

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037355

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.17

(21) Номер заявки
201690297

(22) Дата подачи заявки
2014.07.31

(51) Int. Cl. C07K 14/495 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И РОСТА 15 (GDF-15)

(31) 61/860,723

(32) 2013.07.31

(33) US

(43) 2016.06.30

(86) PCT/US2014/049254

(87) WO 2015/017710 2015.02.05

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

(56) WO-A1-9906445
WO-A1-2010048670
WO-A2-2006000448
WO-A2-2011064758
WO-A1-2013148117
WO-A1-2013113008

(72) Изобретатель:
Сюн Юймэй, Чжан И, Шэн Джкен Ц.,
Хамбургер Агнес Эва, Вениант-
Эллисон Мюриэль, Симамото
Грант, Минь Сяошань, Ван Чжулунь,
Тан Цзе, Каннан Гунасекаран, Мок
Марисса, Уолкер Кеннет (US)

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

(57) Предложены конструкции, содержащие GDF15 (фактор дифференцировки и роста 15) и мутанты GDF15. Согласно различным вариантам реализации изобретения конструкции, содержащие GDF15 и мутанты GDF15, могут найти применение при лечении или облегчении метаболического нарушения. Согласно различным вариантам реализации изобретения метаболическое заболевание или нарушение представляет собой диабет 2 типа, ожирение, дислипидемию, увеличенные уровни глюкозы, увеличенные уровни инсулина и диабетическую нефропатию.

B1

037355

037355

B1

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает Перечень последовательностей, поданный электронным способом в формате ASCII и включенный в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в ASCII, созданная 29 июля 2014, названа A-1850-WO-PCT_SL.txt, и ее размер составляет 630200 байт.

Область техники

Изобретение относится к мономерам и мультимерам, содержащим полипептид, который содержит область GDF15.

Уровень техники

Фактор дифференцировки и роста 15 (growth differentiation factor 15, GDF15) представляет собой нетипичный член суперсемейства TGF β . Его также называют ингибирующим макрофаги цитокином 1 (macrophage inhibitory cytokine 1, MIC1) (Bootcov M.R., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94:11514-9), плацентарным костным морфогенетическим фактором (placental bone morphogenetic factor, PLAB) (Hromas R., 1997, Biochim. Biophys. Acta. 1354:40-4), плацентарным трансформирующим фактором роста β (placental transforming growth factor beta, PTGFB) (Lawton L.N., 1997, Gene. 203:17-26), фактором, полученным из предстательной железы (prostate derived factor, PDF) (Paralkar V.M., 1998, J. Biol. Chem. 273:137 60-7) и геном, активируемым нестероидными противовоспалительными лекарственными препаратами (nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene, NAG-1) (Baek S.J., 2001, J. Biol. Chem. 276: 33384-92).

Ген GDF15 человека расположен на хромосоме 19p13.2-13.1; ген GDF15 крысы расположен на хромосоме 16; и ген GDF15 мыши расположен на хромосоме 8. Открытые рамки считывания GDF15 распространяются на два экзона (Bottner M., 1999, Gene. 237:105-11 и NCBI). Зрелый пептид GDF15 обладает низкой гомологией с другими членами семейства (Katoh M., 2006, Int. J. Mol. Med. 17:951-5).

GDF15 синтезируется в виде большого белка-предшественника, который расщепляется в двухосновном сайте расщепления с высвобождением карбокситерминального зрелого пептида.

Препропептиды GDF15 мыши и крысы содержат по 303 аминокислоты. Полноразмерный белок-предшественник человека содержит 308 аминокислот. Зрелые пептиды грызунов после процессинга по сайту расщепления RGRR (SEQ ID NO:1) содержат по 115 аминокислот. Зрелый пептид человека после процессинга по сайту расщепления RGRRRAR (SEQ ID NO:2) содержит 112 аминокислот. Сходство последовательности зрелого пептида GDF15 человека с последовательностями зрелого пептида GDF15 крысы и мыши составляет 66,1 и 68,1% (Bottner M., 1999, Gene. 237:105-11; Bauskin A.R., 2000, EMBO J. 19:2212-20; NCBI). В зрелом пептиде GDF15 отсутствует сайт гликозилирования.

Зрелый пептид GDF15 содержит семь консервативных остатков цистеина, необходимых для образования мотива "цистеиновый узел" (который содержит три внутрицепочечные дисульфидные связи) и одной межцепочечной дисульфидной связи, которые типичны для членов суперсемейства TGF β . Зрелый пептид GDF15 также содержит два дополнительных остатка цистеина, образующих четвертую внутрицепочечную дисульфидную связь. Биологически активный GDF15 представляет собой гомодимер зрелого пептида с молекулярной массой 25 кДа, ковалентно связанный одной межцепочечной дисульфидной связью.

Сообщалось, что уровни циркулирующего GDF15 увеличиваются при многих патологических и физиологических состояниях, в особенности при беременности (Moore A.G., 2000, J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 4781-4788), β -талассемии (Tanno T., 2007, Nat. Med. 13:1096-101; Zimmermann M.B., 2008 Am. J. Clin. Nutr. 88:1026-31) и врожденной дизэритропоэтической анемии (Tamaru H., 2008, Blood. 112:5241-4). В опубликованных сообщениях GDF15 также связывали с множеством биологических активностей. Исследования нокаута GDF15 и трансгенных мышей свидетельствуют, что GDF15 может защищать от повреждений сердца, вызванных ишемией/реперфузией или перегрузкой (Kempf T., 2006, Circ. Res.98:351-60; Xu J., 2006, Circ. Res. 98:342-50), защищать от связанной с возрастом утраты моторных и сенсорных нейронов (Strelau J., 2009, J. Neurosci. 29:13640-8), в умеренной степени защищать от метаболического ацидоза в почках, а также может вызывать истощение у пациентов, страдающих от рака (Johnen H., 2007 Nat Med. 11:1333-40). Несколько групп ученых также исследовали роль GDF15 в апоптозе и пролиферации клеток, в результате чего при применении различных культур клеток и ксенотрансплантатных моделей были получены противоречивые результаты. Исследования на трансгенных мышах показали, что GDF15 защищает от новообразований в кишечнике и легком, вызванных канцерогеном или мутацией *Apc* (Baek S.J., 2006, Gastroenterology. 131:1553-60; Cekanova M., 2009, Cancer Prev. Res. 2:450-8).

Краткое описание изобретения

В настоящей заявке предложены гибридные белки, содержащие полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 и Fc-домен.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Fc-домен содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO:16, 22, 28, 29, 33, 35, 38, 48, 85, 91, 106, 132, 141, 148, 155, 162, 169, 176, 183, 192, 199, 206, 213, 220, 227, 233, 236, 268, 275, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301 и 302. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 содер-

жит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO:4, 8, 12, 25, 52 и 55. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок также содержит полипептидный линкер. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептидный линкер содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO:18, 30, 34, 40, 58, 61, 64, 69, 72, 75, 78, 113, 116, 119, 122, 125, 128. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит два или более Fc-доменов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит два или более полипептидных линкеров. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 46, 24, 27, 32, 37, 20, 42, 50, 54, 57, 60, 63, 66, 68, 71, 74, 77, 82, 84, 88, 93, 96, 98, 100, 102, 104, 108, 134, 137, 139, 143, 146, 150, 153, 269, 272, 276, 279, 157, 160, 164, 167, 171, 174, 178, 181, 185, 188, 194, 197, 201, 204, 208, 211, 215, 218, 222, 225, 229, 232, 233, 238 и 240.

Также в настоящей заявке предложены димеры, содержащие (i) первую полипептидную цепь, которая содержит один из вышеупомянутых гибридных белков, и (ii) вторую полипептидную цепь, которая содержит Fc-домен. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения указанная конструкция также содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 16, 22, 28, 29, 33, 35, 38, 48, 85, 91, 106, 132, 141, 148, 155, 162, 169, 176, 183, 192, 199, 206, 213, 220, 227, 233, 236, 268, 275, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301 и 302.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены нековалентным образом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены ковалентным образом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи являются ковалентно связанными посредством дисульфидных связей между соответствующими Fc-доменами. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены посредством как ковалентных, так и нековалентных взаимодействий.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит: (a) два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:46; (b) два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:24; или (c) два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:27.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит (a) два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:32; или (b) два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:37.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:20, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:17.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:42, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:39; (b) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:50, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (c) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:54, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (d) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:57, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (e) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:60, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (f) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:63, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (g) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:66, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (h) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:68, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (i) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:71, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (j) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:74, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (k) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:77, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (l) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:80, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; (m) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:82, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47; или (n) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:84, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:47.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:88, и вторую

ную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:182; (е) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:194, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:191; (ф) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:197, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:191; (г) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:201, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:198; или (h) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:204, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:198.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит: (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:208, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:205; (б) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:211, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:205; (с) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:215, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:212; или (d) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:218, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:212.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит: (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:222, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:219; (б) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:225, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:219; (с) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:229, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:226; или (d) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:232, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:226.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит: (а) две полипептидные цепи, каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO:235; (б) две полипептидные цепи, каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO:238; или (с) две полипептидные цепи, каждая из которых содержит последовательность SEQ ID NO:240.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит (i) первый димер, содержащий один из вышеуказанных димеров, и (ii) второй димер, содержащий один из вышеуказанных димеров. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь первого димера связана с первой полипептидной цепью второго димера посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой димер, выбранный из группы, включающей DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(N3Q):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄Q)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(L351C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C), DhCpmFc(+)(S354C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(Y349C), CpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:CpmFc(+), Fc-(G₄S)₈-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15, Fc-(G₄S)₃-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15 и Fc-(G₄S)₅-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой димер, выбранный из группы, включающей DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(N3Q):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄Q)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(L351C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C) и DhCpmFc(+)(S354C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(Y349C).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридный белок представляет собой белок, выбранный из группы, включающей Fc-(G₄S)₈-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15, Fc-(G₄S)₃-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15 и Fc-(G₄S)₅-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой димер, выбранный из группы, включающей DhCpmFc(+)(L351C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C) и DhCpmFc(+)(S354C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(Y349C).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой: DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(N3Q):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄Q)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)(L351C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C), DhCpmFc(+)(S354C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(Y349C), CpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:CpmFc(+), Fc-(G₄S)₈-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15, Fc-(G₄S)₃-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15 или Fc-(G₄S)₅-Fc-GS

(G₄S)₄-GDF15.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(+), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(N3Q):DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)-(G₄Q)₄-GDF15:DhCpmFc(-), DhCpmFc(+)(L351C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C) или DhCpmFc(+)(S354C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(Y349C).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридный белок не представляет собой белок, выбранный из группы, включающей Fc-(G₄S)₈-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15, Fc-(G₄S)₃-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15 и Fc-(G₄S)₅-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридный белок не представляет собой белок, выбранный из группы, включающей DhCpmFc(+)(L351C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C) и DhCpmFc(+)(S354C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(Y349C).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(+). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15:DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(+). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(H6D):DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)-(G₄S)₄-GDF15(N3Q):DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)-GDF15:DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)-(G₄Q)₄-GDF15:DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)(L351C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой DhCpmFc(+)(S354C)-G₄-GDF15:DhCpmFc(-)(Y349C). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой CpmFc(-)-(G₄S)₄-GDF15:CpmFc(+). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой Fc-(G₄S)₈-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой Fc-(G₄S)₃-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер не представляет собой Fc-(G₄S)₅-Fc-GS(G₄S)₄-GDF15.

