-Gly71Cys, Glu58Cys-Ala72Cys, Glu58Cys-Ala73Cys, Ala59Cys-Val69Cys, Ala59Cys-Gly70Cys, Ala59Cys-Gly71Cys, Ala59Cys-Ala72Cys, Ala59Cys-Ala73Cys, His60Cys-Val69Cys, His60Cys-Gly70Cys, His60Cys-Gly71Cys, His60Cys-Ala72Cys, His60Cys-Ala73Cys, Leu61Cys-Val69Cys, Leu61Cys-Gly70Cys, Leu61Cys-Gly71Cys, Leu61Cys-Ala72Cys, Leu61Cys-Ala73Cys, Arg47Cys-Gly148Cys, Tyr48Cys-Gly148Cys, Leu49Cys-Gly148Cys, Tyr50Cys-Gly148Cys, Thr51Cys-Gly148Cys, Asp52Cys-Gly148Cys, Asp53Cys-Gly148Cys, Ala54Cys-Gly148Cys, Gln55Cys-Gly148Cys, Gln56Cys-Gly148Cys, Thr57Cys-Gly148Cys, Glu58Cys-Gly148Cys, Arg47Cys-Asn149Cys, Tyr48Cys-Asn149Cys, Leu49Cys-Asn149Cys, Tyr50Cys-Asn149Cys, Thr51Cys-Asn149Cys, Asp52Cys-Asn149Cys, Asp53Cys-Asn149Cys,

Ala54Cys-Asn149Cys, Gln55Cys-Asn149Cys, Gln56Cys-Asn149Cys, Thr57Cys-Asn149Cys,
 Glu58Cys-Asn149Cys, Arg47Cys-Lys150Cys, Tyr48Cys-Lys150Cys, Leu49Cys-Lys150Cys,
 Tyr50Cys-Lys150Cys, Thr51Cys-Lys150Cys, Asp52Cys-Lys150Cys, Asp53Cys-Lys150Cys,
 Ala54Cys-Lys150Cys, Gln55Cys-Lys150Cys, Gln56Cys-Lys150Cys, Thr57Cys-Lys150Cys,
 5 Glu58Cys-Lys150Cys, Arg47Cys-Ser151Cys, Tyr48Cys-Ser151Cys, Leu49Cys-Ser151Cys,
 Tyr50Cys-Ser151Cys, Thr51Cys-Ser151Cys, Asp52Cys-Ser151Cys, Asp53Cys-Ser151Cys,
 Ala54Cys-Ser151Cys, Gln55Cys-Ser151Cys, Gln56Cys-Ser151Cys, Thr57Cys-Ser151Cys,
 Glu58Cys-Ser151Cys, Arg47Cys-Pro152Cys, Tyr48Cys-Pro152Cys, Leu49Cys-Pro152Cys,
 Tyr50Cys-Pro152Cys, Thr51Cys-Pro152Cys, Asp52Cys-Pro152Cys, Asp53Cys-Pro152Cys,
 10 Ala54Cys-Pro152Cys, Gln55Cys-Pro152Cys, Gln56Cys-Pro152Cys, Thr57Cys-Pro152Cys,
 Glu58Cys-Pro152Cys, Arg47Cys-His153Cys, Tyr48Cys-His153Cys, Leu49Cys-His153Cys, Tyr50Cys-
 His153Cys, Thr51Cys-His153Cys, Asp52Cys-His153Cys, Asp53Cys-His153Cys, Ala54Cys-
 His153Cys, Gln55Cys-His153Cys, Gln56Cys-His153Cys, Thr57Cys-His153Cys, Glu58Cys-
 15 Arg47Cys-Arg154Cys, Tyr48Cys-Arg154Cys, Leu49Cys-Arg154Cys, Tyr50Cys-
 Arg154Cys, Thr51Cys-Arg154Cys, Asp52Cys-Arg154Cys, Asp53Cys-Arg154Cys, Ala54Cys-
 Arg154Cys, Gln55Cys-Arg154Cys, Gln56Cys-Arg154Cys, Thr57Cys-Arg154Cys, Glu58Cys-
 Arg154Cys, Arg47Cys-Asp155Cys, Tyr48Cys-Asp155Cys, Leu49Cys-Asp155Cys, Tyr50Cys-
 Asp155Cys, Thr51Cys-Asp155Cys, Asp52Cys-Asp155Cys, Asp53Cys-Asp155Cys, Ala54Cys-
 Asp155Cys, Gln55Cys-Asp155Cys, Gln56Cys-Asp155Cys, Thr57Cys-Asp155Cys, Glu58Cys-
 20 Asp155Cys, Arg47Cys-Pro156Cys, Tyr48Cys-Pro156Cys, Leu49Cys-Pro156Cys, Tyr50Cys-
 Pro156Cys, Thr51Cys-Pro156Cys, Asp52Cys-Pro156Cys, Asp53Cys-Pro156Cys, Ala54Cys-
 Pro156Cys, Gln55Cys-Pro156Cys, Gln56Cys-Pro156Cys, Thr57Cys-Pro156Cys, Glu58Cys-
 Pro156Cys, Arg47Cys-Ala157Cys, Tyr48Cys-Ala157Cys, Leu49Cys-Ala157Cys, Tyr50Cys-
 Ala157Cys, Thr51Cys-Ala157Cys, Asp52Cys-Ala157Cys, Asp53Cys-Ala157Cys, Ala54Cys-
 25 Ala157Cys, Gln55Cys-Ala157Cys, Gln56Cys-Ala157Cys, Thr57Cys-Ala157Cys, Glu58Cys-
 Ala157Cys, Arg47Cys-Pro158Cys, Tyr48Cys-Pro158Cys, Leu49Cys-Pro158Cys, Tyr50Cys-
 Pro158Cys, Thr51Cys-Pro158Cys, Asp52Cys-Pro158Cys, Asp53Cys-Pro158Cys, Ala54Cys-
 Pro158Cys, Gln55Cys-Pro158Cys, Gln56Cys-Pro158Cys, Thr57Cys-Pro158Cys, Glu58Cys-
 30 Arg47Cys-Arg159Cys, Tyr48Cys-Arg159Cys, Leu49Cys-Arg159Cys, Tyr50Cys-
 Arg159Cys, Thr51Cys-Arg159Cys, Asp52Cys-Arg159Cys, Asp53Cys-Arg159Cys, Ala54Cys-
 Arg159Cys, Gln55Cys-Arg159Cys, Gln56Cys-Arg159Cys, Thr57Cys-Arg159Cys, Glu58Cys-
 Arg159Cys, Arg47Cys-G160Cys, Tyr48Cys-G160Cys, Leu49Cys-G160Cys, Tyr50Cys-Gly160Cys,
 Thr51Cys-Gly160Cys, Asp52Cys-Gly160Cys, Asp53Cys-Gly160Cys, Ala54Cys-Gly160Cys,
 Gln55Cys-Gly160Cys, Gln56Cys-Gly160Cys, Thr57Cys-Gly160Cys, Glu58Cys-Gly160Cys,
 35 Arg47Cys-Pro161Cys, Tyr48Cys-Pro161Cys, Leu49Cys-Pro161Cys, Tyr50Cys-Pro161Cys,
 Thr51Cys-Pro161Cys, Asp52Cys-Pro161Cys, Asp53Cys-Pro161Cys, Ala54Cys-Pro161Cys,
 Gln55Cys-Pro161Cys, Gln56Cys-Pro161Cys, Thr57Cys-Pro161Cys, Glu58Cys-Pro161Cys,
 Arg47Cys-Ala162Cys, Tyr48Cys-Ala162Cys, Leu49Cys-Ala162Cys, Tyr50Cys-Ala162Cys, Thr51Cys-
 Ala162Cys, Asp52Cys-Ala162Cys, Asp53Cys-Ala162Cys, Ala54Cys-Ala162Cys, Gln55Cys-
 40 Ala162Cys, Gln56Cys-Ala162Cys, Thr57Cys-Ala162Cys, Glu58Cys-Ala162Cys, Arg47Cys-
 Arg163Cys, Tyr48Cys-Arg163Cys, Leu49Cys-Arg163Cys, Tyr50Cys-Arg163Cys, Thr51Cys-
 Arg163Cys, Asp52Cys-Arg163Cys, Asp53Cys-Arg163Cys, Ala54Cys-Arg163Cys, Gln55Cys-
 Arg163Cys, Gln56Cys-Arg163Cys, Thr57Cys-Arg163Cys, Glu58Cys-Arg163Cys.

[000140] Інший аспект цього винаходу відноситься до злитих білків, що містять варіанти людського FGF21 дикого типу або його біологічно активного пептиду, що містять заміну на будь-яку заряджену і/або полярну, але незаряджену амінокислоту в кожному з положень амінокислот, зазначених у першому варіанті здійснення цього винаходу, у комбінації із заміною на цистеїн двох або більше положень амінокислот, зазначених у другому варіанті здійснення винаходу.

Поліпшення злитих білків за винаходом у порівнянні з порівняльними білками дикого типу і їх варіантами

[000141] У даній галузі добре відомо, що серйозним випробуванням при розробці білкових лікарських засобів є подолання фізичної і хімічної нестабільності білків. Це навіть більш очевидно, коли білковий фармацевтичний склад призначений, щоб являти собою придатний для ін'єкцій склад для множинного використання, що вимагає стабільного, концентрованого і такого розчину, що містить консерванти, при збереженні в той же час переважного профілю біоактивності. Біофізичною характеристикацією FGF21 дикого типу в літературі встановлено, що концентрований розчин білка (>5 мг/мл), при піддаванні стресовим умовам, таким як висока температура або низький рН, приводить до посиленої асоціації і агрегації (тобто, поганої фізичної стабільності і біофармацевтичними властивостями). Вплив на концентрований розчин

білка FGF21 фармацевтичних консервантів (наприклад, м-крезолу) також впливає на фізичну стабільність.

[000142] Таким чином, варіант здійснення цього винаходу відноситься до поліпшення фізичної стабільності концентрованих розчинів, зі збереженням у той же час хімічної стабільності і біологічної активності, як у фізіологічних умовах, так і в умовах складу, що містить консерванти. Вважають, що асоціація і агрегація можуть виникати в результаті гідрофобних взаємодій, оскільки, при даній концентрації білка, температура та іонна сила значно впливають на фізичну стабільність. Більшою мірою метою служили не консервативні, приблизно, експоновані на поверхні амінокислотні залишки. Аналізували місцеве оточення цих залишків і, ті, які, очевидно, не були структурно важливими, вибирали для мутагенезу. Одним зі способів ініціювати специфічні зміни є подальше зниження pI білка за допомогою введення залишків глутамінової кислоти ("сканування по глутаміновій кислоті"). Висунули гіпотезу, що введення заряджених замісників може інгібувати обумовлену гідрофобністю агрегацію за допомогою відштовхування заряд-заряд і потенційно поліпшувати сумісність з консервантом. Крім того, фахівцві в даній галузі зрозуміло також, що при достатньому ступені мутагенезу pI можна зрушувати в діапазон основного рН за допомогою введення позитивного заряду із супутнім зменшенням негативного заряду або без нього, таким чином, дозволяючи відштовхування заряд-заряд.

[000143] Додатковою складністю, пов'язаною з терапевтичними застосуваннями FGF21 дикого типу як біотерапевтичного засобу, є, наприклад, те, що час його напівжиття *in vivo* є дуже коротким (близько 0,5 і 2 години, відповідно, у мишей і приматів). Існує, таким чином, необхідність розробки наступних сполук, які є більш ефективними за рахунок або більш високої активності, або більш тривалого часу напівжиття. Злиті білки за винаходом розроблені як спосіб досягнення бажаних ефектів лікування FGF21 при більш високій активності і у складі зі збільшеним часом напівжиття.

[000144] Як описано раніше в цьому документі, злиті білки за винаходом мають час напівжиття більше двох тижнів у мишей, на відміну від набагато більш короткого часу напівжиття FGF21 дикого типу і часу напівжиття 17 годин злитого білка Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) у Публікації PCT WO10/129600. Злиті білки за винаходом мають також поліпшений час напівжиття і фармакокінетичні властивості у порівнянні з пегільованим V76, як описано в цьому документі і у Патентній заявці США 61/415476, поданій 19 листопада 2010 р.

[000145] Більше того, злиті білки за винаходом Fc-FGF21 при 1 трк є більш ефективними, ніж V76 при 5 трк, для зменшення рівнів глюкози, інсуліну, маси тіла і рівня ліпідів у печінці. В 12-добовому дослідженні обробки ob/ob мишей, для злитих білків показані наступні % зміни у порівнянні з носієм (усі злиті білки вводили при 1,0 мг/кг, і V76 вводили при 5,0 мг/кг):

[000146] % зміни загального рівня глюкози (AUC) у порівнянні з носієм: V76 - -42 %; V101 - -53 %, V103 - -46 %, і V188 - -42 %;

[000147] % зміни загального рівня інсуліну в плазмі у порівнянні з носієм: V76 - -46 %; V101 - -82 %, V103 - -69 %, і V188 - -59 %;

[000148] % зміни загальної маси тіла у порівнянні з носієм: V76 - -7 %; V101 - -12 %, V103 - -12 %, і V188 - -11 %; і

[000149] % зміни загального рівня ліпідів у печінці у порівнянні з носієм: V76 - -30 %; V101 - -44 %, V103 - -50 %, і V188 - -51 %.

[000150] Подібним чином, аналізи *in vitro* виявляють таку ж 5-кратну або більшу активність злитих білків за винаходом у порівнянні з V76:

[000151] В аналізі pERK в адипоцитах людини (середнє $EC_{50} \pm SEM$), V76- 21 ± 2 нМ (n=3); V101- $1,0 \pm 0,1$ нМ (n=3), V103- $1,3 \pm 0,2$ нМ (n=3) і V188- $1,4 \pm 0,4$ нМ (n=3);

[000152] В аналізі pERK в HEK293 за допомогою β -klotho людини (середнє $EC_{50} \pm SEM$), V76- 13 ± 4 нМ (n=5), V101- $0,60 \pm 0,06$ нМ (n=5), V103- $0,9 \pm 0,3$ нМ (n=5) і V188- $0,4 \pm 0,1$ нМ (n=3); і

[000153] В аналізі поглинання глюкози на адипоцитах миші (середнє $EC_{50} \pm SEM$), V76- 5 ± 1 нМ (n=3), V101- $0,60 \pm 0,06$ нМ (n=3), V103- $0,60 \pm 0,07$ нМ (n=3), і V188- $0,48 \pm 0,14$ нМ (n=3).

[000154] Хоча варіанти здійснення цього винаходу відносяться до фізичної і хімічної стабільності як у фізіологічних умовах, так і в умовах фармацевтичного складу, що містить консервант, збереження біологічної активності злитих білків за винаходом у порівнянні, наприклад, з FGF21 дикого типу, також є важливим фактором, що враховується. Таким чином, біологічну активність білків за цим винаходом визначають за здатністю білків впливати на поглинання глюкози і/або зниження рівнів глюкози в плазмі, як показано в цьому документі в прикладах.

[000155] Білки, поліпептиди і/або пептиди за винаходом, що вводяться за цим винаходом, можна одержувати і/або виділяти будь-якими способами, відомими в даній галузі. Найкращим

способом одержання варіанта є спосіб з використанням рекомбінантної ДНК, і він добре відомий фахівцям у даній галузі. Такі способи описані в *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.), зміст якого наведено в цьому документі як посилання.

[000156] Крім того, кращі варіанти здійснення включають у себе біологічно активний пептид, отриманий з варіанта, описаного в цьому документі. Такий пептид може містити щонайменше одну з описаних замінів, і варіант може мати біологічну активність. Пептид можна одержувати всіма без винятку способами, відомими фахівцям у даній галузі, що включають у себе як необмежуючі приклади способи ферментативного розщеплення, хімічного синтезу або рекомбінантної ДНК.

