

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034847**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.27

(21) Номер заявки
201690946

(22) Дата подачи заявки
2009.06.03

(51) Int. Cl. **C07K 14/50** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) МУТАНТЫ FGF21 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/058,861; 61/058,919; 61/164,364;
61/175,736**

(32) **2008.06.04; 2008.06.04; 2009.03.27;
2009.05.05**

(33) **US**

(43) **2017.05.31**

(62) **201270758; 2009.06.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМГЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Белуски Эдвард Джон, Эллисон
Мюриэль Мэри, Гамбургер Агнес
Ева, Хехт Рэнди Айра, Ли Ю-Шенг,
Михаелс Марк Лео, Сан Джеонгун,
Ксу Джинг (US)**

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) WO-A2-2001038357
GOETZ Regina et al. Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. Molecular and Cellular Biology, May 2007, p. 3417-3428

KHARITONENKOV Alexei et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. The J. Clinical Investigation, 2005, Vol. 115, Number 6, June 2005, p. 1627-1635

BITONTI Alan J. et al. Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. PNAS, 2004, Vol. 101, no. 26, pp. 9763-9768

SHAN Daming et al. Characterization of scFv-Ig constructs generated from the Anti-CD20 mAb 1F5 using linker peptides of varying lengths. The American Association of Immunologists, 1999, 162, pp. 6589-6595

(57) Изобретение предлагает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мутантные полипептиды FGF21, мутантные полипептиды FGF21, как таковые, фармацевтические композиции, включающие мутантные полипептиды FGF21, и способы лечения метаболических заболеваний с применением таких нуклеиновых кислот, полипептидов или фармацевтических композиций.

B1

034847

**034847
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим мутантные полипептиды FGF21, к мутантным полипептидам FGF21, к фармацевтическим композициям, содержащим мутантные полипептиды FGF21, и к способам лечения метаболических заболеваний с применением таких нуклеиновых кислот, полипептидов или фармацевтических композиций.

Предпосылки создания изобретения

FGF21 представляет собой секретируемый полипептид, принадлежащий к подсемейству факторов роста фибробластов (FGF), которые включают FGF19, FGF21 и FGF23 (Itoh et. al., 2004, *Trend Genet.* 20: 563-69). Полипептид FGF21 является атипичным FGF в том отношении, что он независим от гепарина и функционирует как гормон в регуляции глюкозы, липидов и энергетического метаболизма.

FGF21 был выделен из библиотеки кДНК печени как секретируемый печеночный фактор. Он высоко экспрессируется в печени и поджелудочной железе, являясь единственным членом семейства FGF, экспрессируемым, главным образом, в печени. Трансгенные мыши с избыточной экспрессией FGF21 демонстрируют метаболические фенотипы замедленных темпов роста, низкого уровня глюкозы и триглицеридов в плазме, а также отсутствие связанного с возрастом сахарного диабета 2 типа, гиперплазии островковых клеток поджелудочной железы и ожирения. Фармакологическое введение рекомбинантного белка FGF21 в моделях грызунов и приматов приводит к нормализации уровня глюкозы в плазме, к снижению уровня триглицеридов и холестерина, а также к улучшению толерантности к глюкозе и чувствительности к инсулину. В дополнение к этому FGF21 снижает вес тела и отложения телесного жира за счет увеличения потребления энергии, физической активности и скорости метаболизма. Экспериментальные исследования дают подтверждение фармакологическому введению FGF21 для лечения сахарного диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии и других метаболических состояний или заболеваний у человека.

FGF21 человека имеет короткий период полувыведения *in vivo*. У мышей период полувыведения FGF21 человека составляет от 1 до 2 ч, а у обезьян *supomolgus* период полувыведения составляет от 2,5 до 3 ч. При разработке белкового препарата FGF21 для применения в качестве лекарства при лечении сахарного диабета 2 типа было бы желательно увеличить период полувыведения. Белки FGF21, имеющие удлиненный период полувыведения, позволили бы реже вводить дозы лекарства пациентам, получающим такие препараты. Описание таких белков приводится в настоящем документе.

Сущность изобретения

Раскрытие сущности изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, кроме того, включающему аминокислотную замену, выбранную из остатка аланина в положении 45, остатка лейцина в положении 86, остатка лейцина в положении 98, остатка аланина в положении 111, остатка аланина в положении 129, остатка глицина в положении 170, остатка пролина в положении 171, остатка серина в положении 172 или их комбинаций. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения выделенный полипептид включает аминокислотную замену: остатка лейцина в положении 98, остатка пролина в положении 171 или как остатка лейцина в положении 98, так и остатка пролина в положении 171. В другом варианте осуществления изобретения выделенный полипептид включает аминокислотную замену как остатка лейцина в положении 98, так и остатка пролина в положении 171.

Раскрытие изобретения также представляет выделенный полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, имеющую: (a) как минимум одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (i) остаток глутамина, изолейцина или лизина в положении 19, (ii) остаток гистидина, лейцина или фениланина в положении 20, (iii) остаток изолейцина, фениланина, тирозина или валина в положении 21, (iv) остаток изолейцина, фенилаланина или валина в положении 22, (v) остаток аланина или аргинина в положении 150, (vi) остаток аланина или валина в положении 151, (vii) остаток гистидина, лейцина, фениланина или валина в положении 152, (viii) остаток аланина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, пролина или серина в положении 170, (ix) остаток аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, лизина, серина, треонина, триптофана или тирозина в положении 171, (x) остаток лейцина или треонина в положении 172, (xi) остаток аргинина или глутаминовой кислоты в положении 173, или (b) как минимум одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (i) остаток аргинина, глутаминовой кислоты или лизина в положении 26, (ii) остаток аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, лизина или треонина в положении 45, (iii) остаток треонина в положении 52, (iv) остаток цистеина, глутаминовой кислоты, глицина или серина в положении 58, (v) остаток аланина, аргинина, глутаминовой кислоты или лизина в положении 60, (vi) остаток аланина, аргинина, цистеина или гистидина в положении 78, (vii) остаток цистеина или треонина в положении 86, (viii) остаток аланина, аргинина, глутаминовой кислоты, лизина или серина в положении 88, (ix) остаток аргинина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, лизина или треонина в положении 98, (x) остаток аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина или глутаминовой кислоты в положении 99, (xi) остаток лизина или треонина в положении 111, (xii) остаток аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина или лизина в положении 129, или (xiii) остаток аргинина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина или тирозина в положении 134, а также их комбинации. В одном из вариантов осуществ-

ления изобретения аминокислотный остаток в положении 98 представлен аргинином, а аминокислотный остаток в положении 171 представлен пролином, а в другом варианте осуществления изобретения полипептид может включать аминокислотную последовательность, которая как минимум на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой как минимум одна аминокислотная замена из (a)(i)-(xi) и (b)(i)-(xiii) далее не модифицируется.

Настоящее раскрытие изобретения далее представляет выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, имеющую как минимум одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (a) остаток глутамина, лизина или изолейцина в положении 19, (b) остаток гистидина, лейцина или фенилаланина в положении 20, (c) остаток изолейцина, фенилаланина, тирозина или валина в положении 21, (d) остаток изолейцина, фенилаланина или валина в положении 22, (e) остаток аланина или аргинина в положении 150, (f) остаток аланина или валина в положении 151; (g) остаток гистидина, лейцина, фенилаланина или валина в положении 152, (h) остаток аланина, аспарагиновой кислоты или пролина в положении 170, (i) остаток аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, лизина, серина, треонина, триптофана или тирозина в положении 171, (j) остаток лейцина в положении 172, или (k) остаток аргинина или глутаминовой кислоты в положении 173 или их комбинации. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотный остаток в положении 171 представлен пролином, а в другом варианте осуществления изобретения полипептид может включать аминокислотную последовательность, которая как минимум на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой как минимум одна аминокислотная замена из (a)-(k) далее не модифицируется.

Настоящее раскрытие изобретения дополнительно представляет выделенный полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, имеющую как минимум одну аминокислотную замену, которое представляет собой: (a) остаток аргинина, глутаминовой кислоты или лизина в положении 26, (b) остаток аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, лизина или треонина в положении 45, (c) остаток треонина в положении 52, (d) остаток глутаминовой кислоты, глицина или серина в положении 58, (e) остаток аланина, аргинина, глутаминовой кислоты или лизина в положении 60, (f) остаток аланина, аргинина или гистидина в положении 78, (g) остаток аланина в положении 88, (h) остаток аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, лизина или треонина в положении 98, (i) остаток аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина или глутаминовой кислоты в положении 99, (j) остаток лизина или треонина в положении 111, (k) остаток аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина или лизина в положении 129 или (l) остаток аргинина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина или тирозина в положении 134, а также их комбинации. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотный остаток в положении 98 представлен аргинином, а в другом варианте осуществления изобретения полипептид может включать аминокислотную последовательность, которая как минимум на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой как минимум одна аминокислотная замена из (a)-(l) далее не модифицируется.

В различных вариантах осуществления изобретения полипептиды, раскрытые в данном документе, могут дополнительно включать как минимум одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (a) фенилаланин, пролин, аланин, серин или глицин в положении 179, (b) глутаминовую кислоту, глицин, пролин или серин в положении 180 или (c) лизин, глицин, треонин, аланин, лейцин или пролин в положении 181, а также могут дополнительно включать от 1 до 10 аминокислотных остатков слитых с С-концом полипептида, которые могут быть представлены любой аминокислотой, например одним или более остатков, выбранных из группы, состоящей из глицина, пролина и их комбинаций.

В различных вариантах осуществления изобретения полипептиды, раскрытые в данном документе, могут включать: (a) аминоконцевое усечение не более 8 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего, (b) карбоксиконцевое усечение не более 12 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего, или (c) аминоконцевое усечение не более 8 аминокислотных остатков и карбоксиконцевое усечение не более 12 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды, раскрытые в данном документе, могут быть ковалентно связаны с одним или более полимеров, таких как PEG. В других вариантах осуществления изобретения полипептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с гетерологичной аминокислотной последовательностью, в необязательном порядке, через линкер, такой как GGGGS GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23). Гетерологичная аминокислотная последовательность может представлять собой константный домен IgG или его фрагмент, такой как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 13. Такие гибридные полипептиды, раскрытые в данном документе, также могут образовывать мультимеры.

Настоящее раскрытие изобретения также представляет фармацевтическую композицию, содержащую полипептиды, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Такие фармацевтические композиции можно применять в способе лечения метаболического заболевания, а указанный способ включает введение пациенту человеку, нуждающемуся в лечении, фар-

мацевтической композиции, соответствующей настоящему изобретению. Метаболические заболевания, которые можно лечить в соответствии с изобретением, включают сахарный диабет и ожирение.

Также предлагаются выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, раскрытые в данном документе, а также предлагаются векторы, включающие такие молекулы нуклеиновых кислот, и клетки-хозяева, включающие такие молекулы нуклеиновых кислот.

Также раскрыты усеченные формы полипептида SEQ ID NO: 4. В различных вариантах осуществления изобретения полипептид может включать: (a) аминоконцевое усечение не более 8 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего, (b) карбоксиконцевое усечение не более 12 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего, или (c) аминоконцевое усечение не более 8 аминокислотных остатков и карбоксиконцевое усечение не более 12 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего.

Настоящее раскрытие изобретения дополнительно предлагает выделенный гибридный белок, который может включать: (a) константный домен IgG, (b) линкерную последовательность, слитую с константным доменом IgG, и (c) мутант FGF21, слитый с линкерной последовательностью и включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, в которой остаток аргинина был замещен остатком лейцина в положении 98, а остаток глицина был замещен остатком пролина в положении 171. В одном из вариантов осуществления изобретения линкерная последовательность может включать GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23), а в другом варианте осуществления изобретения константный домен IgG может включать SEQ ID NO: 13. Еще в одном варианте осуществления изобретения линкерная последовательность включает GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23), а константный домен IgG включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Еще в одном варианте осуществления изобретения N-конец линкера слит с C-концом константного домена IgG, а N-конец мутанта FGF21 слит с C-концом линкера. Раскрытый гибридный белок может образовывать мультимеры.

В различных вариантах осуществления гибридного белка мутантный компонент FGF21 может включать как минимум одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (a) фенилаланин, пролин, аланин, серин или глицин в положении 179, (b) глутаминовую кислоту, глицин, пролин или серин в положении 180 или (c) лизин, глицин, треонин, аланин, лейцин или пролин в положении 181, а также может дополнительно включать от 1 до 10 аминокислотных остатков, слитых с C-концом мутанта FGF21, и от 1 до 10 аминокислотных остатков, которые могут быть представлены любой аминокислотой, например одним или более остатков, выбранных из группы, состоящей из глицина, пролина и их комбинаций.

В других вариантах осуществления изобретения гибридного белка мутантный компонент FGF21 может включать: (a) аминоконцевое усечение не более 8 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего, (b) карбоксиконцевое усечение не более 12 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего, или (c) аминоконцевое усечение не более 8 аминокислотных остатков и карбоксиконцевое усечение не более 12 аминокислотных остатков, при этом полипептид способен понижать уровень глюкозы в крови млекопитающего. Еще в одном варианте осуществления мутантный компонент FGF21 гибридного белка может включать аминокислотную последовательность, которая как минимум на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой остатки аргинина и лизина далее не модифицируются.

Настоящее раскрытие изобретения также представляет фармацевтическую композицию, включающую гибридный белок, раскрытый в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Такие фармацевтические композиции можно применять в способе лечения метаболического заболевания, а указанный способ включает введение пациенту человеку, нуждающемуся в лечении, фармацевтической композиции, соответствующей настоящему изобретению. Метаболические заболевания, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают сахарный диабет и ожирение.

Также предлагаются выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие гибридный белок, раскрытый в данном документе, а также предлагаются векторы, включающие такие молекулы нуклеиновых кислот, и клетки-хозяева, включающие такие молекулы нуклеиновых кислот.

Специфические варианты осуществления изобретения будут очевидны из последующего более подробного описания некоторых вариантов осуществления изобретения и из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1B показаны результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на усеченных мутантах FGF21 7-181 и 8-181 (фиг. 1A) и усеченных мутантах FGF21 1-172, 1-171, 1-169 и 1-164 (фиг. 1B); каждая панель показывает результаты, полученные на контрольных образцах FGF21 человека;

на фиг. 2 - результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на контрольных образцах FGF21 человека и на усеченных мутантах FGF21 3-181, 4-181, 5-181, 7-181, 8-181, 1-180, 1-178, 1-177, 1-176, 1-175, 1-174, 1-173, 1-172, 9-181 и 1-149;

на фиг. 3 - значения уровня глюкозы в крови, измеряемого у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенный столбец), контрольный FGF21 человека (пустой столбец) или усеченные мутан-

ты FGF21 8-181 (серый столбец) и 9-181 (столбец с шахматными клетками);

на фиг. 4 - процентное изменение уровня глюкозы в крови, измеряемого у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенные кружки), контрольный Fc-FGF21 дикого типа (WT) (пустые кружки) или усеченные гибридные белки Fc-FGF21, включающие аминокислотные остатки 5-181 (закрашенные треугольники) или 7-181 (пустые треугольники);

на фиг. 5 - процентное изменение уровня глюкозы в крови, измеряемого у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенные кружки), контрольный FGF21-Fc (WT) (пустые кружки), усеченный гибридный белок FGF21-Fc, включающий аминокислотные остатки 1-175 (закрашенные треугольники) или усеченный белок Fc-FGF21, включающий остатки 1-171 (пустые треугольники);

на фиг. 6A-6D - результаты анализа контрольного образца Fc(5)FGF21 человека (фиг. 6A) и образцов Fc(5)FGF21, полученных от мышей через 6 ч (образец D6, фиг. 6B), 24 ч (образец D24, фиг. 6C) и 48 ч (образец D48, фиг. 6D) после инъекции с применением комбинированного способа жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS);

на фиг. 7A-7D - результаты анализа контрольного образца FGF21(3)Fc человека (фиг. 7A) и образцов FGF21(3)Fc, полученных от мышей через 6 ч (образец D6, фиг. 7B), 24 ч (образец D24, фиг. 7C) и 48 ч (образец D48, фиг. 7D) после инъекции, способом LC-MS;

на фиг. 8A-8D - результаты анализа контрольного образца Fc(15)FGF21 (фиг. 8A) и образцов Fc(15)FGF21, полученных от мышей через 6 ч (фиг. 8B), 24 ч (фиг. 8C) и 48 ч (фиг. 8D) после инъекции, способом LC-MS;

на фиг. 9A-9D - результаты анализа контрольного образца FGF21(15)Fc (фиг. 9A) и образцов FGF21(15)Fc, полученных от мышей через 6 ч (фиг. 9B), 24 ч (фиг. 9C) и 48 ч (фиг. 9D) после инъекции, способом LC-MS;

на фиг. 10A-10B - сайты расщепления, идентифицированные анализом LC-MS гибридных белков Fc(15)FGF21 (фиг. 10A, SEQ ID NO:24) и FGF21(15)Fc (фиг. 10B, SEQ ID NO:25), введенных мышам путем инъекции;

на фиг. 11 - результаты измерений уровня глюкозы в крови у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенный столбец), Fc(15)FGF21 (пустой столбец) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G 170E (серый столбец), Fc(15)FGF21 P171A (столбец с шахматными клетками), Fc(15)FGF21 S172L (пустой столбец с диагональными полосками), Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L (закрашенный столбец с горизонтальными полосками) или Fc(15)FGF21 G151A (пустой столбец с диагональными полосками);

на фиг. 12 - процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам измерений у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенные кружки), Fc(15)FGF21 (пустые кружки) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G170E (закрашенные треугольники), Fc(15)FGF21 P171A (пустые треугольники), Fc(15)FGF21 S172L (закрашенные ромбы), Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L (пустые ромбы) или Fc(15)FGF21 G151A (закрашенные квадраты);

на фиг. 13 - результаты измерений уровня глюкозы в крови у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенный столбец), Fc(15)FGF21 (пустой столбец) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V (серый столбец), Fc(15)FGF21 G170E (пустой столбец с диагональными полосками), Fc(15)FGF21 G170E/P171A (серый столбец с диагональными полосками) или Fc(15)FGF21 G170E/S172L (пустой столбец с диагональными полосками);

на фиг. 14 - процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам измерений у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенные квадраты), Fc(15)FGF21 (пустые квадраты) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V (закрашенные перевернутые треугольники), Fc(15)FGF21 G170E (пустые перевернутые треугольники), Fc(15)FGF21 G170E/P171A (закрашенные кружки) или Fc(15)FGF21 G170E/S172L (пустые кружки);

на фиг. 15 - результаты измерений уровня глюкозы в крови у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенный столбец) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G 170E (пустой столбец), Fc(15)FGF21 G170A (серый столбец), Fc(15)FGF21 G170C (пустой столбец с диагональными полосками), Fc(15)FGF21 G170D (серо-белый столбец), Fc(15)FGF21 G 170N (закрашенный столбец с диагональными полосками) или Fc(15)FGF21 G 170S (пустой столбец с диагональными полосками);

на фиг. 16 - процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам измерений у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенные кружки) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G170E (пустые кружки), Fc(15)FGF21 G170A (закрашенные треугольники), Fc(15)FGF21 G170C (пустые треугольники), Fc(15)FGF21 G170D (закрашенные ромбы), Fc(15)FGF21 G170N (пустые ромбы) или Fc(15)FGF21 G170S (перевернутые пустые треугольники);

на фиг. 17 - результаты измерений уровня глюкозы в крови у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенный столбец) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G 170E (пустой столбец), Fc(15)FGF21 P171E (серый столбец), Fc(15)FGF21 P171H (закрашенный столбец с диагональными полосками), Fc(15)FGF21 P171Q (пустой столбец с диагональными полосками), Fc(15)FGF21 P171T (столбец с шахматными клетками) или Fc(15)FGF21 P171Y (серый столбец с диагональными полосками);

на фиг. 18 - процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам измерений у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (закрашенные кружки) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G170E (пустые кружки), Fc(15)FGF21 P171E (закрашенные треугольники), Fc(15)FGF21 P171H (пустые треугольники), Fc(15)FGF21 P171Q (закрашенные ромбы), Fc(15)FGF21 P171T (пустые ромбы) или Fc(15)FGF21 P171Y (закрашенные квадраты);

на фиг. 19A-19D - результаты анализа контрольного образца FGF21(15)Fc (фиг. 19A) и образцов, полученных от мышей через 6 ч (фиг. 19B), 24 ч (фиг. 19C) и 48 ч (фиг. 19D) после инъекции, способом LC-MS;

на фиг. 20A-20D - результаты анализа контрольного образца Fc(15)FGF21 G170E (фиг. 20A) и образцов Fc(15)FGF21 G170E, полученных от мышей через 6 ч (фиг. 20B), 24 ч (фиг. 20C) и 48 ч (фиг. 20D) после инъекции, способом LC-MS;

на фиг. 21A-21D - результаты анализа контрольного образца Fc(15)FGF21 P171A (фиг. 21A) и образцов Fc(15)FGF21 P171A, полученных от мышей через 6 ч (фиг. 21B), 24 ч (фиг. 21C) и 48 ч (фиг. 21D) после инъекции, способом LC-MS;

на фиг. 22A-22D - результаты анализа контрольного образца Fc(15)FGF21 S172L (фиг. 22A) и образцов Fc(15)FGF21 S172L, полученных от мышей через 6 ч (фиг. 22B), 24 ч (фиг. 22C) и 48 ч (фиг. 22D) после инъекции, способом LC-MS;

на фиг. 23A-23D - сайты расщепления, идентифицированные анализом LC-MS гибридных белков Fc(15)FGF21 (фиг. 23A, SEQ ID NO: 24), Fc(15)FGF21 G170E (фиг. 23B, SEQ ID NO: 26), Fc(15)FGF21 P171A (фиг. 23C, SEQ ID NO: 27) и Fc(15)FGF21 S172L (фиг. 23D, SEQ ID NO: 28), введенных мышам путем инъекции;

на фиг. 24A-24C - результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на таких мутантах FGF21 как FGF21 L99R, FGF21 L99D и FGF21 A111T (фиг. 24A), на таких мутантах FGF21 как FGF21 A129D, FGF21 A129Q и FGF21 A134K (фиг. 24B) и на таких мутантах FGF21 как FGF21 A134Y, FGF21 A134E и FGF21 A129K (фиг. 24C), при этом каждая панель показывает результаты, полученные на контрольных образцах FGF21 человека;

на фиг. 25A-25D - результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на таких мутантах Fc-FGF21 как Fc-FGF21 P171G, Fc-FGF21 P171S и Fc-FGF21 P171T (фиг. 25A), на таких мутантах Fc-FGF21 как Fc-FGF21 P171Y, Fc-FGF21 P171W и Fc-FGF21 P171C (фиг. 25B), на таких мутантах Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 A45K/G170E и FGF21 A45K (фиг. 25C) и на таких мутантах Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 P171E и Fc(15)FGF21 A45K/G170E (фиг. 25D), при этом каждая панель показывает результаты, полученные на контрольных образцах FGF21 человека;

на фиг. 26A-26B показана агрегация, как функцию времени, для зрелого FGF21 дикого типа и для разных мутантов FGF21, фиг. 26A показывает процентное изменение агрегации для контрольного FGF21 (WT, закрашенные ромбы) и FGF21 A45K (закрашенные кружки) после инкубации 65 мг/мл белка при 4°C в течение 1, 2 и 4 дней, тогда как фиг. 26B показывает процентное изменение агрегации для контрольного FGF21 (WT) и вариантов FGF21 P78C, P78R, L86T, L86R, L98C, L98R, A111T, A129D, A129Q, A129K, A134K, A134Y и A134E (все маркированы на графике) после инкубации 65 мг/мл белка при 4°C в течение 1, 6 и 10 дней;

на фиг. 27 - результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на контрольном FGF21 человека и на таких мутантах FGF21 как FGF21 A45K, FGF21 L52T и FGF21 L58E;

на фиг. 28A представлен график, показывающий изменение уровня агрегации для таких мутантов Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 6-181/G170E (закрашенные ромбы), Fc(15)FGF21 A45K/G170E (пустые квадраты), Fc(15)FGF21 P171E (закрашенные треугольники), Fc(15)FGF21 P171A (крестики), Fc(15)FGF21 G170E (пустые треугольники) и для контрольного FGF21 (закрашенные кружки) после инкубации при 4°C в течение 1, 4 и 8 дней, а фиг. 28B представляет собой гистограмму, также показывающую результаты инкубации;

на фиг. 29 - результаты измерения уровня глюкозы в крови у мышей, которым путем инъекции вводили PBS (носитель) (закрашенные кружки) или такие мутанты Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 A45K/G170E (пустые кружки), Fc(15)FGF21 A45K/P171G (закрашенные треугольники) или Fc(15)FGF21 L98R/P171G (пустые треугольники);

на фиг. 30 представлен график, показывающий результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на FGF21 человека (закрашенные кружки, сплошная линия), на Fc-FGF21 (пустые кружки, сплошная линия) и на Fc-FGF21 L98R/P171G (закрашенные треугольники, пунктирная линия);

на фиг. 31 - график, показывающий процентную величину агрегатов с высоким молекулярным весом, наблюдаемых после девяти дней выдерживания при комнатной температуре (фиг. 31A) и 4°C (фиг. 31B) для FGF21 (закрашенные кружки, сплошная линия), Fc-FGF21 (пустые кружки, сплошная линия) и Fc-FGF21 L98R/P171G (закрашенные треугольники, пунктирная линия);

на фиг. 32 - серия трасс MALDI при масс-спектрометрии, показывающую наблюдаемые изменения Fc-FGF21 L98R/P171G в различных точках на протяжении 168-часового промежутка времени;

на фиг. 33 - график, показывающий процентное изменение уровня глюкозы в крови у мышей ob/ob

для контрольного носителя PBS (пустые кружки), зрелого FGF21 дикого типа (закрашенные квадраты) и таких мутантов FGF21 как L98R, P171G (перевернутые закрашенные треугольники), L98R, P171G, 182P (пустые ромбы) и L98R, P171G, 182G (закрашенные кружки);

на фиг. 34 - график, показывающий процентное изменение уровня глюкозы в крови у мышей ob/ob для контрольного носителя PBS (закрашенные кружки) и таких мутантов FGF21 как L98R, P171G (закрашенные треугольники), L98R, P171G, 182G, 183G (пустые треугольники), L98R, P171G, 182G (закрашенные ромбы) и L98R, P171G, 182P (пустые ромбы);

на фиг. 35 - график, показывающий процентное изменение уровня глюкозы в крови у мышей ob/ob для контрольного носителя PBS (пустые кружки) и таких мутантов FGF21 как L98R, P171G (закрашенные квадраты), L98R, P171G, Y179S (пустые треугольники), L98R, P171G, Y179A (перевернутые закрашенные треугольники), L98R, P171G, 180S (пустые ромбы) и L98R, P171G, A180G (закрашенные кружки);

на фиг. 36 - график, показывающий процентное изменение уровня глюкозы в крови у мышей ob/ob для контрольного носителя PBS (закрашенные кружки) и таких мутантов FGF21 как L98R, P171G (пустые квадраты), L98R, P171G, Y179F (закрашенные треугольники) и L98R, P171G, A180E (пустые ромбы);

на фиг. 37 - диаграмма, отображающую схему шестинедельного исследования с повышением дозы, проведенного на обезьянах резус. На указанной диаграмме полутоновые символы обозначают взятия крови натощак, а фактурные символы обозначают взятия крови после кормления;

на фиг. 38A-38D - серия графиков, отображающих рандомизацию обезьян резус по профилям OGTT, AUC (площади под кривой) OGTT и весу тела. фиг. 38A отображает базовый уровень глюкозы в OGTT1, при этом закрашенные квадраты соответствуют группе А, закрашенные кружки на сплошной линии соответствуют группе В, а пустые кружки на пунктирной линии соответствуют группе С перед распределением испытуемых соединений и носителя по группам. на фиг. 38B отображен базовый уровень глюкозы в OGTT2, при этом закрашенные квадраты соответствуют группе А, закрашенные кружки на сплошной линии соответствуют группе В, а пустые кружки на пунктирной линии соответствуют группе С распределением испытуемых соединений и носителя по группам. на фиг. 38C показан базовый уровень глюкозы в OGTT 1 и OGTT 2 в терминах AUC, при этом фактурный столбец соответствует группе А, полутоновой столбец соответствует группе В, а пустой столбец соответствует группе С. фиг. 38D показывает базовый вес тела, при этом фактурный столбец соответствует группе А, полутоновой столбец соответствует группе В, а пустой столбец соответствует группе С;

на фиг. 39 - график, показывающий влияние носителя, FGF21 и Fc-FGF21(RG) на вес тела у обезьян резус, при этом полутоновые столбцы 1 и 2 соответствуют 1- и 2-й неделям на низкой дозе, пустые столбцы 3 и 4 соответствуют 3- и 4-й неделям на средней дозе, закрашенные столбцы 5 и 6 соответствуют 5- и 6-й неделям на высокой дозе, а фактурные столбцы 7, 8 и 9 соответствуют периоду отмывания (с 7- по 9-ю неделю);

на фиг. 40 - график, показывающий процентное изменение уровня инсулина натощак по отношению к базовому уровню у обезьян резус для носителя, FGF21 и Fc-FGF21 (RG), при этом полутоновые столбцы 1 и 2 соответствуют 1- и 2-й неделям на низкой дозе, пустые столбцы 3 и 4 соответствуют 3- и 4-й неделям на средней дозе, закрашенные столбцы 5 и 6 соответствуют 5- и 6-й неделям на высокой дозе, а фактурные столбцы 7 и 8 соответствуют 7- и 8-й неделе в период отмывания;

на фиг. 41 - график, показывающий влияние носителя, FGF21 и Fc-FGF21(RG) при введении высокой дозы на уровень инсулина у обезьян резус после кормления на 5-й и 6-й неделе исследования, при этом закрашенные столбцы соответствуют 5-й неделе, а полутоновые столбцы соответствуют 6-й неделе;

на фиг. 42 - график, показывающий профили глюкозы в ходе теста OGTT5 (пероральный тест на толерантность к глюкозе), проведенного в конце двухнедельного лечения высокими дозами Fc-FGF21(RG), при этом закрашенные кружки на сплошной линии соответствуют носителю, пустые квадраты на пунктирной линии соответствуют FGF21, а закрашенные треугольники на сплошной линии соответствуют Fc-FGF21(RG);

на фиг. 43 - график, показывающий профили инсулина в ходе теста OGTT5, проведенного в конце двухнедельного лечения высокими дозами Fc-FGF21(RG), при этом закрашенные кружки на сплошной линии соответствуют носителю, пустые квадраты на пунктирной линии соответствуют FGF21, а закрашенные треугольники на сплошной линии соответствуют Fc-FGF21(RG);

на фиг. 44 - график, показывающий AUC 1-3 глюкозы в ходе теста OGTT, проведенном в конце каждого периода введения доз (низкой, средней и высокой дозы) обезьянам резус, при этом пустые столбцы соответствуют AUC3, рассчитанной по результатам измерений глюкозы в OGTT3, закрашенные столбцы соответствуют AUC4, рассчитанной по результатам измерений глюкозы в OGTT4, а полутоновые столбцы соответствуют AUC5, рассчитанной по результатам измерений глюкозы в OGTT5;

на фиг. 45 - график, показывающий влияние носителя, FGF21 и Fc-FGF21(RG) на процентное изменение уровня триглицеридов в плазме по сравнению с базовым уровнем в каждой группе обезьян резус, при этом полутоновые столбцы 1 и 2 соответствуют 1- и 2-й неделям на низкой дозе, пустые столбцы 3 и 4 соответствуют 3- и 4-й неделям на средней дозе, закрашенные столбцы 5 и 6 соответствуют 5- и 6-й неделям на высокой дозе, а фактурные столбцы 7, 8 и 9 соответствуют периоду отмывания (с 7- по 9-ю неделю);

на фиг. 46 - график, показывающий уровень триглицеридов в плазме после кормления в каждой группе обезьян резус по результатам измерений на пятой и шестой неделях лечения носителем, FGF21 или Fc-FGF21(RG) в высокой дозе, при этом полутоновые столбцы соответствуют 5-й неделе, а закрашенные столбцы соответствуют 6-й неделе;

фиг. 47 представляет собой график, показывающий индивидуальный уровень FGF21 у обезьяны по результатам измерений перед началом введения доз, а также в 5-, 12-, 19- и 26-й день при взятии образцов приблизительно через 21 ч после каждой инъекции;

на фиг. 48 представлен график, показывающий индивидуальный уровень Fc-FGF21 (RG) у обезьяны по результатам измерений перед началом введения доз, а также в 5-, 12-, 19- и 26-й день при взятии образцов приблизительно через 5 дней после каждой инъекции;

на фиг. 49 - график, показывающий средние концентрации FGF21 и Fc-FGF21(RG) по результатам измерений в ходе трех тестов OGTT, проведенных после введения каждой дозы (низкой, средней и высокой), при этом полутоновые столбцы соответствуют OGTT3 с низкой дозой, закрашенные столбцы соответствуют OGTT4 со средней дозой, а пустые столбцы соответствуют OGTT5 с высокой дозой.

Подробное описание изобретения

Белок человека FGF21, обладающий улучшенными свойствами, в частности удлиненным периодом полувыведения и/или уменьшенной агрегацией, может быть изготовлен способами, раскрытыми в настоящем описании и стандартными способами молекулярной биологии. Необязательно можно дополнительно увеличить период полувыведения, гибридизируя антитело или его часть с N-концевым или C-концевым участком последовательности FGF21 дикого типа. Также можно дополнительно увеличить период полувыведения или уменьшить агрегацию белка FGF21 дикого типа, вводя в этот белок аминокислотные замещения. Такие модифицированные белки упоминаются в данном документе как мутанты или мутанты FGF21 и формируют варианты осуществления настоящего изобретения.

Способы рекомбинантных нуклеиновых кислот, упоминаемые в данном описании, включая примеры, в целом представляют собой способы, сформулированные в опубликованных источниках Sambrook et. al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) или *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et. al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994), причем оба указанных источника включены в настоящее описание в качестве ссылки с любой целью.

1) Общие термины и определения.

Термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, которая (1) была отделена как минимум приблизительно от 50% белков, липидов, углеводов или других материалов, вместе с которыми она встречается в природе, когда тотальную нуклеиновую кислоту выделяют из клеток-источников, (2) не сцеплена со всем полинуклеотидом или частью полинуклеотида, с которыми "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" сцеплена в природе, (3) функционально связана с полинуклеотидом, с которым она не связана в природе, или (4) не встречается в природе как часть большей полинуклеотидной последовательности. Предпочтительно, чтобы выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению была, по существу, свободна от любых других загрязняющих молекул нуклеиновой кислоты или от других загрязнений, которые обнаруживаются в природном окружении, и которые могли бы помешать ее применению в выработке полипептида или ее терапевтическому, диагностическому, профилактическому применению или применению в научно-исследовательских целях.

Термин "вектор" употребляется для обозначения любой молекулы (например, нуклеиновой кислоты, плазмиды или вируса), используемой для переноса кодирующей информации в клетку-хозяина.

Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, который пригоден для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые направляют и/или контролируют экспрессию вставленных гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты. Экспрессия включает, но не ограничиваясь ими, такие процессы как транскрипция, трансляция и сплайсинг РНК, если присутствуют интроны.

Термин "функционально связанный(ая, ое)" употребляется в данном документе для обозначения компоновки фланкирующих последовательностей, при этом фланкирующие последовательности, описанные таким образом, сконфигурированы или собраны так, что выполняют свою обычную функцию. Итак, фланкирующая последовательность, функционально связанная с кодирующей последовательностью, может быть способной вызывать репликацию, транскрипцию и/или трансляцию кодирующей последовательности. Например, кодирующая последовательность функционально связана с промотором, если промотор способен управлять транскрипцией этой кодирующей последовательности. Фланкирующая последовательность не обязательно должна примыкать к кодирующей последовательности до тех пор, пока она правильно функционирует. Так, например, между промоторной последовательностью и кодирующей последовательностью могут быть вставлены промежуточные не транслируемые, но еще транскрибируемые последовательности, при этом промоторная последовательность, по-прежнему, может считаться "функционально связанной" с кодирующей последовательностью.

Термин "клетка-хозяин" употребляется для обозначения клетки, которая была трансформирована или способна к трансформации последовательностью нуклеиновой кислоты, после чего она экспрессиру-

ет представляющий интерес ген. Этот термин включает потомство родительской клетки независимо от того, идентично ли оно или не идентично первоначальному родителю по морфологии или генетической структуре до тех пор, пока клетка экспрессирует избранный ген.

Термин "выделенный полипептид" относится к полипептиду по настоящему изобретению, который (1) был отделен как минимум приблизительно, от 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, вместе с которыми он встречается в природе, когда его выделяют из клеток-источников, (2) не связан (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) со всем полипептидом или частью полипептида, с которыми "выделенный полипептид" связан в природе, (3) функционально связан (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или (4) не встречается в природе. Предпочтительно, чтобы выделенный полипептид был, по существу, свободен от любых других загрязняющих полипептидов или от других загрязнений, которые обнаруживаются в природном окружении, и которые могли бы помешать его применению в терапевтических, диагностических, профилактических или научно-исследовательских целях.

Термин "встречающийся в природе" применительно к таким биологическим материалам, как молекулы нуклеиновых кислот, полипептиды, клетки-хозяева и т.п., относится к материалам, которые встречаются в природе и не подвергаются манипуляциям со стороны человека. Сходным образом, термин "не встречающийся в природе" при использовании в данном документе относится к материалу, который не встречается в природе либо был структурно модифицирован или синтезирован человеком. При использовании по отношению к нуклеотидам термин "встречающийся в природе" относится к таким основаниям как аденин (A), цитозин (C), гуанин (G), тимин (T) и урацил (U). При использовании по отношению к аминокислотам термин "встречающаяся в природе" относится к следующим 20 аминокислотам: аланин (A), цистеин (C), аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E), фенилаланин (F), глицин (G), гистидин (H), изолейцин (I), лизин (K), лейцин (L), метионин (M), аспарагин (N), пролин (P), глутамин (Q), аргинин (R), серин (S), треонин (T), валин (V), триптофан (W) и тирозин (Y).