Также в настоящей заявке предложены гибридные белки, содержащие полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 и полипептид сывороточный альбумин человека (Human serum albumin, HSA). Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения последовательность полипептида HSA представляет собой последовательность SEQ ID NO:110. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO:4, 8, 12, 25, 52 и 55. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок также содержит полипептидный линкер, который соединяет полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 с полипептидом HSA. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептидный линкер содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO:18, 30, 34, 40, 58, 61, 64, 69, 72, 75, 78, 113, 116, 119, 122, 125, 128. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит два или более полипептидов HSA. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 115, 118, 121, 124, 127 и 130.

Также в настоящей заявке предложены димеры, содержащие (i) первую полипептидную цепь, которая содержит гибридный белок, содержащий первую область GDF15 и первый полипептид HSA, и (ii) вторую полипептидную цепь, которая содержит второй полипептид HSA. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь также содержит вторую область GDF15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гетеродимер (т.е. первая и вторая полипептидные цепи содержат различные последовательности). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гомодимер (т.е. первая и вторая полипептидные цепи содержат одинаковую последовательность). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 115, 118, 121, 124, 127 и 130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 115, 118, 121, 124, 127 и 130. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены нековалентным образом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пер-

вая и вторая полипептидные цепи соединены ковалентным образом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит вторую область GDF15, и первая и вторая полипептидные цепи соединены ковалентным образом посредством дисульфидных связей между соответствующими областями GDF15 данных цепей. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены посредством как ковалентных, так и нековалентных взаимодействий.

Также в настоящей заявке предложены димеры, содержащие (i) первую полипептидную цепь, которая содержит гибридный белок, содержащий первую область GDF15 и полипептид HSA, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую вторую область GDF15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 115, 118, 121, 124, 127 и 130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 4, 8, 12, 25, 52 и 55. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены нековалентным образом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены ковалентным образом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первая и вторая полипептидные цепи соединены посредством как ковалентных, так и нековалентных взаимодействий.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой графическое изображение, представляющее конструкцию "knob-hole" ("выступ-впадина"), содержащую димер, который состоит из двух гетеродимеров DhknobFc-(G₄S)₄-GDF15:DhholeFc;

фиг. 2 - графическое изображение, представляющее конструкцию DhMonoFc, содержащую димер, который состоит из двух гибридных белков DhMonoFc-(G₄S)₄-GDF15;

фиг. 3 - графическое изображение, представляющее конструкцию HemiFc, содержащую димер, который состоит из двух гибридных белков GGGFc-(G₄S)₄-Fc-S(G₄S)₄-GDF15;

фиг. 4 - графическое изображение, представляющее конструкцию "charged pair" ("заряженная пара", delHinge), содержащую димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(+);

фиг. 5 - графическое изображение, представляющее конструкцию "charged pair" ("заряженная пара", delHinge) "cysteine clamp" ("цистеиновый хомут"), содержащую димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(L351C)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(-)(L351C);

фиг. 6 - графическое изображение, представляющее конструкцию HSA (сывороточный альбумин человека), содержащую димер, состоящий из двух гибридных белков HSA-(G₄S)₄-GDF15;

фиг. 7 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhknobFc-G₄-GDF15:DhholeFc на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела (MT)) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 8 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка Fc-(G₄S)₄-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 9 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка Fc-(G₄S)₄-GDF15(H6D) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 10 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка Fc-(G₄S)₄-Fc-(G₄S)₄-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 11 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка DhFc-(G₄S)₅-DhFc-(G₄S)₄-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 12 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(+)-(1K)-GDF15:DhCpmFc(-) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 13 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)-GDF15:DhCpmFc(+) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 14 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 15 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг MT]);

фиг. 16 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зави-

GS(PAPAP)₂GS-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 38 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка HSA-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 39 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка HSA-GGNAEAAAKEAAAKEAAAKAGG-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 40 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка HSA-(G₄S)₆-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 41 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 42 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 43 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(S354C) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 44 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(S354C) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 45 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L351C) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 46 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L351C) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 47 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 48 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):CpmFc(+)(N297G) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 49 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(N297G) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 50 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+)(N297G) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 51 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(N297G)(S354C) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 52 - график, демонстрирующий влияние применения димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(-)(N297G)(S354C) на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 53 - график, демонстрирующий влияние применения димера гибридного белка DhMonoFc(N297G)-GDF15 на потребление пищи (грамм пищи/грамм массы тела) мышами ob/ob в зависимости от дозы (log [грамм конструкции/кг МТ]);

фиг. 54 - график массы тела (г) в зависимости от времени (дни после 1-й инъекции) при введении наполнителя, 0,1, 1 и 10 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+) и 0,1, 1 и 10 нмоль димера гетеродимера Dh3ComFc(-)-GDF15(Ndel3);

фиг. 55 - столбчатую диаграмму площади под кривой (AUC) для теста толерантности к глюкозе в неделю 2 введения (а) наполнителя (b) 10 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (c) 1 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (d) 0,1 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (e) 10 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+) (g) 1 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+) или (g) 0,1 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+);

фиг. 56 - столбчатую диаграмму уровня инсулина (нг/мл) (после приема пищи) в неделю 3 введения (а) наполнителя, (b) 10 нмоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (c) 1

ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (d) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (e) 10 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel):Dh3CpmFc(+);

фиг. 57 - столбчатую диаграмму уровня триглицеридов (мг/мл) (после приема пищи) в неделю 3 введения (a) наполнителя, (b) 10 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (c) 1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (d) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (e) 10 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel):Dh3CpmFc(+);

фиг. 58 - столбчатую диаграмму уровня холестерина (мг/мл) (после приема пищи) в неделю 3 введения (a) наполнителя, (b) 10 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (c) 1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (d) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (e) 10 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel):Dh3CpmFc(+);

фиг. 59 - столбчатую диаграмму площади под кривой (AUC) для теста толерантности к глюкозе в неделю 5 введения (a) наполнителя, (b) 10 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (c) 1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (d) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), (e) 10 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (g) 0,1 ммоль димера гетеродимера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel):Dh3CpmFc(+);

фиг. 60 - столбчатую диаграмму, демонстрирующую связывание, определенное методом ППР поверхностного плазмонного резонанса (ЕО, единицы ответа), в отношении FcγRI, FcγRIIA и FcγRIIA для (a) димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), (b) димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(S354C); (c) димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+); (d) димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(S354C); (e) димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+); и (f) димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+)(S354C) (слева направо в отношении каждого рецептора);

фиг. 61 - столбчатую диаграмму, демонстрирующую первую Tm (°C), определенную методом ДСК (дифференциальной сканирующей калориметрии), в отношении (a) (для пары столбцов, подписанных "N3D") димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), и димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+); (b) (для пары столбцов, подписанных "Ndel3") димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), и димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+); (c) (для пары столбцов, подписанных "N3D+CC") димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+)(S354C) и димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+)(S354C); и (d) (для пары столбцов, подписанных "Ndel3+CC") димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(S354C) и димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(S354C).

Подробное описание изобретения

В изобретении предложены гибридные белки, содержащие полипептид GDF15 или мутантные полипептиды GDF15, и конструкции, содержащие такие гибридные белки. Также предложено получение и применения раскрытых молекул, например, при лечении метаболического нарушения, такого как диабет 2 типа, увеличение уровней глюкозы, увеличение уровней инсулина, дислипидемия или ожирение. Полипептиды GDF15, мутантные полипептиды GDF15 и определенные полипептидные конструкции, содержащие полипептиды GDF15 и мутантные полипептиды GDF15, описаны в заявках того же заявителя РСТ/US2012/032415, поданной 5 апреля 2012, и РСТ/2013/023465, поданной 28 января 2013, которые явным образом включены посредством ссылки в настоящую заявку для любой цели.

Способы на основе рекомбинантных полипептидов и нуклеиновой кислоты, используемые в настоящей заявке, в том числе в примерах, в общем виде изложены в руководствах 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).

I. Общие определения.

Согласно концепции термины, приведенные в настоящей заявке в единственном числе, означают "один или несколько" перечисленных объектов, если конкретно не указано обратное.

В настоящей заявке термины "аминокислота" и "остаток" используются взаимозаменяемо и при использовании в контексте пептида или полипептида означают как существующие в природе, так и синтетические аминокислоты, а также аналоги аминокислот, миметики аминокислот и несуществующие в природе аминокислоты, которые с химической точки зрения являются подобными существующим в природе аминокислотам.

Термины "существующая в природе аминокислота" и "кодируемая в природе аминокислота" ис-

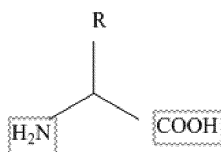
пользуются взаимозаменяемо и означают аминокислоту, которая кодируется генетическим кодом, а также аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, модифицированные после синтеза, например гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин.