[000157] У даній галузі відомо, що фрагменти пептидів конкретних факторів росту фібробластів є біологічно активними. Див., наприклад, Baird et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2324-2328 (1988), і J. Cell. Phys. Suppl. 5:101-106 (1987). Таким чином, вибір фрагментів або пептидів варіанта заснований на критеріях, відомих у даній галузі. Наприклад, відомо, що дипептидил-пептидаза IV (DPP-IV або DPP-4) є протеазою серинового типу, залученою в інактивацію нейропептидів, ендокринних пептидів і цитокинів (Damme et al. *Chem. Immunol.* 72: 42-56, (1999)). N-кінець FGF21 (HisProllePro) містить два дипептиди, які потенційно можуть бути субстратами для DPP-IV, з одержанням у результаті фрагмента FGF21, усиченого з N-кінця на 4 амінокислоти. Несподівано показано, що цей фрагмент FGF21 дикого типу зберігає біологічну активність, таким чином, білки за цим винаходом, усичені на N-кінці на аж до 4 амінокислот, являють собою варіант здійснення цього винаходу.

[000158] Винахід відноситься також до полінуклеотидів, що кодують вищеописані варіанти, які можуть перебувати у формі РНК або у формі ДНК, де ДНК включає в себе кДНК, геномну ДНК і синтетичну ДНК. ДНК може бути дволанцюговою або одностанцюговою. Кодуючі послідовності, кодуючі білки за цим винаходом, можуть мінятися в результаті надмірності або виродженості генетичного коду.

[000159] Полінуклеотиди, що кодують злиті білки за винаходом, можуть включати в себе наступне: тільки кодуючу послідовність для варіанту, кодуючу послідовність для варіанта і додаткову кодуючу послідовність, таку як функціональний поліпептид, або лідерна або секреторна послідовність або про-білкова послідовність; кодуючу послідовність для варіанту і некодуючу послідовність, таку як інтрони або некодуюча послідовність на 5'- і/або 3'- від кодуючої послідовності для варіанта. Таким чином, термін "полінуклеотид, що кодує варіант", включає в себе полінуклеотид, який може включати не тільки кодуючу послідовність для варіанта, але також полінуклеотид, який включає додаткову кодуючу і/або не кодуючу послідовність.

[000160] Винахід, крім того, відноситься до варіантів описаних полінуклеотидів, що кодують фрагменти, аналоги і похідні поліпептиду, що містить зазначені заміни. Варіант полінуклеотида може являти собою природний варіант послідовності FGF21 людини, неприродний варіант або усичений варіант, як описано вище. Таким чином, цей винахід відноситься також до полінуклеотидів, що кодують варіанти, описані вище, так само як до варіантів таких полінуклеотидів, де варіанти кодують фрагмент, похідне або аналог описаного варіанта. Такі варіанти нуклеотидів включають у себе варіанти з делецією, варіанти із заміною, усичені варіанти, і варіанти з додаванням або вставкою, за умови, що присутня щонайменше одна із зазначених замінів амінокислот з першого або другого варіанта здійснення.

[000161] Полінуклеотиди за винаходом можна експресувати у хазяях, після того, як послідовності були функціонально зв'язані (тобто, розташовані для забезпечення функціонування) з послідовністю для контролю експресії. Ці експресуючі вектори, як правило, здатні до реплікації в організмах-хазяях або як епісоми, або як інтегральна частина хромосомальної ДНК хазяїна. Як правило, експресуючі вектори можуть містити селективні маркери, наприклад, тетрациклін, неоміцин і дигідрофолатредуктазу, щоб дозволяти детекцію клітин, трансформованих бажаними послідовностями ДНК. Варіант FGF21 можна експресувати у клітинах ссавців, комах, дріжджах, бактерій або інших клітин під контролем прийнятних промоторів. Безклітинні системи трансляції також можна використовувати для одержання таких білків з використанням РНК, отриманих з конструкцій ДНК за цим винаходом.

[000162] Е. coli являє собою прокаріотичного хазяїна, придатного, зокрема, для клонування полінуклеотидів за цим винаходом. Інші мікроорганізми-хазяї, придатні для використання, включають у себе *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* і різні види *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* і *Staphylococcus*, хоча інші також можна вибірково використовувати. У цих прокаріотичних хазяях, також можна одержувати експресуючі вектори, які, як правило, можуть містити послідовності для контролю експресії, сумісні з клітиною-хазяїном (наприклад, точка початку реплікації). Крім того, може бути присутнім будь-яка кількість добре відомих промоторів,

таких як промоторна система лактози, промоторна система триптофану (Trp), промоторна система бета-лактамази або промоторна система з фагів лямбда або T7. Промотори можуть, як правило, контролювати експресію, необов'язково, за допомогою послідовності оператора, і мати послідовності ділянки зв'язування рибосоми і т.п., для ініціації і завершення транскрипції і трансляції.

[000163] Фахівцєві в галузі експресії білків відомо, що послідовність метіонін або метіонін-аргінін можна вводити на N-кінці зрілої послідовності (SEQ ID NO: 3) для експресії в *E. coli*, і вона передбачена в контексті цього винаходу. Таким чином, якщо не зазначено інакше, білки за цим винаходом, експресовані в *E. coli*, мають послідовність метіоніну, введєну на N-кінці.

[000164] Інші мікроорганізми, такі як дріжджі або гриби, також можна використовувати для експресії. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* і *Pichia angusta* являють собою приклади кращих хазяїв-дріжджів, з придатними векторами, що мають послідовності для контролю експресії, такі як промотори, включаючи промотори 3-фосфогліцераткінази або інших гліколітичних ферментів, і точку початку реплікації, послідовності термінації і т.п., як бажано. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*; і *Schizophyllum commune*, являють собою приклади хазяїв-грибів, хоча інші також можна вибірково використовувати.

[000165] Культуру клітин ссавців також можна використовувати для експресії і продукції поліпептидів за цим винаходом. Еукаріотичні клітини є в дійсності кращими, оскільки ряд придатних ліній клітин-хазяїв, здатних секретувати інтактні варіанти, розроблені в даній галузі, і включають у себе лінії клітин CHO, різні лінії клітин COS, клітини NSO, лінії клітин яєчника сірійського хом'яка, клітини HeLa або лінії клітин ембріональної нирки людини (тобто HEK293, HEK293EBNA).

[000166] Експресуючі вектори для цих клітин можуть включати послідовності для контролю експресії, такі як точка початку реплікації, промотор, енхансер і необхідні для процесінгу інформативні ділянки, такі як ділянки зв'язування рибосоми, ділянки сплайсингу РНК, ділянки поліаденілювання і послідовності термінаторів транскрипції. Кращі послідовності для контролю експресії являють собою промотори, отримані з SV40, аденовірусу, вірусу бичачої папіломи, цитомегаловірусу, вірусу саркоми Рауса і т.п. Кращі ділянки поліаденілювання включають у себе послідовності, отримані з SV40 і бичачого гормону росту.

[000167] Вектори, що містять, полінуклеотидні послідовності, що цікавлять (наприклад, злиті білки за винаходом і послідовності для контролю експресії), можна перенести в клітину-хазяїна добре відомими способами, які міняються залежно від типу клітинного хазяїна. Наприклад, трансфекція хлоридом кальцію є загальноприйнятою для прокаріотичних клітин, у той час як обробку фосфатом кальцію або електропорацію можна використовувати для інших клітинних хазяїв.

[000168] Можна використовувати різні способи очищення білка, і такі способи відомі в даній галузі і описані, наприклад, в Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) і Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). Обрана стадія(стадії) очищення можуть залежати, наприклад, від характеру способу одержання, що використовується для злитих білків за винаходом.

[000169] Білки, поліпептиди, і/або пептиди за винаходом, наприклад, злиті білки за винаходом з подвійною активністю, слід складати і дозувати способом, що відповідає належній медичній практиці, беручи до уваги клінічний стан пацієнта, ділянку доставки білкових композицій, спосіб введення, розклад введення та інші фактори, відомі практикуючим фахівцям у даній галузі. "Терапевтично ефективна кількість" злитих білків за винаходом для цілей за цим винаходом визначають у такий спосіб із цих міркувань.

[000170] Фармацевтичні композиції білків за цим винаходом можна вводити будь-якими способами, що дозволяють досягати загальної наміченої мети: лікування цукрового діабету типу 1 і типу 2, ожиріння, метаболічного синдрому або пацієнтів у критичному стані. Припустимі способи введення включають у себе, без обмеження, наприклад, введення за допомогою інгаляції або супозиторія або введення в слизову тканину, наприклад, за допомогою зрошення у вагінальну, ректальну, уретральну, букальну і під'язичну тканину, введення перорально, назально, місцево, інтраназально, внутрішньочеревинно, парентерально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтрастернально, за допомогою внутрішньосуглобної ін'єкції, у лімфатичні вузли, інтерстиціально, внутрішньоартеріально, підшкірно, усередину суглобів, трансепітеліально і черезшкірно. У деяких варіантах здійснення фармацевтичні композиції вводять за допомогою зрошення, перорально або внутрішньоартеріально. Інші придатні способи введення можуть містити в собі також пристрої, що перезаряджаються або біорозкладаються і полімерні пристрої, що сповільнюють або відкладають вивільнення.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можна вводити також як частини комбінованої терапії з іншими відомими метаболічними засобами.

[000171] Доза, що вводиться, може залежати від віку, стану здоров'я і маси реципієнта, виду супутнього лікування, якщо воно присутнє, частоти лікування і характеру бажаного ефекту. Композиції, включені в обсяг винаходу, включають у себе всі композиції, де варіант FGF21 присутній у кількості, яка є ефективною для досягнення бажаного медичного ефекту для лікування цукрового діабету типу 1 або типу 2, ожиріння або метаболічного синдрому. У той час як індивідуальні потреби можуть мінятися від одного пацієнта до іншого, визначення оптимальних діапазонів ефективних кількостей усіх компонентів перебуває в межах компетенції звичайного фахівця-клініциста.

[000172] Білки за цим винаходом можна становити відомими способами для одержання фармацевтично придатних композицій. Бажаним складом може бути той, який являє собою стабільний ліофілізований продукт, який можна розбавляти прийнятним розріджувачем, або водний розчин високої чистоти з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, консервантами, наповнювачами або стабілізаторами [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition (1980)]. Білки за цим винаходом можна поєднувати з фармацевтично прийнятним буфером і доводити рН для забезпечення прийнятної стабільності і рН, прийнятного для введення.

[000173] Для парентерального введення, в одному варіанті здійснення злиті білки за винаходом, як правило, становлять за допомогою змішування одного або декількох з них з бажаним ступенем чистоти, у формі одиначної придатної для ін'єкції дози (розчину, суспензії або емульсії), з фармацевтично прийнятним носієм, тобто, тим, який є не токсичними для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях і є сумісним з іншими інгредієнтами сполуки. Краще, можна додавати один або декілька фармацевтично прийнятних протимікробних засобів. Фенол, м-крезол і бензиловий спирт є кращими фармацевтично прийнятними протимікробними засобами.

[000174] Необов'язково, можна додавати одну або декілька фармацевтично прийнятних солей для доведення іонної сили або тонічності. Можна додавати один або кілька наповнювачів для додаткового доведення ізотонічності складу. Гліцерин, хлорид натрію і маніт є прикладами наповнювачів для доведення ізотонічності.

[000175] Фахівці в даній галузі можуть легко оптимізувати фармацевтично ефективні дози і режими введення для терапевтичних композицій, що містять білки за винаходом, як визначено належною медичною практикою і клінічним станом індивідуального пацієнта. Типовий діапазон доз для білків за цим винаходом може лежати в діапазоні від приблизно 0,01 мг на добу до приблизно 1000 мг на добу (або від приблизно 0,05 мг на тиждень до приблизно 5000 мг на тиждень, що вводяться один раз на тиждень) для дорослого. Краще, доза лежить у діапазоні від приблизно 0,1 мг на добу до приблизно 100 мг на добу (або від приблизно 0,5 мг на тиждень до приблизно 500 мг на тиждень, що вводяться один раз на тиждень), ще краще, від приблизно 1,0 мг/добу до приблизно 10 мг/добу (або від приблизно 5 мг на тиждень до приблизно 50 мг на тиждень, що вводяться один раз на тиждень). Найкраще, доза становить приблизно 1-5 мг/добу (або від приблизно 5 мг на тиждень до приблизно 25 мг на тиждень, що вводяться один раз на тиждень). Прийнятна доза введеного варіанту FGF21, може приводити в результаті до зниження рівнів глюкози в крові і збільшення споживання енергії за допомогою більш швидкої і більш ефективної утилізації глюкози, і таким чином, є придатною для лікування цукрового діабету типу 1 і типу 2, ожиріння і метаболічного синдрому.

[000176] Крім того, оскільки гіперглікемія і стійкість до інсуліну є загальнопоширеними у пацієнтів у критичному стані з парентеральним харчуванням, що вводиться, у деяких ICU вводять інсулін для лікування надлишкової гіперглікемії при харчуванні пацієнтів у критичному стані. Фактично, у недавніх дослідженнях документовано, що використання екзогенного інсуліну для підтримки глюкози в крові на рівні не вище 110 мг на децилітр знижувало захворюваність і смертність серед пацієнтів у критичному стані в хірургічному відділенні інтенсивної терапії, незалежно від того, чи мають вони діабет в анамнезі (Van den Berghet al. N Engl J Med., 345(19):1359, (2001)). Таким чином, білки за цим винаходом унікально прийнятні для того, щоб допомагати відновлювати стабільність метаболізму у пацієнтів в критичному стані з нестабільністю метаболізму. Білки за винаходом, такі як білки, що містять варіанти FGF21, є унікальними в тому, що вони стимулюють поглинання глюкози і підсилюють чутливість до інсуліну, але не індують гіпоглікемію.

[000177] Інший аспект цього винаходу відноситься до білків за винаходом для використання як лікарського засобу для лікування ожиріння, цукрового діабету типу 1 і типу 2, панкреатиту, дисліпідемії, захворювання неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD),

неалкогольного стеатогепатиту (NASH), стійкості до інсуліну, гіперінсулінемії, нестерпності глюкози, гіперглікемії, метаболічного синдрому, гострого інфаркту міокарда, станів, асоційованих з серйозними інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну, та інших порушень метаболізму.

5 Сайт-специфічні мутанти FGF21

[000178] У деяких варіантах здійснення злиті білки за винаходом включають у себе додаткові мутанти FGF21 або аналоги FGF21 з неприродними амінокислотами.

[000179] У деяких варіантах здійснення злиті білки за винаходом містять агоністи FGF21 з однією або декількома з наступних додаткових модифікацій FGF21 дикого типу:

10 [000180] (i) додаткові дисульфідні, неприродні амінокислоти або модифікації для стимуляції димеризації, наприклад, утворення дисульфиду на R154C або введення цистеїну в іншій ділянці, або димеризація за допомогою злитого домена Fc, або формування димера за допомогою зшиваючого засобу, такого як біфункціональний PEG;

[000181] (ii) фрагменти FGF21;

15 [000182] (iii) білки, обрані як такі, що мають активність FGF21 (зв'язуванням з бета-klotho і зв'язуванням і активацією FGFR); і

[000183] (iv) антитіло-міметик FGF21 (різних форматів, таких як Fab, unibody, svFc і т.д.).

20 [000184] У деяких варіантах здійснення злиті білки за винаходом містять один або декілька з наступних лінкерів: простий амідний зв'язок, короткі пептиди (зокрема, повтори Ser/Gly), додаткові залишки від трансльованої послідовності FGF21 або більш довгий лінкер аж до цілого білка (наприклад, Fc домен, пучок HSA-зв'язувальних спіралей, HSA і т.д.). Дві групи можуть бути також зв'язаними іншими хімічними засобами, наприклад, через неприродні амінокислоти або загальноприйняті хімічні лінкери (малеїнімід-Cys, NHS-Lys, click і т.д.).