Термин "полипептид FGF21" относится к встречающемуся в природе полипептиду дикого типа, экспрессируемому у человека. В целях этого раскрытия изобретения термин "полипептид FGF21" может использоваться взаимозаменяемо любого полноразмерного полипептида FGF21, например SEQ ID NO: 2, который состоит из 209 аминокислотных остатков, и который кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1; любая зрелая форма полипептида, SEQ ID NO: 4, которая состоит из 181 аминокислотного остатка и которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3 и в которой 28 аминокислотных остатков на amino-конце полноразмерного полипептида FGF21 (например, составляющих сигнальный пептид) были удалены, а также их варианты.

Термины "мутант полипептида FGF21" и "мутант FGF21" относятся к варианту полипептида FGF21, в котором природная аминокислотная последовательность FGF21 была модифицирована. Такие модификации включают, но не ограничиваясь ими, одно или более аминокислотных замещений, включая замещения на аналоги аминокислот, не встречающиеся в природе, и усечения. Таким образом, мутанты полипептида FGF21 включают, но, не ограничиваясь ими, сайт-специфические мутанты FGF21, усеченные полипептиды FGF21, мутанты FGF21, устойчивые к протеолизу, мутанты FGF21 с пониженной агрегацией, комбинаторные мутанты FGF21 и гибридные белки FGF21, как описано в данном документе. В целях идентификации специфических усечений и аминокислотных замещений в мутантах FGF21 по настоящему изобретению нумерация усеченных или мутированных аминокислотных остатков соответствует нумерации в зрелом полипептиде FGF21, состоящем из 181 аминокислотного остатка.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения мутант полипептида FGF21 включает аминокислотную последовательность, которая как минимум на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой специфические остатки, придающие мутантному полипептиду FGF21 желательные свойства, например, устойчивость к протеолизу, увеличенный период полувыведения, сниженную агрегацию или их комбинации, не были дополнительно модифицированы. Иными словами, за исключением тех остатков в мутантной последовательности FGF21, которые были модифицированы для придания полипептиду устойчивости к протеолизу, сниженной способности к агрегации или других свойств, модифицированными могут быть приблизительно 15% всех других аминокислотных остатков в мутантной последовательности FGF21. Например, в мутанте FGF21 Q173E, могут быть модифицированы до 15 процентов всех других аминокислотных остатков в дополнение к остатку глутаминовой кислоты, который был замещен на глутамин в положении 173. В других вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид FGF21 включает аминокислотную последовательность, которая как минимум приблизительно, на 90% или, приблизительно, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой специфические остатки, придающие мутантному полипептиду FGF21 свойства устойчивости к протеолизу или пониженной способности к агрегации, не были дополнительно модифицированы. Такие мутанты полипептида FGF21 обладают как минимум одним видом активности полипептида FGF21 дикого типа.

Настоящее изобретение также охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутант полипептида FGF21, включающий аминокислотную последовательность, которая как минимум приблизительно, на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой специфиче-

ческие остатки, придающие мутантному полипептиду FGF21 желательные свойства, например устойчивость к протеолизу, увеличенный период полувыведения, сниженную агрегацию или их комбинации, не были дополнительно модифицированы. Иными словами, за исключением нуклеотидов, кодирующих те остатки в мутантной последовательности FGF21, которые были модифицированы для придания полипептиду устойчивости к протеолизу, сниженной способности к агрегации или других свойств, модифицированными могут быть приблизительно 15% всех других нуклеотидов в мутантной последовательности, кодирующей FGF21. Например, в молекуле, кодирующей мутант FGF21 Q173E, могут быть модифицированы до 15% всех других нуклеотидов в дополнение к нуклеотидам, кодирующим остаток глутаминовой кислоты, который был замещен на глутамин в положении 173. Настоящее изобретение также охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутантный полипептид FGF21, включающий аминокислотную последовательность, которая как минимум приблизительно, на 90% или, приблизительно, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, но в которой специфические остатки, придающие мутантному полипептиду FGF21 свойства устойчивости к протеолизу или пониженной способности к агрегации, не были дополнительно модифицированы. Такие мутанты FGF21 обладают как минимум одним видом активности полипептида FGF21 дикого типа.

Изобретение также охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, которая как минимум приблизительно, на 85% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3, но в которой нуклеотиды, кодирующие аминокислотные остатки, которые придают кодируемому мутантному полипептиду FGF21 устойчивость к протеолизу, пониженную способность к агрегации или другие желательные свойства, не были дополнительно модифицированы. Говоря другими словами, за исключением тех остатков в мутантной последовательности FGF21, которые были модифицированы для придания полипептиду устойчивости к протеолизу, сниженной способности к агрегации или других свойств, модифицированными могут быть приблизительно 15% всех других аминокислотных остатков в мутантной последовательности FGF21. Например, в мутанте FGF21 Q173E, могут быть модифицированы до 15% всех других аминокислотных остатков в дополнение к остатку глутаминовой кислоты, который был замещен на глутамин в положении 173. Далее, настоящее изобретение охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, которая как минимум приблизительно, на 90% или, приблизительно, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, но в которой нуклеотиды, кодирующие аминокислотные остатки, которые придают кодируемому мутантному полипептиду FGF21 свойства устойчивости к протеолизу или пониженной способности к агрегации, не были дополнительно модифицированы. Такие молекулы нуклеиновых кислот кодируют мутанты FGF21, обладающие как минимум одним видом активности полипептида FGF21 дикого типа.

Термин "биологически активный мутант полипептида FGF21" относится к любому мутантному полипептиду FGF21, описанному в данном документе, который обладает активностью полипептида FGF21 дикого типа, в частности, способностью понижать уровень глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови, уменьшать вес тела и улучшать толерантность к глюкозе, потребление энергии или чувствительность к инсулину независимо от числа модификаций, введенных в мутант полипептида FGF21. Мутантные полипептиды FGF21, обладающие в некоторой степени пониженным уровнем активности FGF21 по сравнению с полипептидом FGF21 дикого типа, могут, тем не менее, считаться биологически активными мутантами полипептида FGF21.

Каждый из терминов "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относится к мутантному полипептиду FGF21, применяемому для поддержания наблюдаемого уровня одного или более видов биологической активности полипептида FGF21 дикого типа, в частности способности понижать уровень глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови, снижать вес тела или улучшать толерантность к глюкозе, потребление энергии или чувствительность к инсулину.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "физиологически приемлемый носитель" при использовании в данном документе относится к одному или более рецептурных материалов, пригодных для осуществления или улучшения доставки мутантного полипептида FGF21.

Термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, которые способны связываться с антителом и, кроме того, их можно использовать на животных для выработки антител, которые способны связывать эпитоп антигена. Антиген может иметь один или более эпитопов.

Термин "нативный Fc" относится к молекуле или последовательности, включающей последовательность неантигенсвязывающего фрагмента и полученной в результате расщепления целого антитела или выработанной другими средствами, как в мономерной, так и в мультимерной форме, которая может содержать шарнирный участок. Предпочтительный первоначальный иммуноглобулиновый источник нативного Fc имеет человеческое происхождение и представляет собой любой из иммуноглобулинов, хотя более предпочтительны IgG1 и IgG2. Нативные молекулы Fc состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть соединены в димерные или мультимерные формы посредством ковалентной (т.е. по типу дисульфидных связей) и нековалентной ассоциации. Число межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами нативных молекул Fc варьируется от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и IgGA2). Один из приме-

ров нативного Fc представляет собой дисульфидно связанный димер, полученный в результате папаинового расщепления IgG (см. Ellison et. al., 1982, Nucleic. Acids. Res. 10: 4071-9). Термин "нативный Fc" при использовании в данном документе обобщает мономерные, димерные и мультимерные формы. Пример полипептидной последовательности Fc представлен в SEQ ID NO: 13.

Термин "вариант Fc" относится к молекуле или последовательности, которые модифицированы из нативного Fc, но еще включают сайт связывания для рецептора утилизации, FcRn (рецептор Fc новорожденных). Международные патентные публикации № WO 97/34631 и WO 96/32478 описывают типичные варианты Fc, а также их взаимодействие с рецептором утилизации, в связи с чем указанные публикации включены в этот документ в качестве ссылки. Таким образом, термин "вариант Fc" может включать молекулу или последовательность, которые гуманизированы из нативного Fc нечеловеческого происхождения. Кроме того, нативный Fc включает участки, которые можно удалить, поскольку они обеспечивают структурные признаки биологической активности, не являющиеся необходимыми для гибридных молекул мутантов FGF21, соответствующих настоящему изобретению. Таким образом, термин "вариант Fc" включает молекулу или последовательность, в которых один или более сайтов или остатков нативного Fc утрачены или модифицированы, что влияет на: (1) образование дисульфидных связей, (2) несовместимость с выбранной клеткой-хозяином, (3) N-концевую гетерогенность при экспрессии в выбранной клетке-хозяине, (4) гликозилирование, (5) взаимодействие с комплементом, (6) связывание с другим рецептором Fc, нежели рецептор утилизации, или (7) антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Варианты Fc более подробно описаны в данном документе ниже.

Термин "домен Fc" охватывает нативный Fc, варианты Fc и их последовательности в соответствии с данными выше определениями. Как в отношении вариантов Fc, так и в отношении нативных молекул Fc термин "домен Fc" включает молекулы в мономерной или мультимерной форме, полученные в результате расщепления целого антитела или выработанные другими средствами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен Fc может быть соединен с FGF21 или мутантом FGF21 (включая усеченную форму FGF21 или мутанта FGF21) посредством, например, ковалентной связи между доменом Fc и последовательностью FGF21. Такие составные белки могут образовывать мультимеры через ассоциацию доменов Fc, при этом как составные белки, так и их мультимеры являются аспектом настоящего изобретения.

2) Сайт-специфические мутанты FGF21.

Термин "сайт-специфический мутант FGF21" или "замещенный мутант FGF21" относится к мутантному полипептиду FGF21, имеющему аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности природного полипептида FGF21, например SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и их вариантов. Сайт-специфические мутанты FGF21 можно создавать, вводя аминокислотные замещения, консервативные или не консервативные и используя как встречающиеся, так и не встречающиеся в природе аминокислоты в специфических положениях полипептида FGF21.

"Консервативная аминокислотная замена" может включать замену нативного аминокислотного остатка (т.о. остатка, обнаруживаемого в данном положении полипептидной последовательности FGF21 дикого типа) на ненативный остаток (т.н. остаток, который не обнаруживается в данном положении полипептидной последовательности FGF21 дикого типа), при этом не происходит никаких влияний, или происходят очень незначительные влияния на полярность или заряд аминокислотного остатка в данном положении. Консервативные аминокислотные замещения также охватывают не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые обычно встраиваются посредством химического пептидного синтеза, а не синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие реверсированные или инвертированные формы аминокислотных компонентов.

Встречающиеся в природе аминокислотные остатки можно подразделить на классы, основываясь на общих свойствах боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин (norleucine), Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Консервативные замещения могут включать замену члена одного из этих классов другим членом того же класса. Неконсервативные замещения могут включать замену члена одного из этих классов другим членом другого класса.

Желательные аминокислотные замещения (как консервативные, так и неконсервативные) могут определить компетентные специалисты в данной области в то время, когда такие замены понадобятся. Типичный (но не ограничивающий) список аминокислотных замещений представлен в табл. 1.

Таблица 1. Аминокислотные замещения

Первоначальный остаток	Типичные замещения
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

3) Усеченные полипептиды FGF21.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к усеченным формам зрелого полипептида FGF21. Этот вариант осуществления настоящего изобретения возник в связи с попыткой выявить усеченные полипептиды FGF21, которые способны обеспечивать активность, равную активности не усеченных форм зрелого полипептида FGF21, а в некоторых случаях превосходящую ее.

При использовании в настоящем описании термин "усеченный полипептид FGF21" относится к полипептиду FGF21, в котором были удалены аминокислотные остатки из аминоконцевого (или N-концевого участка) полипептида FGF21, были удалены аминокислотные остатки из карбоксиконцевого (или C-концевого) участка полипептида FGF21 или были удалены аминокислотные остатки как из аминоконцевого, так и из карбоксиконцевого участков полипептида FGF21. Различные усечения, раскрытые в настоящем документе, были подготовлены так, как это изложено в примерах 3 и 6.

Активность полипептидов FGF21, усеченных на N-конце, и полипептидов FGF21, усеченных на C-конце, можно оценивать, применяя анализ на ELK-люциферазу *in vitro*, как это описано в примере 4. Специфические подробности анализов *in vitro*, которые можно применять для исследования активности усеченных полипептидов FGF21, можно найти в примере 4.

Активность усеченных полипептидов FGF21 по настоящему изобретению также можно оценивать в анализе *in vivo*, таком как анализ на мышах *ob/ob*, описанный в примерах 5 и 7. В целом, для оценки активности усеченного полипептида FGF21 *in vivo* этот усеченный полипептид можно ввести животному, используемому для тестирования, внутривенно. После нужного периода инкубации (например, одного часа или более), можно взять образец крови и измерить уровень глюкозы. Специфические подробности анализов *in vivo*, которые можно применять для исследования активности усеченных полипептидов FGF21, можно найти в примерах 5 и 7.

а) N-концевые усечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения N-концевые усечения включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков из N-концевого участка зрелого полипептида FGF21. Как продемонстрировано в примере 5 и на фиг. 3, усеченные полипептиды FGF21, имеющие концевые усечения длиной менее 9 аминокислотных остатков, сохраняют способность зрелого полипептида FGF21 понижать уровень глюкозы в крови субъекта.

В соответствии с этим в специфических вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает усеченные формы зрелого полипептида FGF21 или мутантных полипептидов FGF21, имеющих N-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков.

б) C-концевые усечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения C-концевые усечения включают 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков из С-концевого участка зрелого полипептида FGF21. Как продемонстрировано в примере 4 и на фиг. 1В, усеченные полипептиды FGF21, имеющие С-концевые усечения длиной менее 13 аминокислотных остатков, демонстрируют эффективность на уровне как минимум 50% эффективности FGF21 дикого типа в анализе на ELK-люциферазу *in vitro*, указывающую на то, что эти мутанты FGF21 сохраняют способность зрелого полипептида FGF21 понижать уровень глюкозы в крови субъекта. В соответствии с этим в специфических вариантах осуществления изобретение охватывает усеченные формы зрелого полипептида FGF21 или мутантных полипептидов FGF21, имеющих С-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков.

с) N-концевые и С-концевые усечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения усеченные полипептиды FGF21 могут иметь сочетанные N-концевые и С-концевые усечения. Усеченные полипептиды FGF21, имеющие сочетание N-концевых и С-концевых усечений, сохраняют активность соответствующих усеченных полипептидов FGF21, имеющих только N-концевые или С-концевые усечения. Говоря иначе, усеченные полипептиды FGF21, имеющие как N-концевые усечения длиной менее 9 аминокислотных остатков, так и С-концевые усечения длиной менее 13 аминокислотных остатков, обладают такой же или даже большей активностью по снижению уровня глюкозы в крови, чем усеченные полипептиды FGF21, имеющие только N-концевые усечения длиной менее 9 аминокислотных остатков или С-концевые усечения длиной менее 13 аминокислотных остатков. В соответствии с этим в специфических вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает усеченные формы зрелого полипептида FGF21 или мутантных полипептидов FGF21, имеющих N-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков и С-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков.

Как и в отношении всех мутантов FGF21 по настоящему изобретению, усеченные полипептиды FGF21 могут в необязательном порядке включать аминоконцевой остаток метионина, который можно ввести посредством направленной мутации или в результате процесса бактериальной экспрессии.

Усеченные полипептиды FGF21 по настоящему изобретению можно изготовить так, как это описано в примерах 3 и 6. Средний специалист в данной области, знакомый со стандартными методиками молекулярной биологии, сможет употребить свои знания вместе со сведениями, представленными в настоящем раскрытии изобретения, чтобы изготавливать и применять усеченные полипептиды FGF21 по настоящему изобретению. Для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, тканевой культуры и трансформации можно использовать стандартные методики (например, электропорацию, липофекцию). См., например, публикацию Sambrook et. al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше, которая включена в этот документ в качестве ссылки с любой целью. Ферментативные реакции и методики очистки можно проводить в соответствии со спецификациями производителей, как это общепринято в данной области техники или описано в настоящем документе. Если не представлены специальные определения, номенклатура, используемая в данном документе применительно к лабораторным процедурам и методикам аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, представлена хорошо известной и общепринятой номенклатурой в данной области. Для химического синтеза, химических анализов, изготовления фармацевтических препаратов, рецептурных составов, их доставки и для лечения пациентов можно использовать стандартные методики.

Усеченные полипептиды FGF21 по настоящему изобретению также можно соединять с другим компонентом, который способен придать усеченному полипептиду FGF21 дополнительные свойства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения усеченный полипептид FGF21 может быть соединен с последовательностью Fc. Такое слияние можно осуществить, применяя известные способы молекулярной биологии и/или руководящие указания, представленные в данном документе. Преимущества таких составных полипептидов, а также способы изготовления таких составных полипептидов будут обсуждаться в данном документе более подробно.

4) Мутанты FGF21, устойчивые к протеолизу.

Как указано в примере 8, было обнаружено, что зрелый FGF21 подвергается разрушению *in vivo*, которое, в конечном итоге, является результатом протеолитической атаки. Было обнаружено, что разрушение зрелого FGF21 *in vivo* укорачивает эффективный период его полувыведения, а это, в свою очередь, отрицательно влияет на терапевтический потенциал молекулы. В соответствии с этим было проведено целенаправленное исследование по идентификации мутантов FGF21, которые проявляют устойчивость к протеолизу. В результате этого исследования было определено, что сайты в молекуле зрелого полипептида FGF21, которые особенно чувствительны к протеолизу, включают аминокислотные остатки в положениях 4-5, 20-21, 151-152 и 171-172.

Было проведено широкое, но сфокусированное и целенаправленное исследование по идентификации специфических замещений, которые устраняют наблюдаемый протеолитический эффект, хотя при этом не влияют на активность белка в недопустимой степени. Табл. 8 и 11 представляют некоторые из полученных и протестированных мутантов. Как описано в примерах 13 и 14, не все мутанты FGF21 демонстрируют идеальный профиль: одни мутанты, приобретая устойчивость к протеолизу, утрачивали или снижали полезную активность FGF21, а другие мутанты сохраняли активность FGF21, но не приобретали устойчивости к протеолизу. Некоторые мутанты, включая, например, FGF21 P171G, сохраняли

уровень активности, сходный с FGF21 дикого типа, и в то же время демонстрировали устойчивость к протеолитическому разрушению.

Один из критериев отбора при идентификации желательных мутантов FGF21, устойчивых к протеолизу, заключался в том, чтобы активность мутанта FGF21 была, по существу, такой же или даже большей по сравнению с активностью FGF21 дикого типа. Следовательно, еще один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на мутанты FGF21, которые устойчивы к протеолизу, но при этом сохраняют активность, которая, по существу, не отличается от активности FGF21 дикого типа или превышает ее. Хотя в некоторых случаях это менее желательно, еще один вариант осуществления настоящего изобретения связан с мутантами FGF21, которые устойчивы к протеолизу, но проявляют в некоторой степени сниженную активность. В некоторых случаях может оказаться желательным поддерживать протеолиз, вследствие чего мутанты FGF21, которые допускают некоторую степень протеолиза, формируют еще один вариант осуществления настоящего изобретения.

Как и все мутанты FGF21 по настоящему изобретению, мутанты FGF21, устойчивые к протеолизу, можно изготовить так, как описано в данном документе. Специалисты в данной области, например знающие стандартные методики молекулярной биологии, смогут употребить свои знания вместе со сведениями, представленными в настоящем раскрытии изобретения, чтобы изготавливать и применять мутанты FGF21, устойчивые к протеолизу, в соответствии с настоящим изобретением. Для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, тканевой культуры и трансформации можно использовать стандартные методики (например, электропорацию, липофекцию). См., например, публикацию Sambrook et. al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки с любой целью. Ферментативные реакции и методики очистки можно проводить в соответствии со спецификациями производителей, как это общепринято в данной области техники или описано в настоящем документе. Если не представлены специальные определения, номенклатура, используемая в данном документе применительно к лабораторным процедурам и методикам аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, представлена хорошо известной и общепринятой номенклатурой в данной области. Для химического синтеза, химических анализов, изготовления фармацевтических препаратов, рецептурных составов, их доставки и для лечения пациентов можно использовать стандартные методики.

Мутанты FGF21, устойчивые к протеолизу, можно соединять с другим компонентом, который способен придать мутанту FGF21, устойчивому к протеолизу, дополнительные свойства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения устойчивый к протеолизу мутант FGF21 можно соединить с последовательностью Fc IgG, например SEQ ID NO: 13. Такое слияние можно осуществить, применяя известные способы молекулярной биологии и/или руководящие указания, представленные в данном документе. Преимущества таких составных полипептидов, а также способы изготовления таких составных полипептидов известны и будут обсуждаться в данном документе более подробно.

5. Мутанты FGF21 с пониженной агрегацией.

Как описано в примере 15, одним из свойств полипептида FGF21 дикого типа является его склонность к агрегации. При концентрации свыше приблизительно 5 мг/мл степень агрегации высока при комнатной температуре. Как показано и описано в данном документе, степень агрегации для полипептида FGF21 дикого типа зависит как от концентрации, так и от температуры.

Агрегация может создать проблемы при работе с FGF21 дикого типа в этих концентрациях, например, в контексте составления терапевтической композиции. В соответствии с этим было проведено целенаправленное исследование по идентификации мутантов FGF21, которые проявляют пониженную склонность к агрегации. Затем выявленные мутанты FGF21 были протестированы на склонность к агрегации в различных концентрациях.

Было проведено широкое, но сфокусированное и целенаправленное исследование по идентификации специфических замещений, которые устраняют наблюдаемый эффект агрегации для FGF21 дикого типа, но при этом не влияют на активность белка в недопустимой степени. Подход к идентификации подходящих мутантов с пониженной агрегацией описан в примере 15. В табл. 16 представлены некоторые полученные и протестированные мутанты. Как показано в примере 17, не все мутанты FGF21 проявляют идеальный профиль. Одни мутанты, такие как FGF21 L58E, имели сниженную активность FGF21 и не исследовались далее, а другие мутанты, такие как FGF21 A134E, сохраняли активность FGF21, но не приобретали свойства пониженной склонности к агрегации. В то же время некоторые мутанты, такие как FGF21 L98R, не только сохраняли активность FGF21, но и демонстрировали пониженную агрегацию. Один мутант, FGF21 A45K, неожиданно проявил повышенную активность FGF21 наряду с пониженной склонностью к агрегации.

Один из критериев отбора при идентификации желательных мутантов FGF21, не склонных к агрегации, заключался в том, чтобы активность мутанта FGF21 была, по существу, сходной или даже большей по сравнению с активностью FGF21 дикого типа. Следовательно, еще один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на мутанты FGF21, имеющие пониженную склонность к агрегации, но в то же время сохраняющие активность FGF21, которая сходна с активностью FGF21 дикого типа или превышает ее. Несмотря на то что в некоторых случаях это менее желательно, еще один вариант осуществ-

ствления настоящего изобретения связан с мутантами FGF21, которые имеют пониженную склонность к агрегации, но проявляют в некоторой степени сниженную активность FGF21. В некоторых случаях может оказаться желательным поддерживать определенный уровень агрегации, вследствие чего мутанты FGF21, которые допускают некоторую степень агрегации, формируют еще один вариант осуществления настоящего изобретения.

Как и все мутанты FGF21 по настоящему изобретению, мутанты FGF21, обладающие пониженной склонностью к агрегации, можно изготовить так, как описано в данном документе. Средние специалисты в данной области, знакомые со стандартными методиками молекулярной биологии, смогут употребить свои знания вместе со сведениями, представленными в настоящем раскрытии изобретения, чтобы изготовлять и применять мутанты FGF21 с пониженной склонностью к агрегации, соответствующие настоящему изобретению. Для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, тканевой культуры и трансформации можно использовать стандартные методики (например, электропорацию, липофекцию). См., например, Sambrook et. al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше, которая включена в этот документ в качестве ссылки с любой целью. Ферментативные реакции и методики очистки можно проводить в соответствии со спецификациями производителей, как это общепринято в данной области техники или описано в настоящем документе. Если не представлены специальные определения, номенклатура, используемая в данном документе применительно к лабораторным процедурам и методикам аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, представлена хорошо известной и общепринятой номенклатурой в данной области. Для химического синтеза, химических анализов, изготовления фармацевтических препаратов, рецептурных составов, их доставки и для лечения пациентов можно использовать стандартные методики. Мутанты FGF21, не склонные к агрегации, можно соединять с другим компонентом, который способен придать мутанту FGF21, не склонному к агрегации, дополнительные свойства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения не склонный к агрегации мутант FGF21 можно соединить с последовательностью Fc IgG, например SEQ ID NO: 13. Такое слияние можно осуществить, применяя известные способы молекулярной биологии и/или руководящие указания, представленные в данном документе. Преимущества таких составных полипептидов, а также способы изготовления таких составных полипептидов обсуждаются в данном документе более подробно.

6) Комбинированные мутанты FGF21.

Как описано в данном документе, последовательность FGF21 дикого типа обладает некоторыми свойствами, которые создают значительные проблемы при использовании FGF21 в качестве терапевтической молекулы. Среди этих проблем необходимо упомянуть чувствительность белка к разрушению и его склонность к агрегации в высоких концентрациях. После всесторонних попыток идентифицировать такие полипептиды FGF21, которые преодолевают каждую из этих проблем, было проведено целенаправленное исследование для определения того, можно ли скомбинировать аминокислотные замещения, придающие белку устойчивость к протеолизу, и замещения, понижающие склонность к агрегации, чтобы добиться аддитивного или синергического эффекта таких замещений в одной полипептидной последовательности, поддерживая при этом такой уровень активности, который соответствует активности FGF21 дикого типа или превосходит ее. Эта задача сложна для решения, поскольку в данной области знаний известно, что введение множественных мутаций в определенный полипептид иногда может отрицательно сказаться на экспрессии, активности и последующей выработке белка в производственных масштабах.

Неожиданно, как это продемонстрировано в примерах 19 и 20, было обнаружено, что желательные свойства нескольких мутантов FGF21, действительно, можно комбинировать аддитивным или синергическим образом, чтобы получить такой мутант FGF21, который обладает улучшенными фармацевтическими свойствами. В данном документе раскрыты мутанты FGF21, которые устойчивы к протеолизу, имеют пониженную степень агрегации, но при этом сохраняют такую активность, которая соответствует активности FGF21 дикого типа или превосходит ее.

Один из критериев отбора при идентификации желательных комбинированных мутантов FGF21 заключался в том, чтобы активность мутанта FGF21 была, по существу, сходной или даже большей по сравнению с активностью FGF21 дикого типа. Следовательно, еще один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на мутанты FGF21, устойчивые к протеолизу и имеющие пониженную склонность к агрегации, но в то же время сохраняющие активность FGF21, которая сходна с активностью FGF21 дикого типа или превышает ее. Хотя в некоторых случаях это менее желательно, еще один вариант осуществления настоящего изобретения связан с мутантами FGF21, которые устойчивы к протеолизу и имеют пониженную склонность к агрегации, но проявляют в некоторой степени сниженную активность FGF21. В некоторых случаях может оказаться желательным поддерживать определенный уровень протеолиза и/или агрегации, вследствие чего мутанты FGF21, которые допускают некоторую степень протеолиза и/или агрегации, формируют еще один вариант осуществления настоящего изобретения.

Как и все мутанты FGF21 по настоящему изобретению, комбинированные мутанты FGF21, соответствующие этому изобретению, можно изготовить так, как описано в данном документе. Средние специалисты в данной области, знакомые со стандартными методиками молекулярной биологии, смогут употребить свои знания вместе со сведениями, представленными в настоящем раскрытии изобретения, чтобы

изготавливать и применять комбинированные мутанты FGF21, соответствующие настоящему изобретению. Для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, тканевой культуры и трансформации можно использовать стандартные методики (например, электропорацию, липофекцию). См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше, которая включена в этот документ в качестве ссылки с любой целью. Ферментативные реакции и методики очистки можно проводить в соответствии со спецификациями производителей, как это общепринято в данной области техники или описано в настоящем документе. Если не представлены специальные определения, номенклатура, используемая в данном документе применительно к лабораторным процедурам и методикам аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, представлена хорошо известной и общепринятой номенклатурой в данной области. Для химического синтеза, химических анализов, изготовления фармацевтических препаратов, рецептурных составов, их доставки и для лечения пациентов можно использовать стандартные методики.

Комбинированные мутанты FGF21, соответствующие настоящему изобретению, можно соединять с другим компонентом, который способен придать комбинированному мутанту FGF21 дополнительные свойства. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения комбинированный мутант FGF21 можно соединить с последовательностью Fc IgG, например SEQ ID NO: 13. Такое слияние можно осуществить, применяя известные способы молекулярной биологии и/или руководящие указания, представленные в данном документе. Преимущества таких составных полипептидов, а также способы изготовления таких составных полипептидов обсуждаются в данном документе более подробно.

7) Составные белки FGF21.

При использовании в данном документе термин "составной полипептид FGF21" или "составной белок FGF21" относится к соединению одного или более аминокислотных остатков (например, с образованием гетерологичного белка или пептида) на N-конце или C-конце любого мутантного полипептида FGF21, описанного в данном документе.

Гетерологичные пептиды и полипептиды включают, но, не ограничиваясь ими, эпитоп, позволяющий выявить и/или выделить мутантный полипептид FGF21, трансмембранный рецепторный белок или его часть, такую как внеклеточный домен или трансмембранный и внутриклеточный домен, лиганд или часть лиганда, которые связываются с трансмембранным рецепторным белком, фермент или часть фермента, которые каталитически активны, пептид или полипептид, которые стимулируют олигомеризацию, например, домен лейциновой застежки, пептид или полипептид, которые повышают стабильность, например, константный участок иммуноглобулина, функциональное или не функциональное антитело либо его тяжелая или легкая цепь, а также полипептид, который обладает активностью, в частности, терапевтической активностью, отличной от мутантных полипептидов FGF21 по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также охватывает мутантов FGF21, соединенных с сывороточным альбумином человека (HSA).

Составные белки FGF21 можно изготовить посредством соединения гетерологичных последовательностей или на N-конце, или на C-конце мутантного полипептида FGF21. Как описано в данном документе, гетерологичная последовательность может представлять собой аминокислотную последовательность или полимер, не содержащий аминокислот. Гетерологичные последовательности можно соединять с мутантным полипептидом FGF21 или напрямую, или через линкер/адаптерную молекулу. Линкер или адаптерная молекула могут представлять собой один или более аминокислотных остатков (или -меров), например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, или 9 остатков (или -меров), предпочтительно, от 10 до 50 аминокислотных остатков (или -меров), например 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 остатков (или -меров) и, более предпочтительно, от 15 до 35 аминокислотных остатков (или -меров). Линкер или адаптерную молекулу также можно сконструировать с сайтом расщепления для рестрикционной ДНК-эндонуклеазы или для протеазы, что позволяет разделять соединенные компоненты.

а) Соединения с Fc.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения мутантный полипептид FGF21 соединен с одним или более доменов участка Fc иммуноглобулина IgG человека. Антитела включают две функционально независимые части, вариабельный домен, известный как "Fab", который связывает антиген, и константный домен, известный как "Fc", который вовлечен в такие эффекторные функции как активация комплемента и атака фагоцитарными клетками. Домен Fc имеет длинный период полувыведения из сыворотки, тогда как домен Fab является короткоживущим (Capon et al., 1989, *Nature* 337: 525-31). При соединении с терапевтическим белком домен Fc может обеспечить более длительный период полувыведения или встроить такие функции как связывание рецептора Fc, связывание белка А, фиксация комплемента и, возможно, даже перенос через плаценту (Capon et al., 1989).

Фармакокинетический анализ *in vivo* указывает на то, что FGF21 человека имеет короткий период полувыведения, который составляет у мышей приблизительно 1 ч, что связано с быстрым клиренсом и разрушением *in vivo*. Следовательно, для удлинения периода полувыведения FGF21 последовательность Fc присоединяли к N- или C-концевому участку полипептида FGF21. Слияние участка Fc с FGF21 дикого типа, в особенности, присоединение Fc к N-концу FGF21 дикого типа, вопреки ожиданиям, не удлиняло период полувыведения, однако это привело к исследованию протеолитического распада FGF21 *in vivo* и

к идентификации мутантов FGF21, которые были устойчивы к такому распаду. Такие мутанты, описанные в примерах 8 и 11, проявляют больший период полувыведения по сравнению с FGF21 дикого типа. Эти и другие составные белки FGF21 формируют варианты осуществления настоящего изобретения.

По всему тексту настоящего раскрытия изобретения обозначение Fc-FGF21 относится к составному белку, в котором последовательность Fc присоединена к N-концу FGF21. Сходным образом, обозначение Fc-FGF21 относится к составному белку, в котором последовательность Fc присоединена к C-концу FGF21.

Полученный в результате такого слияния составной белок FGF21 можно очистить, например, применяя колонку для аффинной хроматографии с белком А. Было обнаружено, что пептиды и белки, к которым присоединен участок Fc, проявляют *in vivo* значительно более длительный период полувыведения по сравнению с негибридизированными аналогами. К тому же слияние с участком Fc создает возможность для димеризации/мультимеризации составного полипептида. Участок Fc может представлять собой участок Fc, встречающийся в природе, но также может подвергаться изменениям для улучшения определенных качеств, таких как терапевтические качества, время циркуляции или сниженная агрегация.

Полезные модификации белковых терапевтических средств за счет слияния с доменом "Fc" антитела подробно обсуждаются в Международной патентной публикации № WO 00/024782, содержание которой включено в этот документ в качестве ссылки во всей полноте. Этот документ обсуждает сцепление с "транспортником", таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), декстран или участок Fc.

b) Линкеры составных белков.

При формировании составных белков по настоящему изобретению можно, но не обязательно, использовать линкер. Если линкер представлен, его химическая структура не принципиальна, поскольку он, в первую очередь, служит спейсером. Линкер может состоять из аминокислот, сцепленных друг с другом посредством пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер составлен из 1-20 аминокислот, сцепленных посредством пептидных связей, при этом аминокислоты выбраны из 20 аминокислот, встречающихся в природе. В различных вариантах осуществления изобретения от 1 до 20 аминокислот выбраны из глицина, серина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер составлен из большинства аминокислот, которые не испытывают стерических затруднений, таких как глицин и аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкеры представляют собой полиглицины (такие как (Gly)₄ (SEQ ID NO: 29) и (Gly)₅ (SEQ ID NO: 30)), полиаланины, комбинации глицина и аланина (такие как поли- Ala) или комбинации глицина и серина (такие как поли(Gly-Ser)). Другие подходящие линкеры включают: (Gly)₅-Ser-(Gly)₃-Ser-(Gly)₄-Ser (SEQ ID NO: 23), (Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser (SEQ ID NO: 31), (Gly)₃-Lys-(Gly)₄ (SEQ ID NO: 32), (Gly)₃-Asn-Gly-Ser-(Gly)₂ (SEQ ID NO: 33), (Gly)₃-Cys-(Gly)₄ (SEQ ID NO: 34), и Gly-Pro-Asn-Gly-Gly (SEQ ID NO: 35). Несмотря на то что было обнаружено, что для составных белков FGF21 особенно хорош линкер из 15 аминокислот, настоящее изобретение рассматривает линкеры любой длины или любого состава.

Линкеры, описанные в данном документе, типичны, но настоящее изобретение также рассматривает линкеры, которые намного длиннее и могут включать другие аминокислотные остатки. Непептидные линкеры также рассматриваются в настоящем изобретении.

Например, можно использовать алкильные линкеры, такие как -NH-(CH₂)_s-C(O)-, в котором s = от 2 до 20. Далее, такие алкильные линкеры могут быть замещены любой стерически незатрудненной группой, включая, но не ограничиваясь ими, низший алкил (например, C1-C6), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH₂ или фенил. Типичным непептидным линкером является полиэтиленгликолевый линкер, который имеет молекулярный вес от 100 до 5000 кДа, например от 100 до 500 кДа.

8) Химически модифицированные мутанты FGF21.

Химически модифицированные формы мутантных полипептидов FGF21, описанные в данном документе, включая усеченные формы FGF21, описанные в данном документе, могут быть изготовлены квалифицированным специалистом с учетом информации, представленной в этом раскрытии изобретения. Такие химически модифицированные мутанты FGF21 изменены таким образом, что они отличаются от немодифицированных мутантов FGF21 или по типу, или по локализации молекул, естественным образом прикрепленных к мутанту FGF21. Химически модифицированные мутанты FGF21 могут включать молекулы, образующиеся посредством удаления одной или более химических групп, прикрепленных естественным образом.

В одном из вариантов осуществления изобретения мутантные полипептиды FGF21 по настоящему изобретению могут быть модифицированы посредством ковалентного присоединения одного или более полимеров. Например, в типичном случае отобранный полимер растворим в воде, поэтому белок, к которому он присоединяется, не выпадает в осадок в водной среде, такой как физиологическая среда. В сферу пригодных полимеров включены смеси полимеров. В целях терапевтического использования препарата, являющегося конечным продуктом, предпочтительно, чтобы полимер был фармацевтически приемлемым. Нерастворимые в воде полимеры, конъюгированные с мутантными полипептидами FGF21 по настоящему изобретению, также формируют один из аспектов изобретения.

Типичные полимеры могут иметь любой молекулярный вес и быть разветвленными или неразветв-

ленными. Каждый типичный полимер имеет средний молекулярный вес приблизительно от 2 до 100 кДа (термин "приблизительно" указывает на то, что в препаратах водорастворимых полимеров вес некоторых молекул будет отличаться в большую или меньшую сторону от заявленного молекулярного веса). Предпочтительно, чтобы средний молекулярный вес каждого полимера составлял приблизительно от 5 до 50 кДа, более предпочтительно приблизительно от 12 до 40 кДа, наиболее предпочтительно приблизительно от 20 до 35 кДа.