"Аналог аминокислоты" представляет собой соединение, которое обладает такой же основной химической структурой, что и существующая в природе аминокислота, т.е. α -углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионин-метил-сульфоний. Такие аналоги могут содержать модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные скелеты, но сохраняют ту же основную химическую структуру, которой обладает существующая в природе аминокислота.

"Миметик аминокислоты" представляет собой химическое соединение, структура которого отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует способом, аналогичным способу функционирования существующей в природе аминокислоты. Примеры включают метакриолилное или акриолилное производное амида, β -, γ -, δ -иминокислоты (такие как пиперидин-4-карбоновая кислота) и подобные соединения.

Термины "несуществующая в природе аминокислота" и "некодируемая в природе аминокислота" используются взаимозаменяемо и означают соединение, которое обладает той же основной химической структурой, что и существующая в природе аминокислота, но которое не встраивается в растущую полипептидную цепь комплексом трансляции. Термин "несуществующая в природе аминокислота" также включает, но не ограничивается ими, аминокислоты, которые образуются в результате модификации (например, пост-трансляционных модификаций) кодируемой в природе аминокислоты (включая, но не ограничиваясь ими, 20 общепринятых аминокислот), но которые в природе сами по себе не встраиваются в растущую полипептидную цепь комплексом трансляции. Неограничивающий перечень примеров несуществующих в природе аминокислот, которые могут быть включены в последовательность полипептида или на которые может быть заменен остаток дикого типа в последовательности полипептида, включает β -аминокислоты, гомоаминокислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты с дериватизированными боковыми цепями. Примеры включают (в L-форме или D-форме; сокращенное название приведено в скобках): цитруллин (Cit), гомоцитруллин (hCit), N α -метилцитруллин (NMeCit), N α -метилгомоцитруллин (N α -MeHoCit), орнитин (Orn), N α -метилорнитин (N α -MeOrn или NMeOrn), саркозин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hQ), N α -метиларгинин (NMeR), N α -метиллейцин (Na-MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), N α -метилглутамин (NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновую кислоту (Oic), 3-(1-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (IgI), пара-иодфенилаланин (pI-Phe), пара-аминофенилаланин (4AmP или 4-Amino-Phe), 4-гуанидинофенилаланин (Guf), глициллизин (сокращенно называемый "K(N ϵ -глицил)" или "K(глицил)" или "K(gly)"), нитрофенилаланин (nitrophe), аминифенилаланин (aminophe или Amino-Phe), бензилфенилаланин (benzylphe), γ -карбоксиглутаминовую кислоту (γ -carboxyglu), гидроксипролин (hydroxypro), п-карбоксил-фенилаланин (Cpa), α -аминоадипиновую кислоту (Aad), N α -метилвалин (NMeVal), N- α -метиллейцин (NMeLeu), N α -метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклогексилглицин (Chg), ацетиларгинин (acetylarg), α,β -диаминопропионовую кислоту (Dpr), α,γ -диаминомасляную кислоту (Dab), диаминопропионовую кислоту (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метил-фенилаланин (MePhe), β,β -дифенил-аланин (BiPhA), аминомасляную кислоту (Abu), 4-фенил-фенилаланин (или бифенилаланин; 4Bip), α -амино-изомасляную кислоту (Aib), β -аланин, β -аминопропионовую кислоту, пиперидиновую кислоту, аминапроионовую кислоту, аминогептановую кислоту, аминопимелиновую кислоту, десмозин, диаминопимелиновую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гидроксизин, аллогидроксизин, изодесмозин, аллоизолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-метилвалин, 4-гидроксипролин (Hyp), γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, О-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксизин, ω -метиларгинин, 4-амино-О-фталевую кислоту (4APA), N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозиламинил-L-треонин, О-фосфотирозин и другие подобные аминокислоты и дериватизированные формы любой из перечисленных аминокислот.

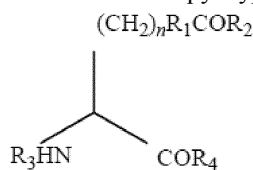
Также в определение "несуществующая в природе аминокислота" включена любая аминокислота, имеющая структуру



где R-группа представляет собой любой заместитель, отличный от заместителей, которые используются в двадцати природных аминокислотах.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения некодируемая в природе ами-

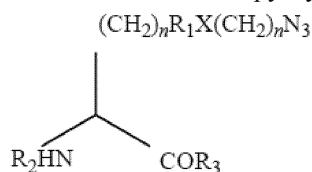
нокислота содержит карбонильную группу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неcodируемая в природе аминокислота имеет структуру



где n представляет собой 0-10; R₁ представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил; R₂ представляет собой H, алкил, арил, замещенный алкил и замещенный арил; R₃ представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую амино-конец, и R₄ представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую карбокси-конец.

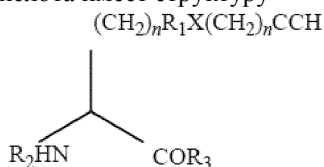
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неcodируемая в природе аминокислота содержит аминоокси-группу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неcodируемая в природе аминокислота содержит группу гидразида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неcodируемая в природе аминокислота содержит группу гидразина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток неcodируемой в природе аминокислоты содержит группу семикарбазида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток неcodируемой в природе аминокислоты содержит азидную группу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неcodируемая в природе аминокислота имеет структуру:



где n представляет собой 0-10; R₁ представляет собой алкил, арил, замещенный алкил, замещенный арил или отсутствует; X представляет собой O, N, S или отсутствует; m представляет собой 0-10; R₂ представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую амино-конец, и R₃ представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую карбокси-конец.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неcodируемая в природе аминокислота содержит алкинную группу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неcodируемая в природе аминокислота имеет структуру



где n представляет собой 0-10; R₁ представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил; X представляет собой O, N, S или отсутствует; m представляет собой 0-10, R₂ представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую амино-конец, и R₃ представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу, модифицирующую карбокси-конец.

Термин "замещенный" означает, что атом водорода в молекуле или группе заменен группой или атомом, который называют заместителем. Типичные заместители включают: галоген, C₁₋₈алкил, гидроксил, C₁₋₈алкокси, -NR^xR^x, нитро, циано, галоген- или пергалогенC₁₋₈алкил, C₂₋₈алкенил, C₂₋₈алкинил, -SR^x, -S(=O)₂R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)R^x, где каждый R^x представляет собой независимо водород или C₁₋₈алкил. Следует отметить, что, когда заместитель представляет собой -NR^xR^x, группы R^x могут быть объединены посредством атома азота с образованием кольца.

Термин "алкил" означает углеводород с неразветвленной или разветвленной цепью. Типичные примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, пентил и гексил. Типичные алкильные группы представляют собой алкильные группы, содержащие от 1 до 8 атомов углерода; такие группы широко представлены C₁₋₈алкилом.

Термин "алкокси" означает алкильную группу, присоединенную к атому кислорода. Типичные примеры алкокси-групп включают метокси, этокси, трет-бутокси, пропокси и изобутокси. Распространенные алкокси-группы представляют собой C₁₋₈алкокси.

Термин "галоген" означает хлор, фтор, бром или иод.

Термин "алкенил" означает углеводород с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащий одну или несколько двойных связей углерод-углерод. Типичные примеры алкенильных групп включают винил, пропенил, аллил, бутенил и 4-метилбутенил. Распространенные алкенильные группы представляют собой C₂₋₈алкенил.

Термин "алкинил" означает углеводород с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащий

одну или несколько тройных связей углерод-углерод. Типичные примеры алкинильных групп включают этинил, пропинил (пропаргил) и бутинил.

Распространенные алкинильные группы представляют собой C_{2-8} алкинил.

Термин "циклоалкил" означает циклический неароматический углеводород. Примеры циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклогептил.

Циклоалкильная группа может содержать одну или несколько двойных связей. Примеры циклоалкильных групп, содержащих двойные связи, включают циклопентенил, циклогексенил, циклогексадиенил и циклобутадиенил. Распространенные циклоалкильные группы представляют собой C_{3-8} циклоалкильные группы.

Термин "перфторалкил" означает алкильную группу, в которой все атомы водорода были замещены атомами фтора. Распространенные перфторалкильные группы представляют собой C_{1-8} перфторалкил. Пример распространенной перфторалкильной группы представляет собой $-CF_3$.

Термин "ацил" означает группу, полученную из органической кислоты путем удаления гидроксильной группы ($-OH$). Например, ацильная группа $CH_3C(=O)-$ образована в результате удаления гидроксильной группы из $CH_3C(=O)OH$.

Термин "арил" означает циклический ароматический углеводород. Примеры арильных групп включают фенил и нафтил. Распространенные арильные группы представляют собой от шести- до тринадцатичленные кольца.

Термин "гетероатом" в настоящей заявке означает атом кислорода, азота или серы.

Термин "гетероарил" означает циклический ароматический углеводород, в котором один или несколько атомов углерода арильной группы были замещены гетероатомом. Если гетероарильная группа содержит более одного гетероатома, гетероатомы могут быть одинаковыми или различными. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиримидинил, имидазолил, тиенил, фурил, пиазанил, пирролил, индолил, триазолил, пиридазинил, индазолил, пуринил, хинолизинил, изохинолил, хинолил, нафтиридинил, хиноксалинил, изотиазолил и бензо[*b*]тиенил. Распространенные гетероарильные группы представляют собой от пяти- до тринадцатичленные кольца, содержащие 1-4 гетероатома. Гетероарильные группы, которые представляют собой пяти- или шестичленные кольца, содержащие от 1 до 3 гетероатомов, являются особенно распространенными.

Термин "гетероциклоалкил" означает циклоалкильную группу, в которой один или несколько атомов углерода были замещены гетероатомом. Если гетероциклоалкильная группа содержит более одного гетероатома, гетероатомы могут быть одинаковыми или различными. Примеры гетероциклоалкильных групп включают тетрагидрофурил, морфолинил, пиперазинил, пиперидинил и пирролидинил. Гетероциклоалкильная группа может также содержать одну или несколько двойных связей, но не являться ароматической. Примеры гетероциклоалкильных групп, содержащих двойные связи, включают дигидрофуран. Распространенные гетероциклоалкильные группы представляют собой от трех- до десятичленные кольца, содержащие 1-4 гетероатома.