25 [000185] Інші варіанти здійснення винаходу включають у себе, але без обмеження, наступні приєднання до мономерного або димерного варіанту злитого білка для продовження часу напівжиття: HSA-зв'язувальний ліпід або мала молекула або міцела.

30 [000186] У конкретних варіантах здійснення винаходу можна здійснювати інші приєднання до білків, поліпептидів і/або пептидів за винаходом, для досягнення продовження часу напівжиття та інших поліпшених біологічних властивостей. Вони можуть містити в собі приєднання кон'югатів PEG-холестерин (включаючи міцели і ліпосоми) до білків, поліпептидів і/або пептидів за винаходом, і/або приєднання цукрів (глікозилювання) до білків, поліпептидів і/або пептидів за винаходом. В інших варіантах здійснення подібні способи використовують для додавання до білків, поліпептидів і/або пептидів кон'югатів, наприклад, полісіалової кислоти (PSA), гідроксиетилкрохмалю (HES), альбумінзв'язувальних лігандів або вуглеводних екранів.

35 [000187] Способом HESилування, наприклад, приєднують розгалужені ланцюги гідроксиетилкрохмалю (HES) (60 кДа або 100 кДа, високо розгалужені фрагменти амілопектину з кукурудзяного крохмалю) до білка, поліпептидів і/або пептидів за допомогою відновлювального алкілювання. Полісіалюванням кон'югують що цікавлять білки, поліпептиди і/або пептиди з полімерами полісіалової кислоти (PSA) способом, подібним з пегілюванням. Полімери PSA являють собою негативно заряджені, неімуногенні полімери, які звичайно зустрічаються в організмі і є доступними з молекулярною масою 10-50 кДа.

40 [000188] В інших варіантах здійснення винаходу можна здійснювати інші приєднання до білків, поліпептидів і/або пептидів за винаходом або інші модифікації білків, поліпептидів і/або пептидів за винаходом, для досягнення продовження часу напівжиття та інших поліпшених біологічних властивостей. Вони включають у себе створення груп рекомбінантного PEG (rPEG) і їх приєднання до білків, поліпептидів і/або пептидів за винаходом, як розроблено компанією Amunix, Inc. Спосіб rPEG заснований на білкових послідовностях з подібними PEG властивостями, які генетично зливають з біофармацевтичними засобами, за винятком додаткової стадії хімічної кон'югації. rPEG являють собою ексенатидні конструкції зі збільшеним часом напівжиття, які містять довгий неструктурований хвіст з гідрофільних амінокислот, і які є здатними як збільшувати час напівжиття в сироватці білка або пептиду, так і сповільнювати швидкість його абсорбції, таким чином, значно зменшуючи відношення максимальної дії до залишкового. rPEG мають збільшений гідродинамічний радіус і мають гадану молекулярну масу, що перевищує приблизно в 15 разів їх справжню молекулярну масу, мімікуючи спосіб, яким досягають тривалий час напівжиття в сироватці за допомогою пегілювання.

55 Усічені поліпептиди FGF21

[000189] Один з варіантів здійснення цього винаходу відноситься до усічених форм зрілого поліпептиду FGF21 (SEQ ID NO:3). Цей варіант здійснення цього винаходу виник зі спроби ідентифікації усічених поліпептидів FGF21, здатних забезпечувати активність, подібну з

активністю, і в деяких випадках переважаючи активність неусічених форм зрілого поліпептиду FGF21.

[000190] Як застосовують у цьому документі, термін "усічений поліпептид FGF21" відноситься до поліпептиду FGF21, у якому залишки амінокислот вилучені з аміно-кінця (або N-кінця) поліпептиду FGF21, залишки амінокислот вилучені з карбокси-кінця (або C-кінця) поліпептиду FGF21, або залишки амінокислот вилучені як з аміно-кінця, так і з карбокси-кінця поліпептиду FGF21. Різні усікання, описані в цьому документі, отримані, як описано в цьому документі.

[000191] Активність усічених по N-кінцю поліпептидів FGF21 і усічених по C-кінцю поліпептидів FGF21 можна аналізувати з використанням аналізу *in vitro* фосфо-ERK. Конкретні подробиці аналізів *in vitro*, які можна використовувати для аналізу активності усічених поліпептидів FGF21, можна виявити в прикладах.

[000192] Активність усічених поліпептидів FGF21 за цим винаходом можна оцінювати також в аналізі *in vivo*, наприклад, на мишах *ob/ob*. Загалом, для оцінки активності *in vivo* усіченого поліпептиду FGF21, усічений поліпептид FGF21 можна вводити тварині, що тестується, внутрішньочеревинно. Після бажаного періоду інкубації (наприклад, одна година або більше), можна відбирати зразок крові, і можна вимірювати рівні глюкози в крові.

[000193] а. N-кінцеві усікання

[000194] У деяких варіантах здійснення цього винаходу N-кінцеві усікання містять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 амінокислотних залишків від N-кінця зрілого поліпептиду FGF21. Усічені поліпептиди FGF21, що мають N-кінцеві усікання менше 9 амінокислотних залишків, зберігають здатність зрілого поліпептиду FGF21 знижувати рівень глюкози в крові індивідуума. Відповідно, у конкретних варіантах здійснення, цей винахід відноситься до усічених форм зрілого поліпептиду FGF21 або до варіантів білка FGF21, що мають N-кінцеві усікання 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 амінокислотних залишків.

[000195] b. C-кінцеві усікання

[000196] У деяких варіантах здійснення цього винаходу, C-кінцеві усікання містять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 амінокислотних залишків від C-кінця зрілого поліпептиду FGF21. Усічені поліпептиди FGF21, що мають C-кінцеві усікання менше 13 амінокислотних залишків, мають ефективність щонайменше 50 % ефективності FGF21 дикого типу в аналізі ELK-люциферази *in vitro* (Yie J. et al. FEBS Letts 583:19-24 (2009)), що вказує на те, що ці мутанти FGF21 зберігають здатність зрілого поліпептиду FGF21 знижувати рівень глюкози в крові індивідуума. Відповідно, у конкретних варіантах здійснення цей винахід відноситься до усічених форм зрілого поліпептиду FGF21 або до варіантів білка FGF21, що мають C-кінцеві усікання 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 амінокислотних залишків.

[000197] c. N-Terminal і C-Terminal усікання

[000198] У деяких варіантах здійснення цього винаходу, усічені поліпептиди FGF21 можуть мати комбінацію N-кінцевих і C-кінцевих усікань. Усічені поліпептиди FGF21, що мають комбінацію N-кінцевих і C-кінцевих усікань, розділяють активність відповідних усічених поліпептидів FGF21, що мають тільки N-кінцеві або C-кінцеві усікання. Іншими словами, усічені поліпептиди FGF21, що мають як N-кінцеві усікання менше 9 амінокислотних залишків, так і C-кінцеві усікання менше 13 амінокислотних залишків, мають подібну або більшу активність зниження рівня глюкози в крові, у порівнянні з усіченими поліпептидами FGF21, що мають N-кінцеві усікання менше 9 амінокислотних залишків або усіченими поліпептидами FGF21, що мають C-кінцеві усікання менше 13 амінокислотних залишків. Відповідно, у конкретних варіантах здійснення, цей винахід відноситься до усічених форм варіантів зрілого поліпептиду FGF21 або білка FGF21, що має як N-кінцеві усікання 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 амінокислотних залишків, так і C-кінцеві усікання 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 амінокислотних залишків.

[000199] Як і всі варіанти FGF21 за цим винаходом, усічені поліпептиди FGF21 можуть, необов'язково, містити аміно-кінцевий залишок метіоніну, який можна вводити за допомогою спрямованої мутації або в результаті процесу експресії в бактеріях.

[000200] Усічені поліпептиди FGF21 за цим винаходом можна одержувати, як описано в прикладах, описаних у цьому документі. Звичайні фахівці в даній галузі, знайомі із загальноприйнятими способами молекулярної біології, можуть використовувати ці знання, разом з цим описом, для одержання і використання вкорочених поліпептидів FGF21 за цим винаходом. Загальноприйняті способи можна використовувати для рекомбінантної ДНК, синтезу олігонуклеотидів, культивування клітин і трансформації (наприклад, електропорації, ліпофекції). Див., наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, вище, зміст якого наведено в цьому документі як посилання для всіх цілей. Ферментативні реакції і способи очищення можна здійснювати відповідно до описів виробника, як є загальноприйнятим у даній

галузі, або як описано в цьому документі. Якщо не наведені конкретні визначення, номенклатура, що використовується в цьому зв'язку, і лабораторні процедури та способи аналітичної хімії, синтетичної органічної хімії, і медичної та фармацевтичної хімії, описані в цьому документі, є такими, які добре відомі і загальноприйняті в даній галузі. Загальноприйняті способи можна використовувати для хімічного синтезу; хімічного аналізу; одержання, складання і доставки фармацевтичних засобів; і лікування пацієнтів.

[000201] Усічені поліпептиди FGF21 за цим винаходом можна також зливати з іншою молекулою, яка може надавати додаткові властивості усіченому поліпептиду FGF21. В одному варіанті здійснення цього винаходу, усічений поліпептид FGF21 можна зливати з константним доменом IgG або його фрагментом (наприклад, Fc-областю), людським сироватковим альбуміном (HSA), або альбумінзв'язувальними поліпептидами. Таке злиття можна здійснювати з використанням відомих способів молекулярної біології і/або керівництва, представленого в цьому документі. Переваги цих злитих поліпептидів, так само як способи одержання таких злитих поліпептидів, більш докладно обговорюють у цьому документі.

Злиті білки FGF21

[000202] Як застосовують у цьому документі, термін "злитий поліпептид FGF21" або "злитий білок FGF21" відноситься до злиття одного або декількох амінокислотних залишків (таких як гетерологічний білок або пептид) з N-кінцем або C-кінцем кожного з варіантів білка FGF21, описаних у цьому документі.

[000203] Злиті білки FGF21 можна одержувати злиттям гетерологічних послідовностей або з N-кінцем, або з C-кінцем, наприклад, варіанта білка FGF21, як визначено в цьому документі. Як описано в цьому документі, гетерологічна послідовність може являти собою амінокислотну послідовність або полімер, що не містить амінокислот. Гетерологічні послідовності можна зливати з варіантом білка FGF21 або прямо, або через лінкерну або адаптерну молекулу. Лінкерна або адаптерна молекула може являти собою один або кілька амінокислотних залишків (або -мерів), наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 залишків (або -мерів), краще від 10 до 50 амінокислотних залишків (або -ерів), наприклад, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 залишків (або -мерів), і ще краще, від 15 до 35 амінокислотних залишків (або -мерів). Лінкерну або адаптерну молекулу можна конструювати також з ділянкою розщеплення ДНК рестрикційною ендонуклеазою або з ділянкою для протеази, щоб дозволяти поділ злитих груп.

[000204] Гетерологічні пептиди і поліпептиди включають у себе, але без обмеження, епітоп, що дозволяє детекцію і/або виділення варіанта білка FGF21; трансмембранний рецепторний білок або його частину, таку як позаклітинний домен або трансмембранний і внутрішньоклітинний домен; ліганд або його частина, яка зв'язується з трансмембранним рецепторним білком; фермент або його частина, яка є каталітично активною; поліпептид або пептид, що стимулює олігомеризацію, такий як домен лейцинової блискавки; поліпептид або пептид, що збільшує стабільність, такий як константна область імуноглобуліну; функціональне або нефункціональне антитіло, або його важкий або легкий ланцюг; і поліпептид, що має активність, такий як терапевтична активність, відмінною від активності варіантів білка FGF21 за цим винаходом. Цей винахід відноситься також до мутантів FGF21, злитих з людським сироватковим альбуміном (HSA).

[000205] а. Злиті з Fc білки

[000206] В одному з варіантів здійснення цього винаходу, варіант білка FGF21 є злитим з одним або декількома доменами Fc-області IgG людини. Антитіла містять дві функціонально незалежні частини, варіабельний домен, відомий як "Fab", зв'язувальний антиген, і константний домен, відомий як "Fc", залучений в ефекторні функції, такі як активація комплементу і атака фагоцитуючими клітинами. Fc має тривалий час напівжиття в сироватці, у той час як Fab є короткоживучим (Caron et al., 1989, Nature 337: 525-31). При приєднанні до терапевтичного білка, домен Fc може забезпечувати більш тривалий час напівжиття або вводити такі функції, як зв'язування рецептора Fc, зв'язування білка А, фіксація комплементу і, можливо, навіть перенесення через плаценту (Caron et al., 1989).

[000207] Протягом опису, Fc-FGF21 відноситься до злитого білка, у якому послідовність Fc є злиною з N-кінцем FGF21. Подібним чином, протягом опису, FGF21-Fc відноситься до злитого білка, у якому послідовність Fc є злиною з C-кінцем FGF21.

[000208] Кращими варіантами здійснення винаходу є злиті білки Fc-FGF21, що містять варіанти FGF21, як визначено в цьому документі. Особливо кращими варіантами здійснення є злиті білки Fc-FGF21, що містять модифікований Fc-фрагмент (наприклад, FcLALA) і варіанти FGF21, як визначено в цьому документі.

[000209] Злитий білок можна очищати, наприклад, з використанням афінної колонки з білком А. Виявлено, що пептиди і білки, злиті з Fc-областю, мають значно більший час напівжиття *in vivo*, ніж незлитий еквівалент. А також, злитий білок з Fc-областю дозволяє димеризацію/мультимеризацію злитого поліпептиду. Fc-область може являти собою природну Fc-область або може бути змінена для поліпшення конкретних якостей, таких як терапевтичні якості, час циркуляції або зменшена агрегація.

[000210] Придатні модифікації білкових лікарських засобів за допомогою злиття з доменом "Fc" антитіла докладно обговорюють у Публікації РСТ No. WO 00/024782. У цьому документі обговорюють зв'язування з "носієм", таким як поліетиленгліколь (PEG), декстран або Fc-область.

[000211] b. Лінкери злитих білків

[000212] При одержанні злитих білків за цим винаходом можна, але необов'язково, використовувати лінкер. Коли лінкер присутній, його хімічна структура може не бути критичною, оскільки він служить у першу чергу спейсером. Лінкер може складатися з амінокислот, зв'язаних разом пептидними зв'язками. У деяких варіантах здійснення цього винаходу лінкер складається з 1-20 амінокислот, зв'язаних пептидними зв'язками, де амінокислоти обрані з 20 природних амінокислот. У різних варіантах здійснення 1-20 амінокислот обрані з амінокислот гліцину, серину, аланіну, проліну, аспарагіну, глутаміну і лізину. У деяких варіантах здійснення лінкер складається з більшості амінокислот, що є стерично неутрудненими, такими як гліцин і аланін. У деяких варіантах здійснення лінкери являють собою полігліцини, поліаланіни, комбінації гліцину і аланіну (такі як полі(Gly-Ala)), або комбінації гліцину і серину (такі як полі(Gly-Ser)). У той час як виявлено, що лінкер з 15 амінокислотних залишків діє особливо добре для злитих білків FGF21, цей винахід відноситься до лінкерів будь-якої довжини або складу.

[000213] Лінкери, описані в цьому документі, є ілюстративними, і лінкери, що є набагато більш довгими і містять інші залишки, включені в цей винахід. Непептидні лінкери також включені в цей винахід. Наприклад, можна використовувати алкільні лінкери. Ці алкільні лінкери можна додатково заміщати будь-якими стерично неутрудненими групами, включаючи, але без обмеження, нижчий алкіл (наприклад, C1-C6), нижчий ацил, галоген (наприклад, Cl, Br), CN, NH₂, або феніл. Ілюстративний непептидний лінкер являє собою поліетиленглікольний лінкер, де лінкер має молекулярну масу 100-5000 кДа, наприклад, 100-500 кДа.