Подходящие водорастворимые полимеры или их смеси включают, но не ограничиваясь ими, N-сцепленные или O-сцепленные углеводы, сахара, фосфаты, полиэтиленгликоль (ПЭГ) (включая такие формы ПЭГ, которые были использованы для получения производных белков, включая моно(C₁-C₁₀), алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль), монометоксиполиэтиленгликоль, декстран (такой как декстран низкого молекулярного веса, например приблизительно 6 кДа), целлюлозу или другие полимеры на углеводной основе, поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиоли (например, глицерин) и поливиниловый спирт. Настоящее изобретение также охватывает бифункциональные поперечно сшитые молекулы, которые могут быть использованы для получения ковалентно связанных мультимеров мутантных полипептидов FGF21. Настоящее изобретение также охватывает мутанты FGF21, ковалентно присоединенные к полисиаловой кислоте.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутант FGF21 ковалентно или химически модифицирован с присоединением одного или более водорастворимых полимеров, включая, но, не ограничиваясь ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиоксиэтиленгликоль или пропиленгликоль. См., например, патенты США № 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутант FGF21 содержит один или более полимеров, включая, но, не ограничиваясь ими, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу, другой полимер на углеводной основе, поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимера полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиоли (например, глицерин), поливиниловый спирт или смеси таких полимеров.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутант FGF21 ковалентно модифицирован субъединицами ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более водорастворимых полимеров связаны в одном или более специфических положений (например, на N-конце) мутанта FGF21. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более водорастворимых полимеров в случайном порядке прикреплены к одной или более боковых цепей мутанта FGF21. В некоторых вариантах осуществления изобретения ПЭГ используется для улучшения терапевтической производительности мутанта FGF21. Некоторые из таких способов обсуждаются, например, в патенте США № 6133426, который включен в этот документ в качестве ссылки с любой целью.

В тех вариантах осуществления настоящего изобретения, где полимером является ПЭГ, группа ПЭГ может иметь любой подходящий молекулярный вес и может быть линейной или разветвленной. Предпочтительно, чтобы средний молекулярный вес группы ПЭГ варьировался в приблизительноном диапазоне от 2 до 100 кДа и, более предпочтительно, приблизительно от 5 до 50 кДа, например 10, 20, 30, 40 или 50 кДа. Группы ПЭГ обычно прикрепляются к мутанту FGF21 посредством ацилирования или восстановительного алкилирования через реактивную группу на компоненте ПЭГ (например, альдегидную, аминокислотную или эфирную группу), взаимодействующую с реактивной группой на мутанте FGF21 (например, альдегидной, аминокислотной или эфирной группой).

ПЭГилирование (или пегилирование) полипептидов, включая мутанты FGF21 по настоящему изобретению, может специфически осуществляться с применением любых реакций пегилирования, известных в данной области знаний. Такие реакции описаны, например, в следующих ссылках: Francis et al., 1992, Focus on Growth Factors 3: 4-10, европейские патенты № 0154316 и 0401384, патент США № 4179337. Например, пегилирование можно осуществить посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реактивной молекулой пропиленгликоля (или аналогичного реактивного водорастворимого полимера), как описано в данном документе. Для реакций ацилирования выбранный полимер должен иметь одну реактивную эфирную группу. Для восстановительного алкилирования выбранный полимер должен иметь одну реактивную альдегидную группу. Реактивным альдегидом является, например, пропиональдегид пропиленгликоля, который стабилен в воде, либо его моно C₁-C₁₀ алкокси или арилокси производные (см., например, патент США № 5252714).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полезная стратегия присоединения группы ПЭГ к полипептиду включает комбинирование через образование конъюгатной связи в растворе между пептидом и компонентом ПЭГ, при этом каждый из них несет особую функциональность со взаимной реактивностью по отношению друг к другу. Пептиды можно легко приготовить с помощью традиционного твердофазного синтеза. Пептиды "предварительно активированы", т.е. имеют соответствующую функциональную группу в специфическом сайте. Перед реакцией с компонентом ПЭГ предшественники очищают и получают их полные характеристики. Сшивание пептида с ПЭГ обычно происходит в водной фазе, и его можно легко мониториовать посредством обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография). Пегилированные пептиды можно легко очи-

стить посредством препаративной ВЭЖХ и охарактеризовать посредством аналитической ВЭЖХ, аминокислотного анализа и лазерной десорбционной масс-спектрометрии.

Полисахаридные полимеры представляют собой еще один тип водорастворимого полимера, который можно применять для модификации белка. Следовательно, мутанты FGF21 по настоящему изобретению, соединенные с полисахаридным полимером, формируют варианты осуществления настоящего изобретения. Декстраны представляют собой полисахаридные полимеры, состоящие из отдельных субъединиц глюкозы, преимущественно соединенных альфа 1-6 связями. Декстран, как таковой, доступен в широком диапазоне молекулярного веса и легко доступен в диапазоне молекулярного веса приблизительно от 1 до 70 кДа. Декстран является подходящим водорастворимым полимером для применения в качестве носителя самостоятельно или в комбинации с другим носителем (например, Fc). См., например, Международную патентную публикацию № WO 96/11953. В ней было описано применение декстрана, конъюгированного с терапевтическими или диагностическими иммуноглобулинами. См., например, Европейскую патентную публикацию № 0315456, которая включена в этот документ в качестве ссылки. Настоящее изобретение также охватывает применение декстрана с молекулярным весом приблизительно от 1 до 20 кДа.

В целом, химическую модификацию можно проводить в любых подходящих условиях, которые способствуют реакции белка с активированной молекулой полимера. Способы приготовления химически модифицированных полипептидов обычно включают следующие этапы: (а) реакция полипептида с активированной молекулой полимера (такой как реактивное эфирное или альдегидное производное молекулы полимера) в таких условиях, при которых мутантный полипептид FGF21 прикрепляется к одной или более молекул полимера, и (б) получение продуктов реакции. Оптимальные условия реакции можно определить, основываясь на известных параметрах и желательном результате. Например, чем больше соотношение между молекулами полимера и белка, тем больше процентный показатель присоединения молекул полимера. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения химически модифицированные мутанты FGF21 могут иметь единичный компонент, представленный молекулой полимера на аминоконце (см., например, патент США № 5234784).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения мутантные полипептиды FGF21 могут быть химически соединены с биотином. Затем комплексам биотина с мутантными полипептидами FGF21 дают возможность связываться с авидином, что приводит к образованию тетравалента авидин/биотин/мутантный полипептид FGF21.

Мутантные полипептиды FGF21 также можно ковалентно соединять с динитрофенолом (DNP) или тринитрофенолом (TNP), а полученные в результате конъюгаты, осаждаемые антителами IgM типа анти-DNP или анти-TNP образуют декамерные конъюгаты с валентностью 10.

В целом, состояния, которые можно облегчить или модулировать введением химически модифицированных мутантов FGF21 по настоящему изобретению, включают те же состояния, которые описаны в данном документе для мутантных полипептидов FGF21. Однако химически модифицированные мутанты FGF21, раскрытые в данном документе, могут обладать дополнительными видами активности, усиленной или ослабленной биологической активностью или другими свойствами, такими как удлиненный или укороченный период полувыведения по сравнению с немодифицированными мутантами FGF21.

9) Терапевтические композиции мутантов FGF21 и их введение.

Терапевтические композиции, включающие мутанты FGF21, относятся к сфере настоящего изобретения и специфически рассматриваются в свете идентификации различных мутантных последовательностей FGF21, проявляющих улучшенные свойства. Такие фармацевтические композиции с мутантами FGF21 могут включать терапевтически эффективное количество мутантного полипептида FGF21 в смеси с фармацевтически или физиологически приемлемым вспомогательным веществом, подобранным в соответствии с предполагаемым способом введения.

Предпочтительно, чтобы приемлемые вспомогательные вещества были нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях.

Фармацевтическая композиция может содержать вспомогательные вещества для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости разложения или высвобождения, адсорбции или пенетрации композиции. Соответствующие вспомогательные вещества включают, но, не ограничиваясь ими, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин), противомикробные средства, антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия), буферы (такие как бораты, бикарбонаты, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты), наполнители (такие как маннит или глицин), хелатообразующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)), комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин), заполнители, моносахариды, дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины), белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины), красящие, вкусо-ароматические или разбавляющие агенты, эмульгирующие агенты, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон), полипептиды низкого молекулярного веса, солеобразующие противоионы (такие как натрий), консерванты (такие как бен-

залконий хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенилэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода), растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль), сахарные спирты (такие как маннит или сорбит), суспендирующие агенты, сурфактанты или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20 или полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин или тилоксапол), агенты, усиливающие стабильность (такие как сахароза или сорбит), агенты, усиливающие тоничность (такие как галиды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит), транспортировщики для доставки, разбавители, наполнители и/или фармацевтические адъюванты (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990) и последующие издания той же книги, которые включены в этот документ в качестве ссылки с любой целью).

Оптимальную фармацевтическую композицию вполне может определить квалифицированный специалист в зависимости, например, от намеченного способа введения, формата доставки и желательной дозы (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, выше). Такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* мутантного полипептида FGF21.

Основной транспортировщик или носитель в фармацевтической композиции может быть водным или не водным по своей природе. Например, подходящим транспортировщиком или носителем для инъекций может быть вода, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно с добавлением других материалов, общепринятых в композициях для парентерального введения. Другими типичными транспортировщиками являются забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином. Другими типичными фармацевтическими композициями являются буфер трис с приблизительным значением pH 7,0-8,5 или ацетатный буфер с приблизительным значением pH 4,0-5,5, которые дополнительно могут включать сорбит или его подходящий заменитель. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиции с мутантным полипептидом FGF21 можно приготовить для хранения, смешивая выбранную композицию, имеющую желательную степень чистоты, с необязательными вспомогательными веществами (Remington's Pharmaceutical Sciences, выше) в виде лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, фармацевтический продукт с мутантным полипептидом FGF21 может выпускаться в виде лиофилизата с применением соответствующих наполнителей, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции с мутантным полипептидом FGF21 могут быть подобраны для парентеральной доставки. В альтернативном варианте можно подобрать композиции для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например пероральной. Изготовление таких фармацевтически приемлемых композиций относится к квалификации специалистов, работающих в данной области.

Вспомогательные компоненты представлены в таких концентрациях, которые приемлемы в месте введения композиции. Например, буферы применяют для поддержания pH композиции на физиологическом уровне или несколько ниже, обычно в приблизительном диапазоне pH от 5 до 8.

Когда речь идет о парентеральном введении, терапевтическая композиция для применения по настоящему изобретению может представлять собой апиrogenный, парентерально приемлемый водный раствор, содержащий желательный мутантный полипептид FGF21 и фармацевтически приемлемый транспортировщик. Особенно подходящим транспортировщиком для парентеральных инъекций является стерильная дистиллированная вода, в которой растворяют мутантный полипептид FGF21, получая в результате стерильный изотонический раствор, законсервированный соответствующим образом. Еще один препарат может включать лекарственный состав из желательной молекулы с таким агентом как инъекционный микросферы, биологически распадающиеся частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), капельки или липосомы, обеспечивающие управляемое и длительное высвобождение продукта, который модно доставлять посредством депонированных инъекций. Также можно использовать гиалуроновую кислоту, что может стимулировать длительное пребывание композиции в кровотоке. Другие подходящие средства для введения желательной молекулы включают имплантируемые приспособления для доставки лекарств.

В одном из вариантов осуществления изобретения может быть составлена фармацевтическая композиция для ингаляции. Например, мутантный полипептид FGF21 может быть оформлен в виде сухого порошка для ингаляции. Также можно приготовить ингаляционные растворы мутантного полипептида FGF21 с пропеллентом для аэрозольной доставки. Еще в одном варианте осуществления изобретения растворы можно распылять при помощи небулайзера. Пульмональное (легочное) введение более подробно описано в Международной патентной публикации № WO 94/20069, которая описывает пульмональное введение химически модифицированных белков.

Также рассматривается возможность перорального введения некоторых лекарственных составов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения мутантные полипептиды FGF21, которые вводят таким способом, можно вводить в лекарственные составы вместе с носителями или без носителей, которые обычно используют при изготовлении твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. Например, можно сконструировать капсулу для высвобождения активной части лекарственного

состава в том отделе желудочно-кишечного тракта, где биологическая доступность лекарства будет максимальной, а распад до попадания в системный кровоток будет минимальным. Для того чтобы облегчить всасывание мутантного полипептида FGF21, в лекарственный состав можно включить дополнительные агенты. Можно также использовать разбавители, вкусо-ароматические вещества, воски с низкой температурой плавления, растительные масла, смазки, суспендирующие агенты, агенты для распада таблеток и связующие вещества.

Фармацевтическая композиция другого типа может включать эффективное количество мутантного полипептида FGF21 в смеси с нетоксичными наполнителями, которые удобны для производства таблеток. Растворяя таблетки в стерильной воде или другом подходящем носителе, можно приготовить растворы в стандартной дозовой форме. Подходящие наполнители включают, но не ограничиваясь ими, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактозу или фосфат кальция, связующие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик, а также смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк. Квалифицированным специалистам будут очевидны дополнительные варианты фармацевтических композиций с мутантными полипептидами FGF21, включая лекарственные составы с замедленным или контролируемым высвобождением мутантных полипептидов FGF21. Компетентным специалистам также должны быть известны методики составления многих других средств с замедленным или контролируемым высвобождением, таких как липосомные носители, биологически разрушаемые микрочастицы, пористый бисер и депонированные инъекции (см., например, такие ссылки как Международная патентная публикация № WO 93/15722, которая описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций, Wischke & Schwendeman, 2008, *Int. J. Pharm.* 364: 298-327, а также Freiberg & Zhu, 2004, *Int. J. Pharm.* 282: 1-18, в которых обсуждается изготовление и применение микросфер/микрочастиц).

Дополнительные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые полимерные матрицы в виде изделий с определенной формой, например пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (патент США № 3773919 и европейский патент № 0058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 22: 547-56), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., выше) или поли-D(-)-3-гидроксибутировую кислоту (европейский патент № 0133988). Композиции с замедленным высвобождением также могут включать липосомы, которые можно изготовить любым из множества способов, известных в данной области техники. См., например, Epstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3688-92 и европейские патенты № 0036676, 0088046 и 0143949.

Типичная фармацевтическая композиция с мутантным полипептидом FGF21, применяемая для введения *in vivo*, должна быть стерильной. Этого можно достичь пропусканием через мембрану для стерильной фильтрации. При изготовлении лиофилизированной композиции стерилизацию с применением этого способа можно проводить или до лиофилизации, или после лиофилизации и восстановления. Композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизированном виде или в растворе. В дополнение к этому парентеральную композицию обычно помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например в мешок для внутривенного раствора или во флакон с пробкой, которую можно проколоть иглой для подкожной инъекции.

После составления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие лекарственные составы можно хранить или в готовой для применения форме, или в такой форме, которая требует восстановления перед введением (например, в лиофилизированной).

В специфическом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на наборы для изготовления модулей разовых доз, предназначенных для введения. Такие наборы могут включать как первый контейнер с сухим белком, так и второй контейнер с водным составом. В сферу этого изобретения также входят наборы, включающие однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

Эффективное количество фармацевтической композиции с мутантным полипептидом FGF21 для терапевтического применения будет зависеть, например, от терапевтической ситуации и целевых объектов терапии. Квалифицированный специалист поймет, что подходящие уровни доз для лечения будут варьироваться, что частично зависит от вводимой молекулы, от показания для применения мутантного полипептида FGF21, от способа введения, а также от габаритов пациента (веса тела, площади поверхности тела или размера органа) и от его/ее медицинского статуса (возраста и общего состояния здоровья). В соответствии с этим клиницист, стремясь добиться оптимального терапевтического эффекта, может титровать дозу и изменять способ введения лекарства.

Типичная доза может варьироваться в приблизительном диапазоне от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. В других вариантах осуществления изобретения доза может варьироваться в приблизительном диапазоне от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг, от 1 мкг/кг до 100 мг/кг

или от 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 мкг/кг до 100 мг/кг. В других вариантах осуществления изобретения доза может составлять 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 мкг/кг или 10 мг/кг.

Частота введения доз будет зависеть от фармакокинетических параметров мутантного полипептида FGF21 в применяемом лекарственном составе. В типичном случае клиницист будет вводить композицию так, чтобы была достигнута доза, позволяющая добиться желательного лечебного эффекта. Следовательно, композицию можно вводить в виде разовой дозы, а также двух или более доз, разделенных по времени (которые могут содержать одно и то же или разное количество нужной молекулы), либо посредством непрерывного вливания через имплантируемое приспособление или катетер. Дальнейшую доводку правильной дозы обычно проводит средний специалист, что находится в пределах его компетенции и входит в сферу его повседневных задач. Правильную дозу устанавливают, исходя из соответствующих данных по дозовой зависимости реакции на лечение.

Способ введения фармацевтической композиции соответствует известным способам, например перорально, через инъекцию: внутривенную, внутривнутрибрюшинную, внутримозговую (интрапаренхиматозную или интравентрикулярную), внутримышечную, внутриглазную, внутриартериальную, интрапортальную (в воротную вену), внутрь повреждения, а также через системы с длительным высвобождением (которые могут быть инъекционными или представлять собой имплантируемые приспособления). При желании композиции можно вводить болюсной инъекцией, непрерывным вливанием или через имплантируемое приспособление.

Альтернативно или в дополнение к этому, композицию можно вводить местно через имплантацию мембраны, губки или другого подходящего материала, который впитывает или инкапсулирует нужную молекулу. При использовании имплантируемого приспособления это приспособление можно имплантировать в любую подходящую ткань или орган, при этом доставка нужной молекулы может происходить через диффузию, рассчитанный по времени болюс или в виде непрерывного введения.

10) Возможности терапевтического применения мутантных полипептидов FGF21.

Мутантные полипептиды FGF21 можно применять для лечения, диагностики, облегчения или профилактики многих заболеваний или патологических состояний, включая нарушения обмена веществ, но, не ограничиваясь ими. В одном из вариантов осуществления изобретения нарушение обмена веществ, подлежащее лечению, представляет собой диабет, например диабет 2 типа. В другом варианте осуществления изобретения нарушением обмена веществ является ожирение. Другие варианты осуществления изобретения направлены на такие метаболические состояния или нарушения как дислипидемия, гипертония, гепатостеатоз, в частности неалкогольный стеатогепатит (NASH), сердечно-сосудистое заболевание, в частности атеросклероз, и возрастные изменения обмена веществ.

В прикладном варианте осуществления изобретения такое заболевание/патологическое состояние, как сахарный диабет или ожирение, можно лечить посредством введения пациенту, нуждающемуся в таком лечении, мутантного полипептида FGF21 в терапевтически эффективной дозе, как описано в данном документе. Введение можно осуществить в соответствии со способами, описанными в данном документе, в частности посредством внутривенной инъекции, внутривнутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции или перорально в виде таблеток или жидкого лекарственного состава. В большинстве ситуаций нужную дозу может определить клиницист, как описано в данном документе, при этом нужная доза представляет собой терапевтически эффективную дозу мутантного полипептида FGF21. Квалифицированному специалисту будет очевидно, что терапевтически эффективная доза мутантного полипептида FGF21 будет зависеть, кроме всего прочего, от графика введения, от стандартной дозы вводимого антигена, от того, вводят ли молекулу нуклеиновой кислоты или полипептида в комбинации с другими терапевтическими средствами, от иммунного статуса и общего состояния здоровья реципиента. Термин "терапевтически эффективная доза" при использовании в данном документе означает, что количество мутантного полипептида FGF21, вызывающее биологическую или медицинскую реакцию в тканевой системе, в организме животного или человека, которое пытается определить исследователь, лечащий врач или другой клиницист, вызывает облегчение симптомов заболевания или расстройства, подлежащего лечению.

11) Антитела.

В объеме изобретения рассматриваются антитела и фрагменты антител, которые специфично связываются с мутантными полипептидами FGF21 по настоящему изобретению, но не дают специфического связывания с полипептидами FGF21 дикого типа. Антитела могут быть поликлональными, включая специфические поликлональные, моноклональными (MAb), рекомбинантными, химерными, гуманизированными, такими как антитела с пересаженным гипервариабельным участком (CDR), антителами человека, одноцепочечными и/или биспецифическими, а также могут представлять собой их фрагменты, варианты или химически модифицированные молекулы. Фрагменты антител включают те части антитела, которые специфически связываются с эпитопом на мутантном полипептиде FGF21. Примеры таких фрагментов включают фрагменты Fab и F(ab)', полученные в результате ферментативного расщепления полноразмерных антител. Другие связывающие фрагменты включают фрагменты, полученные методи-

ками рекомбинантных ДНК, такими как экспрессия рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариабельные участки антитела.

Поликлональные антитела, направленные против мутантного полипептида FGF21, обычно вырабатывают у животных (например, кроликов или мышей) посредством множественных подкожных или внутрибрюшинных инъекций мутантного полипептида FGF21 и адьюванта. Может оказаться полезным конъюгировать мутантный полипептид FGF21 с белковым носителем, который является иммуногеном для иммунизированного биологического вида, таким как гемоцианин лимфы улитки, сывороточный альбумин, тиреоглобулин крупного рогатого скота или соевый ингибитор трипсина. Для усиления иммунного ответа также используют агрегирующие агенты, такие как квасцы. После иммунизации у животных берут образцы крови и проводят анализ сыворотки на титр антитела против мутантного FGF21.

Моноклональные антитела, направленные на мутантные полипептиды FGF21, можно производить любым способом, который предусматривает выработку молекул антитела непрерывной клеточной линией в культуре. Примеры подходящих способов для выработки моноклональных антител включают способ гибридомы, описанные Kohler et al., 1975, *Nature* 256: 495-97 и способ гибридомы из В-клеток человека (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Изобретение также предлагает клеточные линии, которые вырабатывают моноклональные антитела, реагирующие с мутантными полипептидами FGF21.

Моноклональные антитела по изобретению можно модифицировать для применения в качестве лекарственных средств. В одном из вариантов осуществления изобретения моноклональное антитело представляет собой "химерное" антитело, в котором часть тяжелой (H) и/или легкой (L) цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, полученных от определенного биологического вида или принадлежащих к особому классу/подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, полученных от другого биологического вида или принадлежащих к другому классу/подклассу антител. Сюда же можно включить фрагменты таких антител, которые способны проявлять нужную биологическую активность. См., например, патент США № 4816567, Morrison et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6851-55.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело по изобретению представляет собой "гуманизированное" антитело. Способы гуманизации антител, происходящих не от человека, хорошо известны в данной области техники. См., например, патенты США № 5585089 и 5693762. Обычно гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, встроенных в него из источника нечеловеческого происхождения. Гуманизацию можно провести, например, применяя способы, описанные в данной области техники (см., например, Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522-25; Riechmann et al., 1998, *Nature* 332: 323-27; Verhoeven et al., 1988, *Science* 239: 1534-36), посредством замещения как минимум части гипервариабельного участка антитела грызуна соответствующими участками из антитела человека.

Изобретение также охватывает антитела человека, которые связывают мутантные полипептиды FGF21 по настоящему изобретению. Используя трансгенных животных (например, мышей), которые способны вырабатывать набор антител человека при отсутствии эндогенной выработки иммуноглобулина, такие антитела получают, иммунизируя животных антигеном мутанта FGF21 (т.е. антигеном, имеющим как минимум 6 смежных аминокислот), необязательно соединенных с носителем. См., например, Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2551-55; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362: 255-58; Bruggermann et al., 1993, *Year in Immuno*, 7: 33. В одном из способов таких трансгенных животных получают, выводя из строя эндогенные локусы, кодирующие у них тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина, и вставляя в их геном локусы, кодирующие белки тяжелых и легких цепей человека. Затем частично модифицированных животных, т.е. животных, имеющих неполный комплект модификаций, скрещивают, чтобы получить животное, имеющее все нужные модификации иммунной системы. При введении иммуногена эти трансгенные животные вырабатывают антитела с аминокислотными последовательностями человека (скорее, чем, например, с мышинными), включая вариабельные участки, которые иммуноспецифичны для этих антигенов. См., например, международные патентные публикации № WO 96/33735 и WO 94/02602. Дополнительные способы описаны в патенте США № 5545807, международных патентных публикациях № WO 91/10741 и WO 90/04036, а также в европейском патенте № 0546073. Антитела человека также можно вырабатывать посредством экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или экспрессии в клетках гибридомы, как описано в данном документе.

В альтернативном варианте осуществления изобретения антитела человека также можно получать из библиотек фагового дисплея (см., например, Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581). Эти процессы имитируют иммунный отбор через демонстрацию репертуара антител на поверхности нитевидного бактериофага и последующий отбор фага посредством его связывания с антигеном выбора. Одна из таких методик описана в международной патентной публикации № WO 99/10494, которая описывает выделение высокоаффинных и функциональных агонистических антител для MPL- и msk-рецепторов с применением такого подхода.

Химерные антитела, антитела с пересаженным CDR и гуманизированные антитела обычно получают рекомбинантными способами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела вводят в клетки-хозяева и экспрессируют, применяя материалы и процедуры, описанные в данном документе. В одном из вариан-

тов осуществления изобретения антитела вырабатывают в клетках-хозяевах млекопитающего, таких как клетки CHO. Моноклональные (например, человеческие) антитела можно получать посредством экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или в клетках гибридомы, как описано в документе.

Антитела против мутанта FGF21 по изобретению можно использовать в любом известном способе анализа для выявления и количественной оценки мутантных полипептидов FGF21, таком как анализы конкурентного связывания, прямые и непрямые сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации (см., например, публикацию Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987), включенную в этот документ в качестве ссылки во всей полноте ее содержания). Антитела будут связывать мутантные полипептиды FGF21 с аффинностью, которая соответствует используемому методу анализа.

При диагностическом использовании в некоторых вариантах осуществления изобретения антитела против мутантов FGF21 можно пометить выявляемым компонентом. Выявляемый компонент может представлять собой любой компонент, который способен создавать прямым или непрямым образом подающийся выявлению сигнал. Например, выявляемым компонентом может быть радионуклид, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In или ^{67}Ga , флуоресцентное или хемиллюминесцентное соединение, такое как флуоресцинизоцианат, родамин или люциферин, а также фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза или пероксидаза хрена (Bayer et. al., 1990, *Meth. Enz.* 184: 138-63).

Анализы с конкурентным связыванием основаны на способности меченого стандарта (например, мутантного полипептида FGF21 или его иммунологически реактивной части) конкурировать с испытуемым анализируемым продуктом (например, мутантным полипептидом FGF21) за связывание с ограниченным количеством антитела против мутанта FGF21. Количество мутантного полипептида FGF21 в испытуемом образце обратно пропорционально количеству стандарта, который вступает в связь с антителами. Для того чтобы облегчить определение количества связанного стандарта, антитела обычно инсобилизируют (переводят в нерастворимую форму) до или после конкуренции, чтобы стандарт и анализируемый продукт, связанные с антителами, было удобно отделить от стандарта и анализируемого продукта, оставшихся несвязанными.

Сэндвич-анализы обычно включают использование двух антител, каждое из которых способно связываться с самостоятельной иммуногенной частью или эпитопом белка, подлежащего выявлению или количественной оценке. В сэндвич-анализе тестируемый образец анализируемого продукта обычно связывается с первым антителом, которое иммобилизовано на твердой опоре, а затем второе антитело связывается с анализируемым продуктом, формируя таким образом комплекс из трех частей. См., например, патент США № 4376110. Второе антитело, само по себе, может быть мечено выявляемым компонентом (прямые сэндвич-анализы) или измеряться с применением антитела против иммуноглобулина, которое мечено выявляемым компонентом (непрямые сэндвич-анализы). Например, одним из типов сэндвич-анализа является твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), в котором выявляемый компонент представляет собой фермент.

Антитела против мутанта FGF21 по настоящему изобретению также полезны для получения визуальных изображений *in vivo*. Антитело, меченое выявляемым компонентом, можно ввести животному предпочтительно в кровотоки с последующей оценкой наличия и локализации меченого антитела в организме хозяина. Антитело можно пометить любым компонентом, который поддается выявлению у животного способами ядерного магнитного резонанса, радиологии или другими средствами выявления, известными в данной области техники.

Антитела к мутантам FGF21 по изобретению можно использовать как лекарственные средства. Терапевтические агенты обычно являются агонистами или антагонистами в том смысле, что они либо усиливают, либо ослабляют, соответственно как минимум одну из биологических активностей мутантного полипептида FGF21. В одном из вариантов осуществления антагонистические антитела по изобретению представляют собой антитела или их связывающие фрагменты, которые способны к специфическому связыванию с мутантным полипептидом FGF21 и которые способны подавлять или устранять функциональную активность мутантного полипептида FGF21 *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонистическое антитело будет подавлять функциональную активность мутантного полипептида FGF21 как минимум приблизительно на 50% и предпочтительно как минимум приблизительно на 80%. Еще в одном варианте осуществления изобретения антитело против мутанта способно вмешиваться во взаимодействие между мутантным полипептидом FGF21 и рецептором FGF, таким образом, подавляя или устраняя активность мутантного полипептида FGF21 *in vitro* или *in vivo*. Агонистические и антагонистические антитела против мутанта FGF21 идентифицируют скринирующими анализами, который хорошо известны в данной области техники.

Изобретение также относится к набору, включающему антитела против мутанта FGF21 и другие реактивы, полезные для выявления уровня мутантного полипептида FGF21 в биологических образцах. Такие реактивы могут включать выявляемую метку, блокирующую сыворотку, положительные и отрицательные контрольные образцы, а также реактивы для выявления.

Примеры

Приведенные ниже примеры иллюстрируют специфические варианты осуществления изобретения

и различные варианты его применения. Они сформулированы только в целях пояснения, и их не следует воспринимать как ограничивающие сферу действия изобретения каким-либо образом.

Пример 1. Изготовление конструкций для экспрессии FGF21.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую зрелый полипептид FGF21, получали посредством амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, имеющих нуклеотидные последовательности, которые соответствуют 5' и 3' концам последовательности зрелого FGF21. Табл. 2 перечисляет праймеры, использованные амплификации последовательности зрелого FGF21.

Таблица 2. Праймеры ПЦР для конструкции FGF21

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
Смысловой	5'-AGGAGGAATAACATATGCATCCAATTOOAGATTCTTCTCC-3'	5
Антисмысловой	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	6

Праймеры, использованные для изготовления конструкции, экспрессирующей FGF21, включали сайты рестрикционной эндонуклеазы для направленного клонирования последовательности в подходящий вектор экспрессии (например, pET30 (Novagen/EMD Biosciences; Сан-Диего, штат Калифорния) или pAMG33 (Amgen; Саузенд Оукс, штат Калифорния)). Вектор экспрессии pAMG33 содержит низкокопийную точку начала репликации R-100, модифицированный промотор lac и ген устойчивости к канамицину. Вектор экспрессии pET30 содержит точку начала репликации, полученную из pBR322, индуцируемый промотор T7 и ген устойчивости к канамицину. Было обнаружено, что экспрессия из pAMG33 выше, но pET30 является более надежным вектором для клонирования. Таким образом, большинство конструкций, описанных в настоящей патентной заявке, сначала были созданы в pET30, а затем скринированы на эффективность. После этого отобранные последовательности были перенесены в pAMG33 для дальнейшей амплификации.

Последовательность FGF21 была амплифицирована в реакционной смеси, содержащей 40,65 мкл dH₂O, 5 мкл реакционного буфера PfuUltra II Reaction Buffer (10×), 1,25 мкл смеси dNTP (40 mM - 4×10 mM), 0,1 мкл матрицы (100 нг/мл), 1 мкл праймера 1 (10 мкм), 1 мкл праймера 2 (10 мкм) и 1 мкл соединяющей ДНК-полимеразы HS PfuUltra II (Stratagene, Ла-Хойя, штат Калифорния). Реакции амплификации проводили с нагреванием в течение двух минут при 95°C, сопровождающимся десятью циклами при 95°C в течение 20 с, 60°C в течение 20 с (с дополнительным вычитанием 1°C на цикл) и 72°C в течение 15 с на килобазу нужного продукта, после чего проводили 20 циклов при 94°C в течение 20 с, 55°C в течение 20 с и 72°C в течение 15 с на килобазу нужного продукта, а затем 72 °C в течение 3 мин. Продукты амплификации расщепляли рестрикционными эндонуклеазами NdeI, DpnI и EcoRI, вшивали в подходящий вектор, а затем встраивали в компетентную клетку для ее трансформации.

Пример 2. Очистка белков FGF21, полученных из бактерий.

В последующих примерах различные белки FGF21, включая полипептид FGF21 дикого типа, усеченные полипептиды FGF21, мутанты FGF21 и гибридные белки FGF21, были экспрессированы в бактериальной системе экспрессии. После экспрессии, которая описана ниже, белки FGF21 были очищены, как описано в этом примере, если специально не указано иное.

Для очистки полипептида FGF21 дикого типа, усеченных полипептидов FGF21 и мутантов FGF21 от бактериальных телец включений дважды отмытые тельца включений (DWIB) солибилизировали в солилилизационном буфере, содержащем гуанидина гидрохлорид и DTT в буфере Tris при pH 8,5, затем перемешивали в течение одного часа при комнатной температуре, и солилилизированную смесь добавляли к буферу для рефолдинга, содержащему мочевины, аргинин, цистеин и цистамин гидрохлорид при pH 9,5, а затем перемешивали 24 ч при 5°C (см., например, Clarke, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 157-63; Mannall et al., 2007, Biotechnol. Bioeng. 97: 1523-34; Rudolph et al., 1997, "Folding proteins," Protein Function: A Practical Approach (Creighton, ed., New York, IRL Press) 57-99; and Ishibashi et al., 2005, Protein Expr. Purif. 42: 1-6).

После солилилизации и рефолдинга смесь пропускали через фильтр с размером ячеек 0,45 мкм. Затем концентрацию пула рефолдинга увеличивали приблизительно в 10 раз, используя для этого отделяющую кассету Pall Omega с молекулярным весом 10 кДа при трансмембранном давлении (TMP) 20 psi, а также проводили диафильтрацию с 3 объемами колонки 20 mM Tris, pH 8,0 при TMP 20 psi.

После этого очищенный образец подвергали анионообменной хроматографии (АЕХ) с применением смолы Q Sepharose HP. Линейный солевой градиент от 0 до 250 mM NaCl в 20 mM Tris прогоняли при pH 8,0 и температуре 5°C. Пиковые фракции анализировали методом SDS-PAGE и объединяли.

Затем пул элюата АЕХ подвергали хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) с применением смолы Phenyl Sepharose HP. Белок элюировали, применяя понижающийся линейный градиент от 0,7 до 0M сульфата аммония при pH 8,0 и температуре окружающей среды. Пиковые фракции анализировали методом SDS-PAGE (Laemmli, 1970, Nature 227: 680-85) и объединяли.

Концентрацию пула НІС увеличивали до 7 мг/мл, применяя для этого отделяющую кассету Pall Omega 0,2 м² с молекулярным весом 10 кДа при TMP 20 psi. Проводили диафильтрацию концентрата с 5 объе-

мами колонки 10 мМ КРО₄, 5% сорбита, рН 8,0 при TMP 20 psi, а восстановленный концентрат разбавляли до 5 мг/мл. Наконец, раствор фильтровали через позидиновую мембрану Pall mini-Kleenpac 0,2 мкМ.

Для очистки составных белков FGF21 и составных мутантных белков FGF21 от бактериальных телц включений дважды отмытые тельца включений (DWIB) солюбилизировали в солюбилизационном буфере, содержащем гуанидина гидрохлорид и DTT в буфере Tris при рН 8,5, затем перемешивали в течение одного часа при комнатной температуре и солюбилизованную смесь добавляли к буферу для рефолдинга, содержащему мочевины, аргинин, цистеин и цистамин гидрохлорид при рН 9,5, а затем перемешивали 24 ч при 5°C (см., например, Clarke, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157-63; Mannall et al., 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1523-34; Rudolph et al. 1997, "Folding proteins", *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton, ed., New York, IRL Press) 57-99 и Ishibashi et al., 2005, *Protein Expr. Purif.* 42: 1-6).

После солюбилизации и рефолдинга смесь подвергали диализу в 5 объемах 20 мМ Tris, рН 8,0 применяя диализную трубку 10 кД. Уровень рН диализованного пересвернутого материала доводили до 5,0 при помощи 50% уксусной кислоты, а затем осветляли материал центрифугированием в течение 30 мин при 4К.

После этого осветленный образец подвергали анионообменной хроматографии (АЕХ) с применением смолы Q Sepharose HP. Линейный солевой градиент от 0 до 250 мМ NaCl в 20 мМ Tris прогоняли при 8,0 и температуре 5°C. Пиковые фракции анализировали методом SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85) и объединяли.

Затем пул элюата АЕХ подвергали хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) с применением смолы Phenyl Sepharose HP. Белок элюировали, применяя понижающийся линейный градиент от 0,6 до 0М сульфата аммония при рН 8,0 и температуре окружающей среды. Пиковые фракции анализировали методом SDS-PAGE и объединяли.

После этапа НІС пул подвергали диализу в 60 объемах 10 мМ Tris, 2,2% сахарозы, 3,3% сорбита при рН 8,5. Концентрацию диализованного пула увеличивали до 5 мг/мл, применяя устройство Jumbosер. Наконец, раствор фильтровали через позидиновую мембрану Pall mini-Kleenpac 0,2 мкМ.

Пример 3. Изготовление и экспрессия усеченных белков FGF21.

Конструкции, кодирующие усеченные белки FGF21 и перечисленные в табл. 3, были получены посредством амплификации в ПЦР вектора экспрессии FGF21 дикого типа, как описано ниже (конструкция вектора экспрессии FGF21 дикого типа описана в примере 1).

Таблица 3. Усечения FGF21

Аминокислотные остатки	Число усеченных остатков*
С-концевые усечения	
1 – 180	1
1 – 179	2
1 – 178	3
1 – 177	4
1 – 176	5
1 – 175	6

1 – 174	7
1 – 173	8
1 – 172	9
1 – 171	10
1 – 169	12
1 – 168	13
1 – 167	14
1 – 166	15
1 – 165	16
1 – 164	17
1 – 160	21
1 – 156	25
1 – 152	29
1 – 149	32
1 – 113	68
N-концевые усечения	
2 – 181	1
3 – 181	2
4 – 181	3
5 – 181	4
6 – 181	5
7 – 181	6
8 – 181	7
9 – 181	8
C- и N-концевые усечения	
5 – 174	11
7 – 172	17
9 – 169	20
9 – 149	40
15 – 169	26
15 – 149	46
15 – 113	82

* по отношению к зрелому полипептиду FGF21.