Гетероциклоалкильные группы, которые представляют собой пяти- или шестичленные кольца, содержащие 1-2 гетероатома, являются особенно распространенными.

Также следует отметить, что циклические кольцевые группы, т.е. арил, гетероарил, циклоалкил и гетероциклоалкил, могут содержать более одного кольца. Например, нафтильная группа представляет собой конденсированную бициклическую кольцевую систему. Также предполагается, что настоящее изобретение включает кольцевые группы, содержащие мостиковые атомы, или кольцевые группы, имеющие спиро-ориентацию.

Типичные примеры пяти- и шестичленных ароматических колец, необязательно содержащих один или два гетероатома, представляют собой фенил, фурил, тиенил, пирролил, оксазолил, тиазолил, имидазолил, пиазолил, изоксазолил, изотиазолил, пиридинил, пиридазинил, пиримидинил и пиазанил.

Типичные примеры частично насыщенных, полностью насыщенных или полностью ненасыщенных пяти-восьмичленных колец, необязательно содержащих один-три гетероатома, представляют собой циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклоактил и фенил. Дополнительные примеры пятичленных колец представляют собой фурил, тиенил, пирролил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, пирролидинил, 1,3-диоксоланил, оксазолил, тиазолил, имидазолил, 2Н-имидазолил, 2-имидазолинил, имидазолидинил, пиазолил, 2-пиазолинил, пиазолидинил, изоксазолил, изотиазолил, 1,2-дитиолил, 1,3-дитиолил, 3Н-1,2-оксатиолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 3Н-1,2,3-диоксазолил, 1,2,4-диоксазолил, 1,3,2-диоксазолил, 1,3,4-диоксазолил, 5Н-1,2,5-оксатиазолил и 1,3-оксатиолил.

Дополнительные примеры шестичленных колец представляют собой 2Н-пиранил, 4Н-пиранил, пиридинил, пиперидинил, 1,2-диоксинил, 1,3-диоксинил, 1,4-диоксанил, морфолинил, 1,4-дитианил, тиоморфолинил, пиндазинил, пиримидинил, пиазанил, пиперазинил, 1,3,5-триазирил, 1,2,4-триазирил, 1,2,3-триазирил, 1,3,5-тритианил, 4Н-1,2-оксазинил, 2Н-1,3-оксазинил, 6Н-1,3-оксазинил, 6Н-1,2-оксазинил, 1,4-оксазинил, 2Н-1,2-оксазинил, 4Н-1,4-оксазинил, 1,2,5-оксатиазинил, 1,4-оксазинил, о-изоксазинил, п-изоксазинил, 1,2,5-оксатиазинил, 1,2,6-(3-оксатиазинил), 1,4,2-оксадиазинил.

Дополнительные примеры семичленных колец представляют собой азепинил, оксепинил, тиепинил

и 1,2,4-триазепинил.

Дополнительные примеры восьмичленных колец представляют собой циклооктил, циклооктенил и циклооктадиенил.

Примеры бициклических колец, состоящих из двух конденсированных частично насыщенных, полностью насыщенных или полностью ненасыщенных пяти- и/или шестичленных колец, необязательно содержащих от одного до четырех гетероатомов, представляют собой индолизинил, индолил, изоиндолил, индолинил, цикlopента(б)пиридинил, пирано(3,4-б)пирролил, бензофурил, изобензофурил, бензо(б)тиенил, бензо(с)тиенил, 1Н-индазол, индоксазинил, бензоксазолил, антранилил, бензимидазолил, бензтиазолил, пуринил, хинолинил, изохинолинил, циннолинил, фталазинил, хиназолинил, хиноксалинил, 1,8-нафтиридинил, птеридинил, инденил, изоинденил, нафтил, тетралинил, декалинил, 2Н-1-бензопиранил, пиридо(3,4-б)пиридинил, пиридо(3,2-б)пиридинил, пиридо(4,3-б)-пиридинил, 2Н-1,3-бензоксазинил, 2Н-1,4-бензоксазинил, 1Н-2,3-бензоксазинил, 4Н-3,1-бензоксазинил, 2Н-1,2-бензоксазинил и 4Н-1,4-бензоксазинил.

Циклическая кольцевая группа может быть присоединена к другой группе более чем одним способом. Если конкретное расположение связей не указано, включены все возможные расположения. Например, термин "пиридил" включает 2-, 3- или 4-пиридил, и термин "тиенил" включает 2- или 3-тиенил.

Термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает одно- или двухцепочечный полимер оснований дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, считываемых от 5'-конца к 3'-концу (например, последовательность нуклеиновой кислоты GDF15, предложенная в настоящей заявке), или аналог указанного полимера, который был отделен по меньшей мере от приблизительно 50% полипептидов, пептидов, липидов, углеводов, полинуклеотидов или других веществ, с которыми данную нуклеиновую кислоту обнаруживают в природе, когда суммарную нуклеиновую кислоту выделяют из клеток источника. Предпочтительно выделенная молекула нуклеиновой кислоты по существу свободна от любых других загрязняющих молекул нуклеиновой кислоты или других молекул, которые обнаружены в природном окружении нуклеиновой кислоты, препятствующих ее применению для получения полипептида или применению в терапии, диагностике, профилактике или исследовании.

Термин "выделенный полипептид" означает полипептид (например, полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15, предложенные в настоящей заявке), который был отделен по меньшей мере от приблизительно 50% полипептидов, пептидов, липидов, углеводов, полинуклеотидов или других веществ, с которыми данный полипептид обнаруживают в природе, когда его выделяют из клеток источника. Предпочтительно выделенный полипептид по существу свободен от любых других загрязняющих полипептидов или других загрязняющих веществ, которые обнаружены в его природном окружении, препятствующих его применению в терапии, диагностике, профилактике или исследовании.

Термин "кодирующий" означает полинуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислот. Данный термин не требует наличия старт- или стоп-кодона. Аминокислотная последовательность может кодироваться в любой из различных рамок считывания, которые содержит полинуклеотидная последовательность.

Термины "идентичный" и процент "идентичности" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются аналогичными. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков среди аминокислот или нуклеотидов в сравниваемых молекулах; "процент идентичности" рассчитывают на основе размера наименьшей молекулы среди молекул, подвергаемых сравнению. Для данных расчетов с учетом пропусков ("gap") в выравниваниях (в случае наличия таковых) можно прибегнуть к конкретной математической модели или компьютерной программе (т.е. "алгоритму"). Способы, которые можно применять для расчета идентичности выровненных нуклеиновых кислот или полипептидов, включают способы, описанные в руководствах Computational Molecular Biology, (Lesk A.M., ed.), (1988) New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects (Smith D.W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin A.M., and Griffin H.G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje G. (1987) Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer (Gribskov M. and Devereux J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; и Carillo et al. (1988) SIAM J. Applied Math. 48:1073.

При расчете процента идентичности последовательности, подвергаемые сравнению, выравнивают таким способом, который обеспечивает максимальное совпадение последовательностей. Компьютерная программа, которую используют для определения процента идентичности, представляет собой пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al. (1984) Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). Компьютерный алгоритм GAP используют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых проводят определение процента идентичности последовательности. Последовательности выравнивают для максимального совпадения соответствующих аминокислот или нуклеотидов данных последовательностей ("сходного участка", который определяется алгоритмом). Вместе с алгоритмом используют штраф за введение пропуска ("gap opening penalty", который рассчитывают как умноженная на 3 средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднюю величину диагонали используемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет

собой балл или количественный показатель, назначаемый за каждое полное совпадение аминокислот в соответствии с конкретной матрицей сравнения) и штраф за удлинение пропуска ("gap extension penalty", который обычно составляет 1/10 долю от штрафа за введение пропуска), а также матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в данном алгоритме также используется стандартная матрица сравнения (см. публикацию Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5: 345-352 для матрицы сравнения PAM 250; публикацию Henikoff et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62).

Рекомендуемые параметры для определения процента идентичности полипептидной или нуклеотидной последовательности с применением программы GAP являются следующими:

алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-13;

матрица сравнения: BLOSUM 62 из Henikoff et al., 1992, выше;

штраф за пропуск в последовательности ("Gap Penalty"): 12 (штрафы за концевые пропуски отсутствуют);

штраф за длину пропуска ("Gap Length Penalty"): 4;

порог подобия ("Threshold of Similarity"): 0.

Определенные схемы выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей могут привести к совпадению только короткого участка двух последовательностей, и данный небольшой выровненный участок может обладать очень высокой идентичностью последовательности даже при отсутствии значительной взаимосвязи между двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, выбранный метод выравнивания (например, программа GAP) можно при необходимости откорректировать, чтобы обеспечить выравнивание, которое охватывает по меньшей мере 50 последовательных аминокислот целевого полипептида.

Термин "полипептид GDF15" означает существующий в природе GDF15 или GDF15 "дикого типа", который экспрессируется у млекопитающих, включая, без ограничения, человека, кролика, обезьяну (например, яванского макака), собаку, крысу, мышь или свинью. Согласно одному аспекту настоящего изобретения полипептид GDF15 означает любой полноразмерный GDF15, например SEQ ID NO:4, который состоит из 308 аминокислотных остатков и который кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3; любую форму, содержащую активный домен и продомены полипептида, например SEQ ID NO:8, которая состоит из 279 аминокислотных остатков и кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:7 и в которой 29 аминокислотных остатков на аминокислотном конце полноразмерного GDF15 (т.е. остатки, образующие сигнальный пептид) были удалены; и любую форму GDF15, содержащую активный домен, из которой были удалены продомен и сигнальная последовательность, например SEQ ID NO:12, которая состоит из 112 аминокислотных остатков и кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:11, из которой были удалены сигнальная последовательность и продомен. Полипептиды GDF15 могут содержать, но не обязательно содержат, аминокислотный метионин, который может быть введен генно-инженерным способом или в результате процесса экспрессии в бактерии.