[000214] Хімічно модифіковані злиті білки

[000215] Описані в цьому документі хімічно модифіковані форми злитих білків, включаючи, наприклад, усічені форми і форми варіантів злитих білків FGF21, описані в цьому документі, може одержати фахівець у даній галузі, беручи до уваги описи, описані в цьому документі. Такі хімічно модифіковані злиті білки є зміненими так, що хімічно модифікований мутант є відмінним від немодифікованого мутанта, або за типом, або за локалізацією молекул, природно приєднаних до мутанта. Хімічно модифіковані мутанти можуть містити в собі молекули, утворені за допомогою делеції однієї або декількох природно приєднаних хімічних груп.

[000216] В одному з варіантів здійснення, білки за цим винаходом можна модифікувати ковалентним приєднанням одного або декількох полімерів. Наприклад, обраний полімер є, як правило, водорозчинним, так що білок, до якого його приєднують, не осаджується у водному оточенні, такому як фізіологічне оточення. Включені в обсяг цього винаходу придатні полімери являють собою суміш полімерів. Краще, для терапевтичного використання препарату кінцевого продукту, полімер є фармацевтично прийнятним. Нерозчинні у воді полімери, кон'юговані з білками за цим винаходом, також становлять аспект винаходу.

[000217] Кожний з ілюстративних полімерів може мати будь-яку молекулярну масу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кожний з полімерів, як правило, має середню молекулярну масу від приблизно 2 кДа до приблизно 100 кДа (термін "приблизно" вказує на те, що в препаратах водорозчинного полімеру деякі молекули можуть мати масу більше, а деякі менше зазначеної молекулярної маси). Середня молекулярна маса кожного полімеру краще становить між приблизно 5 кДа і приблизно 50 кДа, ще краще, між приблизно 12 кДа і приблизно 40 кДа, і найкраще, між приблизно 20 кДа і приблизно 35 кДа.

[000218] Придатні водорозчинні полімери або їх суміші включають у себе, але без обмеження, N-зв'язані або O-зв'язані вуглеводи, цукри, фосфати, поліетиленгліколь (PEG) (включаючи форми PEG, що використовуються для дериватизації білків, включаючи моно-(C1-C10), алкокси- або арилокси-поліетиленгліколь), монометокси-поліетиленгліколь, декстран (такий як низькомолекулярний декстран, наприклад, приблизно 6 кДа), целюлозу або інші полімери на основі вуглеводів, полі-(N-вінілпіролідон) поліетиленгліколь, гомополімери пропіленгліколю, співполімери поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксиетильовані поліоли (наприклад, гліцерин) і полівініловий спирт. Цей винахід відноситься також до біфункціональних

зшиваючих молекул, які можна використовувати для одержання ковалентно з'єднаних мультимерів варіантів білка FGF21. Цей винахід відноситься також до мутантів FGF21, ковалентно приєднаних до полісіалової кислоти.

[000219] Полісахаридні полімери є іншим типом водорозчинного полімеру, який можна використовувати для модифікації білка. Таким чином, злиті білки за винаходом, злиті з полісахаридним полімером, становлять варіанти здійснення цього винаходу. Декстрини являють собою полісахаридні полімери, що складаються з окремих субодиниць глюкози, краще, зв'язані альфа 1-6 зв'язками. Власне декстран є доступним у багатьох діапазонах молекулярної маси, і є легко доступним з молекулярною масою від приблизно 1 кДа до приблизно 70 кДа. Декстран є придатним водорозчинним полімером для використання як носій окремо або в комбінації з іншим носієм (наприклад, Fc). Див., наприклад, Міжнародну публікацію WO 96/11953. Опубліковане використання декстрану, кон'югованого з терапевтичними або діагностичними імуноглобулінами. Див., наприклад, Європейську Патентну публікацію No. 0315456, зміст якої в такий спосіб наведено як посилання. Цей винахід відноситься також до використання декстрану від приблизно 1 кДа до приблизно 20 кДа.

[000220] Як правило, хімічну модифікацію можна здійснювати в будь-яких прийнятних умовах, що використовуються для реакції білка з молекулою активованого полімеру. Способи одержання хімічно модифікованих поліпептидів, як правило, включають у себе стадії: (a) реакції поліпептиду з молекулою активованого полімеру (такою як реакційноздатне похідне складного ефіру або альдегіду молекули полімеру) в умовах, при яких варіант білка FGF21 стає приєднаним до однієї або декількох молекул полімеру, і (b) одержання продуктів реакції. Оптимальні умови реакції можна визначати на основі відомих параметрів і бажаного результату. Наприклад, чим більше співвідношення молекул полімеру до білка, тим більше відсоток приєднаних молекул полімеру. В одному варіанті здійснення цього винаходу хімічно модифіковані мутанти FGF21 можуть мати одиночну групу молекули полімеру на аміно-кінці (див., наприклад, Патент США No. 5234784).

[000221] В іншому варіанті здійснення цього винаходу білки за винаходом можна хімічно приєднувати до біотину. Потім біотину/білкам за винаходом дозволяють зв'язуватися з авідином, що приводить у результаті до тетравалентних авідину/біотину/білкам за винаходом. Білки за винаходом можна також ковалентно приєднувати до динітрофенолу (DNP) або тринітрофенолу (TNP), і отримані кон'югати преципітувати за допомогою анти-DNP або анти-TNP-IgM з формуванням декамерних кон'югатів з валентністю 10.

[000222] Як правило, стани, які можна полегшувати або модулювати за допомогою введення хімічно модифікованих мутантів FGF21 за цим винаходом, включають у себе стани, описані в цьому документі для білків за винаходом. Однак, хімічно модифіковані мутанти FGF21, описані в цьому документі, можуть мати додаткові види активності, збільшену або зменшену біологічну активність, або інші характеристики, такі як збільшений або зменшений час напівжиття, у порівнянні з немодифікованими мутантами FGF21.

Терапевтичні композиції злитих білків і їх введення

[000223] Цей винахід також відноситься до терапевтичних композицій, що містять один або кілька злитих білків за винаходом, описаних у цьому документі, і в комбінації з фармацевтично або фізіологічно прийнятним засобом для одержання сполуки або фармацевтично прийнятним носієм, обраним за сумісністю зі способом введення. Композиції є конкретно передбаченими у світлі, наприклад, ідентифікації злитих білків, що мають поліпшені властивості.

[000224] У деяких варіантах здійснення терапевтичні композиції одержують у формі придатних для ін'єкції, у формі або рідких розчинів, або суспензій; можна одержувати також тверді форми, придатні для розчинення або суспендування в рідких носіях перед ін'єкцією. Ліпосоми включені у визначення фармацевтично прийнятного носія. У фармацевтичній композиції можуть бути присутні також фармацевтично прийнятні солі, наприклад, солі неорганічних кислот, такі як гідрохлориди, гідроброміди, фосфати, сульфати і т.п.; і солі органічних кислот, такі як ацетати, пропіонати, малонати, бензоати і т.п. Докладне обговорення фармацевтично прийнятних наповнювачів доступно в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkins.

[000225] Придатні для одержання складів матеріали краще є нетоксичними для реципієнтів у дозах і концентраціях, що використовуються.

[000226] Фармацевтична композиція може містити матеріали для одержання сполук для модифікації, підтримки або збереження, наприклад, pH, осмолярності, в'язкості, прозорості, кольору, ізотонічності, запаху, стерильності, стабільності, швидкості розчинення або вивільнення, адсорбції або penetрації композиції. Придатні матеріали для одержання складів включають у себе, але без обмеження, амінокислоти (такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін

або лізин), протимікробні засоби, антиоксиданти (такі як аскорбінова кислота, сульфат натрію або гідросульфат натрію), буфери (такі як борат, бікарбонат, Трис-HCl, цитрати, фосфати або інші органічні кислоти), що надають об'єм засобу (такі як маніт або гліцин), хелатуючі агенти (такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА)), комплексоутворюючі засоби (такі як кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин), наповнювачі, моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи (такі як глюкоза, маноза або декстрини), білки (такі як сироватковий альбумін, желатин, або імуноглобуліни), засоби для фарбування, ароматизації і розведення, емульгатори, гідрофільні полімери (такі як полівінілпіролідон), низькомолекулярні поліпептиди, солеутворюючі протиіони (такі як натрій), консерванти (такі як хлорид бензалконію, бензойна кислота, саліцилова кислота, тимеросал, фенетиловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота або пероксид водню), розчинники (такі як гліцерин, пропіленгліколь, або поліетиленгліколь), цукрові спирти (такі як маніт або сорбіт), суспендуючі засоби, поверхнево-активні речовини або зволожуючі засоби (такі як пліуроніки; PEG; складні ефіри сорбітану; полісорбати, такі як полісорбат 20 або полісорбат 80; тритон; трометамін; лецитин; холестерин або тилоксапал), що збільшують стабільність засобу (такі як сахароза або сорбіт), що збільшують тонічність засобу (такі як галогеніди лужних металів; краще, хлорид натрію або калію; або маніт, сорбіт), носії для доставки, розріджувачі, наповнювачі і/або фармацевтичні ад'юванти (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), і його наступні видання, зміст яких наведено в цьому документі як посилання для всіх цілей).

[000227] Оптимальну фармацевтичну композицію може визначати фахівець у даній галузі в залежності, наприклад, від призначеного способу введення, формату доставки і бажаної дози (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, вище). Такі композиції можуть впливати на фізичний стан, стабільність, швидкість вивільнення *in vivo*, і швидкість виведення *in vivo* злитого білка за винаходом.

[000228] Первинний наповнювач або носій у фармацевтичній композиції може бути водним або неводним по природі. Наприклад, придатний наповнювач або носій для ін'єкції може являти собою воду, фізіологічний сольовий розчин або штучну спинномозкову рідину, можливо, доповнені іншими матеріалами, загальноприйнятими в композиціях для парентерального введення. Нейтральний забуферений сольовий розчин або сольовий розчин, змішаний з сироватковим альбуміном, є додатковими ілюстративними носіями. Інші ілюстративні фармацевтичні композиції містять Трис буфер з рН приблизно 7,0-8,5, або ацетатний буфер з рН приблизно 4,0-5,5, які можуть додатково містити сорбіт або придатний замітник. В одному варіанті здійснення цього винаходу, фармацевтичні композиції з подвійною функцією можна одержувати для зберігання за допомогою змішування обраної композиції, що має бажаний ступінь чистоти, з необов'язковими засобами для одержання сполуки (Remington's Pharmaceutical Sciences, вище) у формі ліофілізованого осаду або водного розчину. Крім того, білковий продукт з подвійною функцією можна складати у формі ліофілізату з використанням придатних наповнювачів, таких як сахароза.

[000229] Фармацевтичні композиції, що містять злиті білки за винаходом, можна вибирати для парентеральної доставки. Альтернативно, композиції можна вибирати для інгаляції або для доставки через травний тракт, наприклад, перорально. Одержання таких фармацевтично прийнятних композицій перебуває в компетенції фахівців у даній галузі.

[000230] Компоненти сполуки присутні в концентраціях, які є прийнятними в ділянці введення. Наприклад, буфери використовують для підтримки композиції при фізіологічному рН або трохи більш нижчому рН, як правило, у діапазоні рН від приблизно 5 до приблизно 8.

[000231] Коли передбачено парентеральне введення, терапевтичні композиції для використання за цим винаходом можуть перебувати у формі апірогенного, прийнятного для парентерального введення, водного розчину, що містить бажаний білок з подвійною функцією у фармацевтично прийнятному носії. Особливо придатним носієм для парентеральної ін'єкції є стерильна дистильована вода, у якій білок з подвійною функцією складають у формі стерильного, ізотонічного розчину, що містить відповідні консерванти. Інший спосіб одержання може містити в собі складання бажаної молекули з таким засобом, як придатні для ін'єкції мікросфери, частинки, що біорозкладаються, полімерні сполуки (такі як полімолочна кислота або полігліколева кислота), бусини або ліпосоми, що забезпечують контрольоване або вповільнене вивільнення продукту, які потім можна доставляти за допомогою ін'єкції-депо. Можна використовувати також гіалуронову кислоту, і це може виявляти ефект, що сприяє продовженій присутності в кровотоці. Інші придатні засоби для введення бажаної молекули включають у себе пристрої, що піддаються імплантації, для доставки лікарських засобів.

[000232] В одному варіанті здійснення фармацевтичну композицію можна складати для інгаляції. Наприклад, білок з подвійною функцією за винаходом можна складати у формі сухого порошку для інгаляції. Можна також складати розчини для інгаляції білка з подвійною функцією з пропелентом для аерозольної доставки. В іншому варіанті здійснення розчини можна розпорошувати. Введення в легені додатково описано в Міжнародній публікації No. WO 94/20069, де описана доставка в легені хімічно модифікованих білків.

[000233] Передбачено також, що конкретні складки можна вводити перорально. В одному варіанті здійснення цього винаходу злиті білки за винаходом, які вводять цим способом, можна складати в присутності або під час відсутності цих носіїв, що зазвичай використовуються в одержанні твердих лікарських форм, таких як таблетки і капсули. Наприклад, може бути розроблена капсула для вивільнення активної частини складу в той момент у шлунково-кишковому тракті, коли біодоступність є максимізованою, а пресистемна деградація є мінімізованою. Можна включати додаткові засоби для полегшення абсорбції злитих білків за винаходом. Можна використовувати також розріджувачі, ароматизуючі засоби, легкоплавкі воски, рослинні олії, змазувальні засоби, суспендуючі засоби, засоби, що дезінтегрують таблетку, і зв'язувальні речовини.

[000234] Інша фармацевтична композиція може включати ефективну кількість злитих білків за винаходом в суміші з нетоксичними наповнювачами, придатними для виготовлення таблеток. Розчиненням цих таблеток у стерильній воді або іншому прийнятному наповнювачі можна одержувати розчини у формі одиної дози. Прийнятні наповнювачі включають у себе, але без обмеження, інертні розріджувачі, такі як карбонат кальцію, карбонат або бікарбонат натрію, лактоза або фосфат кальцію; або зв'язувальні речовини, такі як крохмаль, желатин або аравійська камедь; або змазувальні засоби, такі як стеарат магнію, стеаринова кислота або тальк

[000235] Додаткові фармацевтичні композиції, що містять злиті білки за винаходом, очевидні фахівцям у даній галузі, включаючи складки, що включають злиті білки за винаходом в складах з уповільненою або контрольованою доставкою. Способи складання безлічі інших засобів для вповільненої або контрольованої доставки, таких як ліпосомні носії, мікрочастинки, що біорозкладаються, або пористі бусини та ін'єкції-депо, також відомі фахівцям у даній галузі (див., наприклад, Міжнародну публікацію No. WO 93/15722, у якій описано контрольоване вивільнення з пористих полімерних мікрочастинок для доставки фармацевтичних композицій, і Wischke & Schwendeman, 2008, Int. J Pharm. 364: 298-327, і Freiberg & Zhu, 2004, Int. J Pharm. 282: 1-18, у яких обговорюють одержання і використання мікросфер/мікрочастинок).

[000236] Додаткові приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають у себе напівпроникні полімерні матрикси у формі сформованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Матрикси для вповільненого вивільнення можуть містити в собі полієфіри, гідрогелі, полілактиди (Патент США No. 3773919 і Європейський патент No. 0 058 481), співполімери L-глутамінової кислоти і гамма-етил-L-глутамату (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22: 547-56), полі(2-гідроксиетил-метакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 і Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), етиленвінілацетат (Langer et al., вище) або полі-D-3-гідроксиолійну кислоту (Європейський Патент No. 0 133 988). Композиції з уповільненим вивільненням можуть містити в собі також ліпосоми, які можна одержувати кожним з декількох способів, відомих у даній галузі. Див., наприклад, Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-92; і Європейські патенти No. 0036676, 0088046, і 0143949.