Усеченные белковые конструкции FGF21 были изготовлены с применением праймеров, имеющих последовательности, которые гомологичны участкам, расположенным выше и ниже кодона (или кодонов), подлежащего делеции (что приводит к усечению). Праймеры, использованные в таких реакциях амплификации, также обеспечивали приблизительно 15 нуклеотидов перекрывающейся последовательности, что позволяло рециркуляризовать амплифицированный продукт, а именно весь вектор, теперь содержащий нужный мутант.

Типичная усеченная конструкция FGF21, кодирующая белок FGF21, в котором утрачен остаток гистидина в положении 1 зрелой последовательности FGF21 (т.е. усеченный мутант 2-181), была изготовлена с применением праймеров, показанных в табл. 4.

Таблица 4. Праймеры ПЦР для изготовления типичного усеченного мутанта FGF21

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
Смысловой	5'-GGAGATATACATATGCCAATTCAGATTCTTCTCCATTATT-3'	7
Антисмысловой	5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAA-3'	8

Праймеры, показанные в табл. 4, рассчитаны на делецию остатка гистидина, как показано ниже, при этом верхняя последовательность (SEQ ID NO: 10) является частью зрелого полипептида FGF21, включающей N-концевой метионин, вторая последовательность является смысловым праймером (SEQ ID NO: 7), третья и четвертая последовательности (SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12) являются частями конст-

рукции, экспрессирующей FGF21, а пятая последовательность является антисмысловым праймером (SEQ ID NO: 9)

MetHisProIleProAspSerSerProLeu

5' -GGAGATATACATATG---CAATTCCAGATTCTTCTCCATTATT

TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCATCCAATTCCAGATTCTTCTCCATTATT

AAAACAAATTGAAATTCTTCTCTATATGTATACСТАGGTTAAGGTCTAAGAAGAGGTAATAA

AAAACAAATTGAAATTCTTCTCTATATGTATAC-5'

Усеченные конструкции белка FGF21 были изготовлены с применением, по существу, тех же условий ПЦР, что описаны в примере 1. Продукты амплификации были подвергнуты расщеплению рестрикционной эндонуклеазой DpnI, а затем введены в компетентные клетки для их трансформации. Полученные в результате клоны были секвенированы, чтобы подтвердить отсутствие ошибок, вызванных полимеразой.

Усеченные белки FGF21 были экспрессированы посредством трансформации компетентных клеток BL21 (DE3) или BL21 Star (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) конструкцией, кодирующей частично усеченный белок FGF21. Трансформанты выращивали в течение ночи с ограниченной аэрацией в среде TB с добавлением 40 мкг/мл канамицина, аэрировали на следующее утро и после короткого периода восстановления индуцировали в 0,4 мМ IPTG. Мутанты FGF21 собирали центрифугированием через 18-20 ч после индукции.

Пример 4. Активность усеченных белков FGF21 *in vitro*.

Были проведены эксперименты по идентификации усеченных белков FGF21, которые сохраняют активность FGF21 дикого типа в анализе на ELK-люциферазу *in vitro*. Табл. 5 показывает в сводном виде результаты, полученные для белков FGF21, имеющих усечения на N-конце, C-конце или как на N-конце, так и на C-конце. Анализы на ELK-люциферазу проводили с использованием рекомбинантной системы почечных клеток человека 293T, в которой клетки 293T избыточно экспрессируют генные конструкции бета-клото и репортера люциферазы. Эти конструкции также содержат последовательности, кодирующие GAL4-ELK1 и 5×UAS-Luc, репортер люциферазы, управляемый промотором, который содержит тандемные копии сайта связывания Gal4. Бета-клото представляет собой корецептор, который востребован FGF21 для активации его FGF-рецепторов и индуцирования трансдукции внутриклеточного сигнала, который, в свою очередь, приводит к фосфорилированию Erk и ELK. Активность люциферазы регулируется уровнем фосфорилированного Erk/ELK1 и используется для непрямого мониторинга и количественной оценки активности FGF21.

Анализы на ELK-люциферазу проводили, культивируя клетки 293T в присутствии разных концентраций полипептида FGF21 дикого типа или мутантного полипептида FGF21 в течение 6 ч, после чего проводили оценку клеточных лизатов на активность люциферазы. На фиг. 1A-1B показывают результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на усеченных мутантах FGF21 7-181 и 8-181 (фиг. 1A) и усеченных мутантах FGF21 1-172, 1-171, 1-169 и 1-164 (фиг. 1B). Люминесценция, полученная в анализах на активность ELK-люциферазы в каждом из усеченных мутантов FGF21: 3-181, 4-181, 5-181, 7-181, 8-181, 1-180, 1-178, 1-177, 1-176, 1-175, 1-174, 1-173, 1-172, 9-181 и 1-149, показана на фиг. 2.

Мутантные полипептиды FGF21 сравнивали со стандартом FGF21 дикого типа, а мутанты, показывающие эффективность, составляющую как минимум 50% эффективности FGF21 дикого типа, считали не утратившими активность FGF21 (в табл. 5 они помечены символом "+").

Таблица 5. Усеченные белки FGF21: анализ *in vitro*

С-концевые усечения		
Аминокислотные остатки	Эффективность	Активность (+/-)
1 – 180	93,2%	+
1 – 178	95,0%	+
1 – 177	112,0%	+
1 – 176	104,8%	+
1 – 174	104,6%	+
1 – 173	96,1%	+
1 – 172	97,5%	+
1 – 171	113,0%	+
1 – 169	84,9%	+
1 – 167	20%	-
1 – 166	20%	-
1 – 165	10%	-
Н-концевые усечения		
Аминокислотные остатки	Эффективность	Активность (+/-)
2 – 181	112,5%	+
3 – 181	130,3%	+
4 – 181	117,0%	+
5 – 181	119,6%	+
7 – 181	74,2%	+
8 – 181	24,9%	-
9 – 181	12,5%	-

Собирательный взгляд на результаты, представленные в табл. 5, указывает на то, что С-концевые делеции 14 или более аминокислотных остатков (т.е. белка FGF21 с С-концевым усечением, состоящим из аминокислотных остатков 1-167 и более коротких белков) приводят к элиминации активности FGF21. В дополнение к этому табл. 5 указывает на то, что N-концевые делеции 7 или более аминокислотных остатков (т.е. белка FGF21 с N-концевым усечением, состоящим из аминокислотных остатков 8-181 и более коротких белков) приводят к элиминации активности FGF21. Не удивительно, что усеченные белки FGF21, имеющие как N-концевые усечения от 8 до 14 остатков, так и С-концевые усечения от 12 до 32 остатков по результатам анализов на ELK-люциферазу утрачивали активность.

В соответствии с данными, представленными в табл. 5, усеченные полипептиды FGF21, имеющие N-концевые усечения менее 7 аминокислотных остатков, составляют варианты осуществления настоящего изобретения. Сходным образом, усеченные полипептиды FGF21, имеющие С-концевые усечения менее 13 аминокислотных остатков, составляют варианты осуществления настоящего изобретения.

Пример 5. Активность усеченных белков FGF21 *in vivo*.

Белок FGF21 обладает множеством видов биологической активности, включая способность понижать в крови уровень глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина, уменьшать вес тела, а также улучшать толерантность к глюкозе, потребление энергии и чувствительность к инсулину. Далее усеченные полипептиды FGF21 были проанализированы на активность FGF21 *in vivo* посредством введения усеченных полипептидов FGF21 инсулинорезистентным мышам *ob/ob* и измерения способности частично усеченных полипептидов FGF21 понижать уровень глюкозы в крови. Тестируемый усеченный полипептид FGF21 впрыскивали внутривенно 8-недельным мышам *ob/ob* (Jackson Laboratory) и после разовой инъекции брали у животных образцы крови в разных точках времени, например через 0, 6, 24, 72, 120 и 168 ч после инъекции. Уровень глюкозы в крови измеряли глюкометром OneTouch (LifeScan, Inc. Милпитас, штат Калифорния), и результаты измерений выражали в виде процентного изменения уровня глюкозы по сравнению с начальным уровнем глюкозы в крови (т.е. в точке времени 0).

Результаты одного из экспериментов представлены на фиг. 3, которая отображает количество глюкозы в крови, выявленное у мышей, которым впрыскивали усеченные мутанты FGF21 8-181 и 9-181. Этот эксперимент продемонстрировал, что усеченные составные белки FGF21, включающие аминокислотные остатки 8-181, проявляют активность по снижению уровня глюкозы в крови *in vivo*, однако эта активность несколько меньше по сравнению с активностью FGF21 дикого типа через 3 и 6 ч после инъекции, но усеченные составные белки FGF21, включающие аминокислотные остатки 9-181 не проявляют

такой активности. Таким образом, анализ эффектов, производимых усеченными полипептидами FGF21 *in vivo*, показал, что делеция до 7 аминокислот с N-конца зрелого FGF21 не аннулирует биологическую активность молекулы (в отличие от анализа *in vitro*, результаты которого позволяли предположить, что делеция 7 аминокислот с N-конца зрелого FGF21 аннулирует такую активность).

Различные результаты, полученные для отдельных полипептидов FGF21 с N-концевыми усечениями (например, FGF21 8-181) в анализах *in vitro* и *in vivo*, можно объяснить взаимодействием FGF21 с бета-клото и рецептором FGF при осуществлении сигнальной трансдукции. Более конкретно, FGF21 активирует двойной комплекс рецептора, включающий корецептор бета-клото и рецептор FGF (FGFR), который инициирует сигнальный каскад, включающий тирозинкиназу. Было показано, что N-конец FGF21 вовлечен в связывание и активацию FGFR, тогда как С-конец FGF21 необходим для взаимодействия с бета-клото (Yie et al., 2009 FEBS Lett. 583:19-24). Анализ на ELK-люциферазу *in vitro* был проведен с почечными клетками 293, в которых избыточно экспрессируется корецептор бета-клото, а FGFR экспрессируется на нормальном уровне. Количество FGFR по сравнению с количеством бета-клото относительно мало, следовательно, соотношение между бета-клото и FGFR в клетках 293 не является физиологическим, что может повлиять на формирование рецепторного комплекса, и, в конечном итоге, на связывание лиганда и активацию FGFR. Клеточная система 293 *in vitro*, по-видимому, более уязвима к полипептидам FGF21 с N-концевыми усечениями, следовательно, она могла давать потерю результатов при анализе активности нескольких протестированных мутантов с N-концевыми усечениями, в частности FGF21 8-181. Таким образом, при определении того, сохраняет ли определенный мутант FGF21 с N-концевым усечением активность FGF21 дикого типа, активность этого мутанта FGF21 в анализе *in vivo*, рассматривалась как диспозитивная (допускающая выбор из нескольких вариантов). В соответствии с этим усеченные полипептиды FGF21, имеющие N-концевые усечения менее 8 аминокислотных остатков, охватываются изобретением.

Пример 6. Изготовление и экспрессия усеченных составных белков FGF21.

Поскольку период полувыведения белка можно увеличить, соединяя белок с последовательностью Fc, были изготовлены и проанализированы составные белки, включающие усеченные полипептиды FGF21. Усеченные составные белки FGF21, перечисленные в табл. 6, были изготовлены из амплифицированных последовательностей FGF21 посредством ПЦР типа SOE (сплайсинг генов с удлинением перекрывания).

Составные белки FGF21 были изготовлены таким образом, что участок Fc гена иммуноглобулина человека IgG1 (SEQ ID NO: 13) был присоединен или к N-концу, или к С-концу белка FGF21.

Таблица 6. Усеченные составные белки FGF21

Аминокислотные остатки	Расположение Fc	Линкер
С-концевые усечения		
1 – 178	-NH ₂	15
1 – 175	-NH ₂	14
1 – 175	-COOH	15
1 – 171	-NH ₂	15
1 – 171	-COOH	15
1 – 170	-COOH	15
N-концевые усечения		
5 – 181	-NH ₂	15
5 – 181	-COOH	15
7 – 181	-NH ₂	15
7 – 181	-COOH	15
С- и N-концевые усечения		
5 – 175	-NH ₂	15
5 – 175	-COOH	15
5 – 171	-NH ₂	15
5 – 171	-COOH	15
6 – 170	-COOH	15
7 – 178	-COOH	35
7 – 175	-NH ₂	15
7 – 175	-COOH	15
7 – 174	-COOH	35
7 – 172	-COOH	35
7 – 171	-NH ₂	15
7 – 171	-COOH	35
7 – 171	-COOH	15

В частности, конструкции составного белка FGF21 (включая конструкции, кодирующие усеченные составные белки FGF21) были изготовлены в серии из трех реакций амплификации с применением, по существу, тех же условий реакции, которые были описаны в примере 1. В первой реакции была сконструирована пара праймеров для выработки последовательности, содержащей сайт клонирования NdeI, участок Fc и линкерную последовательность. Во второй реакции была сконструирована пара праймеров для выработки последовательности, содержащей перекрывающуюся часть линкера, часть кодирующей последовательности FGF21 и сайт клонирования EcoRI. Наконец, в третьей реакции была сконструирована пара праймеров для сцепления продуктов двух первых реакций. Типичный набор праймеров для конструирования составного белка Fc-FGF21 1-181 приведен в табл. 7.

Таблица 7. Праймеры ПЦР для изготовления типичной конструкции составного белка FGF21

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
Реакция 1		
Смысловой	5'-AGGAGGAATAACATATGGACAAAАСТCАCАCАТG-3'	14
Антисмысловой	5'-GGATCCACCACCACCGCTACCAC-3'	15
Реакция 2		
Смысловой	5'-GGTGGTGGTGGATCCCАТCСААТТCСAGАТТCТТCТCСA-3'	16
Антисмысловой	5'-TAGTGAGCTCGAАТТCТТАGGAAGCCTAGCTGG-3'	17
Реакция 3		
Смысловой	5'-AGGAGGAATAACATATGGACAAAАСТCАCАCАТG-3'	14
Антисмысловой	5'-TAGTGAGCTCGAАТТCТТАGGAAGCCTAGCTGG-3'	17

Продукт последней реакции был расщеплен рестрикционными эндонуклеазами NdeI и EcoRI, вшит в вектор pET30, а затем введен в компетентные клетки для их трансформации. Полученные в результате клоны были секвенированы, чтобы подтвердить отсутствие ошибок, вызванных полимеразой.

Пример 7. Активность усеченных составных белков FGF21 *in vivo*.

Были созданы и проанализированы на активность *in vivo* составные белки, включающие усеченную последовательность FGF21, соединенную с последовательностью Fc. Усеченные составные белки FGF21 были изготовлены посредством присоединения молекулы Fc IgG1 или к N-концевому, или к C-концевому участку усеченного белка FGF21 для образования целой непрерывной последовательности. Для различения между N-концевыми и C-концевыми слияниями составные белки FGF21, в которых молекула Fc была присоединена к N-концевому участку белка FGF21, будут обозначаться Fc-FGF21, а составные белки, в которых молекула Fc была присоединена к N-концевому участку белка FGF21, будут обозначаться FGF21-Fc.

Белок FGF21 обладает множеством видов биологической активности, включая способность понижать в крови уровень глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина, уменьшать вес тела, а также улучшать толерантность к глюкозе, потребление энергии и чувствительность к инсулину. Для оценки активности FGF21 *in vivo* полипептиды FGF21, мутантные полипептиды FGF21 и составные полипептиды FGF21 вводили инсулинорезистентным мышам *ob/ob* с последующим измерением способности определенного белка FGF21 понижать уровень глюкозы в крови. Тестируемый полипептид FGF21, мутантный полипептид FGF21 или составной полипептид FGF21 впрыскивали внутривенно 8-недельным мышам *ob/ob* (Jackson Laboratory) и после разовой инъекции брали у животных образцы крови в разных точках времени, например через 0, 6, 24, 72, 120 и 168 ч после инъекции. Уровень глюкозы в крови измеряли глюкометром OneTouch (LifeScan, Inc. Милпитас, штат Калифорния), и результаты измерений выражали в виде процентного изменения уровня глюкозы по сравнению с начальным уровнем глюкозы в крови (т.е. в точке времени 0).

Результаты одного из экспериментов представлены на фиг. 4, которая отображает процентное изменение уровня глюкозы в крови, наблюдаемое у мышей, которым впрыскивали контрольный PBS, контрольный Fc-FGF21 дикого типа с аминокислотными остатками 1-181 или усеченные составные белки Fc-FGF21, включающие аминокислотные остатки 5-181 или 7-181. Этот эксперимент продемонстрировал, что усеченные составные белки Fc-FGF21, включающие аминокислотные остатки 5-181 или 7-181 проявляют такую активность по снижению глюкозы в крови, которая сходна с активностью Fc-FGF21 дикого типа через 6 ч после инъекции. Таким образом, анализ действия усеченных полипептидов FGF21 *in vivo* показал, что делеция до 6 аминокислот с N-конца зрелого FGF21 не влияет на биологическую активность молекулы. Однако анализ *in vivo* также показал, что способность усеченных полипептидов FGF21 понижать уровень глюкозы в крови снижалась, при этом содержание глюкозы в крови возвращалось к исходному уровню через 24 ч после инъекции (для FGF21 дикого типа были получены сходные результаты). Было обнаружено, что короткая активность *in vivo* является результатом протеолитического разрушения FGF21, как это описано в примере 8.

Результаты другого эксперимента представлены на фиг. 5, которая отображает процентное изменение уровня глюкозы в крови, наблюдаемое у мышей, которым впрыскивали контрольный PBS, контрольный FGF21-Fc дикого типа с аминокислотными остатками 1-181, усеченный составной белок FGF21-Fc, включающий аминокислотные остатки 1-175, или усеченный белок Fc-FGF21, включающий аминокислотные остатки 1-171. Этот эксперимент продемонстрировал, что FGF21-Fc дикого типа, включающий аминокислотные остатки 1-181, обладает длительной активностью по снижению глюкозы, приводящую к снижению уровня глюкозы в крови приблизительно на 30% в промежутке времени от 24 до 120 ч после инъекции. Усеченный белок Fc-FGF21, включающий аминокислотные остатки 1-171, проявляет замедленную активность по снижению глюкозы в крови, которая очевидно проявляется только через 72 ч после инъекции. Однако наблюдаемая активность почти не отличается от активности FGF21-Fc дикого типа. Усеченный составной белок FGF21-Fc, включающий аминокислотные остатки 1-175, неактивен *in vivo* в отношении снижения глюкозы в крови.

При совместном рассмотрении экспериментов с усечением, описанных в данном документе, было выявлено, что усеченные составные белки FGF21, имеющие N-концевое усечение, проявляют активность по снижению глюкозы в крови, которая сходна с составным белком FGF21 дикого типа, и далее, что усеченные составные белки FGF21, в которых молекула Fc была присоединена к N-концевому участку усеченного белка FGF21, более активны, чем составные белки, в которых молекула Fc была присоединена к C-концевому участку усеченного белка FGF21.

Пример 8. Наблюдаемое разрушение FGF21 *in vivo*.

Разрушение FGF21, прежде всего, наблюдалось при использовании конструкций для составного белка FGF21 Fc, как это описано в примере 7. Фармакокинетический анализ *in vivo* показал, что FGF21 человека имеет короткий период полувыведения у мышей, составляющий приблизительно 1 ч, что является следствием быстрого клиренса и разрушения *in vivo*. Следовательно, для удлинения периода полувыведения FGF21 к N- или C-концевому участку полипептида FGF21 присоединяли последовательность Fc. Однако присоединение участка Fc не полностью разрешает проблему полувыведения, поскольку со-

ставные белки FGF21, к N- или C-концу которых присоединена последовательность Fc (и в особенности слияния Fc-FGF21, т.е. такие структуры, в которых последовательность Fc присоединена к N-концу зрелого FGF21), не проявляют ожидаемой эффективности *in vivo*, а вместо этого, согласно имеющимся данным, сохраняют активность по снижению глюкозы в крови у мышей *ob/ob* не более 24 ч. Как показано на фиг. 4, составные белки Fc-FGF21 снижали уровень глюкозы в крови приблизительно на 30-40% через 6 ч после инъекции, но через 24 ч содержание глюкозы в крови возвращалось к исходному уровню.

Впоследствии изучали протеолитическое разрушение FGF21 дикого типа, при этом было обнаружено, что быстрая потеря активности составных белков Fc-FGF21 *in vivo* происходит в результате разрушения FGF21 *in vivo*. Протеолитическое разрушение приводит к снижению биологической активности молекулы *in vivo*, т.е. укорачивает эффективный период полувыведения, следовательно, такое разрушение отрицательно влияет на терапевтическое применение этой молекулы. В соответствии с этим наблюдаемое разрушение составных белков FGF21 Fc привело к изучению протеолитического разрушения FGF21 *in vivo* и к поиску таких мутантов FGF21, которые были бы устойчивы к подобному разрушению.

Для того чтобы определить сайты разрушения, были проведены анализ LC-MS и секвенирование по Эдману на FGF21 человека дикого типа и составных белках FGF21, наблюдаемых в разных точках времени после инъекции самцам мышей C57B6. Секвенирование по Эдману помогало подтвердить, подвергался ли N-концевой участок или C-концевой участок белка разрушению. Было обнаружено, что при слиянии последовательности Fc с N-концом FGF21 человека разрушение в пептиде происходило между аминокислотными остатками 151 и 152 и между аминокислотными остатками 171 и 172 человеческой части составной молекулы FGF21 (приведенная выше нумерация остатков основана на зрелой последовательности FGF21 и не включает участок Fc составного белка). Было обнаружено, что в первую очередь происходит разрушение в сайте 171-172, вслед за которым происходит разрушение в сайте 151-152. Разрушение в сайте 171-172, по-видимому, является стадией, которая определяет скорость процесса, т.е. играет роль в темпах полувыведения молекулы. Кроме того, было обнаружено, что, если последовательность Fc была присоединена к C-концу FGF21, разрушение в пептиде происходило в связке между аминокислотными остатками 4 и 5 и между аминокислотными остатками 20 и 21. В результате этих экспериментов было определено, что последовательность Fc, по-видимому, защищает от разрушения ту часть последовательности FGF21, которая примыкает к Fc. Далее анализ разрушения FGF21 дикого типа и составных белков Fc-FGF21 *in vivo* был проведен на обезьянах *supomolgus*. Эти исследования подтвердили, что сайт расщепления FGF21 в аминокислотных остатках 171-172 является мажорным сайтом разрушения у обезьян, причем этот сайт разрушения законсервирован между мышинными и приматами.

Пример 9. Идентификация мутантов FGF21, устойчивых к протеолизу.

Подходящие мутанты FGF21 были идентифицированы посредством определения в экспериментах тех положений в последовательности FGF21 дикого типа, которые являются сайтами мажорной протеолитической активности, после чего в эти сайты были внесены специфические аминокислотные замещения. Аминокислотные замещения были основаны на консервации последовательности FGF21 с другими биологическими видами (как это описано в примере 8) и биохимической консервации с другими аминокислотными остатками. Перечень аминокислотных замещений, которые были введены или могут быть внесены в белок FGF21 дикого типа, представлен в табл. 8, хотя табл. 8 является только примером, то есть, вполне возможны и другие замещения. Номера положений, представленные в табл. 8, соответствуют положениям остатков в зрелом белке FGF21, который состоит из 181 аминокислотного остатка.

Таблица 8. Мутированные аминокислотные остатки в FGF21

Положение аминокислоты	Нативный остаток	Мутации
19	Arg	Gln, Ile, Lys
20	Tyr	His, Leu, Phe
21	Leu	Ile, Phe, Tyr, Val
22	Tyr	Ile, Phe, Val
150	Pro	Ala, Arg
151	Gly	Ala, Val
152	Ile	His, Leu, Phe, Val
170	Gly	Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Pro, Ser
171	Pro	Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Lys, Ser, Thr, Trp, Tyr
172	Ser	Leu, Thr
173	Gln	Arg, Glu

Пример 10. Анализ разрушения Fc-FGF21 и FGF21-Fc in vivo.

Стабильность составных белков FGF21 Fc in vivo определяли посредством впрыскивания мышам составного белка, взятия у этих мышей проб крови в разных точках времени и анализа сыворотки методом жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). Более конкретно, мышам внутривенно впрыскивали 10 мг/кг Fc(5)FGF21 (экспрессированного в E.coli и очищенного, как описано в примере 2) или FGF21(3)Fc (экспрессированного в клетках млекопитающего и очищенного в соответствии со стандартными процедурами). Образцы крови от мышей получали через 6, 24 и 48 ч после инъекции (табл. 9) и собирали в пробирки с EDTA, предварительно обработанные коктейлями с ингибиторами протеаз (Roche Diagnostics). Плазму отделяли центрифугированием образцов на скорости 12000 g в течение 10 мин. Белки FGF21 аффинно очищали от крови с использованием агарозной смолы против Fc человека.

Таблица 9. Образцы FGF21

Образец	Введенный белок	Взятие крови
D6	Fc-FGF21	6 часов
D24	Fc-FGF21	24 часа
D48	Fc-FGF21	48 часов
E6	FGF21-Fc	6 часов
E24	FGF21-Fc	24 часа
E48	FGF21-Fc	48 часов

Перед анализом аффинно очищенных образцов способом LC-MS в качестве эталона анализировали стандарты белков Fc-FGF21 и FGF21-Fc. Белковые стандарты либо были редуцированы трис[2-карбокситетил] фосфином (TCEP), либо не были редуцированы. Редуцированные и не редуцированные стандарты анализировали методом LC-MS, используя колонку ACE циано 0,3 мм × 30 см с распылением элюата в масс-спектрометрическую ионную ловушку LCQ Classic. Поскольку развернутые спектры редуцированных образцов были чище, перед анализом LC-MS аффинно очищенные образцы были редуцированы.

Наблюдаемые массы редуцированного стандарта Fc(5)FGF21 и образцов D6, D24 и D48 показаны на фиг. 6A-6D. Наблюдаемые массы редуцированного стандарта FGF21(3)Fc и образцов E6, E24 и E48 показаны на фиг. 7A-7D. Некоторые элюаты стандартов и образцов были подвергнуты секвенированию по Эдману для подтверждения N-конца белков и фрагментов в соответствии с определением в анализе LC-MS. Результаты анализа стандартов и образцов методом LC-MS показаны в табл. 10.

Таблица 10. Результаты анализа LC-MS и предсказанные фрагменты

Образец FGF21	Основные наблюдаемые массы	Фрагмент	Интактный N-конец?
Стандарт Fc(5)FGF21	45,339 Da	1-414	Да
D6	45,338 Da 44,317 Da	1-414 1-404	Да
D24	44,321 Da	1-404	Да
D48	44,327 Da 42,356 Da	1-404 ?	Да
Стандарт FGF21(3)Fc	46,408 Da (гликозилированный, GOF) 44,964 Da (не гликозилированный)	1-410 1-410	Да
E6	45,963 Da (гликозилированный, GOF)	5-410	Нет
	44,516 Da (не гликозилированный)	5-410	
E24	45,963 Da (гликозилированный, GOF) 44,526 Da (не гликозилированный) 44,130 Da (glycosylated, GOF)	5-410 5-410 21-410	Нет
E48	45,984 Da 44,130 Da 44,022 Da	5-410? 21-410 ?	Нет

Как показано в табл. 10, все аффинно очищенные образцы демонстрировали некоторую степень разрушения только через 6 ч циркуляции. После 24-часовой циркуляции основной продукт Fc-FGF21 представлял собой фрагмент, состоящий из аминокислотных остатков 1-404, что наблюдалось как в об-

разцах D, так и в образцах E. Однако в образцах E основной продукт FGF21-Fc представлял собой фрагмент, состоящий из аминокислотных остатков 5-410. В обоих протестированных составных белках FGF21-часть составного белка была более чувствительна к разрушению, чем Fc-часть белка.

Пример 11. Изготовление и экспрессия мутантов и составных белков FGF21, устойчивых к протеолизу.

Конструкции, кодирующие мутанты FGF21, перечисленные в табл. 11, были получены посредством амплификации в ПЦР вектора экспрессии FGF21 дикого типа, как описано ниже (конструкция вектора экспрессии FGF21 дикого типа описана в примере 1). Цель этих экспериментов заключалась в создании мутантов FGF21, которые устойчивы к протеолизу и проявляют удлиненный период полувыведения.

Таблица 11. Мутанты FGF21, устойчивые к протеолизу

Мутация (мутации)	Fc	Линкер
R19I		
R19I	-COOH	15
R19K		
R19K	-COOH	15
R19Q		
R19Q	-COOH	15
R19K, Y20H		
R19K, Y20H	-COOH	15

R19K, L21I		
R19K, L21I	-COOH	15
R19K, Y20H, L21I		
R19K, Y20H, L21I	-COOH	15
Y20F		
Y20F	-COOH	15
Y20H		
Y20H	-COOH	15
Y20L		
Y20L	-COOH	15
Y20H, L21I		
Y20H, L21I	-COOH	15
L21I		
L21I	-COOH	15
L21F		
L21F	-COOH	15
L21V		
L21V	-COOH	15
L21Y		
L21Y	-COOH	15
Y22F		
Y22F	-COOH	15
Y22I		
Y22I	-COOH	15
Y22V		
Y22V	-COOH	15
P150A		
P150A	-NH2	15
P150R	-NH2	15
P150A, G151A		
P150A, G151A	-NH2	15
P150A, I152V		
P150A, I152V	-NH2	15

P150A, G151A, I152V		
P150A, G151A, I152V	-NH2	15
G151A		
G151A	-NH2	15
G151V		
G151V	-NH2	15
G151A, I152V		
G151A, I152V	-NH2	15
I152F		
I152F	-NH2	15
I152H		
I152H	-NH2	15
I152L		
I152L	-NH2	15
I152V		
G170A		
G170A	-NH2	15
G170C		
G170C	-NH2	15
G170D		
G170D	-NH2	15
G170E		
G170E	-NH2	15
G170N		
G170N	-NH2	15
G170P		
G170P	-NH2	15
G170Q		
G170Q	-NH2	15
G170S		
G170S	-NH2	15
G170E, P171A		
G170E, P171A	-NH2	15

G170E, S172L		
G170E, S172L	-NH2	15
G170E, P171A, S172L		
G170E, P171A, S172L	-NH2	15
P171A		
P171A	-NH2	15
P171C	-NH2	15
P171D	-NH2	15
P171E	-NH2	15
P171G	-NH2	15
P171H	-NH2	15
P171K	-NH2	15
P171N	-NH2	15
P171Q	-NH2	15
P171S	-NH2	15
P171T	-NH2	15
P171W	-NH2	15
P171Y	-NH2	15
P171A, S172L		
P171A, S172L	-NH2	15
S172L	-NH2	15
S172T		
S172T	-NH2	15
Q173E		
Q173E	-NH2	15
Q173R		
Q173R	-NH2	15

Мутантные конструкции FGF21 были изготовлены с применением праймеров, имеющих последовательности, которые гомологичны участкам, расположенным выше и ниже кодона (или кодонов), подлежащего мутированию. Праймеры, использованные в таких реакциях амплификации, также обеспечивали приблизительно 15 нуклеотидов перекрывающейся последовательности, что позволяло рециркуляризовать амплифицированный продукт, а именно весь вектор, теперь содержащий нужный мутант.

Типичная мутантная конструкция FGF21, кодирующая мутант FGF21, имеющий остаток глутаминовой кислоты в положении 170 вместо нативного остатка глицина (т.е. мутант G 170E), была изготовлена с применением праймеров, показанных в табл. 12.

Таблица 12. Праймеры ПЦР для изготовления типичного мутанта FGF21

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
Смысловой	5'-ATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGC-3'	18
Антисмысловой	5'-GGAAGGTTCCACCATGCTCAGAGGGTCCGA-3'	19

Праймеры, показанные в табл. 12, рассчитаны на замену остатка глицина на остаток глутаминовой кислоты, как показано ниже, при этом первая последовательность представляет собой смысловой праймер (SEQ ID NO: 18), вторая и третья последовательности (SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 22) являются частями конструкции, экспрессирующей FGF21, а четвертая последовательность является антисмысловым праймером (SEQ ID NO: 21)

5' -ATGGTGGAAACCTTCCCAGGGCCGAAGC
 CTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA
 GAGGAGCCTGGGAGACTCGTACCACCTTGGAAAGGGTCCCGGCTTCGGGGT
 AGCCTGGGAGACTCGTACCACCTTGGAAAGG-S'

Конструкции мутанта FGF21 были изготовлены с применением, по существу, тех же условий ПЦР, что описаны в примере 1. Продукты амплификации были подвергнуты расщеплению рестрикционной эндонуклеазой DpnI, а затем введены в компетентные клетки для их трансформации. Полученные в результате клоны были секвенированы, чтобы подтвердить отсутствие ошибок, вызванных полимеразой. Составные белки Fc-FGF21 и FGF21-Fc были созданы в соответствии с описанием, приведенным в данном документе, например в примере 6.

Мутанты FGF21 были экспрессированы посредством трансформации компетентных клеток BL21 (DE3) или BL21 Star (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) конструкцией, кодирующей специфический мутант. Трансформанты выращивали в течение ночи с ограниченной аэрацией в среде TB с добавлением 40 мкг/мл канамицина, аэрировали на следующее утро и после короткого периода восстановления индуцировали в 0,4 мМ IPTG. Мутантные полипептиды FGF21 собирали центрифугированием через 18-20 ч после индукции.

Мутанты FGF21 также анализировали на предсказанную иммуногенность. Имунные реакции против белков усиливаются за счет процессинга антигена и его презентации в сайте связывания главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II. Это взаимодействие необходимо для помощи Т-клеток в созревании антител, распознающих белок. После того как были охарактеризованы сайты связывания молекул МНС класса II, стало возможным предсказание того, имеют ли белки специфические последовательности, которые способны связываться с серией распространенных аллелей человека. На основе литературных ссылок и структур кристаллов МНС класса II были созданы компьютерные алгоритмы, позволяющие определить, имеет ли линейная аминокислотная последовательность пептида потенциал для разрушения иммунотолерантности. Компьютерная программа TEPITOPE была использована для определения того, могут ли точковые мутации в конкретных мутантах FGF21 увеличить количество специфических Т-клеток у большинства людей. Основываясь на результатах анализа линейной белковой последовательности каждого мутанта FGF21, нельзя было предсказать усиление иммуногенности для какого-либо мутанта.

Пример 12. Влияние линкерной последовательности на разрушение FGF21.

Для того чтобы определить, влияет ли присутствие удлиненного аминокислотного линкера между последовательностью Fc и последовательностью FGF21 на разрушение FGF21, мышам впрыскивали составные белки FGF21, в которых участок Fc был отделен от последовательности FGF21 линкером из 15 аминокислот, имеющим последовательность GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23), после чего у мышей брали кровь в разных точках времени и проводили анализ сыворотки методом LC-MS. В частности, мышам впрыскивали Fc(15)FGF21 или FGF21(15)Fc (полученные из E.coli) в дозе 23 мг/кг, образцы крови брали через 6, 24 и 48 ч, а взятую кровь аффинно очищали, используя агарозную смолу против Fc человека.

Перед анализом аффинно очищенных образцов способом LC-MS в качестве эталона анализировали стандарты белков F, Fc(15)FGF21 и FGF21(15)Fc. Стандарты белков либо были редуцированы TCEP, либо не были редуцированы. Как редуцированные, так и не редуцированные стандарты анализировали методом LC-MS, используя колонку ACE циано 0,3 мм × 30 см с распылением элюата в масс-спектрометрическую ионную ловушку LCQ Classic. Поскольку развернутые спектры редуцированных образцов были чище, перед анализом LC-MS аффинно очищенные образцы были редуцированы.

Наблюдаемые массы редуцированного стандарта Fc(15)FGF21 и соответствующих аффинно очищенных образцов, взятых в разных точках времени, показаны на фиг. 8A-8D. Наблюдаемые массы редуцированного стандарта FGF21(15)Fc и соответствующих аффинно очищенных образцов, взятых в разных точках времени, показаны на фиг. 9A-9D. Некоторые элюаты стандартов и образцов были подвергнуты секвенированию по Эдману для подтверждения N-конца белков и помощи в предсказании идентичности фрагментов, наблюдаемых посредством LC-MS. Результаты анализа стандартов и образцов методом LC-MS, а также индикация предсказанных фрагментов показаны в табл. 13.

Таблица 13. Результаты анализа LC-MS и предсказанные фрагменты

Образец FGF21	Основные наблюдаемые массы	Процентная доля от общей величины	Фрагмент	Интактный N-конец?
Стандарт Fc(15)FGF21	46002 Da	100%	1-424	Да
Fc(15)FGF21	46000 Da	65%	1-424	Да
6 часов	44978 Da	35%	1-414	
Fc(15)FGF21	44978 Da	85%	1-414	Да
24 часа	43022 Da	15%	1-394	
Fc(15)FGF21	44976 Da	60%	1-414	Да
48 часов	43019 Da	40%	1-394	
Стандарт FGF21(15)Fc	45999 Da	100%	1-424	Да
FGF21(15)Fc	45870 Da	100%	1-423	Да
6 часов				
FGF21(15)Fc	45869 Da	40%	1-423	Несколько
24 часа	45301 Da	35%	6-423	
	43460 Da	25%	22-423	
FGF21(15)Fc	45870 Da	15%	1-423	Несколько
48 часов	45297 Da	20%	6-423	
	43461 Da	65%	22-423	

Как показано в табл. 13, все аффинно очищенные образцы демонстрировали некоторую степень разрушения только через 6 ч циркуляции. После 24 ч циркуляции основными продуктами Fc(15)FGF21 были фрагменты, состоящие из аминокислотных остатков 1-414 (85% образца) и 1-394 (15% образца), а основными продуктами FGF21(15)Fc были фрагменты, состоящие из аминокислотных остатков 1-423 (40% образца), 6-423 (35% образца) и 22-423 (25% образца). Идентифицированные точки расщепления для белков Fc(15)FGF21 и FGF21(15)Fc показаны на фиг. 10А и 10В соответственно.

Пример 13. Активность устойчивых к протеолизу мутантов Fc(15)FGF21 *in vivo* через 1-7 дней после инъекции.

Как описано в данном документе, протеолитическое расщепление составных белков FGF21 Fc зависит от ориентации последовательности Fc, при этом окончание Fc составного белка более стабильно, чем окончание FGF21 составного белка (т.е. было обнаружено, что N-концевая часть составных белков Fc-FGF21 и C-концевая часть составных белков FGF21-Fc более стабильны). Например, расщепление было идентифицировано в положениях 5 и 21 белка FGF21-Fc и в положениях 151 и 171 белка Fc-FGF21.