Термин "мутантный полипептид GDF15" означает полипептид GDF15 (например, согласно SEQ ID NO:4, 8 или 12), который был модифицирован. Такие модификации включают, но не ограничены ими, замены одной или нескольких аминокислот, в том числе замены несуществующими в природе аминокислотами, несуществующими в природе аналогами аминокислот и миметиками аминокислот, делеции или добавления. Согласно одному аспекту настоящего изобретения термин "мутантный полипептид GDF15" означает полипептид GDF15, в котором по меньшей мере один остаток, который в норме присутствует в данном положении существующего в природе полипептида GDF15, был удален или замещен остатком, который в норме не присутствует в данном положении существующего в природе полипептида GDF15. В некоторых случаях необходимо заменить единичный остаток, который в норме присутствует в данном положении в последовательности существующего в природе полипептида GDF15, более чем одним остатком, который в норме не присутствует в данном положении; в других случаях может быть необходимо сохранить последовательность существующего в природе полипептида GDF15 и встроить один или несколько остатков в данное положение белка; в других случаях может быть необходимо удалить данный остаток полностью; все данные конструкции охватываются термином "мутантный полипептид GDF15".

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения мутантный полипептид GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% идентична существующему в природе полипептиду GDF15 (например, SEQ ID NO:4, 8 или 12). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения мутантный полипептид GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности существующего в природе полипептида GDF15 (например, SEQ ID NO:4, 8 или 12). Такие мутантные полипептиды GDF15 предпочтительно, но не обязательно, обладают по меньшей мере одной активностью существующего в природе полипептида GDF15, такой как способность уменьшать уровни глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови; способность уменьшать массу тела; способность улучшать толерантность к глюко-

зе, толерантность к липидам или чувствительность к инсулину; или способность уменьшать уровень глюкозы в моче и выведение белка.

Термин "область GDF15" охватывает полипептиды GDF15 и мутантные полипептиды GDF15 и последовательности, определенные выше.

Полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 являются предпочтительно биологически активными. В некоторых случаях для лечения или облегчения метаболического нарушения у субъекта применяют полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 вида или происходящий из вида, отличного от вида субъекта. В некоторых случаях для лечения или облегчения метаболического нарушения у субъекта применяют полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15 того же вида или происходящий из того же вида, что и субъект.

Термин "нативная Fc" означает молекулу или последовательность, содержащую последовательность, отличную от последовательности антиген-связывающего фрагмента, полученную в результате расщепления целого антитела, которая представлена в мономерной или мультимерной форме. Исходный иммуноглобулин - источник нативной Fc - предпочтительно получен из человека и может представлять собой любой иммуноглобулин, однако предпочтительными являются IgG1 и IgG2. Нативные Fc состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть объединены в димерные или мультимерные формы в результате ковалентного (т.е. посредством дисульфидных связей) и нековалентного связывания. Количество внутримолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами нативных молекул Fc варьирует от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA, IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2). Примером нативной Fc является связанный дисульфидной связью димер, полученный в результате расщепления IgG папаином (см. публикацию Ellison et al. (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9). Термин "нативная Fc" в настоящей заявке является общим для мономерной, димерной и мультимерной форм.

Термин "вариант Fc" означает молекулу или последовательность, которая является модифицированной относительно нативной Fc. Такие модификации включают, но не ограничены ими, замены одной или нескольких аминокислот, в том числе замены несуществующими в природе аминокислотами, несуществующими в природе аналогами аминокислот и миметиками аминокислот, делеции или добавления. Таким образом, термин "вариант Fc" включает молекулу или последовательность, которая представляет собой гуманизованную нативную Fc, отличную от Fc человека. Более того, нативная Fc содержит сайты, которые могут быть удалены, поскольку данные сайты отвечают за структурные свойства или биологическую активность, которые не требуются для гибридных молекул согласно настоящему изобретению. Таким образом, термин "вариант Fc" включает молекулу или последовательность, в которой отсутствуют один или несколько сайтов или остатков нативной Fc, влияющие на или вовлеченные в (1) образование дисульфидной связи, (2) несовместимость с избранной клеткой-хозяином (3) N-терминальную гетерогенность после экспрессии в избранной клетке-хозяине, (4) гликозилирование, (5) взаимодействие с компонентом, (6) связывание с Fc-рецептором, отличным от рецептора реутилизации, или (7) антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Варианты Fc описаны более подробно ниже. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения вариант Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% идентична нативной Fc. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения вариант Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нативной Fc.

Термин "Fc-домен" охватывает молекулы и последовательности нативной Fc и варианта Fc, как определено выше. Как и в случае вариантов Fc и нативных Fc, термин "Fc-домен" включает молекулы в мономерной или мультимерной форме.

Термин "мультимер" применительно к Fc-доменам или молекулам, содержащим Fc-домены, означает молекулы, содержащие две или более полипептидных цепей, соединенных ковалентным образом, нековалентным образом или посредством как ковалентных, так и нековалентных взаимодействий. Молекулы IgG, как правило, образуют димеры; IgM - пентамеры; IgD - димеры; и IgA момеры, димеры, тримеры или тетрамеры. Мультимеры могут быть получены путем использования последовательности и полученной в результате активности нативного Ig - источника Fc либо путем получения производных такой нативной Fc.

Термин "димер" применительно к Fc-доменам или молекулам, содержащим Fc-домены, означает молекулы, содержащие две полипептидные цепи, соединенные ковалентным образом, нековалентным образом или посредством как ковалентных, так и нековалентных взаимодействий.

Термин "шарнир" или "шарнирная область" в настоящей заявке включает подвижный полипептид, содержащий аминокислоты, расположенные между первым и вторым константными доменами антитела. "Шарнирная область" в настоящей заявке означает последовательность области, составляющей 6-62 аминокислоты в длину и присутствующей только в IgA, IgD и IgG, которая охватывает остатки цистеина, образующие мостики между двумя тяжелыми цепями.

"Полипептидный линкер" означает короткий полипептид, обычно составляющий от 1 до 30 аминокислотных остатков в длину, который ковалентным образом связывает два полипептида вместе, как пра-

вило, посредством пептидных связей.

В настоящей заявке термин "полипептид HSA" охватывает существующий в природе сывороточный альбумин человека "дикого типа". Данный термин также включает различные биологически активные фрагменты и варианты, гибридные белки и модифицированные формы белка HSA дикого типа. Такие биологически активные фрагменты или варианты, гибридные белки и модифицированные формы белка HSA дикого типа содержат по меньшей мере часть аминокислотной последовательности, обладающей значительной идентичностью последовательности белка HSA дикого типа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения такие биологически активные фрагменты или варианты, гибридные белки и модифицированные формы белка HSA дикого типа содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 85% идентичную последовательности дикого типа HSA. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения такие биологически активные фрагменты или варианты, гибридные белки и модифицированные формы белка HSA дикого типа содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности HSA дикого типа.

II. Fc-слияния, содержащие полипептиды GDF15 или мутантные полипептиды GDF15, а также полинуклеотиды.

В настоящей заявке предложен ряд белков, гибридных с Fc, содержащих полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридные белки содержат нативную Fc. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридные белки содержат Fc-домен, который был сконструирован.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения Fc-гибридные белки, содержащие полипептид GDF15 (или мутантный полипептид GDF15), связаны с другой полипептидной цепью, состоящей из или содержащей Fc-домен, с образованием гетеродимера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения два таких гетеродимера объединяются с образованием гетеротетрамера. Некоторые из данных полипептидных конструкций (т.е. Fc-гибридные белки, содержащие полипептид GDF15 (или мутантный полипептид GDF15), и мультимеры, содержащие один или несколько таких Fc-гибридных белков, содержащих полипептид GDF15 (или мутантный полипептид GDF15)) исследовали эмпирическим способом, как описано в примерах, представленных в настоящей заявке ниже.

Антитела относятся к классу белков иммуноглобулинов, который включает IgG, IgA, IgE, IgM и IgD. Наиболее многочисленным классом иммуноглобулинов в сыворотке человека является IgG (Deisenhofer J. 1981, Biochem. 20:2361-2370; Huber R. 1984, Behring Inst. Mitt. 76:1-14; Roux K.H. 1999, Int. Arch. Allergy Immunol. 120:85-99). Структура IgG включает четыре цепи, две легкие и две тяжелые цепи; каждая легкая цепь содержит по два домена, и каждая тяжелая цепь содержит по четыре домена. Антиген-связывающий сайт расположен в Fab-доме (fragment antigen binding, антиген-связывающий фрагмент), который содержит вариабельный домен легкой (VL) и вариабельный домен тяжелой (VH) цепи, а также константный домен легкой (LC) и константный домен тяжелой (CH1) цепи. Область доменов CH2 и CH3 тяжелой цепи называют Fc (fragment crystallizable, кристаллизуемый фрагмент). Молекулу IgG можно рассматривать как гетеротетрамер, содержащий две тяжелые цепи, которые поддерживаются вместе дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области, и две легкие цепи. Количество дисульфидных связей в шарнирной области среди подклассов иммуноглобулинов варьирует (Papadea C., 1989, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 27:27-58). Сайт связывания FcRn расположен в Fc-доме антитела (Martin W.L., 2001, Mol. Cell 7:867-877), и, таким образом, свойство увеличенного периода полужизни антитела в сыворотке обеспечивается Fc-фрагментом. Fc-домен сам по себе можно рассматривать в качестве гомодимера, который состоит из тяжелых цепей, содержащих домены CH2 и CH3.

Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения гибридные белки, описанные в настоящей заявке, содержат Fc-домен IgG, полученный из Fc-домена IgG человека дикого типа. Под Fc IgG человека "дикого типа" подразумевают последовательность аминокислот, которая в природе присутствует в популяции человека. Разумеется, поскольку последовательности Fc могут незначительно варьировать среди индивидуумов, в последовательности дикого типа могут быть введены одно или несколько изменений, и данная последовательность все еще будет относиться к объекту настоящего изобретения. Например, Fc-домен может содержать дополнительные изменения, не связанные с настоящим изобретением, такие как мутация в сайте гликозилирования или встраивание неприродной аминокислоты. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий CH3-область, представляет собой молекулу IgG и также содержит CH1- и CH2-домен. Примеры последовательностей IgG человека включают константные области IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Fc-домен также может содержаться в константной области тяжелой цепи IgA, IgD, IgE и IgM.