[000237] Фармацевтичні композиції за винаходом, призначені для використання шляхом введення in vivo, як правило, повинні бути стерильними. Це можна здійснювати фільтрацією через мембрани для стерилізації фільтрацією. Коли композиція є ліофілізованою, стерилізацію з використанням цього способу можна проводити або до, або після ліофілізації і розведення. Композицію для парентерального введення можна зберігати в ліофілізованій формі або в розчині. Крім того, парентеральні композиції звичайно поміщають у контейнер, що має стерильний отвір для доступу, наприклад, мішок для внутрішньовенного розчину або флакон, що має пробку, яка проколюється голкою для підшкірної ін'єкції.

[000238] Після приготування фармацевтичної композиції її можна зберігати в стерильних флаконах у формі розчину, суспензії, гелю, емульсії, твердої речовини або дегідратованого або ліофілізованого порошку. Такі складки можна зберігати або в готовій для використання формі, або у формі (наприклад, ліофілізованій), що вимагає розведення перед введенням.

[000239] У конкретному варіанті здійснення, цей винахід відноситься до наборів для одержання одиниці введення однократної дози. Кожний з цих наборів може містити як перший контейнер, що містить висушений білок, так і другий контейнер, що містить водний склад. В

обсяг цього винаходу включені також набори, що містять одно- і мультикамерні попередньо заповнені шприци (наприклад, шприци з рідиною і шприци з ліофілізатом).

Дози злитих білків і їх введення

[000240] Ефективна кількість фармацевтичної композиції за винаходом для терапевтичного використання, може залежати, наприклад, від терапевтичного контексту і терапевтичних цілей. Фахівцеві в даній галузі зрозуміло, що прийнятні для лікування рівні дозування можуть, таким чином, залежати, частково, від молекули, що доставляється, показання, для якого використовують варіант злитого білка, способу введення і розміру (маси тіла, поверхні тіла або розміру органа) і стану (віку і загального стану здоров'я) даного пацієнта. Відповідно, клініцист може титрувати дозу і модифікувати спосіб введення для одержання оптимального терапевтичного ефекту. Типова доза може лежати в діапазоні від приблизно 0,1 мкг/кг аж до приблизно 100 мг/кг або більше, залежно від вищезгаданих факторів. В інших варіантах здійснення доза може лежати в діапазоні від 0,1 мкг/кг до приблизно 100 мг/кг; або від 1 мкг/кг до приблизно 100 мг/кг.

[000241] Частота дозування може залежати від фармакокінетичних параметрів білка з подвійною функцією у складі, що використовується. Як правило, клініцист вводить композицію до досягнення дози, що дає бажаний ефект. Таким чином, композицію можна вводити у формі однократної дози, у формі двох або більше доз (які можуть містити або не містити однакову кількість бажаної молекули) протягом часу або у формі безперервної інфузії за допомогою імплантованого пристрою або катетера. Додаткове уточнення прийнятої дози фахівці в даній галузі виконують у загальноприйнятний спосіб, і воно перебуває в їхній звичайній компетенції. Прийнятні дози можна уточнювати з використанням відповідних даних доза-відповідь.

[000242] Спосіб введення фармацевтичної композиції узгоджується з відомими способами, наприклад, перорально, за допомогою ін'єкції внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним, інтрацеребральним (інтрапаренхімальним), інтрацеребровентрикулярним, внутрішньом'язовим, внутрішньоартеріальним, інтрапортальним або внутрішньоосередковим способами; за допомогою систем для вповільненого вивільнення (які можна також ін'єциувати); або за допомогою пристроїв, що імплантуються. Якщо бажано, композиції можна вводити за допомогою болюсної ін'єкції або безупинно за допомогою інфузії або за допомогою імплантованого пристрою.

[000243] Альтернативно або додатково, композицію можна вводити місцево за допомогою імплантації мембрани, губки або іншого прийнятного матеріалу, у якому була абсорбована або інкапсульована бажана молекула. При використанні пристрою, що імплантується, цей пристрій можна імплантувати у будь-які прийнятні тканину або орган, і доставку бажаної молекули можна здійснювати за допомогою дифузії, болюса з вивільненням у певний час або безперервного введення.

Терапевтичні застосування злитих білків

[000244] Білки за винаходом можна використовувати для лікування, діагностики, полегшення або запобігання ряду захворювань, порушень або станів, включаючи, але без обмеження, порушення метаболізму. В одному варіанті здійснення порушення метаболізму, що підлягає лікуванню, являє собою діабет, наприклад, цукровий діабет типу 2. В іншому варіанті здійснення, порушення метаболізму являє собою ожиріння. Інші варіанти здійснення включають у себе такі стани або порушення метаболізму, як цукровий діабет типу 1, панкреатит, дисліпідемія, захворювання неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD), неалкогольний стеатогепатит (NASH), стійкість до інсуліну, гіперінсулінемія, нестерпність глюкози, гіперглікемія, метаболічний синдром, гіпертензія, серцево-судинне захворювання, гострий інфаркт міокарда, атеросклероз, хвороба периферичних артерій, інсульт, серцева недостатність, коронарна хвороба серця, захворювання нирок, ускладнення діабету, невропатія, порушення, асоційовані з серйозними інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну, гастропарез та інші порушення метаболізму.

[000245] При застосуванні, порушення або стан, такий як цукровий діабет типу 1 або типу 2, або ожиріння, можна лікувати введенням варіанта білка FGF21, як описано в цьому документі пацієнту, що потребує цього, у кількості терапевтично ефективної дози. Введення можна проводити, як описано в цьому документі, наприклад, за допомогою IV ін'єкції, внутрішньоочеревинної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, або перорально у формі таблетки або рідкого складу. У більшості випадків, бажану дозу може визначати клініцист, як описано в цьому документі, і вона може являти собою терапевтично ефективну дозу мутантного поліпептиду FGF21. Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що терапевтично ефективна доза мутантного поліпептиду FGF21 може залежати, серед іншого, від розкладу введення, однократної дози антигену, що вводиться, від того, чи вводять молекулу нуклеїнової кислоти або поліпептид у

комбінації з іншими лікарськими засобами, від імунного статусу і стану здоров'я реципієнта. Термін "терапевтично ефективна доза", як застосовують у цьому документі, означає ту кількість мутантного поліпептиду FGF21, яка викликає біологічну або медичну відповідь у системі тканини, у тварини або у людини, як вважає дослідник, лікар або інший клініцист, що включає в себе полегшення симптомів захворювання або порушення, що підлягає лікуванню.

[000246] При наявності докладно описаного зараз цього винаходу, його можна більш ясно зрозуміти з посиланням на наступні приклади, які наведені в цьому документі тільки з метою ілюстрації і не призначені для обмеження винаходу.

[000247] У практичному здійсненні цього винаходу можна використовувати, якщо не зазначено інакше, загальноприйняті способи хімії, біохімії, молекулярної біології, імунології і фармакології, відомі в даній галузі. Такі способи повністю пояснені в літературі. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); i Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); i Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989).

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Одержання варіантів білків FGF21

[000248] Експресуюча конструкція для FGF21 V76: варіанти FGF21 клонували в модифікований вектор експресії для E.coli pET30a, описаний Achmuller et al. (2007) (Nature Methods 4:1037-1043), для одержання злитих білків у рамці з гекса-гістидиновою міткою з наступною міткою N^{pro}-EDDIE на N-кінці FGF21 (ак 33-209).

[000249] Експресія і очищення FGF21 V76: експресуючою плазмідною pET30a-His-N^{pro}-EDDIE-FGF21 трансформували компетентні клітини E. coli BL21Star (DE3) (Invitrogen). Клітини, що вирости протягом ночі, з окремої колонії свіжотрансформованих клітин переносили в 50 мл Terrific Broth (TB), що містить 50 мкг/мл канаміцину при 37 °C. Попередню культуру переносили в 1 л середовища TB з канаміцином і культивували в колбах з відбивачами при 37 °C з погойдуванням при 250 об./хв. Після 6 годин культивування, експресію FGF21 індукували додаванням IPTG у кінцевій концентрації 1 мМ, і культури вирощували протягом ночі при 37 °C. Потім клітини збирали і ресуспендували в 50 мл крижаного буфера для лізису; 50 мМ Трис-HCl, pH 8, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, з наступним лізисом з використанням мікрофлюїдизатора™.

[000250] Тільця включення (IB) осаджували центрифугуванням при 30000×g протягом 1 години при 4 °C. IB промивали 50 мМ Трис-HCl, pH 8, 150 мМ NaCl і потім розчиняли в 30 мл буфера для розчинення; 10 мМ Трис-HCl, pH 8, 100 мМ NaH₂PO₄, 6 М GnHCl. Розчинені IB висвітлювали центрифугуванням при 30000×g протягом 1 години при 25 °C. Розчин IB наносили на 5 мл стовпчик високоефективної смоли Ni-NTA (GE Healthcare), урівноважений буфером для розчинення. Білки, що зв'язалися зі смолою, елюювали зменшенням pH до 4,5. Елюат модифікували доведенням pH і додаванням дитіотреїтолу (DTT) у концентрації 20 мМ. Модифікований елюат повільно розводили в 1 л буфера для перезгортання; 50 мМ Трис-HCl, pH 8, 0,5 М аргінін, 20 мМ DTT, з наступною інкубацією протягом 2 діб при 4 °C. Розведений зразок концентрували, і буфер міняли на 20 мМ Трис-HCl, pH 9 з використанням способу ультрафільтрації. Концентрований зразок наносили на 10 мл стовпчик зі смолою Q сефароза fast flow (GE Healthcare), урівноваженої за допомогою 20 мМ Tri-HCl (pH9).

[000251] Після промивання смоли буфером для зрівноважування, білки, що зв'язалися зі смолою, елюювали 20 мМ Трис-HCl, pH 9, 500 мМ NaCl. Для видалення відщепленого фрагмента злитого білка His-N^{pro} і всього нерозщепленого злитого білка від повторно згорнутого білка FGF21, елюат наносили на 5 мл стовпчик з високоефективною смолою Ni-NTA, урівноваженою 20 мМ Трис, pH 8,0, 50 мМ імідазолом, і фракцію проскакування, що містить FGF21, збирали. Для зменшення рівнів ендотоксинів, фракцію FGF21 обробляли смолою EndoTrap HD (Hyglos), урівноваженою 10 мМ Трис, pH 8, 50 мМ імідазолом, 500 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂. Зразок з низьким вмістом ендотоксинів діалізували проти PBS і потім стерилізували за допомогою фільтра 0,22 мкм. Очищений білок FGF21 швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80 °C. Концентрацію білка визначали за оптичною щільністю при 280 нм з використанням 9362 M⁻¹ cm⁻¹ як молярного коефіцієнта поглинання для FGF21. Чистоту і цілісність білка визначали за допомогою HPLC, SDS-PAGE і рідинної хроматографії-мас-спектрометрії.

[000252] Пегілювання варіантів FGF21 за допомогою цистеїну: Варіант V76 FGF21 (R154C) варіант мав тенденцію до димеризації через сконструйований цистеїн; таким чином, перед пегілюванням розчин білка (як правило, 5 мг/мл у Трис буфері) м'яко відновлювали за допомогою 5 мМ меркаптоетиламіну протягом 30 хвилин на льоду і негайно знесолювали в 20

мМ Трис, рН 7. Потім свіжовідновлений білок (як правило, 3 мг/мл) негайно пегілювали 1,5 еквівалентами реагенту 40 кДа розгалужений малеїмідо-PEG (NOF, кат. # GL2-400MA із серій Sunbright) протягом 3 годин на льоду. Нарешті, пегілюваний білок очищали аніонообмінною хроматографією (MonoQ) із загальним виходом приблизно 25 %.

5 [000253] Експресуючі конструкції для варіантів злитого білка Fc-FGF21: кДНК для варіантів людського FGF21, кодуючі амінокислоти 33-209, клонували у вектор експресії для ссавців нижче промотору цитомегаловірусу (CMV) в одній рамці з N-кінцевими послідовностями, включаючи лідерний пептид (каппа-ланцюга імунoglobуліну) для керування секрецією білків, з Fc-доменом і коротким лінкером, що слідує за ним.

10 [000254] Експресія і очищення варіантів Fc-FGF21: варіанти білків Fc-FGF21 експресували в клітинах HEK293T (Американська колекція типових культур). Клітини вирощували в суспензійній культурі при 37 °C, 8 % CO₂, у середовищі для експресії Freestyle 293 (Invitrogen, кат. #12338-018) до дня трансфекції. Клітини центрифугували при 1000×g протягом 7 хв у бакет-роторі і підраховували з використанням автоматичного лічильника клітин. Клітини розводили в 900 мл середовища Freestyle 293 до кінцевої концентрації 1,4×10⁶ клітин/мл і поміщали в 3 л колбу без відбивачів (Corning, Cat. #431252). Клітини трансфіціювали з використанням суміші поліетиленіміну (PEI) і плазмідів в такий спосіб. Три мл стерильного вихідного розчину 1 мг/мл лінійного PEI, M.W. 25000, (Alfa Aesar, кат.#43896) додавали до 50 мл середовища Freestyle 293, обережно перемішували та інкубували при 25 °C протягом 5 хвилин. У той же час, 1 мг вільної від ендотоксину плазмідів додавали до 50 мл середовища Freestyle 293 і стерилізували фільтруванням з використанням фільтра 0,22 мкм. Потім суміш PEI додавали до стерильної фільтрованої ДНК, обережно перемішували і залишали для інкубації при 25 °C протягом 10 хвилин. Потім суміш PEI-плазмідів додавали в 3 л колбу, що містить розведені клітини HEK 293T і поміщали в інкубатор з погойдуванням при 125 об./хв, 37 °C, 8 % CO₂.

25 [000255] На добу 6 після трансфекції клітини центрифугували при 2000×g протягом 10 хвилин і збирали супернатант. Супернатант додатково висвітлювали фільтрацією через фільтр 0,8/0,2 мкм (Pall Corporation, кат. #4628).

[000256] Періодичне очищення білка FGF21 виконували за допомогою додавання 1 мл сефарози Fast Flow з рекомбінантним білком А (GE, кат. #17-5138-03), на 20 мг очікуваного білка, що підлягає очищенню, безпосередньо до висвітленого супернатанту та інкубації протягом 1 години при 4 °C з обережним обертанням. Потім суміш супернатанта заливали в одноразову хроматографічну колонку Poly-Prep (Bio-Rad, кат. #731-1550), і проскакування викидали. Бусини, що залишилися, промивали 5 об'ємами колонки DPBS, рН 7,4 (Invitrogen, кат. #14190-144). Елюцію білка з бусин з білком А виконували за допомогою додавання 20 об'ємів колонки буфера 50 мМ цитрату натрію, рН 3,0. Буфер для елюції нейтралізували додаванням 20 % буфера Трис-НСІ, рН 9,0. Ексклюзійну хроматографію проводили як стадію вторинного додаткового очищення за допомогою пропущення матеріалу після періодичного очищення з білком А через колонку High Load 26/600 Superdex 200 pg (GE, кат. #28-9893-36). Вихід очищеного білка оцінювали кількісно як А280. Проводили SDS-Page для верифікації чистоти і молекулярної маси. Рівень ендотоксинів оцінювали кількісно з використанням системи Endosafe PTS (Charles River Labs).

Приклад 2: Вимірювання залежного від FGF21 поглинання 2-дезоксиглюкози (2-DOG)

[000257] Показано, що FGF21 стимулює поглинання глюкози в адипоцитах миші 3T3-L1 у присутності і під час відсутності інсуліну, і зменшує рівні глюкози, тригліцеридів і глюкагону в крові після їжі і натще в ob/ob і db/db мишей, і пацюків ZDF у віці 8 тижнів залежним від дози способом, таким чином, надаючи основу для використання FGF21 як лікарського засобу для лікування діабету і ожиріння (див., наприклад, патентну публікацію WO03/011213, і Kharitonov et al., (2005) Jour, °F Clinical Invest. 1 15:1627-1635). Спостерігали також, що FGF21 стимулює фосфорилування тирозину FGFR-1 і FGFR-2 в адипоцитах 3T3-L1.