В результате этих наблюдений было проведено исследование по идентификации мутантов FGF21, устойчивых к протеолизу. Анализ белков Fc-FGF21 методом LC-MS показывает, что протеолитическое разрушение *in vivo* в первую очередь происходит между аминокислотными остатками 171-172 с последующим разрушением между аминокислотными остатками 151-152. Блокируя протеолитическое разрушение в положении 171, можно предотвратить разрушение в положении 151, что эффективно увеличивает период полувыведения молекулы. Однако устойчивые к протеолизу мутанты, у которых расщепление в положении 151 предотвращено, по-прежнему могут обладать в положении 171 остатками, чувствительными к атаке протеазы, что приводит к потере молекулой 10 последних аминокислот, которые, как известно, вовлечены в связывание корцептора бета-клото, являющегося детерминантом аффинности рецептора к лиганду и мощности *in vitro* и *in vivo*. Следовательно, мутационные изменения аминокислотных остатков, окружающих положение 171 в зрелом FGF21, по-видимому, более важны для улучшения стабильности *in vivo*, мощности и эффективности молекулы.

Активность отдельных мутантов Fc(15)FGF21, устойчивых к протеолизу *in vivo*, оценивали, вводя внутривенно мутант FGF21 мышам об/об, затем у мышей брали образцы крови через 0, 0,25, 1, 3, 5 и 7 дней после инъекции и измеряли в образцах уровень глюкозы. Результаты одного из экспериментов показаны на фиг. 11, которая отображает уровень глюкозы в крови, измеренный у мышей после инъекции контрольного PBS, контрольного Fc(15)FGF21 или таких мутантов Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21 P171A, Fc(15)FGF21 S172L, Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L или Fc(15)FGF21 G151A. Фиг. 12 показывает процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам этого эксперимента. Этот эксперимент демонстрирует, что мутанты Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21

P171A, Fc(15)FGF21 S172L и Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L проявляют длительную активность по снижению уровня глюкозы в крови (до 5 дней), которая превосходит активность Fc-FGF21 дикого типа. Мутант Fc(15)FGF21 G151A лишь немного улучшал длительность активности по снижению уровня глюкозы в крови по сравнению с составным белком Fc-FGF21 дикого типа. Неожиданно было обнаружено, что, хотя мутант Fc(15)-FGF21 S172L неустойчив к протеолизу и, следовательно, имеет сходный профиль разрушения с полипептидом Fc(15)-FGF21 дикого типа, этот мутант демонстрирует улучшенную эффективность *in vivo* по сравнению с полипептидом Fc(15)-FGF21 дикого типа.

Результаты другого эксперимента представлены на фиг. 13, которая отображает уровень глюкозы в крови, измеренный у мышей после инъекции контрольного PBS, контрольного Fc(15)FGF21 или таких мутантов Fc(15)FGF21, как Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V, Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21 G170E/P171A или Fc(15)FGF21 G170E/S172L. Фиг. 14 показывает процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам этого эксперимента. Как и в эксперименте, описанном выше, составной белок Fc-FGF21 дикого типа и мутант Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V не проявляли длительной активности по снижению уровня глюкозы в крови, возможно, вследствие того, что все еще могло происходить разрушение в сайте 171, а уровень глюкозы в крови животных, которым вводили эти белки, возвращался к исходному не более чем через 24 ч после инъекции. Однако мутанты Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21 G170E/P171A и Fc(15)FGF21 G170E/S172L проявляли максимальную активность по снижению уровня глюкозы в крови до 5 дней после инъекции, что превосходит эффекты составного белка Fc-FGF21 дикого типа и мутанта Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V.

Результаты еще одного эксперимента показаны на фиг. 15, которая отображает уровень глюкозы в крови, измеренный у мышей после инъекции контрольного PBS, или таких мутантов Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21 G170A, Fc(15)FGF21 G170C, Fc(15)FGF21 G170D, Fc(15)FGF21 G170N или Fc(15)FGF21 G170S. Фиг. 16 показывает процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам этого эксперимента. Все мутанты FGF21, протестированные в этом эксперименте, проявляли длительную активность по снижению уровня глюкозы в крови (до 5 дней после инъекции).

Результаты еще одного эксперимента показаны на фиг. 17, которая отображает уровень глюкозы в крови, измеренный у мышей после инъекции контрольного PBS или таких мутантов Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21 P171E, Fc(15)FGF21 P171H, Fc(15)FGF21 P171Q, Fc(15)FGF21 P171T, or Fc(15)FGF21 P171Y. Фиг. 18 показывает процентное изменение уровня глюкозы в крови по результатам этого эксперимента. Все мутанты FGF21, протестированные в этом эксперименте, демонстрировали улучшенную активность по снижению уровня глюкозы в крови при сопоставлении с Fc-FGF21 дикого типа.

Пример 14. Разрушение устойчивых к протеолизу мутантов Fc(15)FGF21 *in vivo* через 6-120 дней после инъекции.

Стабильность отобранных мутантов FGF21 *in vivo* анализировали, впрыскивая мышам мутант FGF21, после чего у мышей брали образцы крови в разных точках времени и проводили анализ сыворотки методом LC-MS. Более конкретно, мышам впрыскивали либо мутанты Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21 P171A, либо мутант Fc(15)FGF21 S172L (полученные из *E.coli*, как это описано в примере 2), причем каждый мутант перед инъекцией разбавляли приблизительно в 180 мкл 10 мМ HCl, а образцы крови брали через 6, 24, 48, 72 и 120 ч. Белки FGF21 аффинно очищали от крови, используя колонку с агарозной смолой против Fc человека. Образцы элюировали из колонки, используя 10 мМ HCl. Все конструкции FGF21 включали участок Fc и линкер из 15 аминокислот в аминоконцевой области белка FGF21. Мышам также впрыскивали контрольный FGF21 дикого типа.

Перед анализом аффинно очищенных образцов способом LC-MS в качестве эталона анализировали необработанный FGF21 дикого типа и необработанные мутанты FGF21. Все стандарты и образцы по точкам времени были редуцированы TCEP, а затем проанализированы методом LC-MS с применением колонки ACE циано 0,3 мм × 30 см и последующим распылением элюата в масс-спектрометрическую ионную ловушку LCQ Classic. Аффинно очищенные образцы были разбавлены ацетатом аммония, редуцированы TCEP, а затем проанализированы методом LC-MS, как описано выше.

Наблюдаемые массы Fc(15)FGF21 дикого типа через 0, 6, 24 и 48 ч после инъекции показаны на фиг. 19A-19D соответственно. Наблюдаемые массы Fc(15)FGF21 G170E через 0, 6, 24 и 48 ч после инъекции показаны на фиг. 20A-20D соответственно. Наблюдаемые массы Fc(15)FGF21 P171A через 0, 6, 24 и 48 ч после инъекции показаны на фиг. 21A-21D соответственно. Наблюдаемые массы Fc(15)FGF21 S172L через 0, 6, 24 и 48 ч после инъекции показаны на фиг. 22A-22D соответственно.

Было обнаружено, что все образцы, взятые через 72 и 120 ч, содержат компонент фибриногена высокого молекулярного веса (>200 кДа по результатам нередуцирующего анализа SDS-PAGE), который представлен намного обильнее, чем остальной составной белок Fc(15)FGF21. Результаты анализа LC-MS для других стандартов и образцов представлены в табл. 14.

Таблица 14. Результаты анализа LC-MS и предсказанные фрагменты

Образец FGF21	Основные наблюдаемые массы	Процентная доля от общей величины	Фрагмент	Эдман
Стандарт Fc(15)FGF21	45994 Da	100%	1-424	–
Fc(15)FGF21 WT 6 часов	46001 Da 44987 Da	80% 20%	1-424 1-414	Нет
Fc(15)FGF21 WT 24 часа	44979 Da	-100%	1-414	Нет
Fc(15)FGF21 WT 48 часов	44980 Da	-100%	1-414	–
Стандарт Fc(15)FGF21 G170E	46068 Da	100%	1-424	–
Fc(15)FGF21 G170E 6 часов	46078 Da	100%	1-424	Нет
Fc(15)FGF21 G170E 24 часа	46074 Da 45761 Da	80% 20%	1-424 1- 421	Нет
Fc(15)FGF21 G170E 48 часов	46072 Da 45760 Da	-60% -40%	1-424 1- 421	Нет
Стандарт Fc(15)FGF21 P171A	45970 Da	100%	1-424	–
Fc(15)FGF21 P171A 6 часов	45980 Da	100%	1-424	Нет
Fc(15)FGF21 P171A 24 часа	45973 Da 45657 Da	-70% -30%	1-424 1- 421	Нет
Fc(15)FGF21 P171A 48 часов	45992 Da	-50%	1-424	Нет
Стандарт Fc(15)FGF21 S172L	46022 Da	100%	1-424	–
Fc(15)FGF21 S172L 6 часов	46027 Da	100%	1-424	Нет
Fc(15)FGF21 S172L 24 часа	44984 Da	100%	1-414	Нет
Fc(15)FGF21 S172L 48 часов	44985 Da	100%	1-414	Нет

Как показано в табл. 14, разрушение Fc(15)FGF21 дикого типа и мутанта S172L выглядят сходно в том отношении, что после 24 ч циркуляции основной продукт составного белка представлял собой фрагмент, состоящий из аминокислотных остатков 1-414. Продукты разрушения мутантов Fc(15)FGF21 G170E и Fc(15)FGF21 P171A также выглядят сходно в том отношении, что образцы, взятые через 24 ч циркуляции, содержат 70-80% интактного белка (аминокислоты 1-424) и 20-30% фрагмента, состоящего из аминокислотных остатков 1-421.

Даже спустя 48 ч мутанты Fc(15)FGF21 G170E и Fc(15)FGF21 P171A все еще сохраняли интактный

белок, но в то же время демонстрировали увеличение количества фрагментов, состоящих из аминокислотных остатков 1-421. Как наблюдалось в предыдущих анализах конструкций Fc-FGF21, выявлялось разрушение компонента FGF21 составного белка, а компонент F оставался стабильным. Сайты расщепления, идентифицированные для белка дикого типа, Fc(15)FGF21 G170E, Fc(15)FGF21 P171A и Fc(15)FGF21 S172L, показаны на фиг. 23A-23D соответственно.

Пример 15. Идентификация мутантов FGF21 с пониженной агрегацией.

Одним из свойств FGF21 дикого типа является склонность к агрегации. Мутанты FGF21 с пониженной агрегацией были выявлены на основе двух гипотез. Первая гипотеза заключается в том, что применительно к FGF21 агрегацию (или димеризацию) запускают гидрофобные взаимодействия и ван-дер-Ваальсовы взаимодействия между молекулами FGF21, вызванные гидрофобными остатками, которые подвергаются воздействию гидрофильной водоосновной среды растворителя. Вторая гипотеза заключается в том, что эти открытые гидрофобные остатки могут быть замещены для создания вариантов точковых мутаций с пониженной агрегацией без нарушения активности FGF21.

Для идентификации открытых гидрофобных остатков в FGF21 был использован системный рациональный подход белковой инженерии. Поскольку не были известны рентгеновские или ЯМР-структуры FGF21, которые можно было бы использовать для идентификации открытых гидрофобных остатков, для создания трехмерной модели гомологии FGF21 с применением компьютерной программы моделирования MOE (молекулярная операционная среда, Chemical Computing Group, Монреаль, Квебек, Канада) была использована рентгенокристаллическая структура FGF19 (IPWA) высокого разрешения (1,3 Å), полученная из банка данных по белкам (PDB). В качестве матричного шаблона был выбран FGF 19, поскольку среди белков, депонированных в PDB, именно FGF 19 является белком, наиболее родственным FGF21 по гомологии аминокислотной последовательности. Доступность для растворителя была рассчитана следующим способом с применением программы MOE. Первое измерение площади поверхности (SA1) было определено как доступная площадь поверхности остатков в A2. Наряду с тем, что определенный аминокислотный остаток появляется в первичной последовательности белка много раз, каждое появление остатка может иметь разную площадь поверхности вследствие различий, среди всего прочего, в близости остатка к поверхности белка, в ориентации боковой цепи остатка и в пространственном расположении прилегающих аминокислотных остатков. Следовательно, проводят второе измерение площади поверхности (SA2), в котором представляющий интерес остаток извлечен из структуры белка наряду с его окружением, т.е. прилегающими остатками. Эти пространственно прилегающие остатки виртуально мутировали в глицины, чтобы удалить их боковые цепи, а затем вычисляли SA2 для представляющего интерес остатка, получая размер общей площади поверхности для этого остатка в его специфической конформации. Затем, вычисляя отношение SA1 к SA2 (SA1/SA2), можно получить процентный показатель возможной площади поверхности для того остатка, который фактически открыт.

Для дальнейшего анализа были отобраны несколько гидрофобных остатков, которые в значительной степени открыты для растворителя, и в этих остатках осуществлены виртуальные мутации с их заменой на другие встречающиеся в природе аминокислотные остатки. Изменения термостабильности белка, происходящие в результате различных замещений, были рассчитаны на модели FGF21 с применением интерактивной сетевой версии программы CUPSAT (Cologne University Protein Stability Analysis Tools [Инструменты кельнского университета для анализа стабильности белков]) в соответствии с инструкциями, представленными на веб-сайте CUPSAT. См. Parthiban et. al., 2006, *Nucleic. Acids. Res.* 34: W239-42; Parthiban et. al., 2007, *BMC Struct. Biol.* 7:54. При конструировании вариантов точковых мутаций для снижения агрегации были исключены значительно дестабилизирующие или гидрофобные мутации. В качестве кандидатов на роль мутантов FGF21 с пониженной агрегацией рассматривались стабилизирующие (или, в редких случаях, немного дестабилизирующие) замещения, которые приводят к улучшению гидрофильных и/или ионных характеристик.

Сводка данных, полученных через этот рациональный подход белковой инженерии, представлена в табл. 15, где также перечислены типичные мутанты FGF21 с ожидаемой пониженной склонностью к белковой агрегации и улучшенной стабильностью.

Таблица 15. Расчетное влияние мутантов FGF21 на стабильность

№ остатка	остаток WT	Мутация	Стабилизация (ккал/моль)
26	A	K	1,25
		E	1,54
		R	2,016
45	A	T	0,66
		Q	0,71
		K	1,8
		E	2,34
		R	1,59
52	L	T	-0,33
58	L	G	0,16
		S	-0,15
		c	1,0
		E	0,08
60	P	A	1,3
		K	1,51
		E	0,66
		R	1,31
78	P	A	0,14
		C	2,48
		R	0,08
		H	0,13
86	L	T	0,18
		C	4,1

88	F	A	2,52
		S	3,08
		K	2,88
		E	1,48
98	L	T	0,49
		Q	0,17
		K	-0,19
		C	3,08
		E	0,84
		R	3,4
99	L	C	7,34
		E	2,0
		D	1,01
		R	1,61
111	A	T	0,47
		K	-0,12
129	A	Q	3,93
		K	1,02
		N	3,76
		E	3,01
		D	3,76
		R	1,68
134	A	K	5,37
		Y	4,32
		E	5,13
		R	6,18
		H	2,86

Пример 16. Изготовление и экспрессия мутантов и составных белков FGF21 с пониженной агрегацией.

Конструкции, кодирующие мутанты FGF21, которые перечислены в табл. 16, были получены посредством амплификации в ПЦР вектора экспрессии FGF21 дикого типа, как описано в примере 11 (конструкция вектора экспрессии FGF21 дикого типа описана в примере 1). Составные белки были изготовлены, как описано в данном документе, в частности в примере 6.

Таблица 16. Мутанты FGF21 с пониженной агрегацией

Мутация (мутации)	Fc	Линкер
A26E		
A26K		
A26R		
A45E		
A45K		
A45K	-NH2	15
A45R	-NH2	15
A45Q	-NH2	15
A45T	-NH2	15
A45K, L98R	-NH2	15
52T		
L58C		
L58E		
L58G		
L58S		
P60A		
P60E		
P60K		
P60R		
P78A		
P78C		
P78H		
P78R		
L86C		
L86T		
F88A		
F88E		
F88K		

F88R		
F88S		
L98C		
L98E	-NH2	15
L98K	-NH2	15
L98Q	-NH2	15
L98R		
L98R	-NH2	15
L99C		
L99D		
L99E		
L99R		
A111K	-NH2	15
A111T		
A129D		
A129E	-NH2	15
A129H	-NH2	15
A129K		
A129N	-NH2	15
A129R	-NH2	15
A129Q		
A134E		
A134H	-NH2	15
A134K		
A134Y		

Агрегацию разных белков FGF21, включая FGF21 дикого типа, усеченные полипептиды FGF21, мутанты FGF21 и составные белки FGF21, оценивали посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Анализируемые образцы инкубировали при 4°C, комнатной температуре или 37°C в течение разного времени, а затем подвергали анализу методом SEC. Эксперименты проводили в системе FLPLC Beckman, оснащенной колонкой SEC. Для FGF21 дикого типа использовали колонку TOSOHAAS TSK-GeI G2000 SEC с 2×PBS, содержащую 2% изопропиловый спирт в мобильной фазе. Для составных белков FGF21 Fc и мутантных полипептидов FGF21 использовали колонку TOSOHAAS TSK-GeI G3000 SEC с 2×PBS в мобильной фазе.

Пример 17. Активность *in vitro* мутантов FGF21 с пониженной агрегацией.

Были проведены эксперименты по идентификации мутантов с пониженной агрегацией, которые сохраняют активность FGF21 дикого типа в анализе на ELK-люциферазу *in vitro*. Анализы на ELK-люциферазу проводили, как это описано в примере 4. На фиг. 24А-24С показаны результаты анализа на активность ELK-люциферазы, проведенного на таких мутантах FGF21 как FGF21 L99R, FGF21 L99D и FGF21 A111T (фиг. 24А), на таких мутантах FGF21 как FGF21 A129D, FGF21 A129Q и FGF21 A134K (фиг. 24В) и на таких мутантах FGF21 как FGF21 A134Y, FGF21 A134E и FGF21 A129K (фиг. 24С). Результаты этих экспериментов демонстрируют, что некоторые из мутантов с пониженной агрегацией не проявляют отрицательного влияния на активность FGF21 по результатам анализов на ELK-люциферазу.

Пример 18. Изготовление и экспрессия комбинированных мутантов Fc(15)FGF21, демонстрирующих удлиненное полувыведение и пониженную агрегацию.

Были изготовлены и конъюгированы с молекулами Fc IgG1 многие комбинированные мутанты FGF21, демонстрирующие пониженную агрегацию и удлиненный период полувыведения за счет подрыва протеолитического разрушения. Эти мутанты FGF21 были изготовлены, по существу, как это описано в примере 11.

Пример 19. Исследования *in vitro* по изучению мутантов Fc(15)FGF21, демонстрирующих удлиненное полувыведение и пониженную агрегацию.

Были проведены эксперименты по идентификации комбинированных мутантов FGF21, которые сохраняют активность FGF21 дикого типа в анализе на ELK-люциферазу *in vitro*. Анализа на ELK-люциферазу проводили, как это описано в примере 4.

На фиг. 25A-25D показаны результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на таких мутантах Fc-FGF21 как Fc-FGF21 P171G, Fc-FGF21 P171S и Fc-FGF21 P171T (фиг. 25A), на таких мутантах Fc-FGF21 как Fc-FGF21 P171Y, Fc-FGF21 P171W и Fc-FGF21 P171C (фиг. 25B), на таких мутантах Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 A45K/G170E и FGF21 A45K (фиг. 25C) и на таких мутантах Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF21 P171E и Fc(15)FGF21 A45K/G170E (фиг. 25D). Результаты этих экспериментов демонстрируют, что мутации, направленные на улучшение стабильности или как стабильности, так и растворимости, не теряют активность *in vitro* по сравнению с Fc-FGF21 дикого типа. Интересно, что мутант FGF21 A45K продемонстрировал более высокую мощность по сравнению с Fc-FGF21 дикого типа.

На фиг. 26A показан процентное изменение агрегации для контрольного FGF21 (WT) и мутанта FGF21 A45K после инкубации 65 мг/мл белка при 4°C в течение 1, 2 и 4 дней. Данные показывают, что мутация A45K приводит к снижению агрегации мутантного белка по сравнению с белком дикого типа.

Фиг. 26B показывает процентное изменение агрегации для контрольного FGF21 (WT), а также таких мутантов FGF21 как P78C, P78R, L86T, L86R, L98C, L98R, A111T, A129D, A129Q, A129K, A134K, A134Y и A134E после инкубации 65 мг/мл белка при 4°C в течение 1, 6 и 10 дней. Данные показывают, что мутации L86R, L98C, L98R, A111T, A129Q и A129K приводят к снижению агрегации мутантного белка по сравнению с белком дикого типа.

Фиг. 27 показывает результаты анализа активности ELK-люциферазы, проведенного на контрольном FGF21 человека и на таких мутантах FGF21 как FGF21 A45K, FGF21 L52T и FGF21 L58E. Этот эксперимент демонстрирует, что мутант FGF21 A45K сохраняет полную эффективность FGF21 дикого типа и проявляет даже большую мощность по сравнению с FGF21 дикого типа. Однако мутанты FGF21 L52T и FGF21 L58E показывают меньшую мощность и эффективность по сравнению с FGF21 дикого типа.

На фиг. 28A-28B показано изменение уровня агрегации для таких мутантов Fc(15)FGF21 как Fc(15)FGF216-181/G170E, Fc(15)FGF21 A45K/G170E, Fc(15)FGF21 P171E, Fc(15)FGF21 P171A, Fc(15)FGF21 G170E и контрольного FGF21 после их инкубации при 4°C в течение 1, 4 и 8 дней. Этот эксперимент демонстрирует, что после 8-дневного периода мутант Fc(15)FGF21 A45K/G170E проявлял меньшую агрегацию по сравнению с мутантами Fc(15)FGF21 G170E или Fc(15)FGF21 P171E, но все три мутанта проявляли меньшую агрегацию по сравнению с контрольным Fc(15)FGF21. Табл. 17 показывает процентную величину агрегации, полученную для контрольного Fc-FGF21 и мутанта Fc-FGF21 A45K/G170E после инкубации при 4 °C или при комнатной температуре (RT) в течение 0, 2, 3, 4 или 7 дней.

Таблица 17. Процентная величина агрегации для Fc-FGF21 и мутанта Fc-FGF21

Образец		день 0	день 2	день 3	день 4	день 7
Fc-FGF21 WT 32 мг/мл	4°C	1,12	1,71	1,89	2,14	2,32
	RT	1,12	6,09	7,94	9,57	12,59
Fc-FGF21 A45K/G170E 33 мг/мл	4°C	0,45	0,77	0,88	1,03	1,24
	RT	0,45	3,86	5,22	6,62	8,60

Пример 20. Изготовление и экспрессия комбинированных составных мутантов Fc-FGF21.

Как описано выше, стабильность и растворимость FGF21 можно модулировать при внесении специфических усечений и аминокислотных замещений. В дополнение к этому стабильность FGF21 можно дополнительно увеличить за счет соединения таких модифицированных белков FGF21 с участком Fc гена иммуноглобулина человека IgG1. Кроме того, комбинируя вышеуказанные модификации, можно создать молекулы FGF21, обладающие как улучшенной стабильностью, так и улучшенной растворимостью. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих комбинированные мутанты FGF21, перечисленные в табл. 18, были изготовлены по методикам, описанным выше.

Таблица 18. Комбинированные мутанты FGF21

Аминокислотные остатки	Мутация, направленная на устойчивость к протеолизу	Мутация, направленная на уменьшение агрегации	Fc	Линкер
1-181	G170E	A45K	-NH2	15
1-181	G170E	L98R	-NH2	15
1-181	G170E	A45K, L98R	-NH2	15
1-181	P171G	A45K	-NH2	15
1-181	P171S	A45K	-NH2	15
1-181	P171G	L98R	-NH2	15
1-181	P171S	L98R	-NH2	15
1-181	P171G	A45K, L98R	-NH2	15
1-178	G170E		-NH2	15
6-181	G170E		-NH2	15
6-181	G170E	A45K	-NH2	15
6-181	G170E	L98R	-NH2	15
6-181	P171G		-NH2	15
6-181	P171G	L98R	-NH2	15
7-181	G170E		-NH2	15

На фиг. 29 показаны результаты измерения уровня глюкозы в крови у мышей, которым впрыскивали такие комбинированные мутанты Fc(15)FGF21, как Fc(15)FGF21 A45K/G170E, Fc(15)FGF21 A45K/P171G или Fc(15)FGF21 L98R/P171G.

В другом эксперименте такой мутант FGF21 как Fc(15)FGF21 L98R/P171G исследовали параллельно со зрелым FGF21 и Fc-FGF21 дикого типа. В одном из экспериментов рекомбинантные клетки линии 293 T культивировали в присутствии разных концентраций FGF21, Fc-FGF21 или Fc-FGF21L98R/P171G в течение 6 ч. Затем клеточные лизаты анализировали на активность люциферазы. Как показано на фиг. 30, Fc-FGF21 L98R/P171G имел сходную активность с Fc-FGF21, а это указывало на то, что внесение двух точковых мутаций не изменяет активность молекулы *in vitro*.

Еще в одном эксперименте стабильность Fc-FGF21 L98R/P171G в концентрации 65 мг/мл оценивали в течение девяти дней при двух разных температурах, а именно, при комнатной температуре и при 4°C, параллельно с FGF21 и Fc-FGF21. По окончании периода инкубации клеточные лизаты анализировали методом SEC-HPLC для определения профиля агрегации по времени при разных температурах. Данные, показанные на фиг. 31A и 31B, свидетельствуют о том, что скорость формирования агрегатов значительно снижалась для мутанта Fc-FGF21 L98R/P171G при комнатной температуре (закрашенные треугольники, пунктирная линия на фиг. 31 A) и при 4°C (закрашенные треугольники, пунктирная линия на фиг. 31B).

Пример 21. Устойчивые к протеолизу мутанты FGF21, содержащие С-концевые мутации.

Также проводили исследования стабильности комбинированных мутантов *in vivo*. В частности, стабильность *in vivo* мутанта Fc-FGF21 L98R/P171G сравнивали со стабильностью Fc-FGF21 в мышинной модели и модели *супомолгус*. На обоих биологических видах были получены сходные результаты. В исследовании на обезьянах *супомолгус* белки Fc-FGF21 L98R/P171G и Fc-FGF21 впрыскивали внутривенно в дозе 23,5 мг/кг, после чего собирали аликвотные пробы сыворотки и плазмы в разных точках времени до 840 ч после введения дозы. Анализировали точки времени до 168 ч. Образцы для разных точек времени аффинно очищали с применением реактивов против Fc, а затем анализировали методом масс-спектрометрии MALDI. Сравнение результатов двух анализов выявило хорошую корреляцию между ними.

При анализе данных, полученных способом иммуноаффинность-MALDI, было обнаружено, что в результате мутации P171 в P171G обрезание молекулы Fc-FGF21 L98R/P171G в сайте P171 элиминировалось. Однако для мутанта Fc-FGF21 L98R/P171G наблюдалось минорное и медленное разрушение, приводящее к утрате до трех С-концевых остатков (фиг. 32). Минорные расщепления в трех С-концевых остатках также наблюдались для других мутантов FGF21 после того, как более чувствительный сайт расщепления между аминокислотными остатками 171 и 172 был заблокирован, как это показано на фиг. 20 и 21. Расщепление трех С-концевых остатков может представлять остановку отщепления от С-концевого участка молекулы карбоксипептидазой последовательным (от остатка к остатку) образом или специфическую атаку протеазы в аминокислотных остатках 178 и 179 с неспецифическим расщеплением в аминокислотных остатках 179-180 и 180-181. Утрата 2-3 аминокислот на С-конце может вызывать

уменьшенное связывание бета-клото и, в конечном итоге, снижение мощности и уменьшение активности молекулы *in vivo*. См., например, Yie et al., 2009, FEBS Lett. 583:19-24. Для адресного анализа очевидного разрушающего эффекта карбоксипептидазы на С-конце исследовали влияние добавления "колпачка" аминокислотного остатка к различным мутантным полипептидам FGF21. С применением методик, описанных в данном документе, были изготовлены и проанализированы многие конструкции, включая те, что представлены в табл. 19. Табл. 19 приводит сводку результатов анализа на ELK-люциферазу *in vitro*.

Подходящие аминокислотные колпачки могут иметь длину от 1 до 15 аминокислот, например 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15 аминокислот. В колпачке может быть использовано любое число аминокислот любого типа, например один остаток пролина, один остаток глицина, два остатка глицина, пять остатков глицина, а также другие комбинации. Дополнительные примеры колпачков представлены в непосредственном примере и в табл. 19.

В дополнение к этому, для адресного анализа очевидной атаки протеазы в аминокислотных остатках 178 и 179 исследовали мутации аминокислотных остатков в положениях 179, 180 и 181. И вновь с применением методик, описанных в данном документе, были изготовлены и проанализированы многие конструкции, включая те, что представлены в табл. 19. Также исследовали влияние комбинаций колпачка и мутаций в этих сайтах. Табл. 19 приводит в сводном виде типичные конструкции, которые были изготовлены и проанализированы *in vitro* на активность ELK-люциферазы способом, который описан в данном документе. В соответствии с терминологией, использованной в данном документе, hFc означает последовательность Fc человека (например, SEQ ID NO: 13), L15 относится к линкеру, имеющему 15 аминокислотных остатков (например, SEQ ID NO: 23).

Таблица 19. Эффективность и значения EC50 для полипептидов FGF21 с С-концевыми модификациями

Конструкции	Эффективность	EC50(нМ)
huFGF21	0,4	100,0 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G)	2,5	76,1 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, Y179F)	2,6	78,3 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, I-180)		
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, I-179)	7,8	77,4 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, A180E)	1,9	79,6 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, S181K)	130	87,9 %
GS GSGSGSGS.hFGF21.L15.hFc		
MKEDD.hFGF21.L15.hFc	834	83,1 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, S181P, P182)	272	69,9%
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, A180G)	3,25	76,9 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, S181G)	3,43	77,3 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, I-182)		
hFGF21(L98R, P171G, G182)		
hFc.L15.hFGF21 (L98R, P171G, Y179P)	428	44,4 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, Y179G)	61	82,6 %
hFc.L15hFGF21(L98R, P171G, Y179S)	25,3	74,8 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, Y179A)	43,2	79,6 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, S181T)	3,07	77,6 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, S181A)	2,66	73,5 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, S181L)	3,46	72,6 %
hFc.L15.hFGF21 (L98R, P171G, S181P)	33,8	79,5 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, A180P)	617	77,1 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, A180S)	2,18	84,7 %
HFGF21 (L98R, P171G, GGGGG182-6)		
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, P182)	6,1	85,9 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, G182)	6,5	71,1 %
hFc.L15.hFGF21(1-178, L98R, P171G)	167	63,9 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, GG182-3)	1941	84,2 %
hFc.L15.hFGF21(L98R, P171G, GGGGG182-6)	4307	99,7%

На фиг. 33 показано процентное изменение уровня глюкозы в крови, наблюдаемое у диабетических мышей db/db (фон C57B6), которым впрыскивали контрольный PBS, нативный FGF21 дикого типа, Fc-FGF21 (L98R, P171G) и две закрытые колпачками молекулы, к С-концевому участку которых был добавлен или остаток пролина, или остаток глицина, т.е. Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182P) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182G). В непосредственном примере, когда остаток добавляли к С-концу полипептида FGF21 дикого типа или мутантного, остаток упоминается в том положении, которое он занимает в результирующем белке. Так, обозначение "182G" указывает на то, что остаток глицина присоединен к С-концевому остатку 181 зрелого полипептида дикого типа или мутанта. Фиг. 33 показывает, что нативный FGF21 снижал уровень глюкозы в крови в течение 6 ч, тогда как три изученных мутанта Fc-FGF21 демонстрировали длительную активность по снижению глюкозы в крови в течение как минимум 120 ч. Белок Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182P), молекула которого включала добавление остатка пролина на С-конце компонента FGF21 составного белка, оказался наиболее мощным и приводил к самому низкому уровню глюкозы в крови по сравнению с Fc-FGF21 (L98R, P171G) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182G).

В последующем эксперименте изучали активность *in vivo* молекул Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182G) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182P), сопоставляя ее с активностью *in vivo* закрытой колпачком молекулы, которая включала два остатка глицина, добавленных на С-конце, а именно Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182G) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182P). Фиг. 34 показывает результаты этого эксперимента. Фиг. 34 отображает процентное изменение уровня глюкозы в крови, наблюдаемое у мышей ob/ob, которым впрыскивали контрольный PBS, Fc-FGF21 (L98R, P171G), Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182G) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182P).

Как показано на фиг. 34, все исследованные молекулы демонстрировали длительную активность по снижению глюкозы при сравнении с контрольным PBS. Этот эксперимент подтвердил предыдущие результаты (фиг. 33), свидетельствующие о том, что Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182P) с добавлением пролина на С-конце демонстрирует немного большую активность по снижению уровня глюкозы при сравнении с молекулой без пролинового колпачка, например Fc-FGF21 (L98R, P171G). Однако оказалось, что добавление двух остатков глицина на С-конце, например Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182G) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, 182P), снижает мощность молекулы *in vivo* и уменьшает длительность эффекта *in vivo* по снижению уровня глюкозы.

На фиг. 35 показано процентное изменение уровня глюкозы в крови, наблюдаемое у диабетических мышей db/db (фон C57B6), которым впрыскивали контрольный PBS или такие мутантные полипептиды FGF21 как Fc-FGF21 (L98R, P171G), Fc-FGF21 (L98R, P171G, Y 179S), Fc-FGF21 (L98R, P171G, Y179A), Fc-FGF21 (L98R, P171G, A180S) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, A180E). Все мутанты продемонстрировали сходную активность по снижению уровня глюкозы, а также сходную длительность эффекта.

Фиг. 36 отображает процентное изменение уровня глюкозы в крови, наблюдаемое у диабетических мышей db/db (фон C57B6), которым впрыскивали контрольный носитель, Fc-FGF21 (L98R, P171G), Fc-FGF21 (L98R, P171G, Y179F) и Fc-FGF21 (L98R, P171G, A180E). По сравнению с белком Fc-FGF21 (L98R, P171G) белок Fc-FGF21 (L98R, P171G, Y 179F) был менее эффективен в понижении уровня глюкозы в крови. Однако Fc-FGF21 (L98R, P171G, A180E), в котором было произведена мутационная замена аланина на глутаминовую кислоту в положении 180, оказался более эффективным, чем Fc-FGF21 (L98R, P171G) и вызывал дополнительное снижение уровня глюкозы на 20% по сравнению с Fc-FGF21 (L98R, P171G). Эти данные позволяют предположить, что мутация A180E может детерминировать уменьшенное С-концевое разрушение *in vivo*, т.е. улучшенную мощность и эффективность молекулы *in vivo*.

Пример 22. Исследование на обезьянах резус.

С применением методологии, описанной в данном документе, была создана конструкция Fc-линкер-FGF21. Эта конструкция включала последовательность Fc IgG1 (SEQ ID NO: 13), соединенную на С-конце с линкерной последовательностью (Gly)5-Ser-(Gly)3-Ser-(Gly)4-Ser (SEQ ID NO: 23), которая далее была присоединена на С-конце к N-концу зрелой последовательности FGF21 (SEQ ID NO: 4) с двумя внесенными в последнюю мутациями, L98R и P171G. Затем эта конструкция была экспрессирована и очищена, как описано в данном документе, и была выделена в димерной форме белка, каждый мономер которого был сцеплен через межмолекулярные дисульфидные связи между участками Fc каждого мономера. Эта молекула упоминается в непосредственном примере как "Fc-FGF21(RG)", имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 и кодируется последовательностью SEQ ID NO: 37. В этом примере обозначение FGF21 относится к зрелой форме FGF21, а именно, к SEQ ID NO: 4.

22.1. Схема исследования.

Конструкцию Fc-FGF21(RG) вводили хронически и подкожно ("SC") самцам обезьян резус без диабета и с индексом массы тела (BMI) > 35. Две других группы обезьян (n=10 на группу) получали либо зрелый FGF21 (т.е. SEQ ID NO: 4), либо контрольный носитель.

Перед началом введения любого испытуемого соединения животные проходили акклиматизацию в течение 42 дней, а затем их делили на группы численностью по 10 особей и вводили посредством множественных SC инъекций испытуемые соединения или контрольное вещество по принципу слепого исследования, как это отображено графически на фиг. 37. Вкратце, каждому животному делали в день одну инъекцию испытуемого соединения или носителя. FGF21 вводили ежедневно, тогда как Fc-FGF21(RG) вводили еженедельно. Дозы Fc-FGF21(RG) и FGF21 повышали каждые 2 недели, как это показано на

фиг. 37. По ходу всего исследования контролировали вес тела и потребление пищи. Научно-исследовательская организация, работающая по контракту (CRO) не была осведомлена о проводимом лечении.

Перед началом лечения проводили два пероральных теста на толерантность к глюкозе (OGTT). Результаты OGTT1 использовали для разделения животных на три равноценные группы, основываясь на равномерном распределении по таким признакам как площадь под кривой (AUC) и вес тела.

Результаты второго OGTT (OGTT2) использовали для подтверждения сортировки по итогам первого OGTT (OGTT1). Те обезьяны, для которых профиль OGTT, полученный в первом тесте (OGTT1), отличался от профиля, полученного в следующем тесте (OGTT2), были исключены из исследования. Результаты OGTT1 и OGTT2 показаны на фиг. 38A и 38B, а результаты измерений AUC показаны на фиг. 38C. Исходный вес тела показан на фиг. 38D и в табл. 20.

OGTT 3, 4 и 5 проводили через каждые 2 недели по окончании лечения каждой из трех доз (низкой, средней и высокой). Образцы крови от животных собирали натощак еженедельно и использовали их для измерения уровней глюкозы, инсулина, триглицеридов, а также уровня испытываемого соединения. Образца крови также собирали еженедельно в течение 3-недельного периода отмывания. Начальные результаты OGTT1 и OGTT2 показали ожидаемый профиль глюкозы у здоровых животных с максимальным уровнем глюкозы в плазме через 30 мин и продемонстрировали стабильность AUC в 3 разных группах.