Некоторые Fc-гибридные белки, содержащие полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF15, и мультимеры, содержащие такие Fc-гибридные белки, включают описанные ниже.

II.A. Конструкции DhMonoFc.

Определения "Моно-" или "MonoFc-домен" в настоящем изобретении означают Fc-домен, который был сконструирован для уменьшения или предотвращения образования гомодимеров. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения MonoFc-домен получают посредством введения мутации

тирозина на треонин (Y349T) и мутаций двух лизинов на аспарагиновую кислоту (K392D и K409D) в нативной Fc или варианте Fc.

С-терминальный лизин (K447) в MonoFc может быть необязательно удален. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным с С-концом для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Предложен гибридный белок, содержащий MonoFc-домен и область GDF15. Как правило, N-конец области GDF15 соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом MonoFc-домена. Однако согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец MonoFc-домена соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом области GDF15.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гомодимер. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гетеродимер.

Определения "DhMonoFc-" или "DhMonoFc-домен" в настоящем изобретении означают Fc-домен, из которого была удалена шарнирная область целиком либо ее часть и который был сконструирован для уменьшения или предотвращения образования гомодимеров. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен DhMonoFc-домен, в котором была введена мутация тирозина на треонин (Y349T) и мутации двух лизинов на аспарагиновую кислоту (K392D и K409D) в нативной Fc или варианте Fc, из которых была удалена шарнирная область целиком либо ее часть.

С-терминальный лизин (K447) в DhMonoFc может быть необязательно удален. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным на С-конце, для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Предложен гибридный белок, содержащий DhMonoFc-домен и область GDF15. Как правило, N-конец области GDF15 соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом DhMonoFc-домена. Однако согласно некоторым вариантам реализации изобретения N-конец DhMonoFc-домена соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом области GDF15.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гомодимер. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гетеродимер.

II.A.1. DhMonoFc-GDF15.

Определение "MonoFc-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, N-конец которого соединен напрямую с С-концом MonoFc-домена.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

(a) два MonoFc-домена (в каждом мономере), содержащие последовательность
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVTTTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:22),

и (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащие последовательность SEQ ID NO:12.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVTTTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGARNGDHCPLGPGRCCRLHTRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:46),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

```
gcacctgaactcctgggggaccgtcagtccttcttcccc
caaaacccaaggacacccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgc
gtggtgtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagc
agtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccct
cccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
aaccacaggtgaccacccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaac
caggtcagcctgacctgctgtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
cgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacgacaccacgc
ctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcacc
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtgcgcgcaacggagaccactgtccgctcgggcccggggtgtgtgc
cgtctgcacacggctccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccattg
ggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgccc
cgagccagttccggcggaacatgcacgcgagatcaagacgagcctg
caccgcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcag
ctacaatcccatggtgtcattcaaaagaccgacaccggggtgtcgtcc
agacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:45).
```

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:46.

II.A.2. DhMonoFc-(G₄S)₄-GDF15.

Определение "DhMonoFc-(G₄S)₄-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, связанный с DhMonoFc-доменом посредством полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:18 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом DhMonoFc-домена.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гомодимер содержит:

- (a) два DhMonoFc-домена (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:22;
- (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и
- (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность

GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:18),

причем каждый линкер соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом DhMonoFc-домена.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

```
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVQLQDWLNKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGR
CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTS
LHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID
```

NO:24),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

cacctgaactcctgggggacggtcagtccttcttccccccaaaaccc
aaggacacccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggt
ggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg
gcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacaac
agcaggtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct
gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccc
ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag
gtgaccacccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcag
cctgacctgctgtgtaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
gggagagcaatgggcagccggagaaactacgacaccacgcctcccgtg
ctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaa
gagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgga
ggtggtggatccggaggcggtggaagcggaggtggtggatctggaggcgg
tggaagcgcgcgcaacggagaccactgtccgctcgggccggcggttgc
gccgtctgcacacggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggccgat
tgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgcgtg
cccgagccagttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcc
tgcaccgcctgaagcccgcacggtgccagcgcctgctgctgcccgc
agctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgctgct
ccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID

NO:23) .

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:24.

II.A.3. DhMonoFc-(G₄S)₄-GDF15 (H6D).

Определение "DhMonoFc-(G₄S)₄-GDF15(H6D)" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с DhMonoFc-доменом посредством полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:18 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом DhMonoFc-домена. Вариант GDF15(H6D) представляет собой существующий в природе вариант GDF15 человека.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гомодимер содержит:

(a) два DhMonoFc-домена (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:22;

(b) два полипептида GDF15(H6D) (в каждом мономере), содержащих последовательность

ARNGDDCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPS

QFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQT

YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:25),

и (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:18, каждый из которых связывает N-конец полипептида GDF15 с С-концом DhMonoFc-домена.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHE

ALHNNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDDCPLGPGRC

CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTS

LHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID

NO:27),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagaca
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggcagccccgagaaccaca
 ggtgaccaccctgcccccatcccggaggagatgaccaagaaccagggtca
 gctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
 aggtggtggatccggaggcggtggaagcggaggtggtggatctggaggcg
 gtggaagcgcgcgcaacggagacgactgtccgctcggggcccggttgc
 tgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggccga
 ttgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgccgcgt
 gcccgagccagttccggggcgcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagc
 ctgcaccgcctgaagcccgcacacggtgccagcgcctgctgcgtgccgc
 cagctacaatcccaggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgc
 tccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID

NO:26) .

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:27.

II.B. HemiFc.

Определения "Hemi-" или "HemiFc-домен" в настоящем изобретении означают полипептидную цепь, содержащую первый Fc-домен, соединенный напрямую или посредством полипептидного линкера со вторым Fc-доменом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первый Fc-домен и второй Fc-домен содержат одинаковую последовательность. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первый Fc-домен и второй Fc-домен содержат различные последовательности. Как правило, первый и второй Fc-домены соединены ковалентным образом связанными посредством дисульфидных связей между соответствующими шарнирными областями данных доменов.

С-терминальный лизин (K447) может быть необязательно удален в первом Fc-домене, во втором Fc-домене или в обоих доменах. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным на С-конце, для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Предложен гибридный белок, содержащий HemiFc-домен и область GDF15. Как правило, N-конец области GDF15 соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом HemiFc-домена. Однако согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец HemiFc-домена соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом области GDF15.

Согласно определенным вариантам реализации изобретения предложен димер, который содержит два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гомодимер. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гетеродимер. Графическое представление варианта реализации гомодимера, состоящего из двух гибридных белков GGG-Fc-(G₄S)₄-Fc-S(G₄S)₄-GDF15, см. на фиг. 3.

GGGFc-(G₄S)₄-Fc-S(G₄S)₄-GDF15.

Определение "GGGFc-(G₄S)₄-Fc-S(G₄S)₄-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с HemiFc-доменом посредством первого полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:30 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом HemiFc-домена. HemiFc-домен содержит первый Fc-домен, соединенный со вторым Fc-доменом посредством полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:18 и который соединяет N-конец первого Fc-домена с С-концом второго Fc-домена (который содержит три остатка глицина, присоединенные к его N-концу).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи

между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гомодимер содержит:

(а) два вторых Fc-домена (в каждом мономере), содержащих последовательность (часть шарнирной области включена в скобки)

GGG (ERKSSVECPPCP) APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPG (SEQ ID NO:28),

(b) два первых Fc-домена (в каждом мономере), содержащих последовательность (часть шарнирной области включена в скобки)

(ERKSSVECPPCP) APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK
EYCKKVSNGKLPAPIEKTIKSTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGSGFFLYSKLTVDKSRW
QOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:29).

(с) два вторых полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:18, которые соединяют N-конец первого Fc-домена с С-концом второго Fc-домена,

(d) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(е) два первых полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEO ID NO:30),

которые соединяют N-конец полипептида GDF15 с С-концом первого Fc-домена.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (часть шарнирной области включена в скобки; последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

GGG (ERKSSVECPPCP) APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGSGGGSGGG
GS (ERKSSVECPPCP) APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGSGGGSGGGSGGG
GSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAL
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDTSVSL
QTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:32),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggaggtggagagcgcaaattcttctgtcagtgcccaccgtgccagcacc
 acctgtggcaggaccgtcagttcttcttccccccaaaaccaaggaca
 ccctcatgatctcccgacccctgaggtcacgtgctggtggtggcagtg
 agccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaaaccacgggaggagcagttcaacagcacgt
 tccgtgtggtcagcgtcctcacggttgtgcaccaggactggctgaacggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcga
 gaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgctgtggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtggagag
 caatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgtctggact
 ccgacggctccttcttctctacagcaagctcacggtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggaggtggcg
 gtagcgggtggcgaggttcaggtggcggggaagcgggtggaggaggttca
 gagcggaatccagcgttgaatgtcctccgtgccctgctccaccgctcgc
 ggggcctagtgtcttcttcttccccccaaaaccaaaggatacactgatga
 tcagccggacccccgaggttacgtgcgtcgtcgtcgatgtctcccacgag
 gatccagaggtccaattcaactggtacgtggacggggtcgaggtgcataa
 tgcaaagacaaagccacgggaagagcagtttaactctactttccgctgg
 tttctgtgctgaccgtggtgcaccaagattgggtcaacggcaaggagtac
 aagtgaaggtaagcaataaggggtccctgccccattgagaagactat
 ctccaagacaaagggacagccacgcgagccacaagtctatacactcccc
 cttcccgcaagaaatgaccaagaatcaggttagcctgacatgcttggtt
 aagggtttctacccctctgacatagccgtggagtgggagagcaatggaca
 accagagaacaactacaagaccacccccacccatgctggatagcgacggtt
 cattctttctgtatagtaagcttacggtggacaagtcccgggtggcaacaa
 ggaaatgtcttttcatgctctgtgatgcacgaggccttgcataatcacta
 tactcagaagagcttgagcctcagccccggatctggaggtggcggtccg
 gggcggtggaagcggaggtggtggatcgggaggcggtggaagcgcgcgc
 aacggcgaccactgtccgctcgggccccggacggttgcctgctgtgcacac
 ggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggcccgattgggtgctgtcgc
 cacgggaggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgcgtgcccagccagttc
 cgggcggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaa
 gcccgcacaggtgccagcgcctgctgcgtgcccgcagctacaatccca
 tgggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctcgtccagacctatgat
 gacttgtagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:31).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:32.