50 [000258] Фібробласти 3T3-L1 закуповували з ATCC (кат. # CL173). Клітини вирощували до конфлюентності в чашках Петрі 150 см і підтримували в DMEM з високим вмістом глюкози (Invitrogen, кат. # 11995065), доповненої 10 % ембріональною бичачою сироваткою і 1 % пеніциліном-стрептоміцином, протягом додаткових 4 діб. Потім клітини піддавали диференціюванню у вищевказаному середовищі, доповненому 4 мкг/мл інсуліну (Sigma, кат. #I-5500), 115 мкг/мл IBMX (Sigma, кат. #I5879) і 0,0975 мкг/мл дексаметазону (Sigma, кат. #D1756) протягом 3 діб, після чого середовище для диференціювання заміняли на повну DMEM. Один планшет диференційованих 3T3-L1 адипоцитів розсівали в чотири 96-ямкових планшета через добу після заміни середовища.

60 [000259] Потім адипоцити обробляли FGF21-WT і варіантом білка FGF21 (див. список варіантів у таблиці 2; 30 пМ - 100 нМ являє собою звичайний використовуваний діапазон

концентрацій) протягом ночі в повному середовищі. Зразки адипоцитів, оброблених FGF21, піддавали голодуванню по сироватці в 50 мкл на лунку буфера KRH (0,75 % NaCl; 0,038 % KCl; 0,0196 % CaCl₂; 0,032 % MgSO₄; 0,025 M HEPES, pH 7,5; 0,5 % BSA; 2 mM піруват натрію) протягом 2 годин. У лунки для нуля додавали 1 мкл (кінцева концентрація 5 мкг/мл) цитохалазину В на 15 хв. [3H]-2-DOG (20,6 мКи/моль (762,2 МБк/мл), 1 мКи/мл (37 МБк/мл)) розводили 1:20 в 5,1 mM холодному 2-DOG і додавали 1 мкл розведеного 2-DOG на лунку, і клітини інкубували протягом 5 хв. Клітини промивали 100 мкл/лунку буфера KRH три рази. 40 мкл/лунку 1 % SDS додавали до клітин, і клітини струшували протягом щонайменше 10 хвилин. Додавали 200 мкл/лунку сцинтиляційної рідини, і планшети струшували протягом ночі і зчитували в бета-лічильнику для мікропланшетів. Значення, отримані для цілого стовпця/ряду, оброблених цитохалазином В, усереднювали і віднімали з усіх інших значень. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism, результати чого узагальнено в таблиці 2. Варіанти злитого білка Fc-FGF21 V101, V103 і V188 перевершували пегільований варіант FGF21 V76 по індукції поглинання 2-дезоксиглюкози адипоцитами 3T3L1 миші.

Приклад 3: pERK у Вестерн-аналізі клітин (ICW)

[000260] Клітини HEK293, стабільно трансфіційовані β -klotho людини, культивовані в DMEM з високим вмістом глюкози, 10 % FBS, 1 % PS і 600 нг/мол G418, розсівали в покриті полі-D-лізином 96-ямкові планшети (BD bioscience, кат. #356640) при 30000 клітин на лунку протягом ночі. Клітини піддавали голодуванню по сироватці в DMEM з високим вмістом глюкози, 0,5 % BSA і 10 mM HEPES протягом 4 годин. WT FGF21 і варіанти FGF21 (див. список варіантів у таблиці 3) розводили до різних концентрацій (100 nM - 300 nM являє собою звичайний використовуваний діапазон концентрацій) у середовищі для голодування. Клітини стимулювали FGF21 протягом 10 хвилин. Після стимуляцією FGF21 або варіантами білка FGF21, середовище відбирали з лунок, і клітини промивали один раз 100 мкл холодного PBS і потім фіксували за допомогою 100 мкл 4 % формальдегіду протягом 15 хвилин при кімнатній температурі і потім додатково інкубували 10 хвилин зі 100 мкл крижаного метанолу.

[000261] Після фіксації клітини промивали 0,3 % Тритон X-100 в PBS чотири рази, 5 хвилин кожний. 150 мкл блокувального буфера Odyssey додавали до пермеабілізованих клітин при кімнатній температурі протягом 1,5 годин. Антитіло проти фосфо-ERK (pERK) розводили до концентрації 0,17 мкг/мл (розведення 1:200 або зазначені розведення), і антитіло проти тотального ERK (tERK) розводили до концентрації 2,2 мкг/мл (розведення 1:200 або зазначені розведення) у блокувальному буфері Odyssey. 50 мкл додавали в кожну лунку, крім одного стовпця, який обробляли тільки вторинним антитілом для нормалізації по фоні. Планшет накривали вологим паперовим рушником і кришкою для запобігання випаровуванню і потім інкубували при 4 °C протягом ночі.

[000262] Потім первинне антитіло відбирали, і клітини промивали чотири рази 0,3 % Твін 20 в PBS протягом 5 хвилин кожний. Під час відмивання підготовлювали реакційну суміш для вторинного антитіла в блокувальному буфері Odyssey, що містить розведене 1:1000 (або в зазначених розведеннях) антитіло кози проти антитіл миші з Alexa 680 і розведене 1:1000 (або в зазначених розведеннях) антитіло кози проти антитіл кролика з IRDye800. Після завершення відмивання, 40 мкл реакційної суміші додавали в кожну лунку. Планшети накривали чорною кришкою для захисту вторинного антитіла від світла, і інкубували планшети при кімнатній температурі протягом 1 години на струшувачі. Нарешті, клітини знову промивали чотири рази 0,3 % Твін 20 в PBS протягом 5 хвилин кожний і потім сканували в системі візуалізації LI-COR Bioscience Odyssey Infrared (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) у каналах 700 нм (червоному) і 800 нм (зеленому). Alexa 680 офарблював tERK за допомогою флуоресценції в дальньому червоному діапазоні (довжина хвилі випромінювання 668 нм), у той час як IRDye800 офарблював pERK за допомогою зеленої флуоресценції (довжина хвилі випромінювання 800 нм). Для виключення флуоресцентного фону, значення, отримані для цілого стовпця/ряду, обробленого тільки вторинним антитілом, усереднювали і віднімали з усіх інших значень, отриманих для планшета. Для нормалізації кількості pERK, присутнього в кожному зразку, значення для pERK у кожній лунці ділили на значення для tERK. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism, результати чого узагальнено в таблиці 2. Варіанти злитого білка Fc-FGF21 V101, V103 і V188 перевершували пегільований варіант FGF21 V76 у цьому аналізі фосфорилування ERK.

Таблиця 2

Узагальнення результатів для ERK у Вестерн-аналізі клітин і поглинання глюкози адипоцитами 3T3L1 миші

ID варіанта FGF21	pERK (HEK293/β-klotho людини) EC50±SEM	поглинання глюкози (адипоцити 3T3L1 миші) EC50±SEM
V76	13±4 нМ (n=5)	5±1 нМ (n=3)
V101	0,60±0,06 нМ (n=5)	0,60±0,06 нМ (n=3)
V103	0,9±0,3 нМ (n=5)	0,60±0,07 нМ (n=3)
V188	0,4±0,1 нМ (n=3)	0,48±0,14 нМ (n=3)

Приклад 4: Тести варіантів FGF21 in vivo

5 [000263] Миша ob/ob являє собою модель на мишах діабету типу 2. Миші позбавлені функціонального лептину і характеризуються гіперглікемією, стійкістю до інсуліну, гіперфагією, гепатостеатозом і ожирінням. Самців мишей ob/ob (у віці 10-13 тижнів) використовували для вимірювання ефекту на рівень глюкози в крові наступних пегільованого варіанта V76 FGF21 і варіантів V101, V103 і V188 злитого білка Fc-FGF21.

10 [000264] Варіанти FGF21 або носій PBS вводили s.c. при 1 мг/кг (V101, V103 і V188) або s.c. при 5 мг/кг V76 двічі на тиждень 12 діб (усього 4 дози). На першу добу дослідження вимірювали рівень глюкози в крові з хвоста і масу тіла, і мишей розподіляли в різні групи (n=8 на групу) з середнім рівнем глюкози і масою тіла, що збігаються у групі. Рівень глюкози в крові вимірювали з використанням глюкометра (OneTouch). Рівень інсуліну в плазмі вимірювали на добу 1 перед дозуванням і на добу 12, через 24 години після останньої дози. Результати цих досліджень

15 підсумовано в таблиці 5.
[000265] Результати цих досліджень підсумовано в таблиці 3 і на фігурах 1-3. Варіанти V101, V103 і V188 злитого білка Fc-FGF21 перевершували пегільований варіант V76 FGF21 у кожній кінцевій точці, що вимірюється в цих дослідженнях і при меншій у п'ять разів дозі.

Таблиця 3

% змін у порівнянні з носієм рівнів глюкози, інсуліну в плазмі, збільшення маси тіла (BW), рівнів TG/ліпідів у печінці за допомогою варіантів FGF21 у ході 12-добових дослідженнях на мишах ob/ob.
Узагальнення 12-добового дослідження лікування мишей ob/ob з діабетом
(% змін у порівнянні з носієм)

ID варіанта FGF21	Доза (мг/кг)	Загальний рівень глюкози (AUC)	Рівень інсуліну в плазмі	Маса тіла	Рівень ліпідів у печінці
V76	5,0	-42 %	-46 %	-7 %	-30 %
V101	1,0	-53 %	-82 %	-12 %	-44 %
V103	1,0	-46 %	-69 %	-12 %	-50 %
V188	1,0	-42 %	-59 %	-11 %	-51 %

Приклад 5: Фармакокінетика варіантів злитих білків FGF21 у мишей

20 [000266] Для визначення фармакокінетичного профілю варіантів V101, V103 і V188 злитих білків Fc-FGF21, мишам C57BL/6J ін'єціювали IV 1 мг/кг речовини, що тестується, і відбирали кров у різних тимчасових точках аж до 16 діб (384 години). Зразки крові збирали в покриті ЕДТА пробірки-мікроконтейнери з підщелепної або ретроорбітальної мережі. Приблизно 50 мкл крові відбирали в кожній тимчасовій точці, одержуючи ~ 25 мкл плазми.

25 [000267] Для вимірювання концентрацій у плазмі речовин, що тестуються, за допомогою ELISA, 384-ямкові планшети покривали протягом ночі при кімнатній температурі (RT) 2 мкг/мл поліклонального антитіла кози проти Fc-гамма людини (30 мкл/лунку) і потім блокували розріджувачем на основі казеїну протягом 2 годин при RT (100 мкл/лунку). Розведені зразки, стандарти і контроль додавали в планшет (30 мкл/лунку) і інкубували протягом 2 годин при RT. Після видалення зразків, лунки промивали 3 рази розчином для промивання на основі фосфату (100 мкл/лунку). Антитіло для детекції, мічений HRP варіант антитіла для зв'язування, додавали

в планшет і інкубували протягом 1 години при RT (30 мкл/лунку). Після того, як планшет знову промивали 3 рази розчином для промивання на основі фосфату (100 мкл/лунку), додавали хемілюмінесцентний субстрат (30 мкл/лунку) і люмінесценцію планшета зчитували в межах 5 хвилин з використанням прийнятого зчитувача для планшетів. Як показано на фігурах 4А і 4В, варіанти злитого білка Fc-FGF21 мали набагато збільшений час напівжиття в плазмі у порівнянні з відомими в даній галузі злитими білками Fc-FGF21 (Фігура 4А) і у порівнянні з пегільованим варіантом V76 FGF21 (Фігура 4В).

[000268] Рівні в сироватці речовин Fc-FGF21, що тестуються, підтверджували Вестерн-блоттингом для порівняння з рівнями, виміряними за допомогою ELISA, щоб переконалися, що повнорозмірний варіант Fc-FGF21, а не один Fc детектований за допомогою ELISA. Два мкл сироватки крові миші поєднували з 2,5 мкл 4Х буфера для нанесення, 1 мкл 10Х денатуруючого засобу і 4 мкл dH₂O, нагрівали до 95 °С протягом 5 хвилин, наносили в 4-12 % градієнтний поліакриламідний гель і піддавали електрофорезу протягом 1 години при 100 вольт (постійна напруга). Зразки переносили на нітроцелюлозний фільтрувальний папір за допомогою Вестерн-блоттингу з використанням системи iblot (Invitrogen, кат. #IB1001, час перенесення 7 хвилин). Нітроцелюлозні фільтри блокували за допомогою 30 мл блокувального розчину Rockland (кат. #MB-070), обробляли згідно з протоколом системи snap iblot первинним антитілом кози проти FGF21 у розведенні 1:2000 (R&D systems, кат. #BAF2539) і флуоресцентно міченим стрептавідином як вторинним реагентом в розведенні 1:10000 (Licor, кат. #926-68031). Рівні білка візуалізували в системі Licor Odyssey при 700 нм і порівнювали з поділом 2 нМ контролю V101 у тому ж самому гелі. Як показано на фігурі 4С, варіанти V101, V103 і V188 повнорозмірного Fc-FGF21 піддаються детекції за допомогою Вестерн-блоттингу з використанням антитіла проти FGF21 аж до 15 діб в сироватці мишей з фармакокінетичного дослідження.

Приклад 6: Варіанти V101, V103 і V188 злитого білка Fc-FGF21 є надзвичайно термодинамічно стабільними

[000269] Білки можна розвертати в специфічному діапазоні температур. Температура розгортання білка являє собою властивий йому параметр для опису термостабільності білків. Диференціальну скануючу калориметрію (DSC) використовують для детекції температури розгортання білка. Цю характерну температуру описують як температуру плавлення (T_m), що представляє собою пік температури в ході розгортання білка.

[000270] Вихідні зразки білка розводили в PBS до концентрації ~ 1 мг/мл (0,5 мг/мл - 1,2 мг/мл) до загального об'єму 0,5 мл. Аліквоту 0,4 мл на лунку розведеного зразка білка, стандарту, PBS і DI води додавали в 96-ямковий планшет DSC. Потім планшет покривали герметичною плівкою. Зразки аналізували в 96-ямковому диференціальному скануючому калориметрі з MicroCal. Температуру сканували при 10-110 градусах С зі швидкістю 1 градус на хвилину.

[000271] Як показано на фігурі 4D, температури плавлення варіантів V101, V103 і V188 FGF21 є надзвичайно високими. Це відрізняється від більш низьких температур плавлення варіанта V76 FGF21 і FGF21 дикого типу (не показано). Автори цього винаходу приписують поліпшену стабільність V101, V103 і V188 специфічному додаванню другого дисульфідного зв'язку з нових мутацій Q55C і G148C. Відомо, що цей тип термодинамічної стабільності захищає білки від протеолізу і може, крім того, переходити в значно продовжену стабільність in vivo і поліпшені фармакокінетичні профілі, проілюстровані даними на фігурах 4В і 4С.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Злитий білок, що містить варіант FGF21 та область Fc, де варіант FGF21 включає наступні мутації відносно повнорозмірної hFGF21 послідовності SEQ ID NO: 1: Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G та G202A.

2. Злитий білок, що містить варіант FGF21 та область Fc, де злитий білок містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.