Исходные биохимические показатели плазмы натощак показаны в табл. 20. Биохимические измерения в плазме проводили на образцах крови, полученных перед началом лечения.

Таблица 20. Исходные показатели веса тела, уровней глюкозы, инсулина и триглицеридов в плазме натощак в трех группах обезьян резус

	Носитель	FGF21	Fc-FGF21(RG)
N	10	10	10
Вес тела (кг)	8,5 ± 0,5	8,7 ± 0,4	8,5 ± 0,4
Глюкоза в плазме (мг/дл)	91,9 ± 4,8	94,8 ± 5,3	82,2 ± 3,7
Инсулин (пг/мл)	942,6 ± 121,4	976,1 ± 107,7	1023,4 ± 205,1
Триглицериды (мг/дл)	44,4 ± 4,8	58,6 ± 5,2	71,7 ± 9,8

Были выбраны три разных уровня дозы: низкие дозы составляли 0,1 и 0,3 мг/кг, средние дозы - 0,3 и 1 мг/кг, а высокие дозы - 1 и 5 мг/кг для FGF21 и Fc-FGF21 (RG) соответственно. Уровни дозы были выбраны на основе наблюдаемой дозовой реакции у мышей, а схема введения доз основывалась на ожидаемой частоте инъекций для человека. Для средней и низкой доз были использованы эквивалентные дозы FGF21, а высокую дозу Fc-FGF21(RG) увеличили до 5 мг/кг (вместо 3 мг/кг, что соответствовало дозе, эквивалентной 1 мг/кг для FGF21).

22.2. Влияние испытываемых соединений на вес тела.

В этом эксперименте для оценки влияния испытываемых соединений на вес тела, измеряемый еженедельно, в трех разных группах обезьян резус еженедельно рассчитывали процентное изменение веса тела по сравнению с исходным. Вес тела также измеряли в течение трехнедельного периода отмывания. В табл. 20 указаны исходные значения веса тела для каждой группы.

Вес тела контролировали по ходу всего исследования как до, так и после выведения испытываемых соединений. Процентное изменение веса тела по сравнению с начальным у животных, получавших носитель, нарастало, тогда как у животных, получавших Fc-FGF21(RG) и FGF21, на протяжении 6-недельного периода лечения вес тела снижался с эффектом дозовой зависимости, как это показано на фиг. 39. Как ранее наблюдалось у грызунов (Xu et al., *Diabetes* 58(1):250-9 (2009)), лечение FGF21 снижало вес тела на уровне статистической значимости. Fc-FGF21(RG) имел большую экспозицию по сравнению с FGF21 (на фиг. 48 и 47 соответственно), и это позволяло дать полученным наблюдениям такое возможное объяснение, что Fc-FGF21(RG) демонстрировал более выраженное снижение веса тела по сравнению с FGF21.

22.3. Влияние испытываемых соединений на уровень инсулина.

Уровень инсулина измеряли в образцах крови, полученных после ночного перерыва в приеме пищи (натощак) или после дневного кормления.

Уровень инсулина в плазме у обезьян резус, получавших носитель, FGF21 или Fc-FGF21(RG), измеряли натощак еженедельно, включая 3-недельный период отмывания. Образцы крови натощак собирали приблизительно через пять дней после последней инъекции Fc-FGF21(RG) и приблизительно через 21 ч после последней инъекции FGF21.

Уровень инсулина в плазме после приема пищи у обезьян резус измеряли на пятой и шестой неделе лечения либо носителем, либо FGF21 в высокой дозе. Образцы крови после приема пищи собирали приблизительно через три дня после последней инъекции Fc-FGF21(RG) и приблизительно через 2 ч после последней инъекции FGF21. Фиг. 40 показывает влияние носителя, FGF21 и Fc-FGF21(RG) на уровень инсулина в крови натощак на протяжении всего девятинедельного исследования, тогда как Фиг. 41 отображает уровень инсулина после приема пищи, определенный в образцах, которые были получены на 5-

и 6-й неделе.

Вкратце, в двух самых высоких дозах как FGF21, так и Fc-FGF21(RG) статистически значимо снижали уровень инсулина натощак и после приема пищи. То наблюдение, что уровень инсулина у животных, получавших FGF21 и Fc-FGF21(RG), снижался, а повышения уровня инсулина не происходило, свидетельствует о повышенной чувствительности к инсулину.

22.4. Влияние испытуемых соединений на OGTT (глюкоза и инсулин).

Три теста OGTT (OGTT 3, 4 и 5) были проведены после начала лечения. В тесте OGTT5 профили уровней глюкозы и инсулина измеряли у животных, которые в течение 6 недель получали носитель, FGF21 или Fc-FGF21(RG), в соответствии с последними двумя неделями режима повышения дозы (высокая доза). Тест OGTT5 проводили приблизительно через 7 дней после последней инъекции Fc-FGF21(RG) и приблизительно через 21 ч после последней инъекции FGF21. Профили глюкозы и инсулина в тесте OGTT5 показаны на фиг. 42 и 43 соответственно. Животные, получавшие Fc-FGF21(RG), демонстрировали улучшенный клиренс глюкозы, сравнимый с 5 животными, получавшими носитель, только при самой высокой дозе и в последней точке времени при проведении измерений, как это показано на фиг. 42. В конце периода введения последней дозы Fc-FGF21(RG) показал самое сильное улучшение клиренса глюкозы. FGF21 не показал улучшения клиренса глюкозы. Fc-FGF21(RG) имел большую экспозицию по сравнению с FGF21 (на фиг. 48 и 47 соответственно), и это позволяло дать полученным наблюдениям такое возможное объяснение, что Fc-FGF21(RG) демонстрировал более выраженный эффект в отношении клиренса глюкозы по сравнению с FGF21. Уровень инсулина по результатам теста OGTT5 был статистически значимо снижен в последней точке времени проведения измерений у животных, получавших Fc-FGF21(RG), по сравнению с животными, получавшими носитель.

Процентное изменение AUC глюкозы по сравнению с исходным рассчитывали для трех OGTT (OGTT 3, 4 и 5), проведенных в конце периода введения каждой дозы (низкой, средней и высокой) в трех разных группах обезьян резус, как это показано на фиг. 44. Тест OGTT5 проводили приблизительно через семь дней после последней инъекции Fc-FGF21(RG) и через 21 ч после последней инъекции FGF21, и полученные результаты показали, что Fc-FGF21(RG) статистически значимо улучшал AUC5. Исходные показатели теста OGTT для каждой группы показаны на фиг. 38C.

Уровень глюкозы в плазме натощак измеряли в те дни, когда не проводили тесты OGTT. Не было выявлено каких-либо значимых статистических различий между тремя группами животных по результатам измерений уровня глюкозы натощак.

22.5. Влияние испытуемых соединений на уровень триглицеридов.

Процентное изменение уровня триглицеридов натощак в плазме у обезьян резус, получавших носитель, FGF21 или Fc-FGF21(RG), рассчитывали еженедельно, включая 3-недельный период отмывания. Образцы крови натощак собирали приблизительно через пять дней после последней инъекции Fc-FGF21(RG) и приблизительно через 21 ч после последней инъекции FGF21. Уровень триглицеридов измеряли каждую неделю после начала лечения, процентные изменения по сравнению с начальным уровнем показаны на фиг. 45, и исходные величины натощак показаны в табл. 20.

Как отображено на фиг. 45, животные, получавшие либо Fc-FGF21(RG), либо FGF21, демонстрировали снижение уровня триглицеридов с эффектом дозозависимости, причем Fc-FGF21(RG) имел более выраженный понижающий эффект по сравнению с FGF21.

На фиг. 46 показан уровень триглицеридов в плазме в образцах, полученных от обезьян резус после приема пищи на пятой и шестой неделе лечения носителем, Fc-FGF21(RG) или FGF21. Образцы крови после приема пищи собирали приблизительно через 3 дня после последней инъекции Fc-FGF21(RG) и приблизительно через 2 ч после последней инъекции FGF21. Уровень триглицеридов в плазме после приема пищи у животных, получавших FGF21 и Fc-FGF21(RG) был статистически значимо снижен по сравнению с животными, получавшими носитель (фиг. 46).

22.6. Концентрация испытуемых соединений.

Экспозицию испытуемых соединений, вводимых на приблизительно эквивалентном уровне молярной дозы, оценивали на протяжении всего исследования. Концентрацию Fc-FGF21(RG) измеряли перед введением дозы и приблизительно через 5 дней после последней инъекции. Уровень FGF21 измеряли перед введением дозы, а также через 5, 12, 19 и 26 дней. Образцы крови получали приблизительно через 21 ч после последней инъекции.

Показатели индивидуальной концентраций испытуемых соединений у каждой обезьяны отображены на фиг. 47 и 48. Как показано на фиг. 47, большинство животных в группе, получавшей FGF21, имели концентрацию ниже порога количественного определения. Фиг. 48 показывает, что животные в группе, получавшей Fc-FGF21(RG), имели определяемый уровень Fc-FGF21(RG) в каждой дозовой фазе (две еженедельных дозы одинаковой интенсивности). Средняя концентрация в каждой дозовой фазе для Fc-FGF21(RG) увеличивалась примерно пропорционально дозе от 0,3 до 5 мг/кг. Имеется минимальное накопление, о чем свидетельствует устойчивая концентрация после первой и второй еженедельной дозы в каждой фазе повышения дозы для обоих соединений. В фазе после лечения (период отмывания) уровень Fc-FGF21(RG) был определяемым приблизительно до 47-го дня (12 дней после последней дозы), а после этого падал ниже порога количественного определения (LLOQ).

Экспозицию испытуемых соединений также мониторировали при каждом ОГТТ. FGF21 не поддавался определению в ходе тестов ОГТТ 3 и 4, после лечения FGF21 в низкой и средней дозе. Однако по результатам ОГТТ5, т.е. после лечения высокой дозой, наблюдался определяемый уровень. Пропорциональное дозе увеличение уровня Fc-FGF21(RG) наблюдалось от третьего до пятого ОГТТ при увеличении дозы, как это показано на фиг. 49.

Данные об уровнях соединений подтверждают, что животные подвергались воздействию ожидаемого количества каждого соединения, а именно FGF21 и Fc-FGF21(RG), в режиме повышения дозы. В отношении измеряемого количества FGF21 наблюдалась большая вариабельность, которая представляла собой ожидаемый результат, учитывая то, что сбор образцов проводили приблизительно через 21 ч после последней дозы, а период полувыведения FGF21 составляет приблизительно 1 ч.

22.7. Выводы.

FGF21 понижал уровень триглицеридов натощак и после приема пищи, уровень инсулина и уменьшал вес тела в самых высоких дозах. Fc-FGF21(RG) улучшал показатели тестов ОГТТ и понижал уровень инсулина в самой высокой дозе, а также с эффектом дозовой зависимости понижал уровень триглицеридов в плазме натощак и после приема пищи, как и вес тела. Как FGF21, так и Fc-FGF21(RG) снижали показатели по многим метаболическим параметрам у обезьян резус, неотягощенных сахарным диабетом. Уровень инсулина и триглицеридов снижался одинаково при лечении FGF21 и Fc-FGF21(RG), если уровень циркулирующих соединений находился в сходном диапазоне (в состоянии животных после приема пищи). Вследствие улучшенных характеристик Fc-FGF21(RG) превосходил FGF21 в отношении большинства измеряемых параметров, а для эффективного воздействия на метаболические параметры его можно было вводить один раз в неделю.

Хотя настоящее изобретение было описано на основе различных вариантов его осуществления, квалифицированные специалисты поймут, что вполне возможны его вариации и модификации. Таким образом, надо понимать, что прилагаемая формула изобретения охватывает все равноценные вариации, которые относятся к сфере действия настоящего изобретения, заявленного в данном документе. В дополнение к этому следует упомянуть, что заголовки разделов, использованные в данном документе, даны только в организационных целях и на должны восприниматься как ограничивающие описанный здесь предмет обсуждения.

Все источники, процитированные в этой заявке, явным образом включены в настоящий документ в качестве ссылок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный мутантный полипептид фактора роста фибробластов 21 (FGF21), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и содержащий аминокислотную замену A180E или аминокислотные замены A180E и P171G.

2. Выделенный полипептид по п.1, способный понижать глюкозу в крови у млекопитающего и содержащий:

(a) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков;

(b) карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков; или

(c) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков и карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков.

3. Выделенный полипептид по п.1, ковалентно связанный с одним или более полимеров.

4. Выделенный полипептид по п.3, причем полимер представляет собой ПЭГ.

5. Выделенный мутантный полипептид фактора роста фибробластов 21 (FGF21), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, содержащую замену в положении 98, 171 и 180, причем:

(a) замена в положении 171 выбрана из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, лизина, серина, треонина, триптофана или тирозина;

(b) замена в положении 98 выбрана из группы, состоящей из аргинина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, лизина или треонина; и

(c) замена в положении 180 выбрана из группы, состоящей из глицина, пролина, серина или глутаминовой кислоты;

и их комбинации.

6. Выделенный полипептид по п.5, в котором остаток в положении 98 представляет собой аргинин, остаток в положении 171 представляет собой глицин и остаток в положении 180 представляет собой глутаминовую кислоту.

7. Выделенный мутантный полипептид фактора роста фибробластов 21 (FGF21), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, содержащую аминокислотные замены в положениях 180 и 98, причем:

(a) аминокислотный остаток в положении 98 представляет собой аргинин, и

(b) аминокислотный остаток в положении 180 выбран из группы, состоящей из глицина, пролина,

серина или глутаминовой кислоты.

8. Выделенный полипептид по п.7, в котором остаток в положении 98 представляет собой аргинин, а остаток в положении 180 представляет собой глутаминовую кислоту.

9. Выделенный полипептид по п.7, способный понижать глюкозу в крови у млекопитающего и содержащий:

(a) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков;

(b) карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков; или

(c) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков и карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков.

10. Выделенный полипептид по п.7, ковалентно связанный с одним или более полимеров.

11. Выделенный полипептид по п.10, причем полимер представляет собой ПЭГ.

12. Выделенный гибридный полипептид мутантного фактора роста фибробластов 21 (FGF21), содержащий:

(a) константный домен IgG;

(b) линкерную последовательность, слитую с константным доменом IgG; и

(c) мутант FGF21, слитый с линкерной последовательностью и содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, причем остаток лейцина в положении 98 заменен на остаток аргинина, а остаток пролина в положении 171 заменен на остаток глицина.

13. Выделенный гибридный полипептид по п.12, причем линкерная последовательность содержит GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23).

14. Выделенный гибридный полипептид по п.12, причем константный домен IgG содержит SEQ ID NO: 13.

15. Выделенный гибридный белок 12, причем линкерная последовательность содержит GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23) и константный домен IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

16. Выделенный гибридный полипептид 15, причем N-конец линкера слит с C-концом константного домена IgG, а N-конец мутанта FGF21 слит с C-концом линкера.

17. Выделенный гибридный полипептид по п.12, причем мутант FGF21 дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой:

(a) фенилаланин, пролин, аланин, серин или глицин в положении 179;

(b) глутаминовую кислоту, глицин, пролин или серин в положении 180; или

(c) лизин, глицин, треонин, аланин, лейцин или пролин в положении 181.

18. Выделенный гибридный полипептид по п.12, причем мутант FGF21 дополнительно содержит 1-10 аминокислотных остатков, слитых с C-концом мутанта FGF21.

19. Выделенный гибридный полипептид по п.18, причем 1-10 аминокислотных остатков выбраны из группы, состоящей из глицина, пролина и их комбинаций.

20. Выделенный гибридный полипептид по п.12, способный понижать глюкозу в крови у млекопитающего, причем мутант FGF21 содержит:

(a) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков;

(b) карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков; или

(c) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков и карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков.

21. Гибридный полипептид, содержащий выделенный полипептид по любому из пп.1-11, слитый с гетерологичной аминокислотной последовательностью.

22. Гибридный полипептид по п.21, в котором гетерологичная аминокислотная последовательность представляет собой константный домен IgG или его фрагмент.

23. Гибридный полипептид по п.22, в котором константный домен IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

24. Гибридный полипептид по п.23, в котором полипептид присоединен к константному домену IgG через линкер.

25. Гибридный полипептид по п.24, в котором линкер содержит GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 31).

26. Мультимер, содержащий два или более гибридных полипептида по любому из пп.12-20 либо два или более гибридных полипептида по любому из пп.21-25.

27. Мультимер мутантных полипептидов FGF21, содержащий по меньшей мере первую и вторую цепь, причем первая цепь содержит:

(a.1) полипептид по п.6;

(b.1) линкерную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 31; и

(c.1) домен Fc, содержащий SEQ ID NO: 13;

и вторая цепь содержит:

(a.2) полипептид по п.6;

(b.2) линкерную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 31; и

(с.2) домен Fc, содержащий SEQ ID NO: 13.

28. Мультимер по п.27, представляющий собой димер.

29. Мультимер по п.28, причем полипептид (а.1) или (а.2) способен понижать глюкозу в крови у млекопитающего и содержит:

(а) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков;

(b) карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков; или

(с) аминоконцевое усечение не более чем 8 аминокислотных остатков и карбоксиконцевое усечение не более чем 12 аминокислотных остатков.

30. Мультимер по п.28, причем полипептид ковалентно связан с одним или более полимеров.

31. Мультимер по п.28, причем полимер представляет собой ПЭГ.

32. Фармацевтическая композиция для лечения диабета, снижения уровней триглицеридов, улучшения переносимости глюкозы, снижения уровня глюкозы в крови, снижения уровня инсулина, снижения веса тела, лечения гепатостеатоза или лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), содержащая выделенный полипептид по любому из пп.1-11, выделенный гибридный полипептид по любому из пп.12-20, гибридный полипептид по любому из пп.21-25 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

33. Фармацевтическая композиция по п.32, в которой вспомогательное вещество представляет собой гидрогель.

34. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-11.

35. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.34.

36. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.34.

37. Способ лечения диабета, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.32.

38. Способ снижения уровней триглицеридов у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.32.

39. Способ улучшения толерантности к глюкозе у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.32.

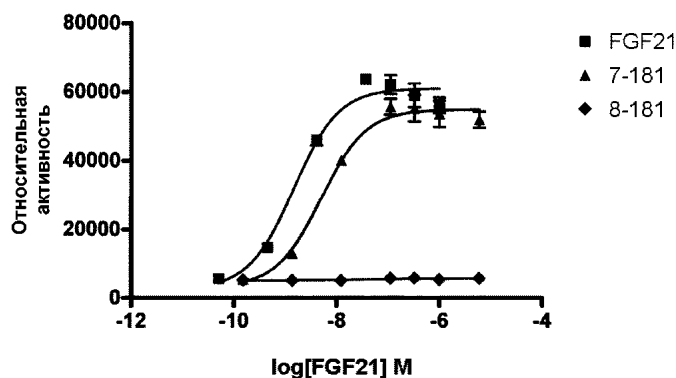
40. Способ снижения уровня глюкозы в крови у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.32.

41. Способ снижения уровней инсулина у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.32.

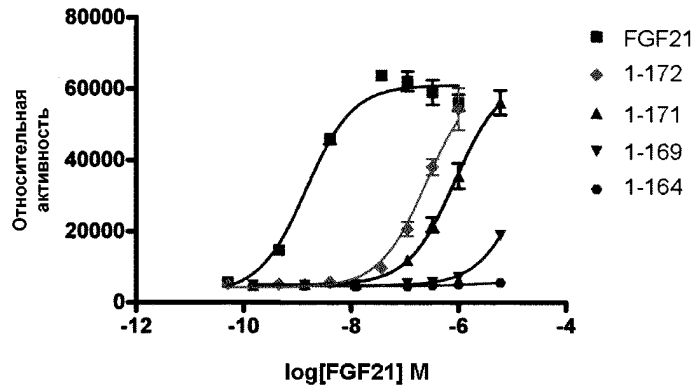
42. Способ снижения массы тела у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по п.32.

43. Способ лечения гепатостеатоза пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по п.32.

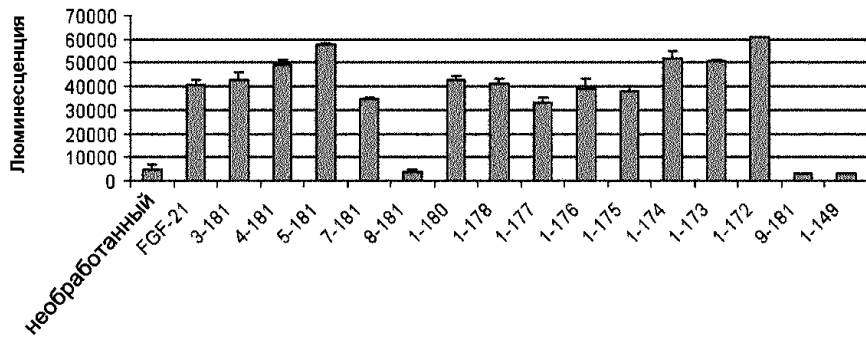
44. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по п.32.