II.C. DhHemiFc.

Определения "DhHemi-" или "DhHemiFc-домен" в настоящем изобретении означают полипептидную цепь, содержащую первый Fc-домен, из которого была удалена шарнирная область целиком либо ее часть (домен "DhFc"), соединенный напрямую или посредством полипептидного линкера со вторым DhFc-доменом. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения удаляют 12 N-терминальных аминокислот в шарнирной области, например ERKSSVECPPCP (SEQ ID NO:15). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первый DhFc-домен и второй DhFc-домен содержат одинаковую последовательность. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

первый DhFc-домен и второй DhFc-домен содержат различные последовательности.

Предложен гибридный белок, содержащий DhHemiFc-домен и область GDF15. Как правило, N-конец области GDF15 соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом DhHemiFc-домена. Однако согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец DhHemiFc-домена соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом области GDF15.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен димер, который содержит два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гомодимер. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения димер представляет собой гетеродимер.

GGGDhFc-(G₄S)₅-DhFc-S(G₄S)₄-GDF15.

Определение "GGGDhFc-(G₄S)₅-DhFc-S(G₄S)₄-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с DhHemiFc-доменом посредством первого полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:30 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом HemiFc-домена. HemiFc-домен содержит первый DhFc-домен, соединенный со вторым DhFc-доменом посредством полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:34 и который соединяет N-конец первого DhFc-домена с C-концом второго DhFc-домена (который содержит три остатка глицина, присоединенные к его N-концу).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гомодимер содержит:

(а) два вторых DhFc-домена (в каждом мономере), содержащих последовательность

GGGAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY

VDGVEVHNAKTKPREEOFNSTFRVVSVLTVVHODWLNGKEYKCKVSNKGL

PAPIEKTISKTKGOPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIA

VEWESNGOPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:33),

(b) два первых DhFc-домена (в каждом мономере), содержащих последовательность

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVOFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP

IEKTISKTKGOPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

ESNGOPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFSCSVMHEA

LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:35),

(с) два вторых полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:34),

которые соединяют N-конец первого DhFc-домена с C-концом второго DhFc-домена,

(d) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(е) два первых полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:30, которые соединяют N-конец полипептида GDF15 с С-концом первого DhFc-домена.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

GGGAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVOFNWY

VDGVEVHNAKTKPREEOFNSTFRVSVLTVVHODWLNGKEYKCKVSNKGL

PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIA

VEWESNGOPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSAPPVAGP

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK

TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK

TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

NNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSPGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVR

ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD

TVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:37),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

```
ggcgggtggagctccgccggtggctggaccctcagtggtcctctttccacc
gaagccgaaggacacccttatgattagccggaccccagaggtcacttgcg
tcgtcgtggacgtgtcccatgaggatcccgaagtgcagtttaactggtat
gtggacggagtgagggtccataacgccaagaccaagccaagggaagaaca
gttcaatagcaccttccgggtggtgtccgtgctcacctggtgcatcaag
actggctgaatggcaaagagtacaaatgtaagggtgtcaacaaggggctc
ccagcccctattgaaaagaccatctcaaagactaagggacagccacgcga
acctcaagtgtataccctcccgcttcacgcgaagaaatgactaagaatc
aggtcagccttacttgtctgggtcaagggcttctacccgagcgacattgca
gtcgaatgggagagcaatggtcagccagagaataactacaagaccactcc
tcccatgcttgatagcgatggaagctttttcctttacagcaagcttactg
tggataagtctcgtggcaacagggaaatgtgttcagctgttcagtgatg
catgaagcactccacaatcattacaccagaagtcactcagcctctcacc
cggaggaggaggcgggttctggtggaggagggtctggaggtggaggagcg
gcggaggcgggtctggtgggtgggtctgagaggaaagtcacagtgga
tgccaccatgccctgctcctccgtggcgggtccgagcgtgtttctctt
cccacctaagcccaaggacactctgatgatctcacggactccggaagtga
cttgtgtggtggtggacgtgtctcatgaggacctgaagtgcagttcaac
tggtacgtggacggcgtggaggtgcacaatgctaagaccaagcctagaga
ggaacagttcaattccacctttcgctggtgagcgtcctgaccgtcgtgc
accaggactggcttaacggaaaggaatacaagtgaagggtgtccaacaaa
ggccttcagctcccatgagaaaacatctctaaaactaaggggtcaacc
aagggaaccccaagtctacaccctccctccgtctagagaagagatgacca
aaaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggattttaccctcagac
atcgccgtggagtgggaaagcaacggacagccgaaaacaactataagac
taccctcctatgctggactcagacggatctttcttctctatagcaagc
tcactgtggacaaatccagatggcaacaagggaatgtgttctcatgcagc
gtgatgcacgaggctcttcacaaccactataaccagaagagcctgtctct
ttcacctggttccggagggtggtgggagcggagggggtggatcaggtggtg
gagggtccggaggcggaggatccgcacggaatggcgaccactgtccactg
ggacccggaagatgttgtgcctccacaccgtgagggcctctctggagga
ccttggtgggcccactgggtcctgtcacctcgggaggtccaagtcacca
tgtgtatcgagcctgccccagccaattcagagcagcaaatatgcacgca
cagattaagaccagcctgcacgtgcttaaacctgatactgtgccggctcc
ttgttgctgcccagcatcttacaaccgatgggtgctgatccagaaaaccg
ataccggtgtctccctccagacttacgacgacctccttgcaaaggactgc
cattgcatc (SEQ ID NO:36).
```

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащие последовательность SEQ ID NO:37.

II.D. Knob/Hole.

Определения "knob-" или "knobFc-домен" в настоящем изобретении означает Fc-домен, содержащий мутацию "knob" ("выступ"). Определения "hole-" или "holeFc-домен" в настоящем изобретении означают нативную Fc или вариант Fc, содержащий мутацию "hole" ("впадина").

Мутации "knob" могут быть получены посредством замены небольших аминокислот боковых цепей большими аминокислотами, а мутации "hole" могут быть получены посредством замены больших аминокислот боковых цепей меньшими аминокислотами. См., например, публикации Ridgway JBB 1996, Protein Eng. 9:617-621; Merchant AM 1998, Nature Biotech. 16:677-681.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен "knobFc" получают посред-

ством введения в последовательность Fc-домена мутации треонина на триптофан (T366W). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен "holeFc" получают посредством введения в последовательность Fc-домена мутации треонина на серин (T366S), мутации лейцина на аланин (L368A) и мутации тирозина на валин (Y407V).

С-терминальный лизин (K447) может быть необязательно удален в knobFc-доме, holeFc-доме или в обоих доменах. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным на С-конце, для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен "DhknobFc" получают посредством введения в последовательность Fc-домена, из которого была удалена шарнирная область целиком либо ее часть, мутации треонина на триптофан (T366W). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен "DhholeFc" получают посредством введения в последовательность Fc-домена, из которого была удалена шарнирная область целиком либо ее часть, мутации треонина на серин (T366S), мутации лейцина на аланин (L368A) и мутации тирозина на валин (Y407V).

С-терминальный лизин (K447) может быть необязательно удален в DhknobFc, DhholeFc, или в обоих доменах. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным на С-конце, для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с holeFc-домом напрямую или посредством полипептидного линкера, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую knobFc-дом. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с knobFc-домом напрямую или посредством полипептидного линкера, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую holeFc-дом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с DhholeFc-домом напрямую или посредством полипептидного линкера, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую DhknobFc-дом. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с DhknobFc-домом напрямую или посредством полипептидного линкера, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую DhholeFc-дом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, содержащий два таких гетеродимера, в которых гетеродимеры соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между областями GDF15 соответствующих первых полипептидных цепей данных гетеродимеров. Графическое представление варианта реализации гетеротетрамера, содержащего два гетеродимера, в котором каждый гетеродимер содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с DhknobFc-домом посредством полипептидного линкера, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую DhholeFc-дом, см. на фиг. 1.

DhknobFc-(G₄S)₄-GDF15:DhholeFc.

Определение "DhknobFc-(G₄S)₄-GDF15:DhholeFc" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, соединенный с DhknobFc-домом посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:18 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом DhknobFc-домена, и (ii) полипептидную цепь, содержащую DhholeFc-дом.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, содержащий димер двух гетеродимеров DhknobFc-(G₄S)₄-GDF15:DhholeFc, в котором первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит

(a) два DhknobFc-домена (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность:

```

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:16),

```

(b) два DhholeFc-домена (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APPELLGGPSVFLFPPKPKDTMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP^{SD}IAVE
 WESNGQPENNYKTT^{PP}VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV^{FS}CSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:281),

(с) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:18, каждый из которых связывает N-конец полипептида GDF15 с C-концом DhknobFc-домена посредством пептидных связей.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRC
 CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTS
 LHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI (SEQ ID

NO:20),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggtgggggaccgtcagttcttctcttcccccaaaaacc
caaggacacctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctggtgg
tggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacacctgcccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtca
gcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggatccggagcggtggaagcggaggtggtggatctggaggcg
gtggaagcgcgcgcaacggagaccactgtccgctcgggccccgggcttg
tgccgtctgcacacggctccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggccga
ttgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgct
gcccagccagttccgggcggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagc
ctgcaccgcctgaagcccgacacggtgccagcgcctgctgcgtgcccg
cagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgcacccgggtgtcgc
tccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID

NO:19) .