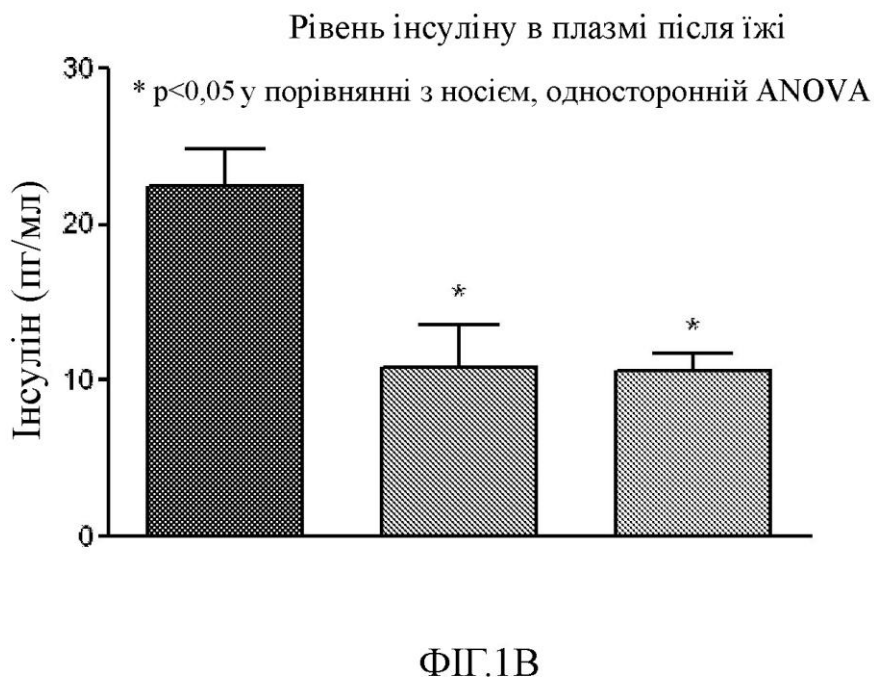
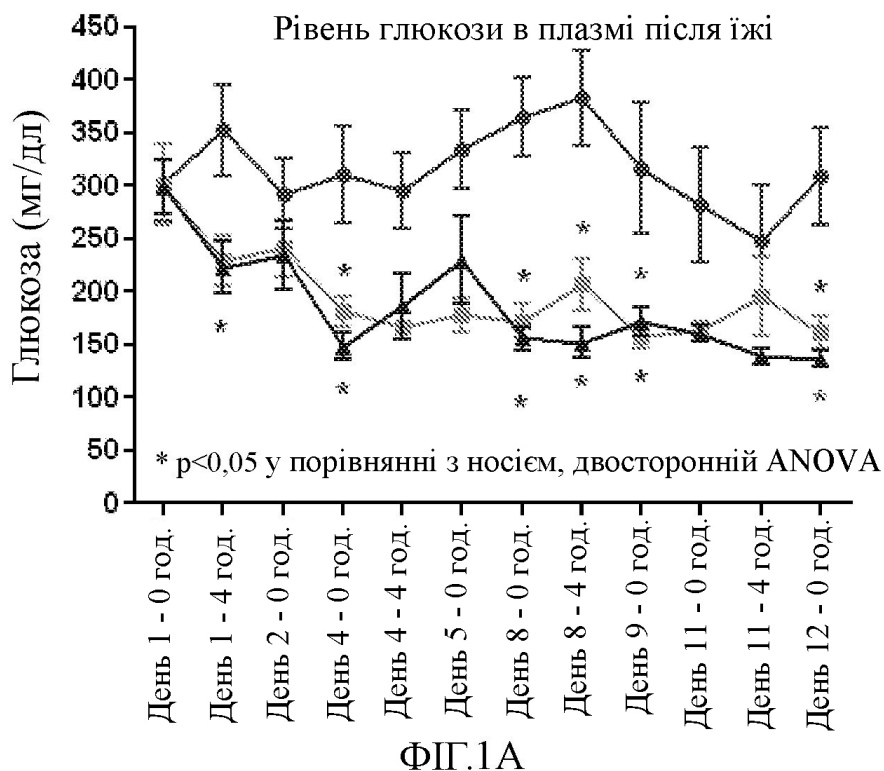
3. Злитий білок за п. 1, де варіант FGF21 злитий з вказаною областю Fc за допомогою GS лінкера.

4. Злитий білок за п. 1, де область Fc являє собою фрагмент Fc, модифікований LALA мутацією.

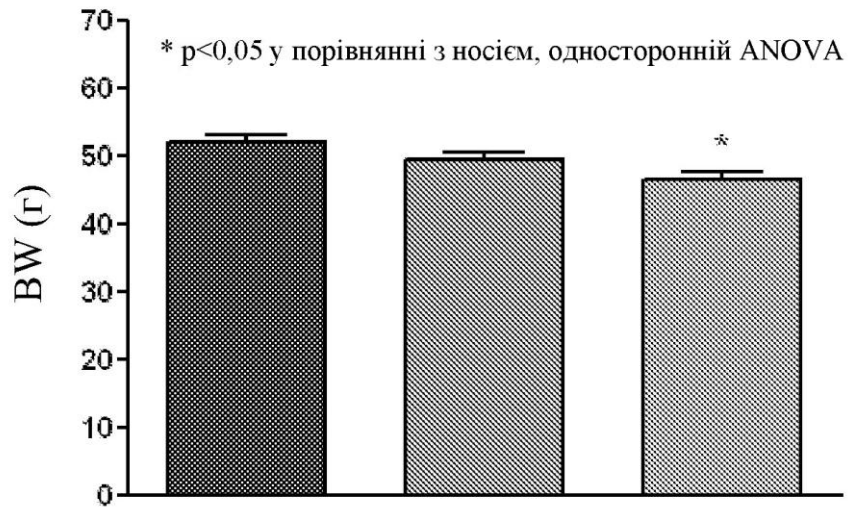
5. Злитий білок за п. 1, який включає принаймні один дисульфідний зв'язок, сконструйований між Gln55Cys та залишком цистеїну на одному з Cys103, Cys121, Gly148Cys, Asn149Cys, Lys150Cys, Ser141Cys, Pro152Cys, His153Cys, Arg154Cys, Asp155Cys, Pro156Cys, Ala157Cys, Pro158Cys, Arg159Cys, Gly160Cys, Pro161Cys, Ala162Cys та Arg163Cys.

6. Злитий білок за п. 1, який включає принаймні один дисульфідний зв'язок, сконструйований між Gly148Cys та залишком цистеїну на одному з Cys103, Cys121, Arg47Cys, Tyr48Cys, Leu49Cys, Tyr50Cys, Thr51Cys, Asp52Cys, Asp53Cys, Ala54Cys, Gln55Cys, Gln56Cys, Thr57Cys, Glu58Cys, Gly160Cys, Pro161Cys, Ala162Cys, Arg163Cys та Phe164Cys.
- 5 7. Злитий білок за п. 6, який додатково посилений сконструйованим дисульфідним зв'язком Gln55Cys-Gly148Cys.
8. Злитий білок за п. 1, де злитий білок включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.
9. Злитий білок за п. 1, де варіант FGF21 включає дисульфідний зв'язок між C103 та C121, позиціями, які належать до амінокислотної позиції повнорозмірної hFGF21 послідовності SEQ ID
- 10 NO: 1.
10. Злитий білок за п. 1, де область Fc зв'язана з варіантом FGF21 через лінкер.
11. Злитий білок за п. 10, де лінкер має довжину від 1 до 20 амінокислот.
12. Злитий білок за п. 10 або 11, де лінкер містить залишки гліцину та серину.
13. Злитий білок за пп. 1, 3, 10, 11 або 12, де область Fc злитого білка являє собою
- 15 модифікований фрагмент Fc.
14. Фармацевтична композиція, яка містить злитий білок за будь-яким з пп. 1-13 та фармацевтично прийнятний носій.
15. Фармацевтична композиція за п. 14, яка призначена для застосування у досягненні однієї або більше біологічної активності, вибраної з групи, яка складається зі: зниження рівнів глюкози
- 20 в крові, зниження рівнів інсуліну, зниження рівнів тригліцеридів, зниження рівнів холестерину, зниження рівнів ліпідів у печінці, зниження рівнів тригліцеридів у печінці, зменшення маси тіла, поліпшення толерантності до глюкози та поліпшення чутливості до інсуліну у пацієнта.
16. Фармацевтична композиція за п. 15, де вказаний пацієнт страждає від одного або більше розладів, вибраних з групи, яка складається з: ожиріння, цукрового діабету типу 1 і типу 2,
- 25 стійкості до інсуліну, гіперінсулінемії, порушення толерантності до глюкози, гіперглікемії, метаболічного синдрому, ускладнень діабету, гастропарезу, порушень, асоційованих з серйозними інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну та інших порушень метаболізму.
17. Фармацевтична композиція за п. 16, де вказаний розлад являє собою ожиріння, цукровий діабет 2 типу, дисліпідемію або гіперглікемію.
- 30 18. Фармацевтична композиція за п. 14 для застосування у способі лікування порушення метаболізму у пацієнта.
19. Фармацевтична композиція за п. 18, де порушення метаболізму являє собою ожиріння, цукровий діабет, дисліпідемію або гіперглікемію.
20. Застосування злитого білка за будь-яким з пп. 1-13 у приготуванні лікарського засобу для
- 35 застосування у досягненні однієї або більше біологічної активності, вибраної з групи, яка складається зі: зниження рівнів глюкози в крові, зниження рівнів інсуліну, зниження рівнів тригліцеридів, зниження рівнів холестерину, зниження рівнів ліпідів у печінці, зниження рівнів тригліцеридів у печінці, зменшення маси тіла, поліпшення толерантності до глюкози та поліпшення чутливості до інсуліну у пацієнта.
- 40 21. Застосування за п. 20, де вказаний пацієнт страждає від одного або більше розладів, вибраних з групи, яка складається з: ожиріння, цукрового діабету типу 1 і типу 2, стійкості до інсуліну, гіперінсулінемії, порушення толерантності до глюкози, гіперглікемії, метаболічного синдрому, ускладнень діабету, гастропарезу, порушень, асоційованих з серйозними інактивуючими мутаціями в рецепторі інсуліну та інших порушень метаболізму.
- 45 22. Застосування за п. 21, де вказаний розлад являє собою ожиріння, цукровий діабет 2 типу, дисліпідемію або гіперглікемію.
23. Полінуклеотид, який кодує злитий білок за будь-яким з пп. 1-13.
24. Вектор, який включає полінуклеотид за п. 23.
25. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 24 або полінуклеотид за п. 23.
- 50 26. Спосіб одержання злитого білка, який включає експресію злитого білка клітиною-хазяїном за п. 25.
27. Спосіб за п. 26, який додатково включає очищення злитого білка.
28. Застосування злитого білка за будь-яким з пп. 1-13 у приготуванні лікарського засобу для застосування у способі лікування порушення метаболізму у пацієнта.
- 55 29. Застосування за п. 28, де порушення метаболізму являє собою ожиріння, цукровий діабет, дисліпідемію або гіперглікемію.
30. Спосіб лікування порушення метаболізму у пацієнта, який включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 14-19.

31. Спосіб за п. 30, де порушення метаболізму являє собою ожиріння, цукровий діабет, дисліпідемію або гіперглікемію.