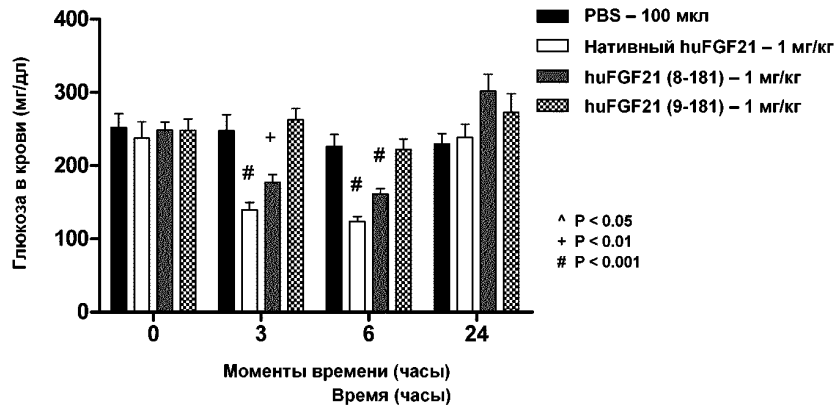
Фиг. 1А



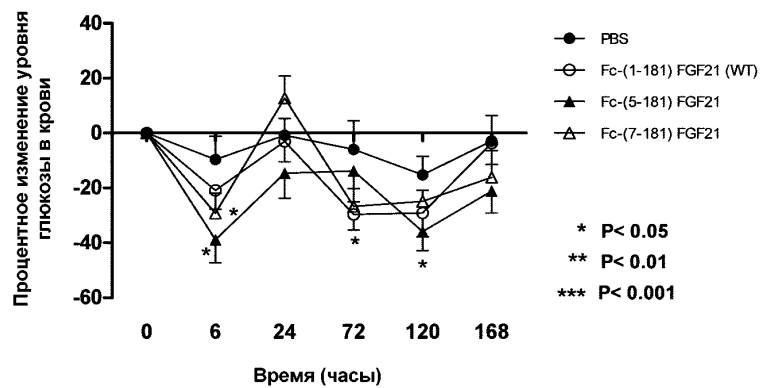
Фиг. 1В



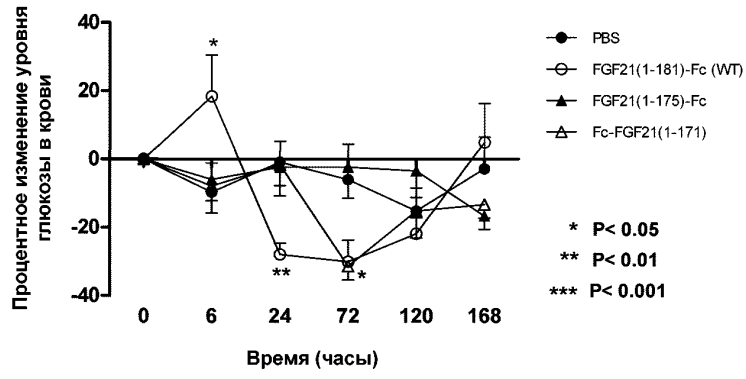
Фиг. 2



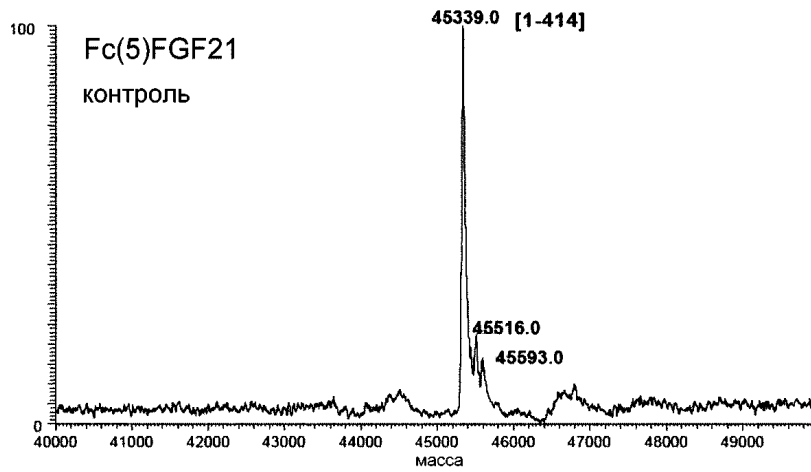
Фиг. 3



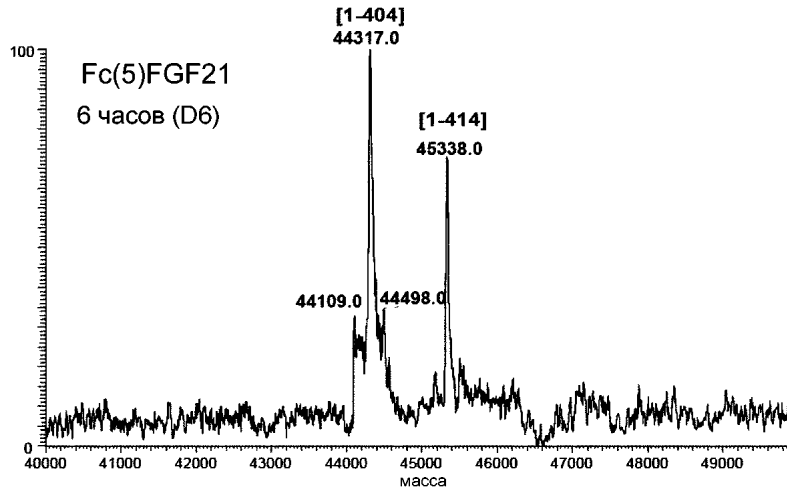
Фиг. 4



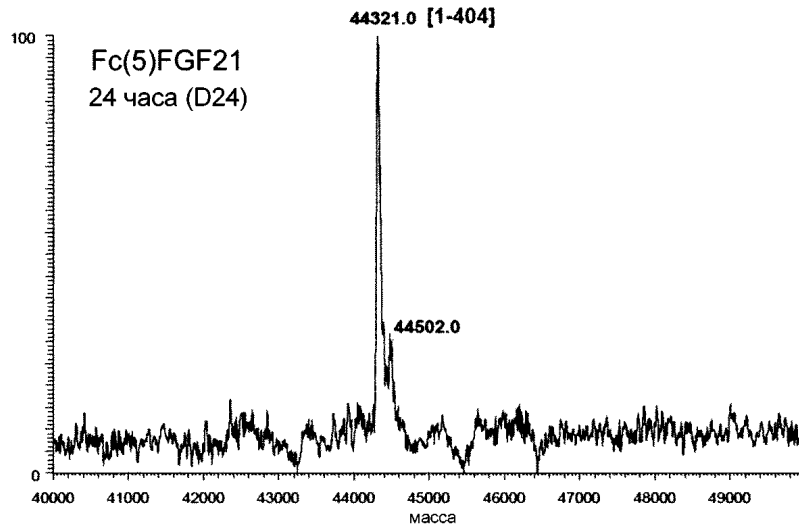
Фиг. 5



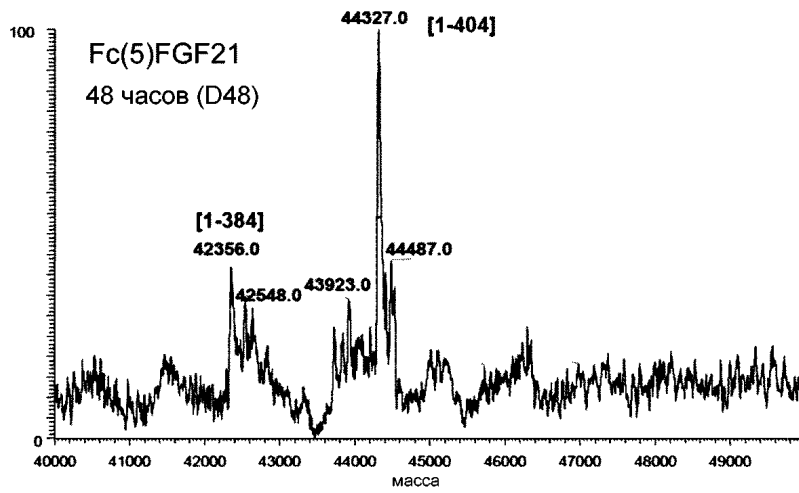
Фиг. 6А



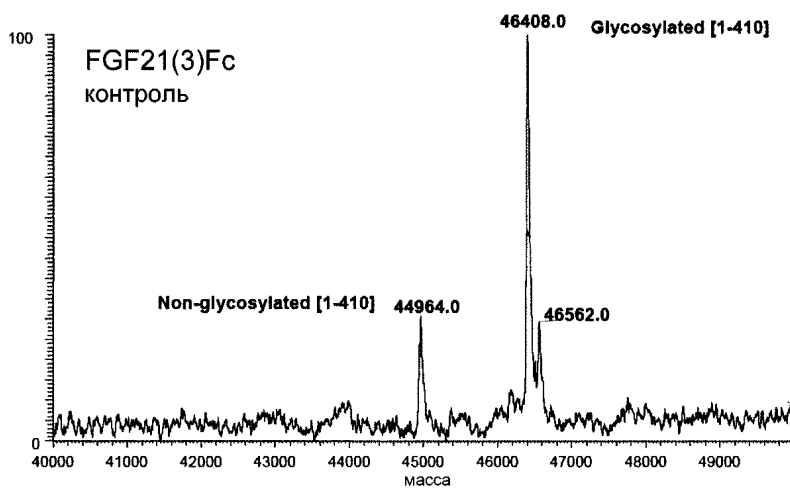
Фиг. 6В



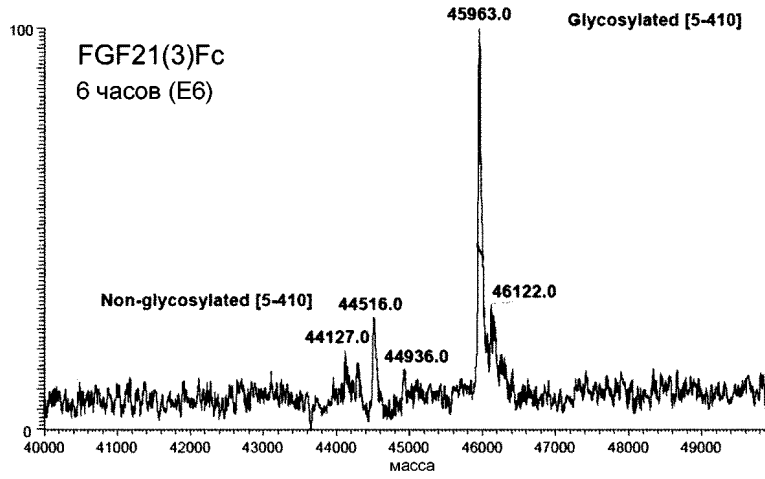
Фиг. 6С



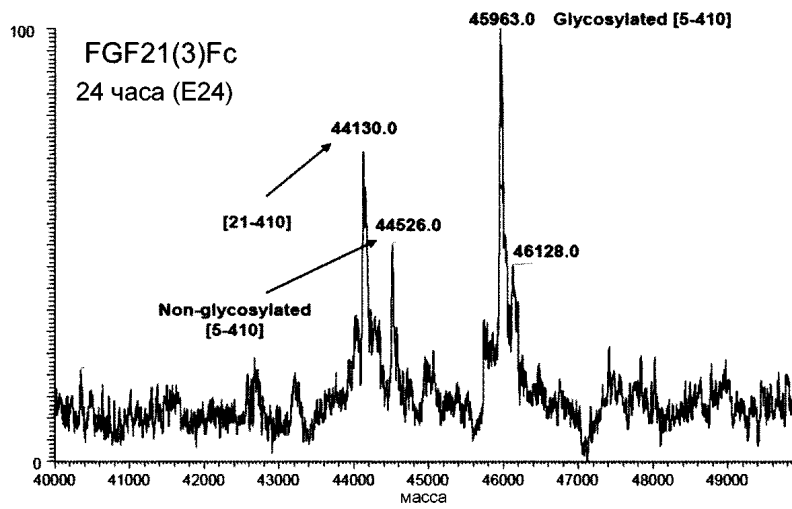
Фиг. 6D



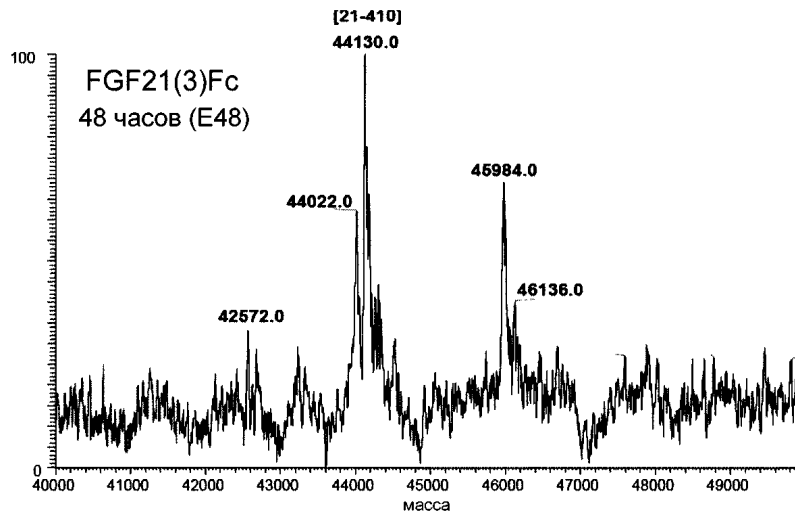
Фиг. 7А



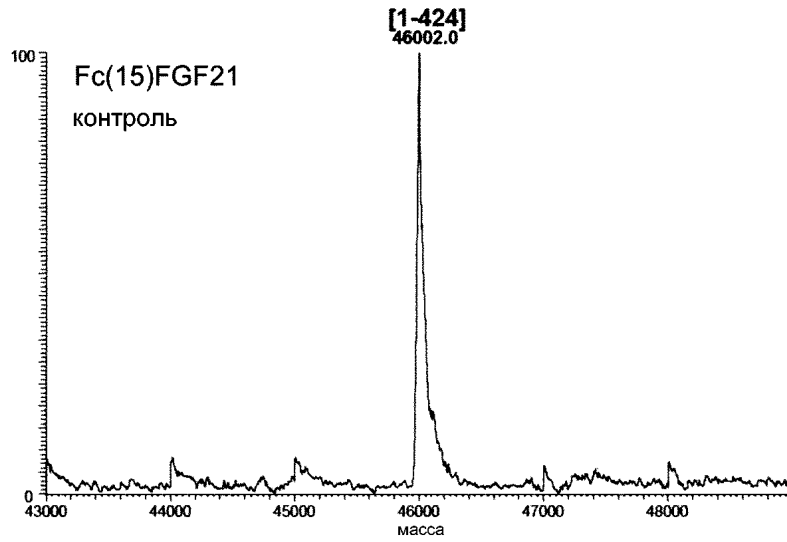
Фиг. 7B



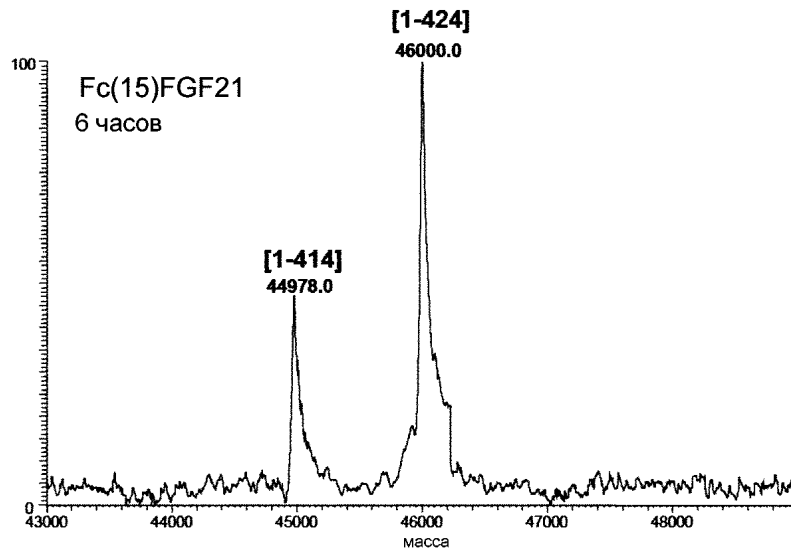
Фиг. 7C



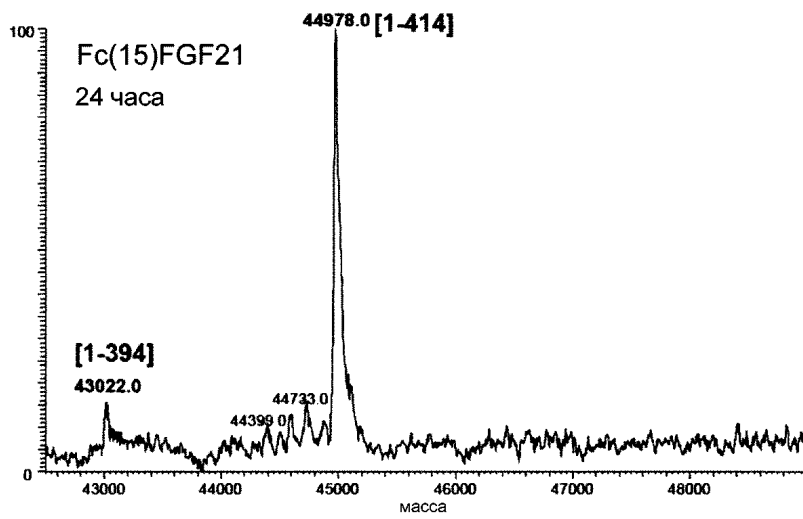
Фиг. 7D



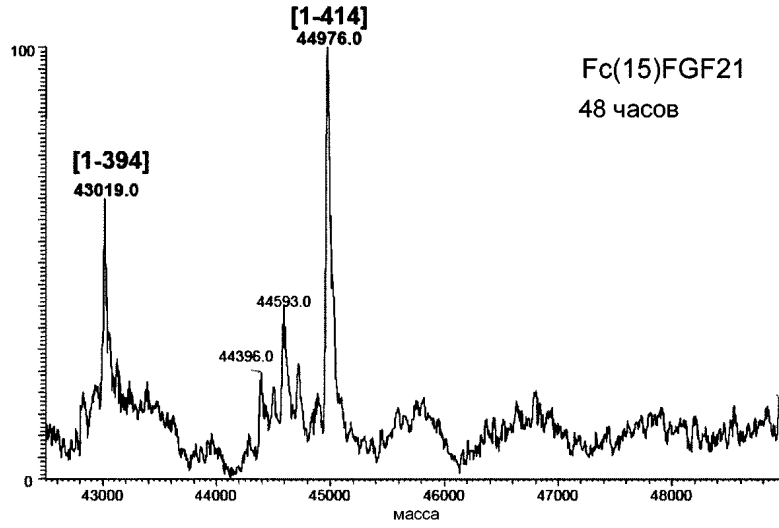
Фиг. 8А



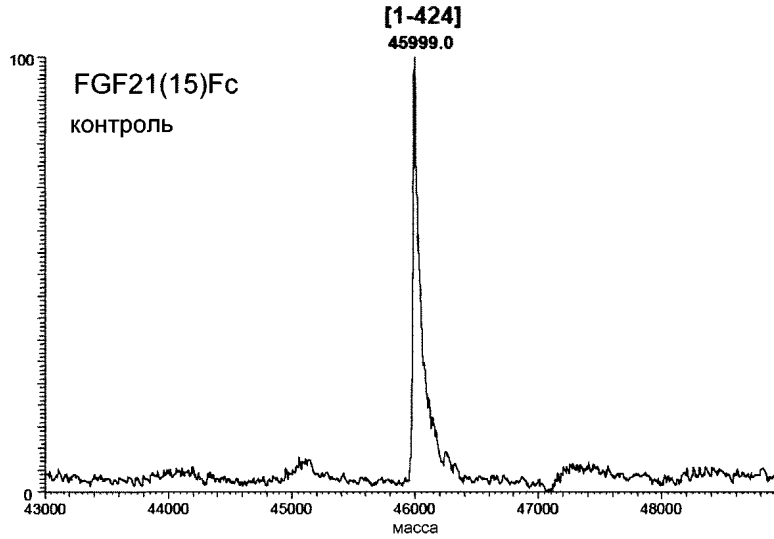
Фиг. 8В



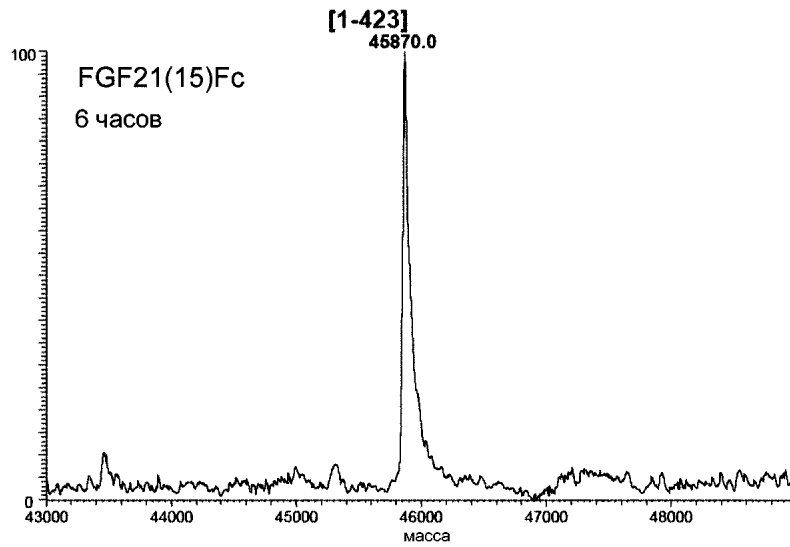
Фиг. 8С



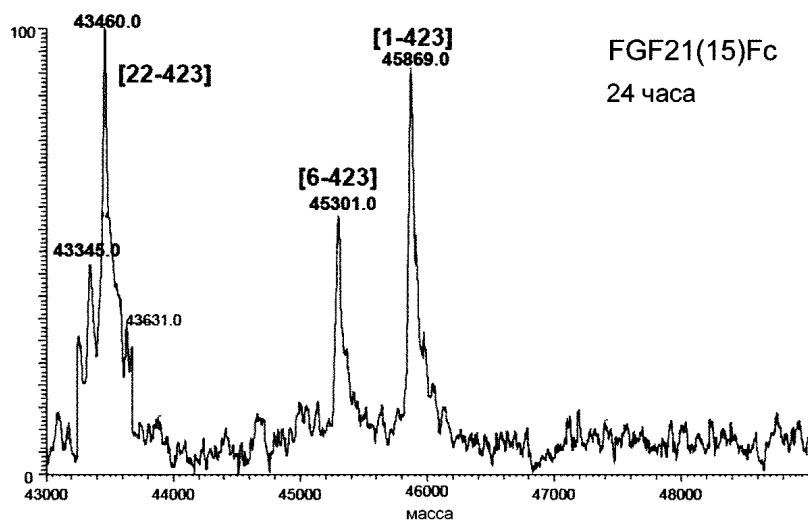
Фиг. 8D



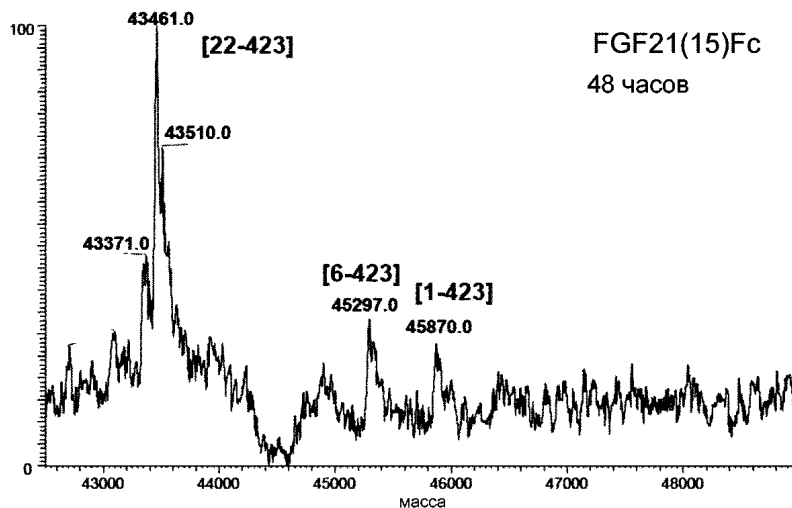
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 9D

Fc(15)FGF21

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMEALHNHHTQKSLSLSPGKGGGG
GSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
REDGTVGGAADQSPELLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
YGSLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
APRGPARGFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSSG
RSPSYAS

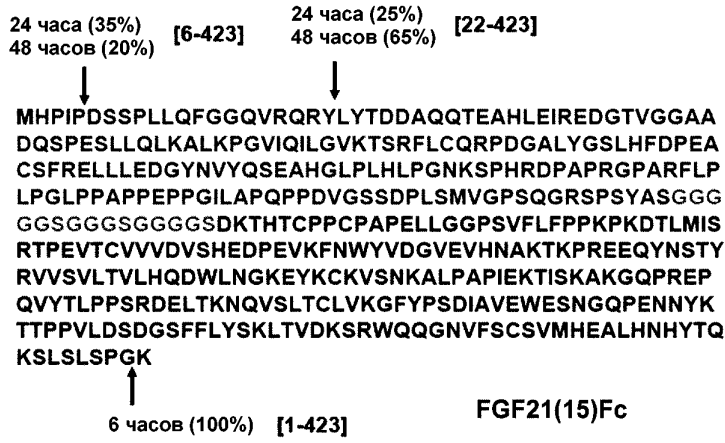
24 часа (15%)
48 часов (40%)

[1-394]

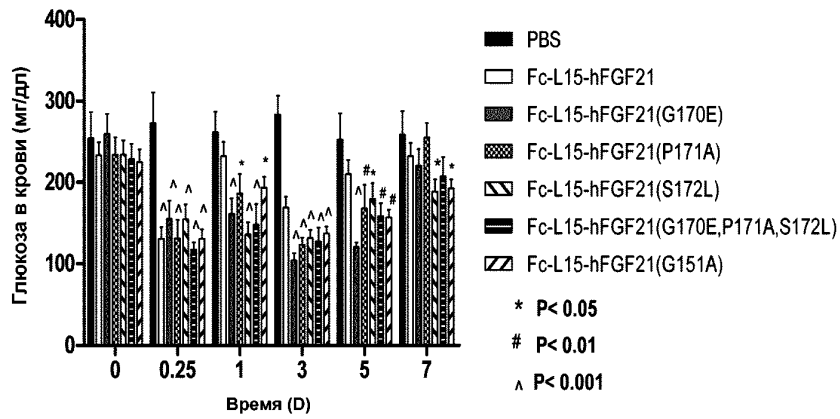
6 часов (35%)
24 часа (85%)
48 часов (60%)

[1-414]

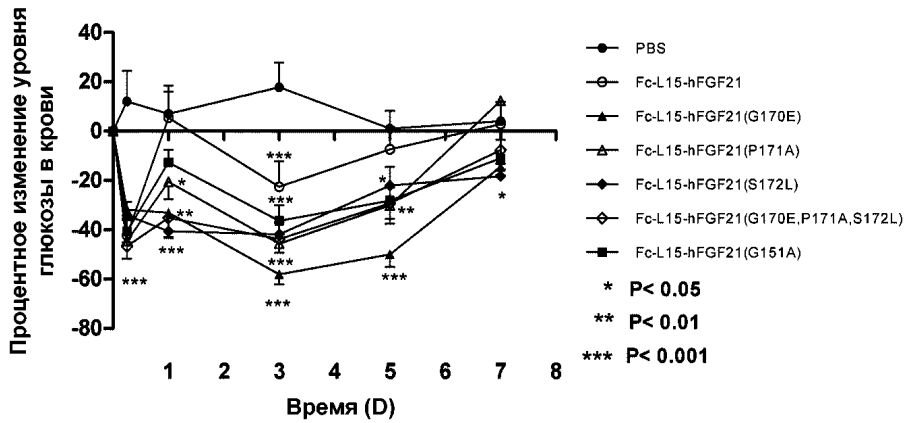
Фиг. 10А



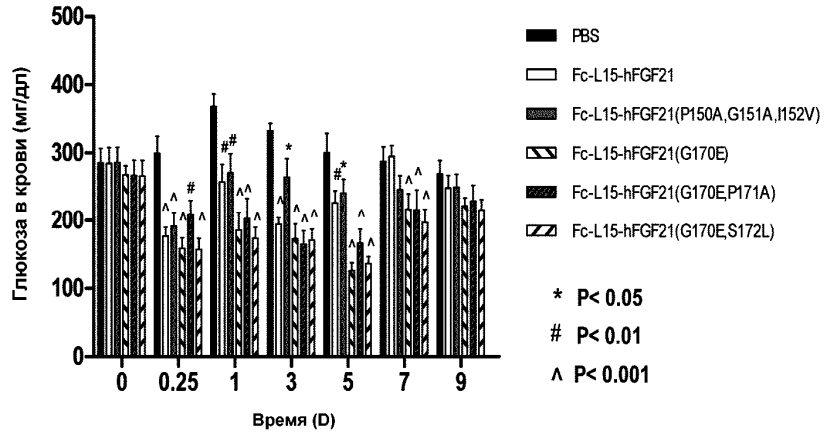
Фиг. 10B



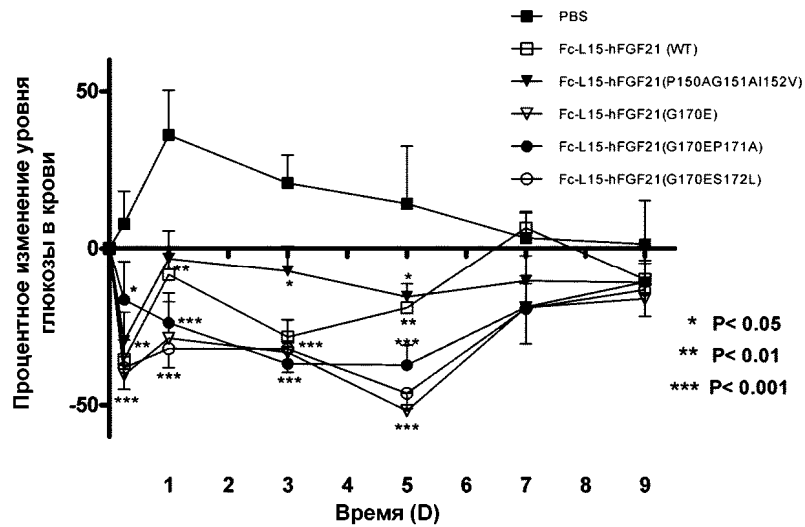
Фиг. 11



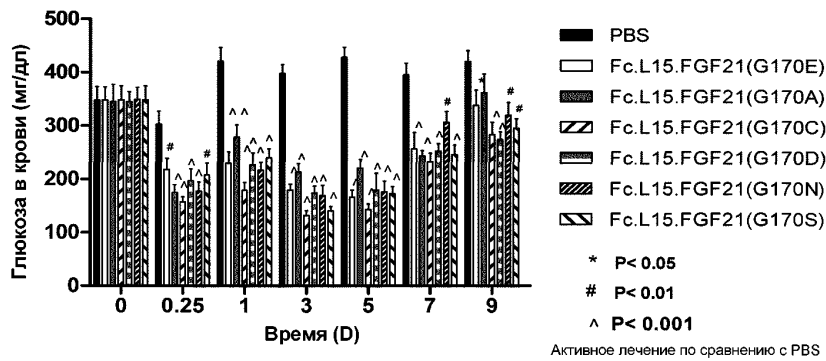
Фиг. 12



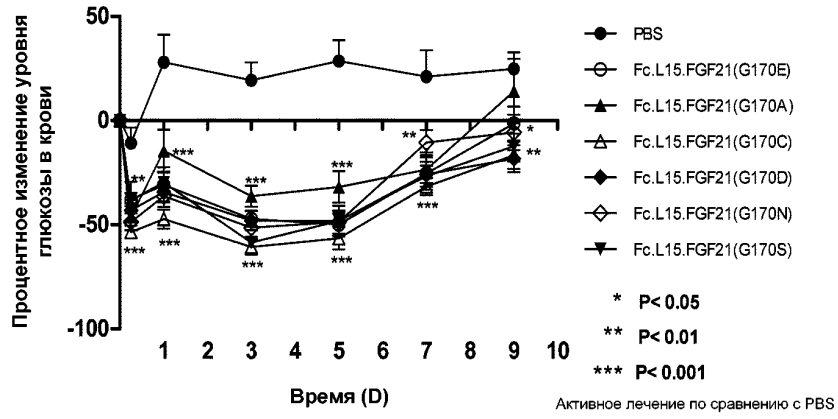
Фиг. 13



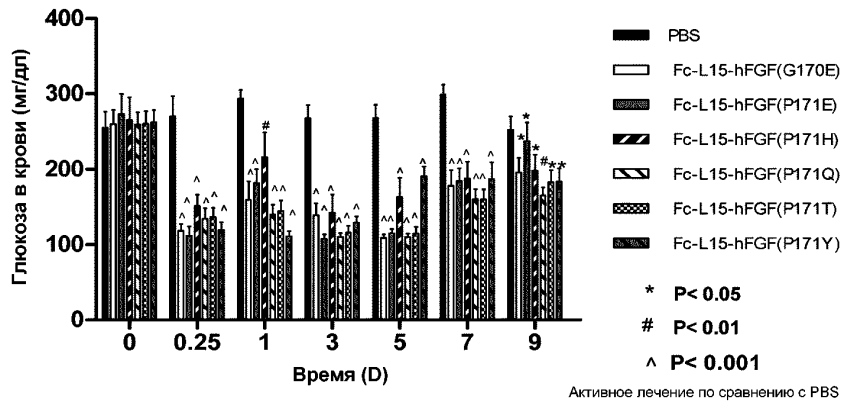
Фиг. 14



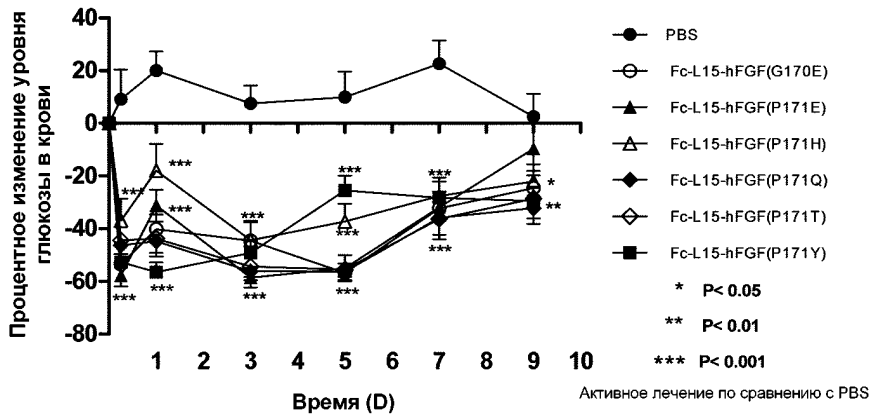
Фиг. 15



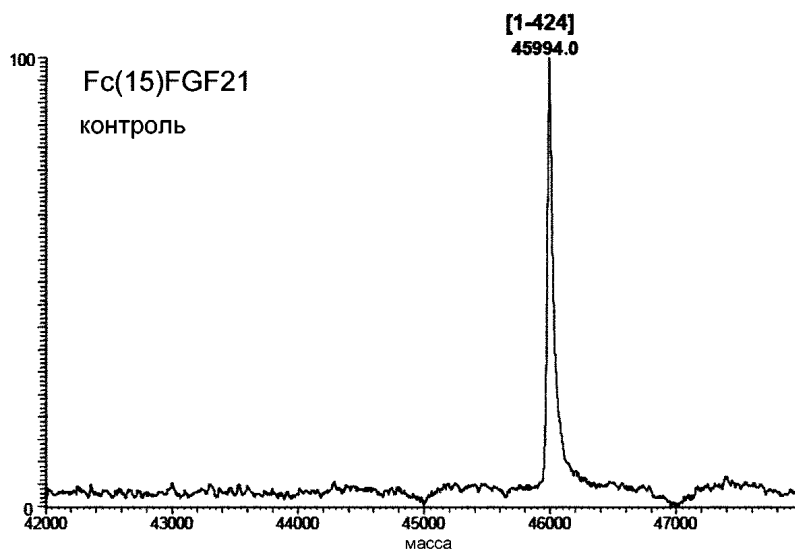
Фиг. 16



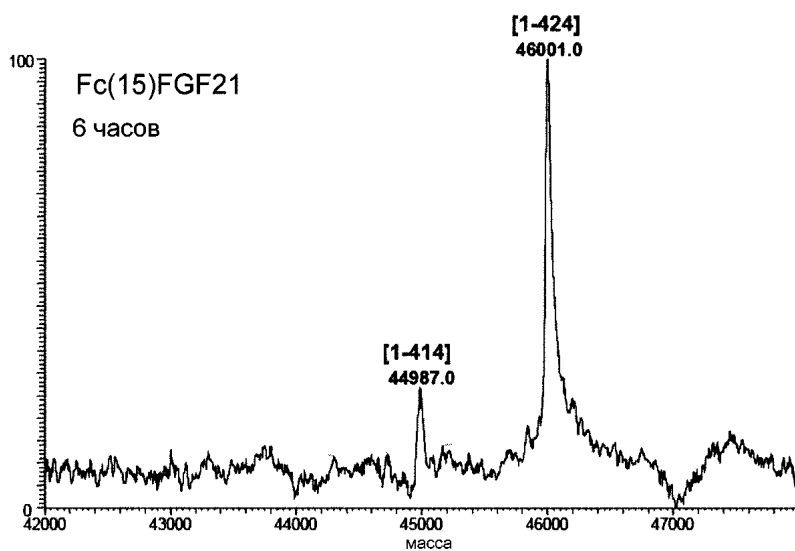
Фиг. 17



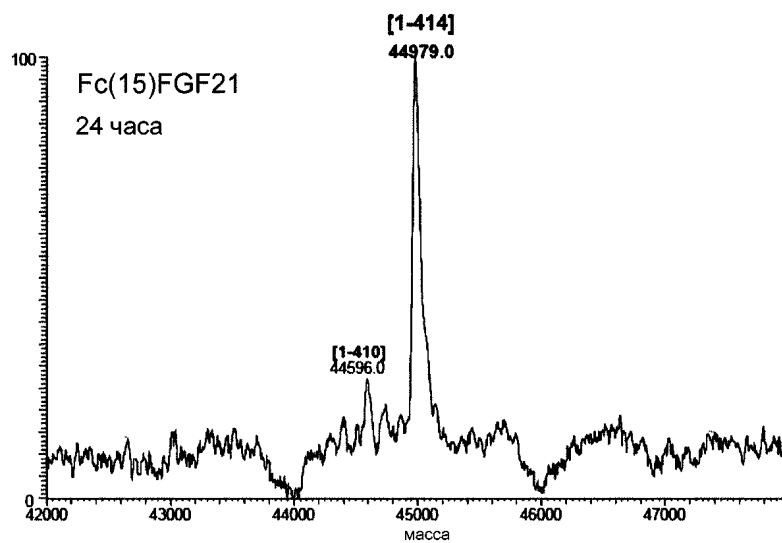
Фиг. 18



Фиг. 19А

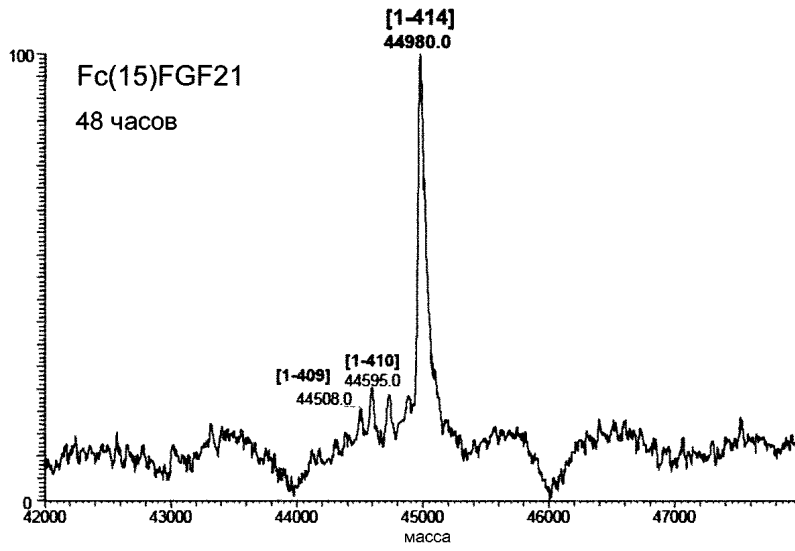


Фиг. 19В

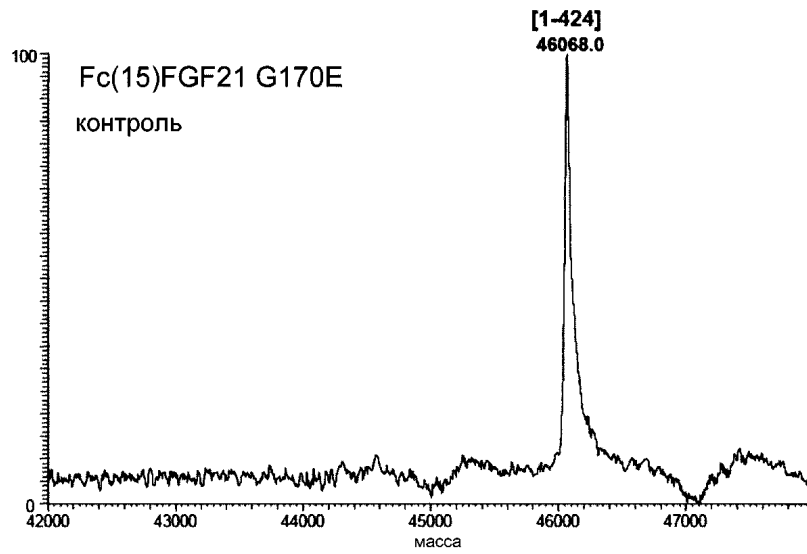


Фиг. 19С

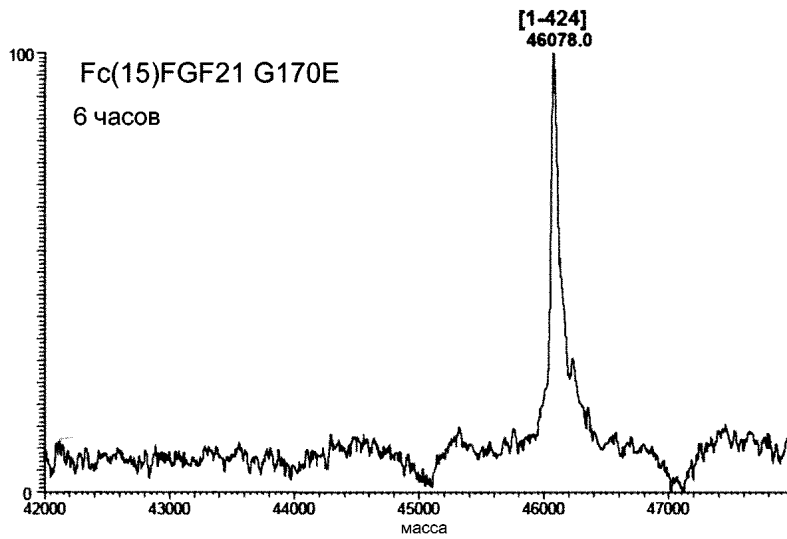
034847



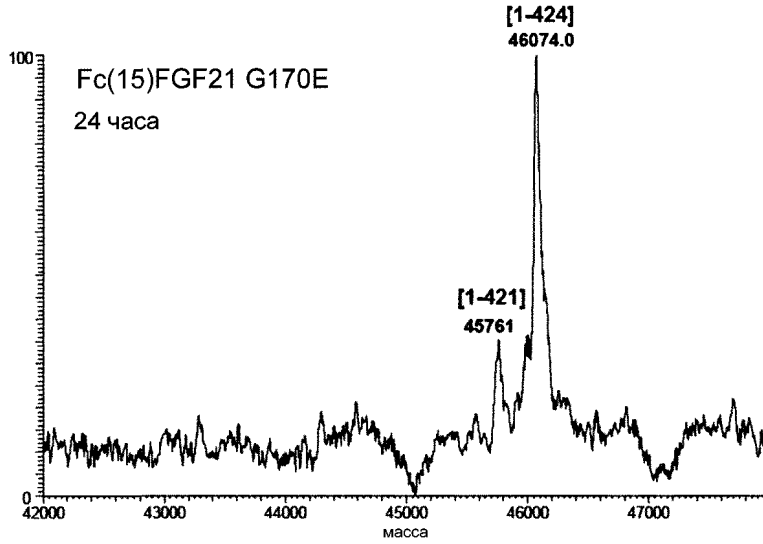
Фиг. 19D



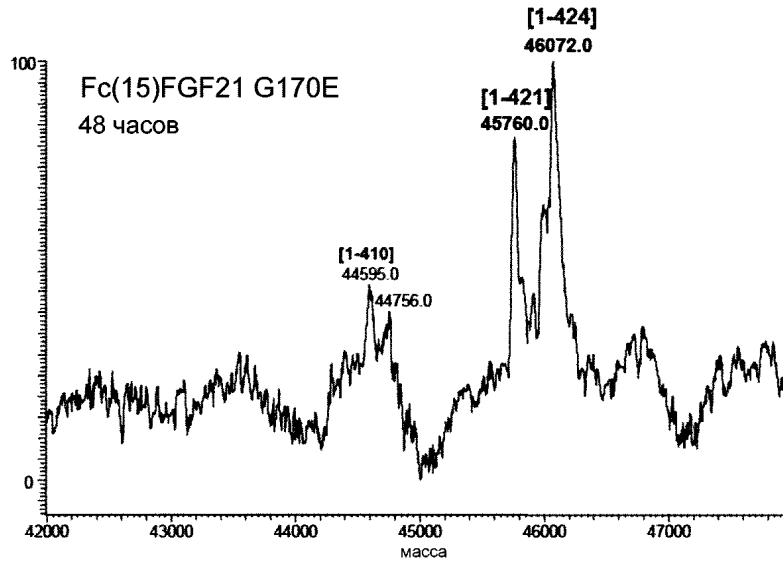
Фиг. 20А



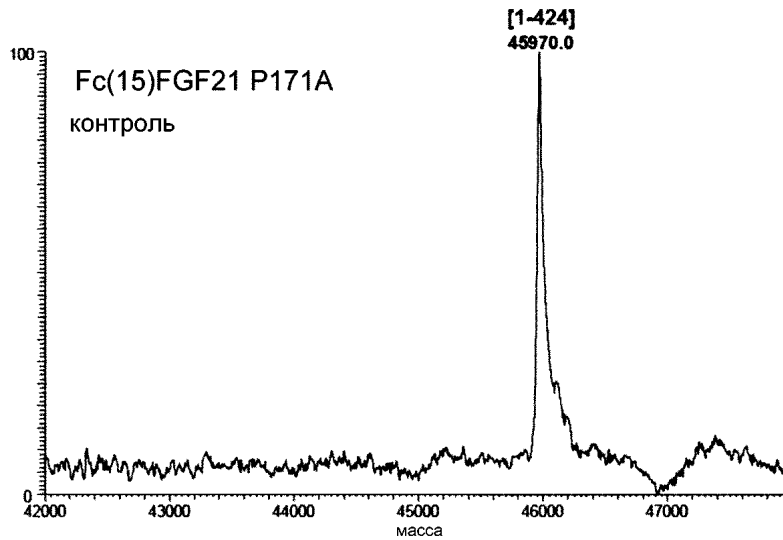
Фиг. 20В



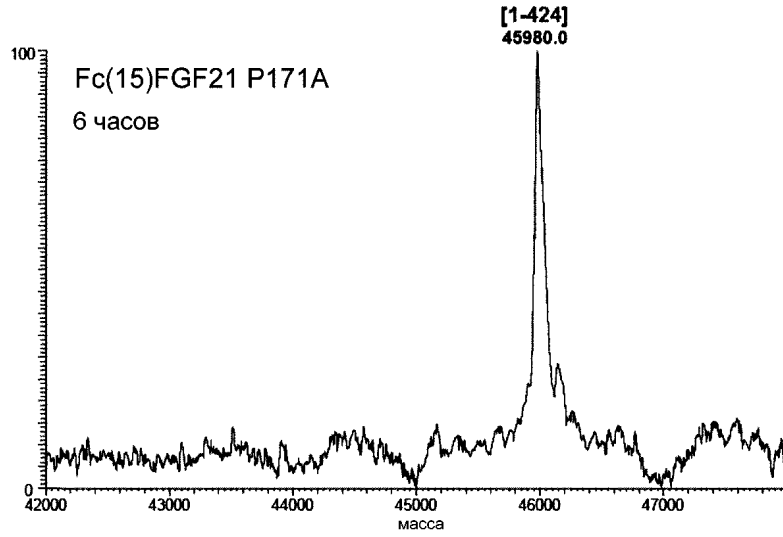
Фиг. 20С



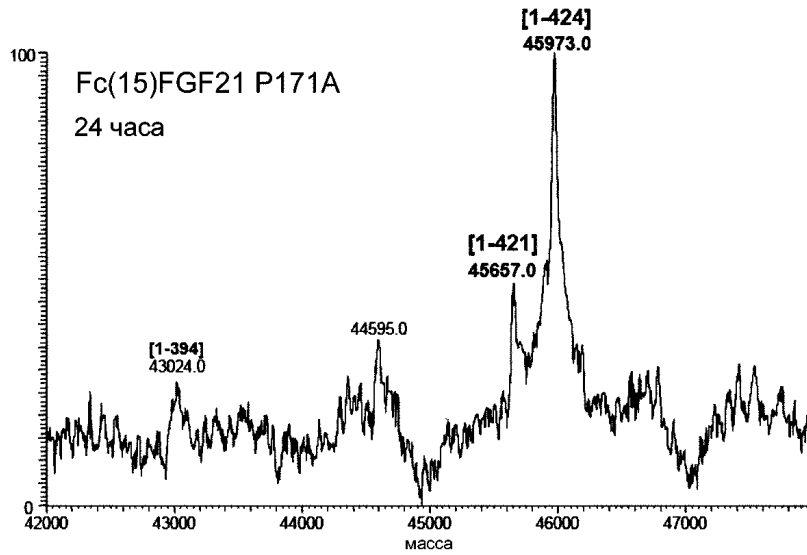
Фиг. 20D



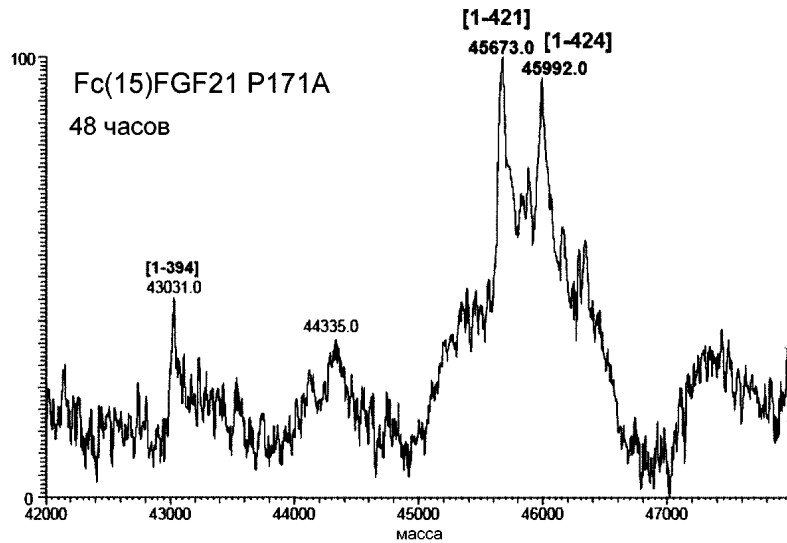
Фиг. 21А



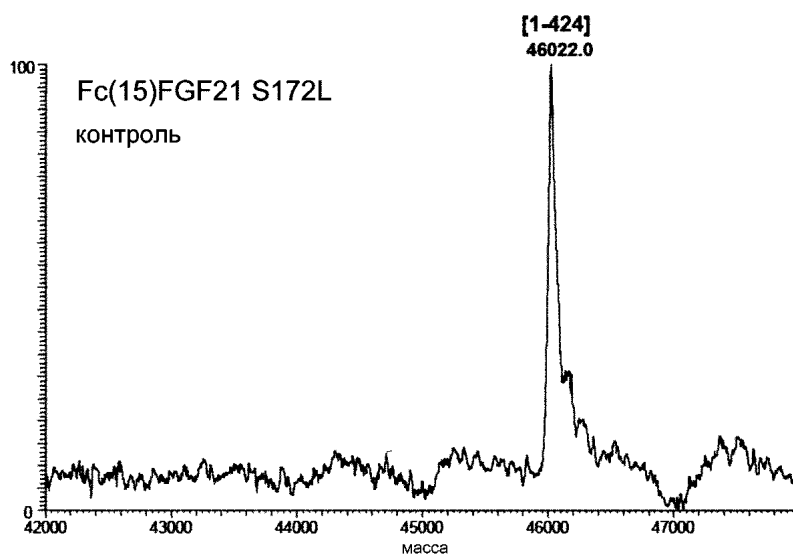
Фиг. 21В



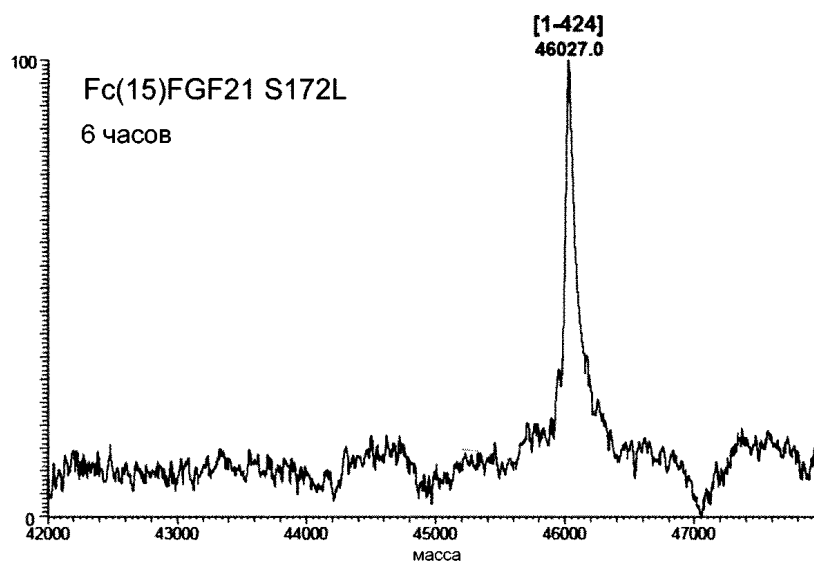
Фиг. 21С



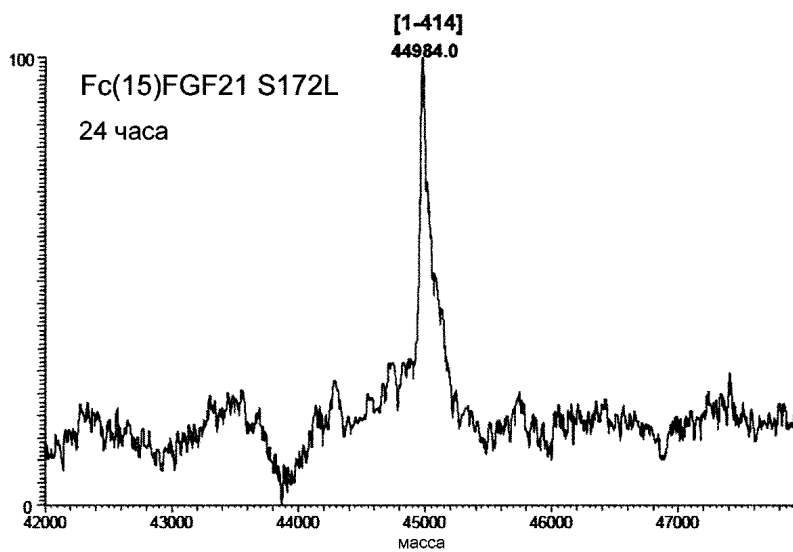
Фиг. 21D



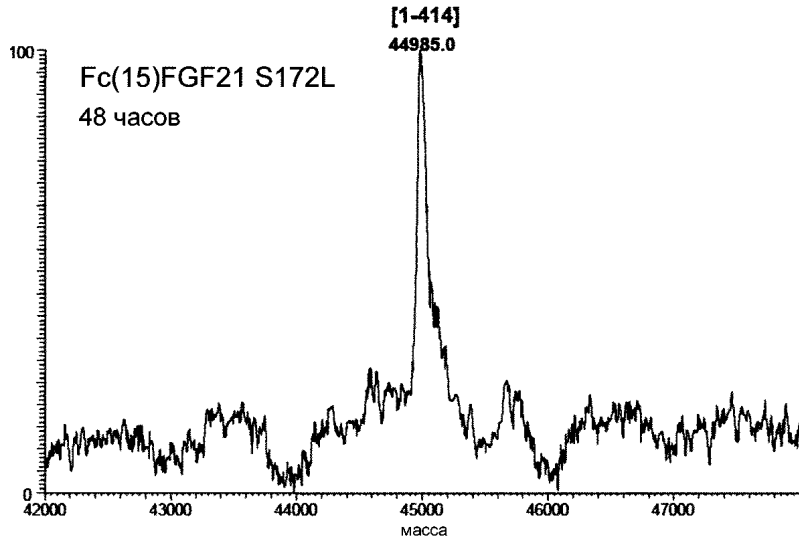
Фиг. 22А



Фиг. 22В



Фиг. 22С



Фиг. 22D

Fc(15)FGF21

MDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 KNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
 GSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
 REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD
 GALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
 APRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQ
 RSPSYAS

↑
 6 часов (20%)
 24 часа (100%) [1-414]
 48 часов (≈100%)

Фиг. 23A

Fc(15)FGF21 G170E

MDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 KNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
 GSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
 REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD
 GALYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
 APRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQ
 RSPSYAS

↙
 6 часов (0%)
 24 часа (20%) [1-421]
 48 часов (≈40%)

Фиг. 23B

Fc(15)FGF21 P171A

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
 GSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
 REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
 YGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
 APRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGASQ
 RSPSYAS

↑
 6 часов (0%)
 24 часа (≈30%) [1-421]
 48 часов (≈50%)

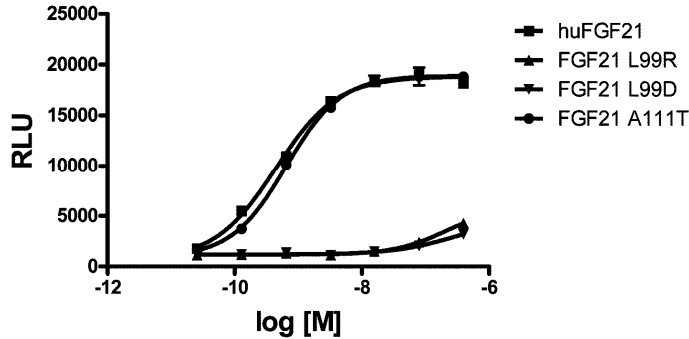
Фиг. 23С

Fc(15)FGF21 S172L

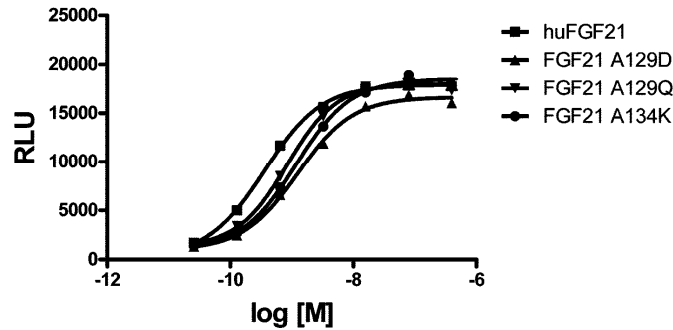
MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
 GSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
 REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
 YGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
 APRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPLQG
 RSPSYAS

↑
 6 часов (0%)
 24 часа (100%) [1-414]
 48 часов (100%)

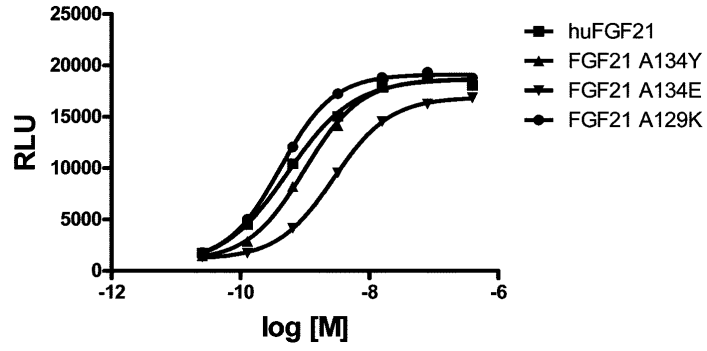
Фиг. 23D



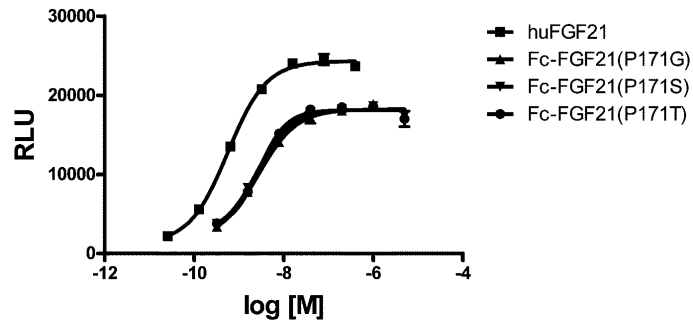
Фиг. 24А



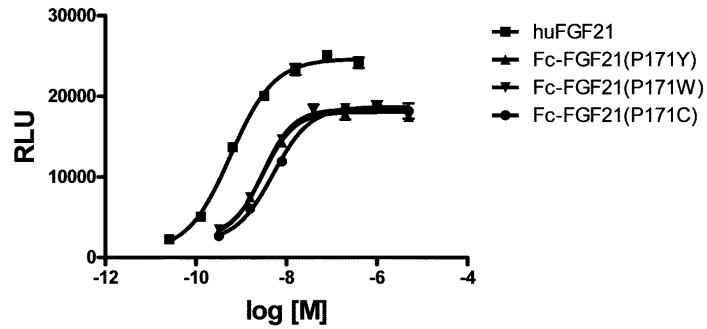
Фиг. 24В



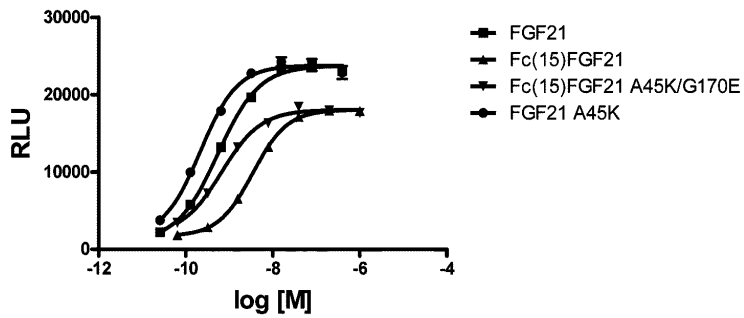
Фиг. 24С



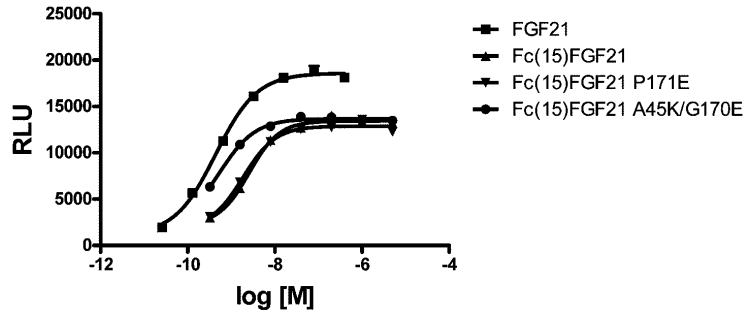
Фиг. 25А



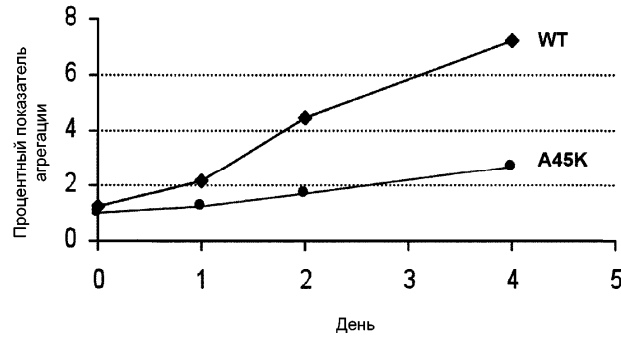
Фиг. 25В



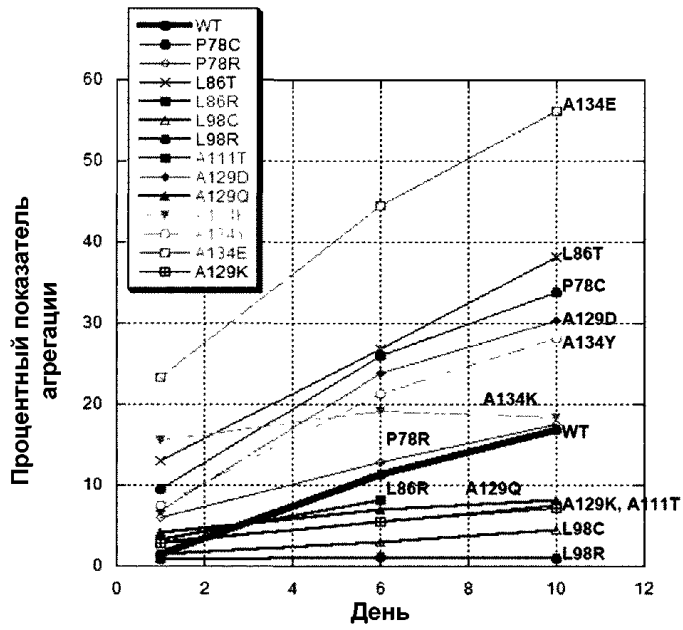
Фиг. 25С



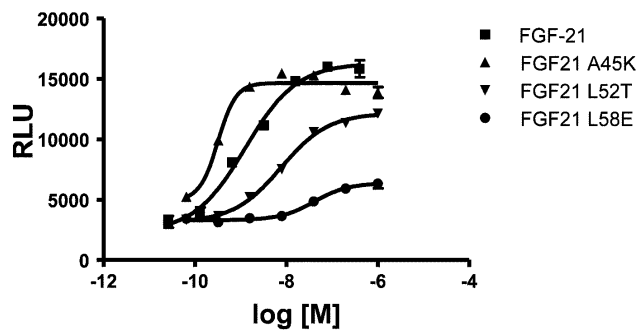
Фиг. 25D



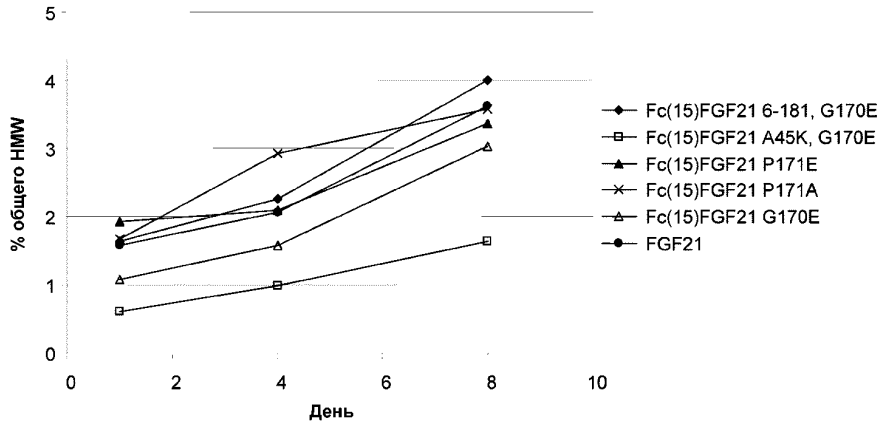
Фиг. 26A



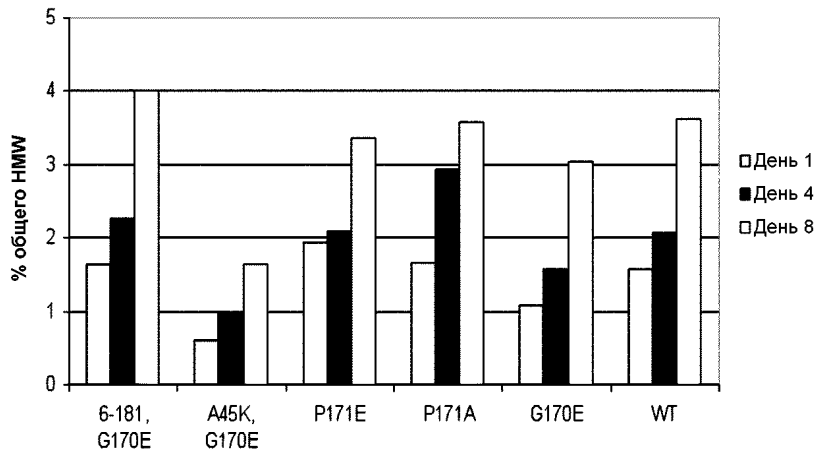
Фиг. 26B



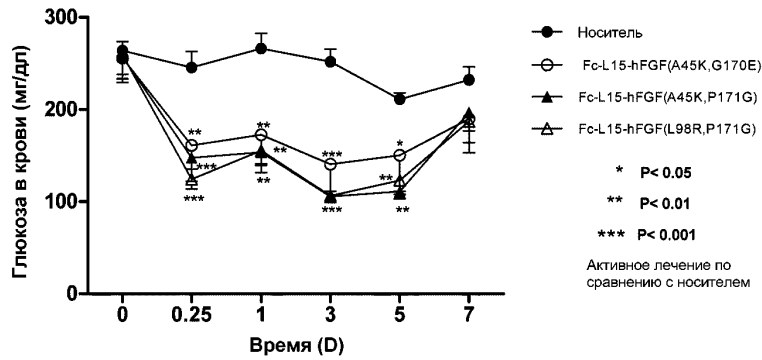
Фиг. 27



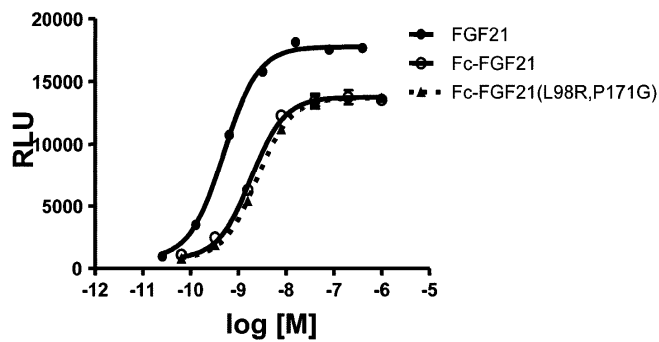
Фиг. 28А



Фиг. 28В

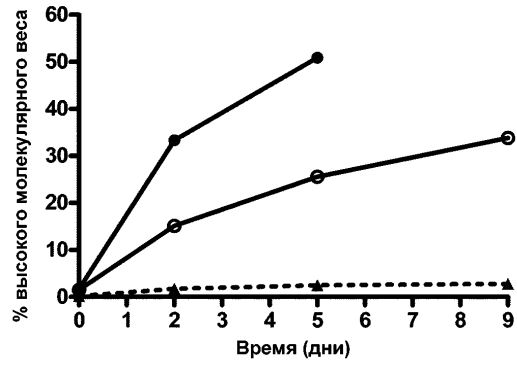


Фиг. 29

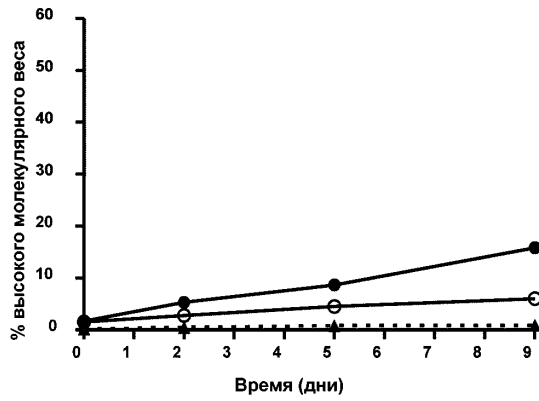


Фиг. 30

034847

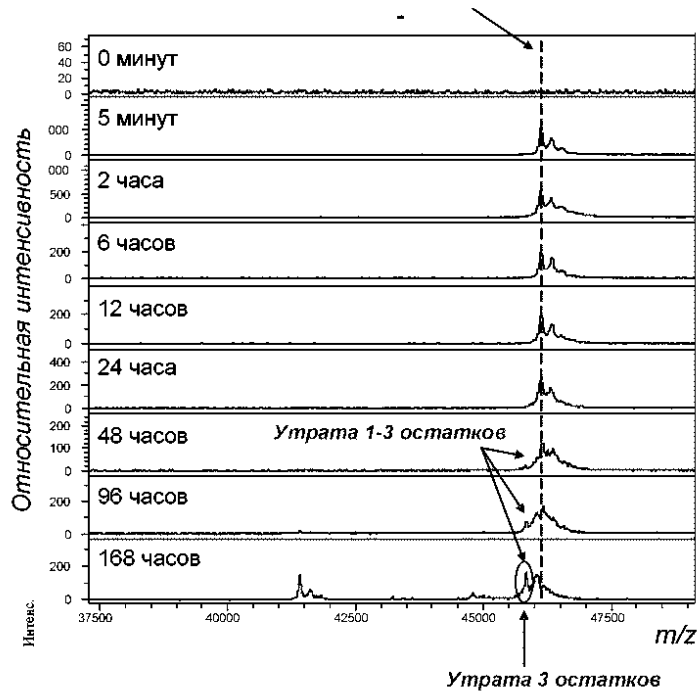


Фиг. 31А

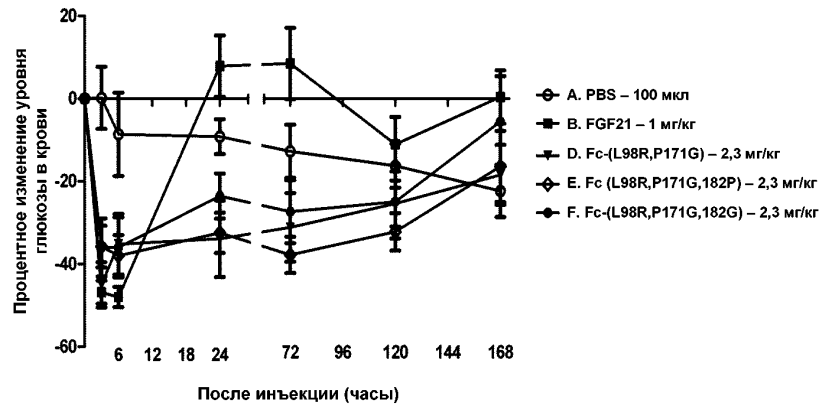


Фиг. 31В

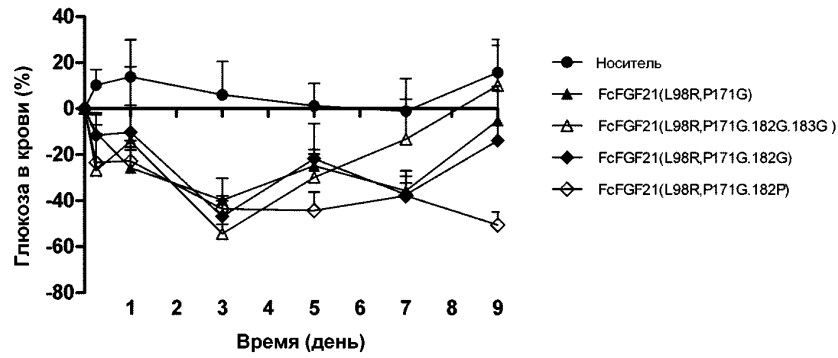
Fc-FGF21 L98R/P171G



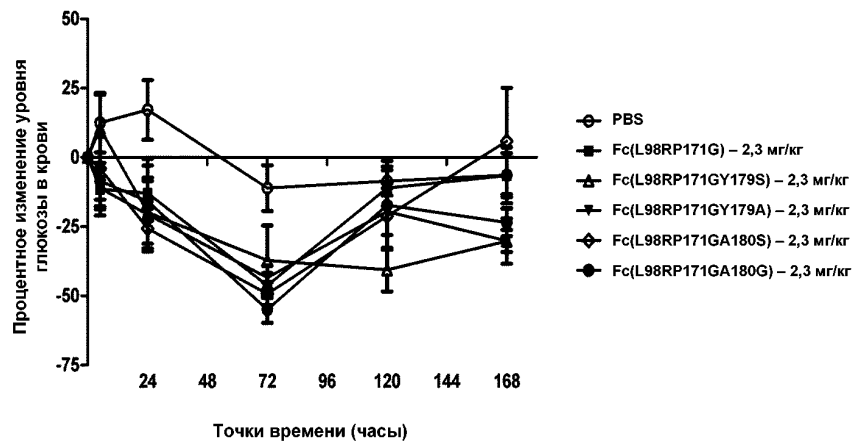
Фиг. 32



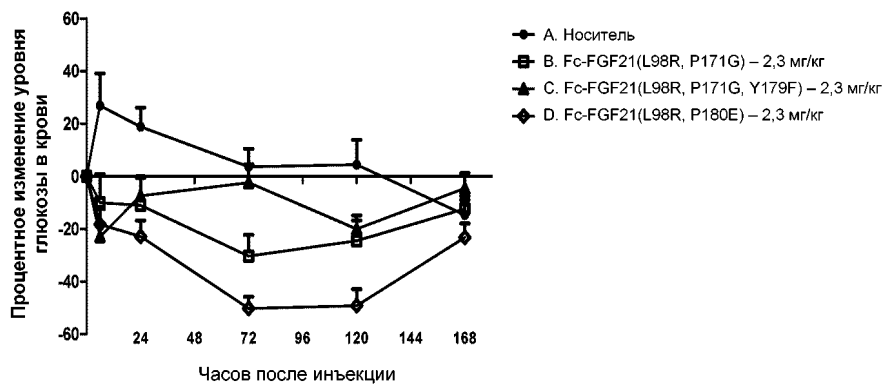
Фиг. 33



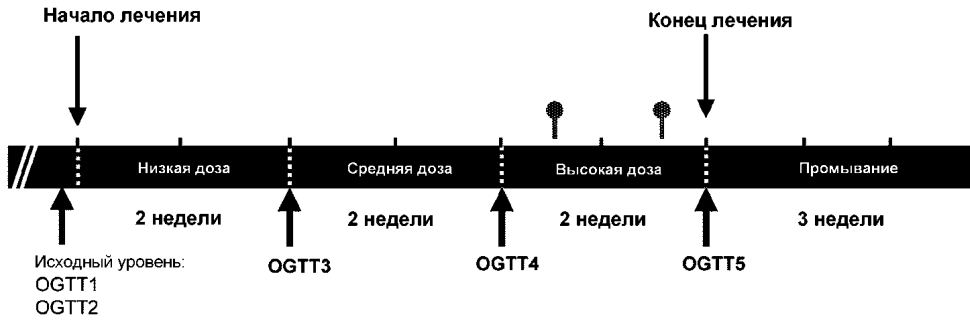
Фиг. 34



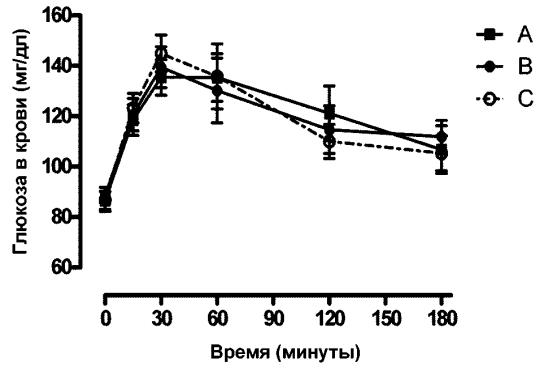
Фиг. 35



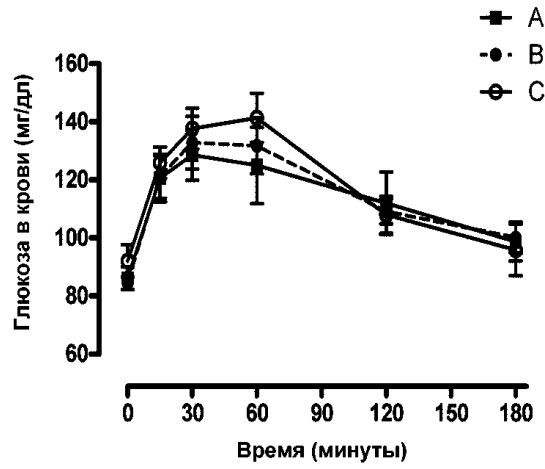
Фиг. 36



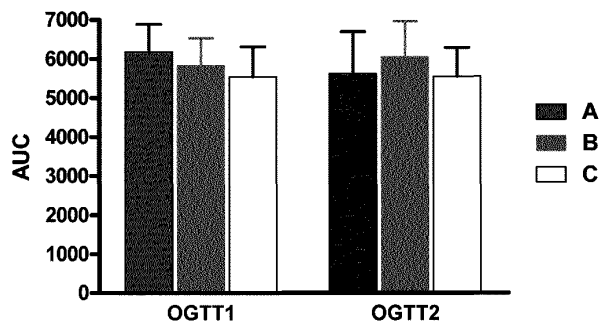
Фиг. 37



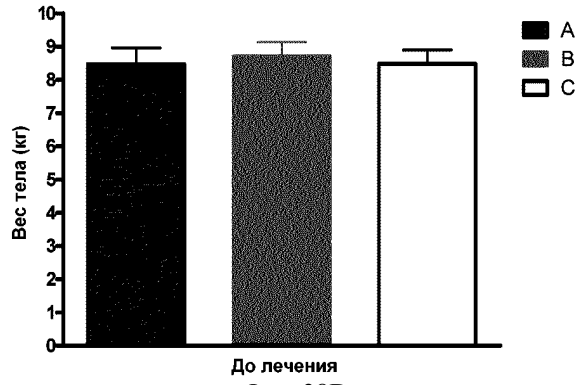
Фиг. 38А



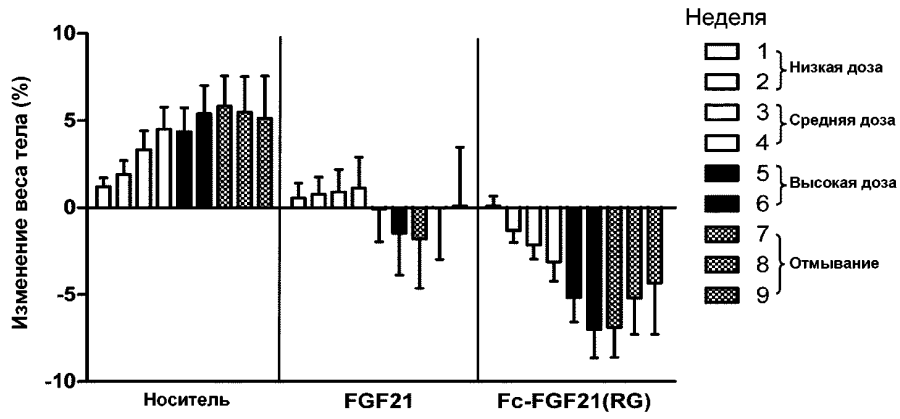
Фиг. 38В



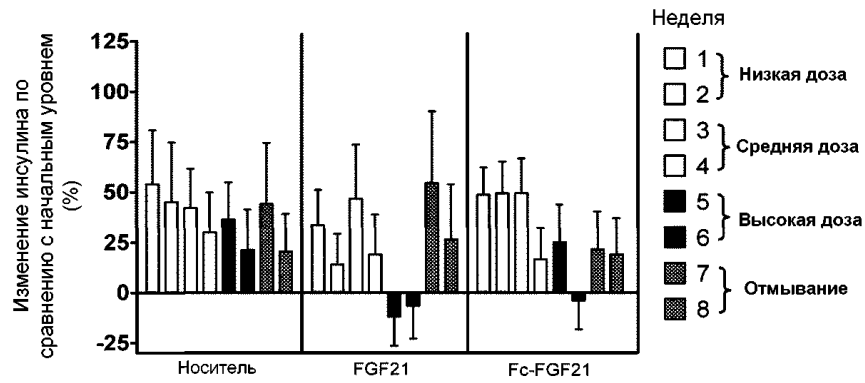
Фиг. 38С



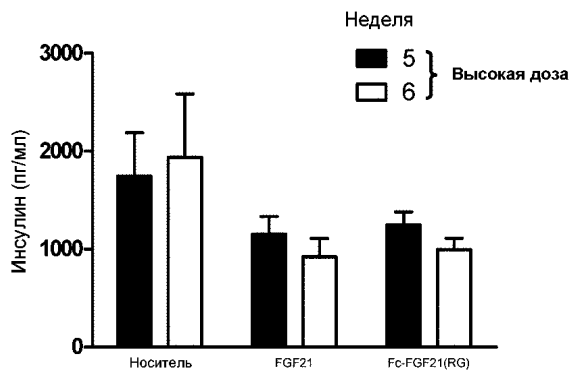
До лечения
Фиг. 38D



Фиг. 39

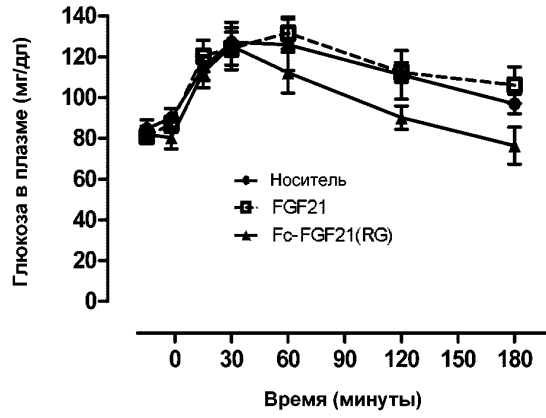


Фиг. 40

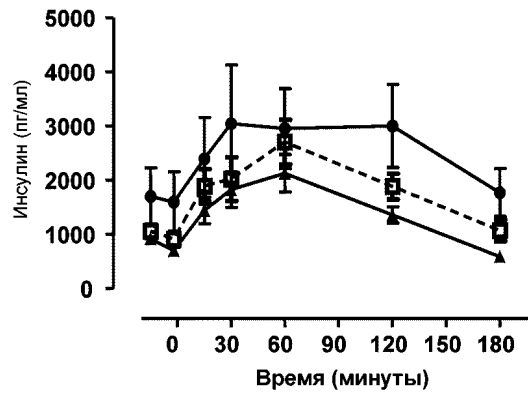


Фиг. 41

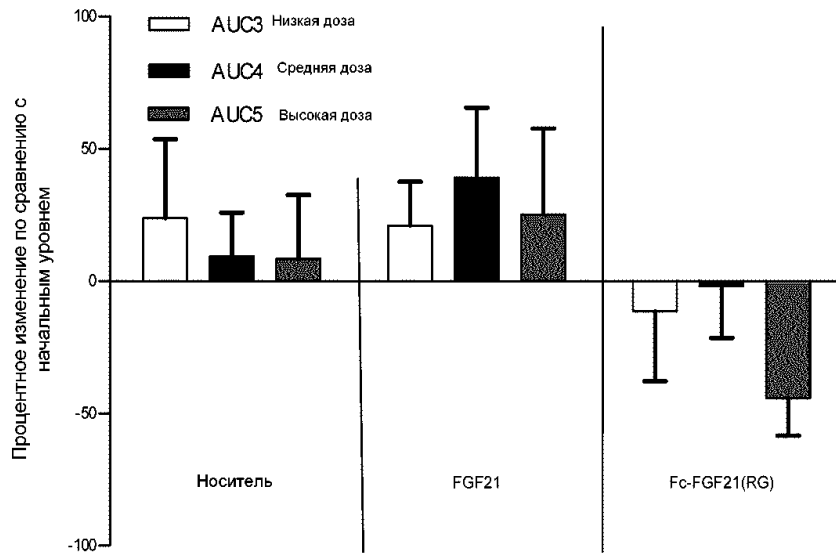
034847



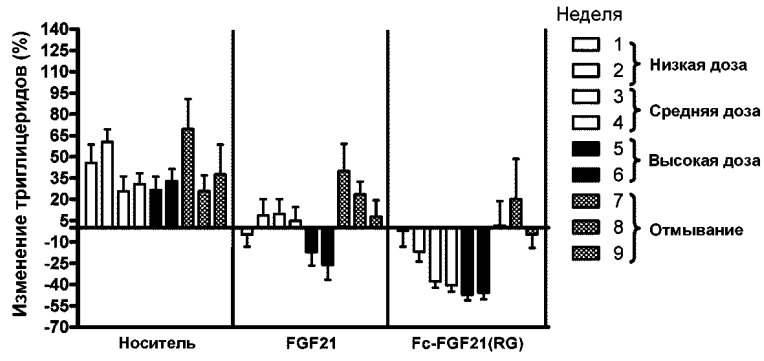
Фиг. 42



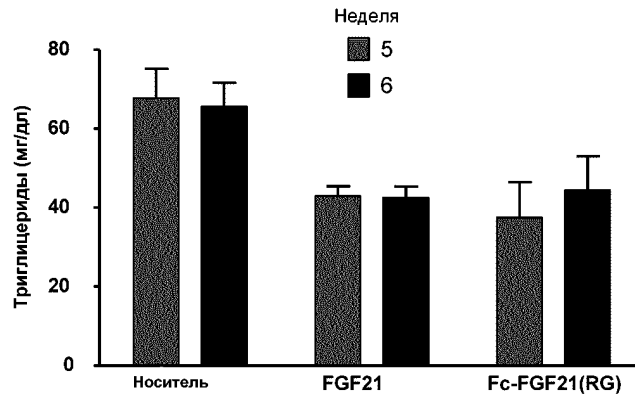
Фиг. 43



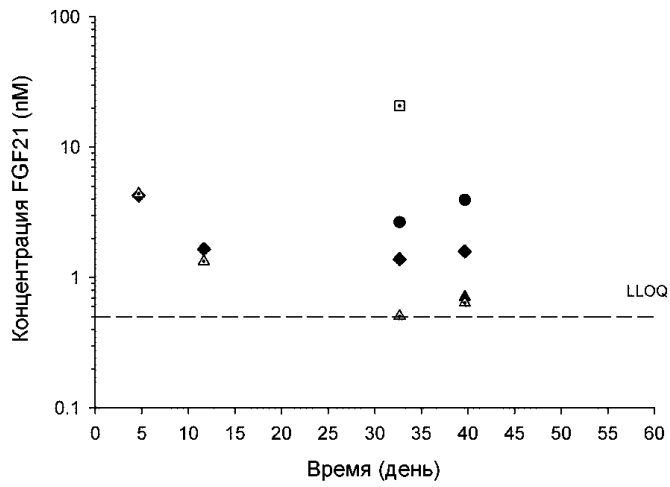
Фиг. 44



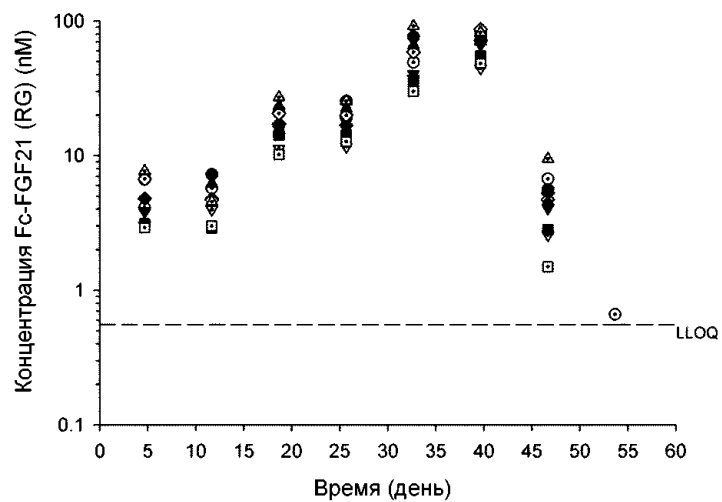
Фиг. 45



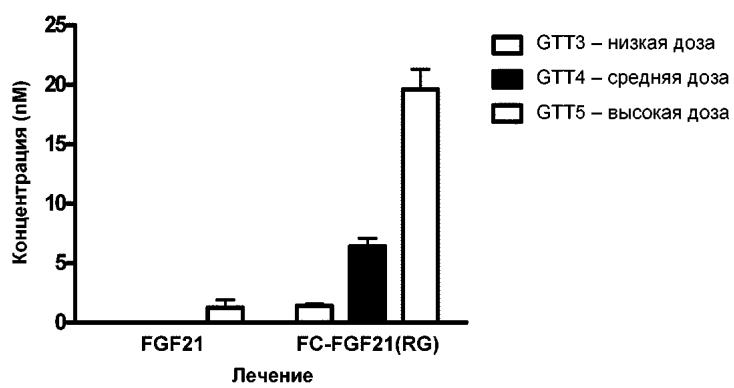
Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49