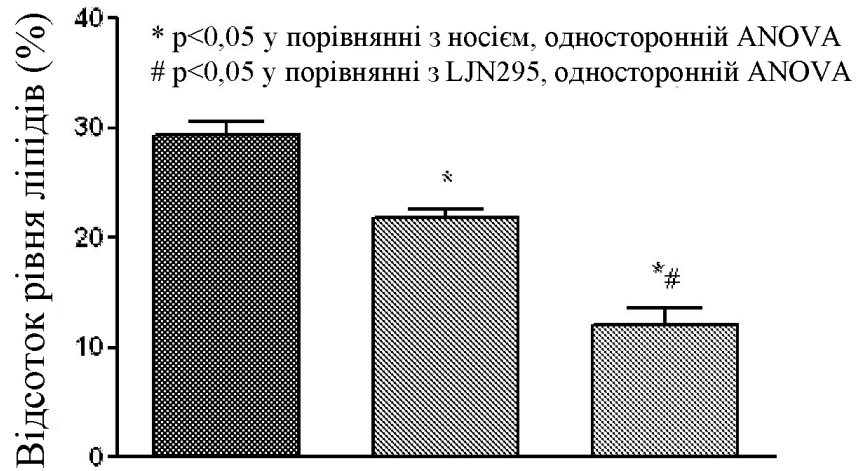


Маса тіла

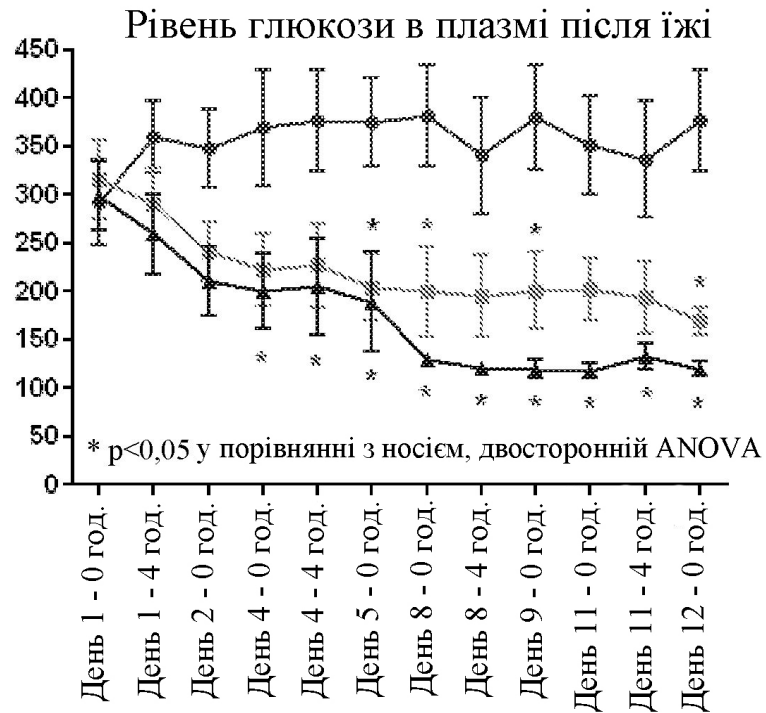


ФІГ.1С

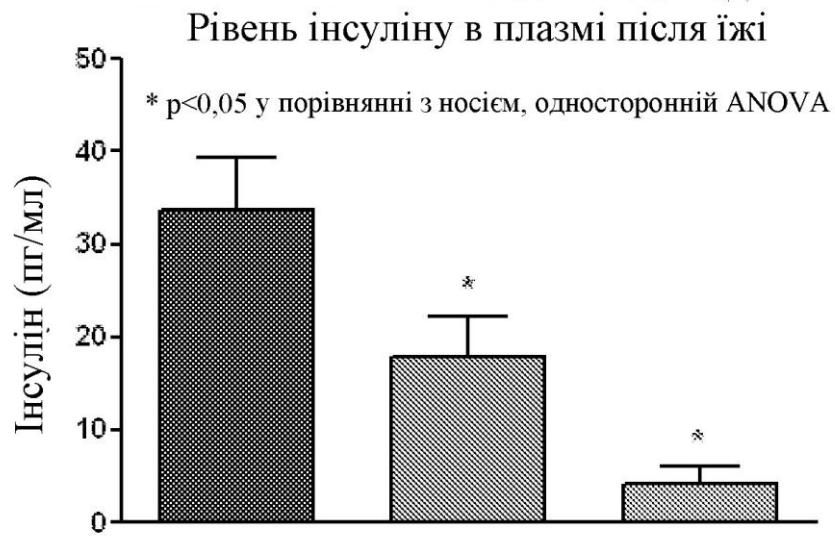
Вміст ліпідів в печінці



ФІГ.1D

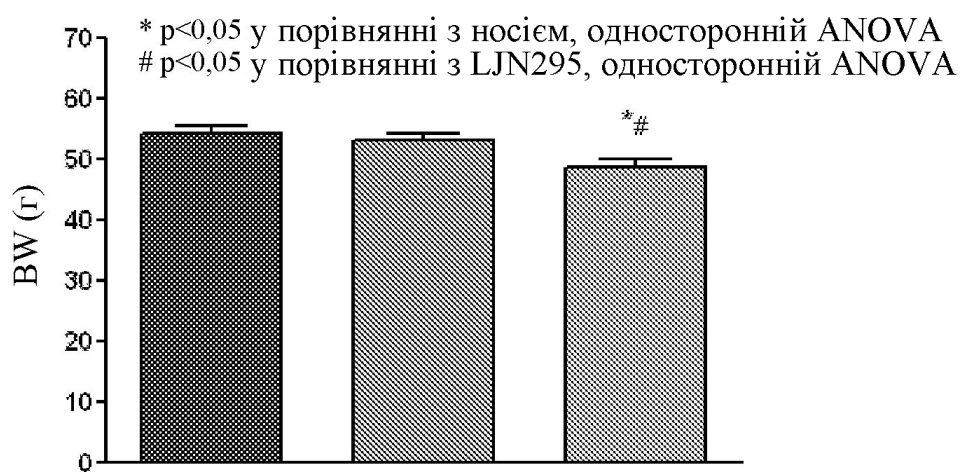


ФІГ.2А



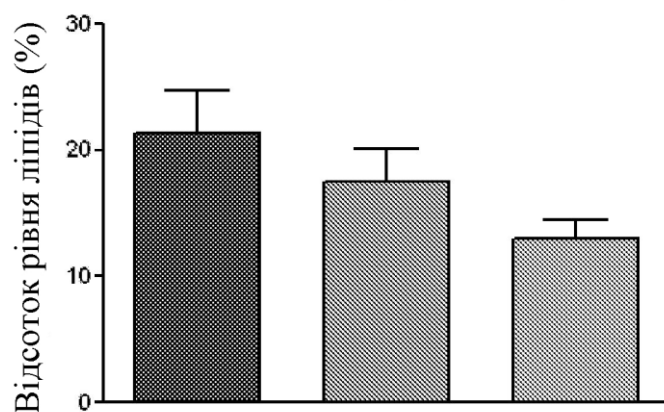
ФІГ.2В

Маса тіла

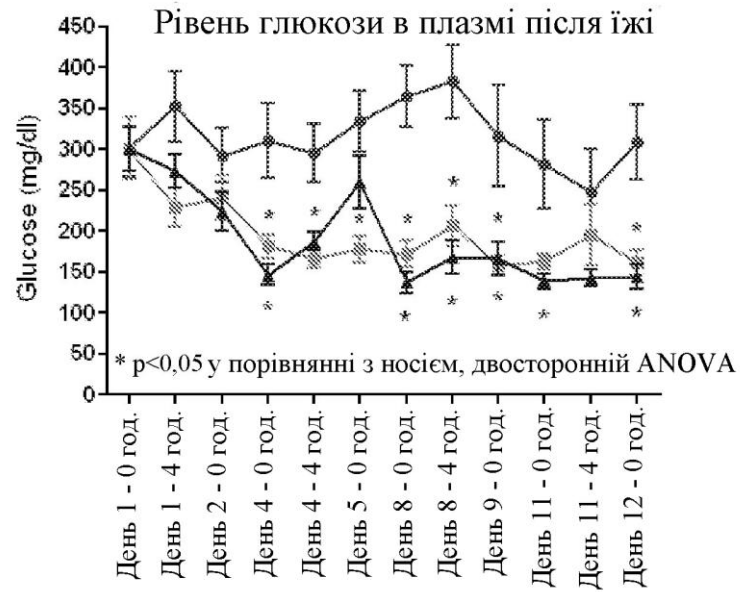


ФІГ.2С

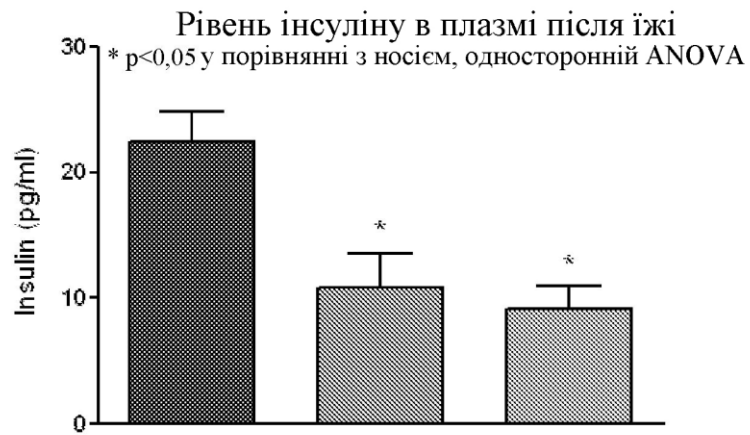
Вміст ліпідів в печінці



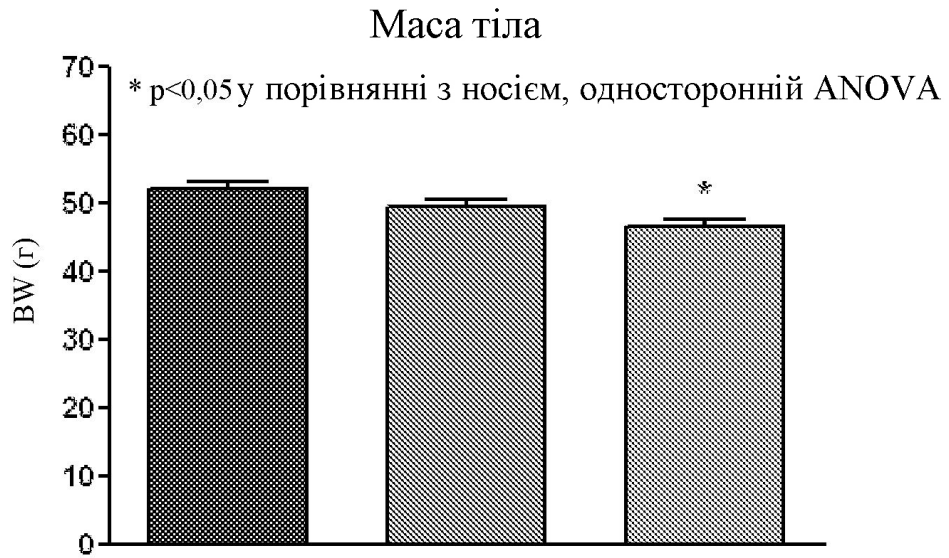
ФІГ.2D



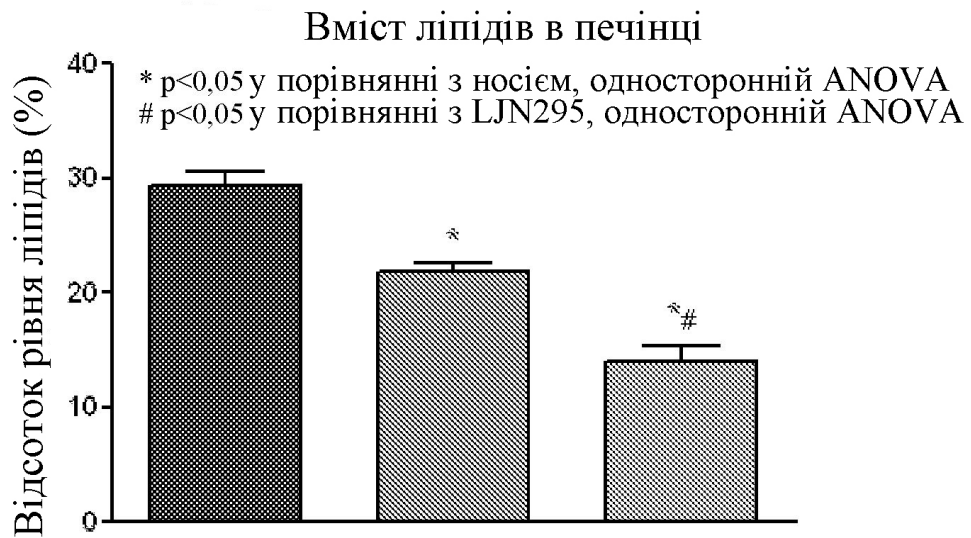
ФІГ. 3А



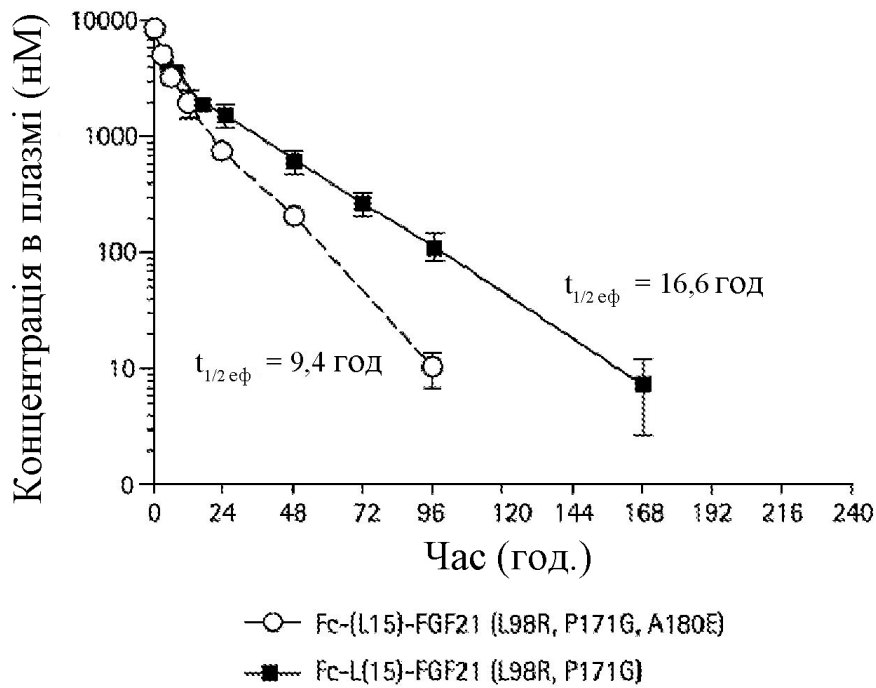
ФІГ. 3В



ФІГ.3С

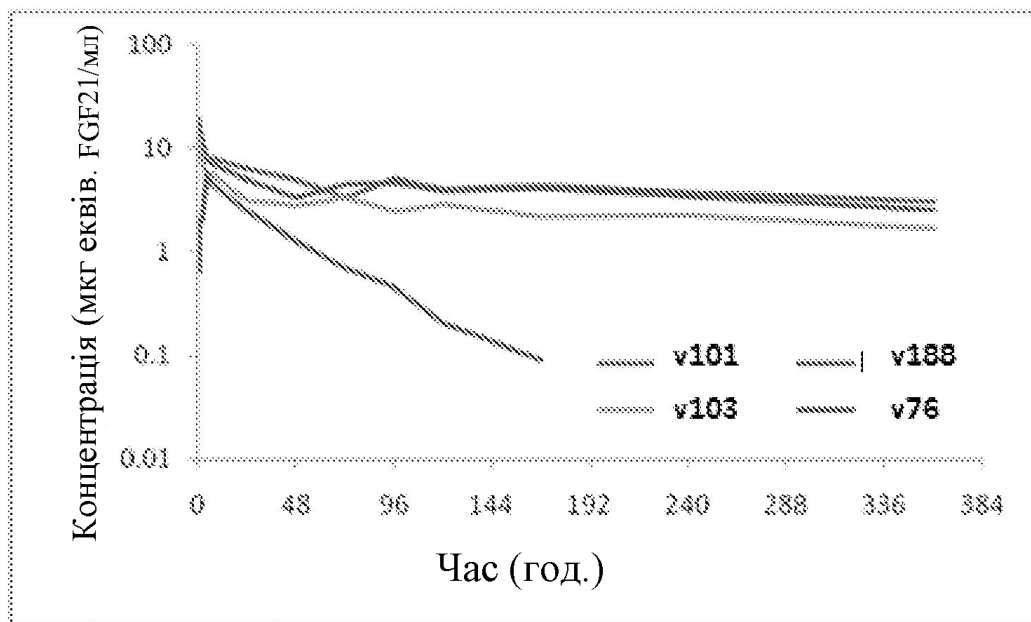


ФІГ.3D



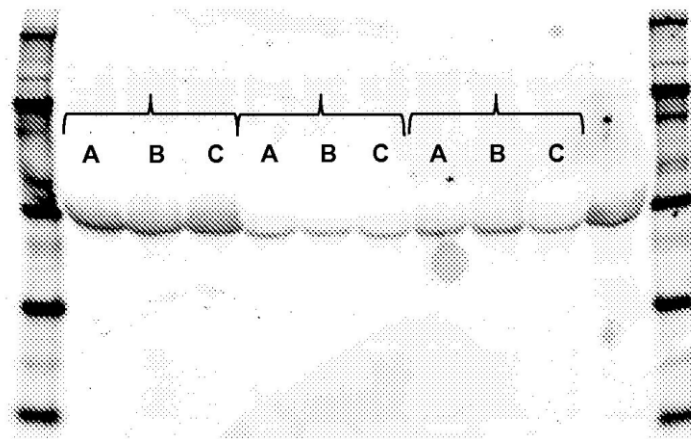
ФІГ.4А

РК однократної ІV дози 1 мг/кг у мишей

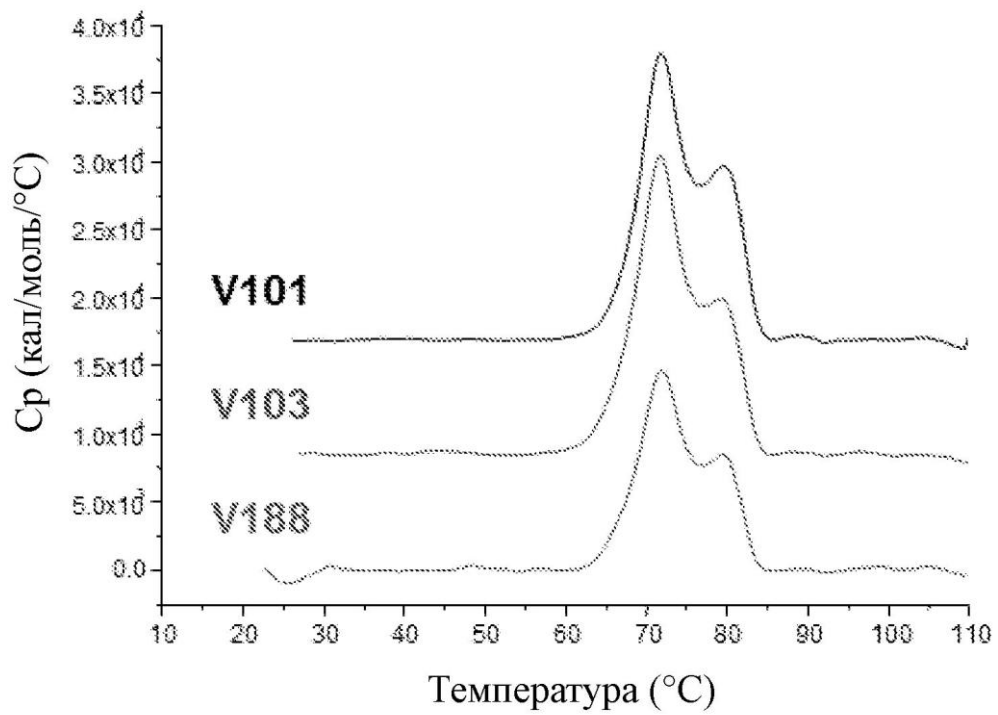


ФІГ.4В

Тварина 3
120 годин I.V. Тварина 3
15 діб I.V. Тварина 6
15 діб S.C.



ФІГ.4С



ФІГ.4D

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601