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
 ALHNHYTOKSLSLSPGK (SEO ID NO:17),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

```
gcacctgaactcctgggggacgcgtcagtccttctctccccccaaaacc
caaggacacccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgtgtgg
tggaactgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtagaa
cagcacgtaccgtgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagcccgagaaaccaca
ggtgtacacccctgcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtca
gcctgagctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tggaagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccgt
gctggactccgacggctccttcttctcgtcagcaagctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
atga (SEQ ID NO:21)
```

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:20, и два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:17.

II.E. Charged pair ("заряженная пара", delHinqe).

Определение "CpmFc(+)" домен" в настоящем изобретении означает Fc-домен, содержащий "положительно" заряженную пару мутаций. Определение "CpmFc(-)" домен" в настоящем изобретении означает Fc-домен, содержащий "отрицательно" заряженную пару мутаций. Следует отметить, что использование терминов "положительный" и "отрицательный" предназначено для удобства описания (т.е. для описания природы заряженной пары мутаций в Fc-доменах) и не означает, что последовательность или конструкция в целом обязательно имеет положительный или отрицательный заряд.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "положительно" заряженную пару мутаций получают посредством введения в последовательность Fc-домена мутации глутаминовой кислоты на лизин (E356K) и мутации аспарагиновой кислоты на лизин (D399K). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "отрицательно" заряженную пару мутаций получают посредством введения в последовательность Fc-домена мутаций двух лизинов на аспарагиновую кислоту (K392D, K409D).

При инкубации вместе остатки аспартата связываются с остатками лизина посредством электростатического взаимодействия, что облегчает образование гетеродимеров между доменами CpmFc(+) и доменами CpmFc(-) и уменьшает или предотвращает образование гетеродимеров между последовательностями CpmFc(+) или между последовательностями CpmFc(-).

С-терминальный лизин (K447) может быть необязательно удален в домене CpmFc(+), домене CpmFc(-) или в обоих доменах. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным на С-конце, для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен "DhCpmFc(+)" получают посредством введения в последовательность Fc-домена, из которого была удалена шарнирная область целиком либо ее часть, мутации глутаминовой кислоты на лизин (E356K) и мутации аспарагиновой кислоты на лизин (D399K). Согласно одному варианту реализации изобретения домен "DhCpmFc(-)" получают посредством введения в последовательность Fc-домена, из которого была удалена шарнирная область целиком либо ее часть, мутаций двух лизинов на аспарагиновую кислоту (K392D, K409D).

При инкубации вместе остатки аспартата связываются с остатками лизина посредством электростатического взаимодействия, что облегчает образование гетеродимеров между доменами DhCpmFc(+) и доменами DhCpmFc(-) и уменьшает или предотвращает образование гомодимеров между последовательностями DhCpmFc(+) или между последовательностями DhCpmFc(-).

С-терминальный лизин (K447) может быть необязательно удален в DhCpmFc(+), DhCpmFc(-) или в обоих доменах. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным на С-конце, для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом CpmFc(+), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен CpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с С-концом домена CpmFc(+) напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена CpmFc(+) соединен с С-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом CpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен CpmFc(+). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с C-концом домена CpmFc(-) напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена CpmFc(-) соединен с C-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом DhCpmFc(+), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(-). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с C-концом домена DhCpmFc(+), напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена DhCpmFc(+), соединен с C-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с C-концом домена DhCpmFc(-) напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена DhCpmFc(-) соединен с C-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, содержащий димер, состоящий из двух таких гетеродимеров, в котором две первые полипептидные цепи гетеродимеров соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей. Графическое представление варианта реализации тетрамера, содержащего два гетеродимера, в котором каждый гетеродимер содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, соединенную посредством полипептидного линкера с доменом DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+), см. на фиг. 4.

II.E.1. DhCpmFc(+)-(1K)-GDF15:DhCpmFc(-).

Определение "DhCpmFc(+)-(1K)-GDF15:DhCpmFc(-)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(+), посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:40 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом домена DhCpmFc(+), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(-).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, содержащий димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(+)-(1K)-GDF15:DhCpmFc(-), в которых две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:38),

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:282),

(c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GSGSATGGSGSVASSGSGSATHL (SEQ ID NO:40),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом домена DhCpmFc(+) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная

цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGSGSATGGSGSVASSGSGSATHLARNGDHCPLGP
GRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQI
KTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLAKDCHC

I (SEQ ID NO:42),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gccccagagctgcttggtggaccatccgtgttcctgtttcctccaaagcc
gaaggacaccctgatgatctcaagaactccggaagtgacttgctgctgctg
tgagcgtgtcacatgaggatccagaggtcaagttcaattggtatgtggac
ggagtgggaagtgcataacgccaagaccaaaccggaagaacagtacaa
tagcacctaccgctggtgagcgtccttactgtgctccaccaggactggc
ttaatgggaaggaatacaagtgttaaggtgtccaacaaggccctccccgct
cccatcgaaaagaccatctcaaaggcaaaggggcaaccaagggaacctca
agtgtacaccctgcctccgagcaggaaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacttgctcgtgaagggcttctatcccagcgatattgctgtggaa
tgggagtcaaatggccagcccagaaataactacaaaactacccaccgct
gctgaaatctgatgggtccttcttcttactccaagctgaccgtggaca
agagccgctggcaacaaggcaatgtctttagctgctcagtgatgcatgag
gctctccataatcactacactcagaagtcactgtccctgtcacctggcgg
atccgggttctgctactggtggttccggctccgtcgcaagctctggttcag
gcagtgcgactcatctggcaggaacggggaccattgtccctgggacct.
ggctgggtgctgccggcttcacaccgtcagagcctctctggaggaccttg
atgggctgattgggtgctgagccctcgggaggtgcaagtcaccatgtgca
tcggggcctgccttagccagttccgcgagccaacatgcacgctcagatc
aaaacctctcttcacagactgaagcccagaccgtgccagcaccttgctg
tgtgccggcctcttataaccccatggctcctcattcagaaaaccgacaccg
gagtgtcacttcagacttacgatgacctcctggccaaggactgccactgc
ata (SEQ ID NO:41).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTPPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:39),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcgccggaactgctgggcccgcgagcgtgtttctgtttccgccgaaacc
gaaagataccctgatgattagccgcaccccggaagtacctgcgtggtgg
tggatgtgagccatgaagatccggaagtgaatttaactggtatgtggat
ggcgtggaagtgcataacgcgaaaaccaaaccgcggaagaacagtataa
cagcacctatcgctgggtgagcgtgctgaccgtgctgcatcaggattggc
tgaacggcaaaagaatataaatgcaaagtgaacaaagcgtgccggcg
ccgattgaaaaaaccattagcaaagcgaaaggccagccgcggaaccgca
ggtgtataccctgccgcgagccgcgaagaatgacaaaaaccaggtga
gcctgacctgcctggtgaaaggcttttatccgagcgatattgcggtggaa
tgggaaagcaacggccagccggaaaacaactatgataccaccccgccggt
gctggatagcgatggcagcttttttctgtatagcgatctgaccgtggata
aaagccgctggcagcagggcaacgtgttttagctgcagcgtgatgcatgaa
gcgctgcataaccattataccagaaaagcctgagcctgagcccgggcaa
a (SEQ ID NO:43).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:42, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:39.

II.E.2. DhCpmFc(-)-GDF15:DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-GDF15:DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, содержащий димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-GDF15:DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:283),

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:48),

и (c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:50),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgcaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgc
 gcgcaacggagaccactgtccgctcggggccggcggttgcgtgccgtctgc
 acacggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggccgattgggtgctg
 tcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgcgtgcccgagcca
 gttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcc
 tgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccgcagctacaat
 cccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctcgctccagacct
 tgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:49).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:47),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgcccccatcccggaaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccg
 gctgaagtccgacggctccttcttctctatagcaagctcacgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
 atga (SEQ ID NO:51).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:50, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.3. DhCpmFc(-)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую существующий в природе вариант GDF15, который содержит мутацию аспарагина на аспарагиновую кислоту (N3D) ("GDF15(N3D)") и N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+). Мутация N3D может уменьшать гетерогенность, вызванную деамидированием.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, содержащий димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

ARDGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPS
 QFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQT
 YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:52).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS
 PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDGTGVSQT YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:54),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaacc
 caaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgggtg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctccgt
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgc
 gcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccggcggttgcctgctgc
 acacggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccattgggtgctg
 tcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgcgctgcccagacca
 gttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcc
 tgaagcccgcacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat
 cccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgtccagacct
 tgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:53).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:54, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.4. DhCpmFc(-)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую вариант GDF15, в котором первые три аминокислоты удалены ("GDF15 (Ndel3)") и N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+). Вариант Ndel3 может уменьшать деамидирование N3 и гетерогенность, вызванную изомеризацией D3.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48, и

(c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR

AANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDD

LLAKDCHCI (SEQ ID NO:55).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVHME
 ALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
 EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMV
 LIQKTDGTGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:57),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccg
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtgg
 agaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcacacggtcc
 gcgctgcgtggaagacctgggctgggcccagattgggtgctgtcgccacgg
 gaggtgcaagtgacctgtgcatcgccgctgcccagccagttccggggc
 ggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccc
 acacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtg
 ctcatcctcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgactt
 gttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:56).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:57, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.5. DhCpmFc(-)-G₄-GDF15 (N3D):DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), соединенный с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:58 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность GGGG (SEQ ID NO:58),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидных связей.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первый полипептид содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNYHTQKSLSLSPGGGGGARDGDHCPFGPRCCRLHTVRASLEDLGWA
DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:60),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacgcagtcagtccttcctctccccccaaaacc
caaggacacctcatgatctcccgacacctgaggtcacatgcgtggtg
tggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacacctgccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctccggt
gctggactccgacggctccttctctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcagag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggagcgcgacggagaccactgtccgctcgggccccggcggtt
gctgccgtctgcacacggtccgcgctcgctggaagacctgggctgggcc
gattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgc
gtgccccgagccagttccggcggaacatgcacgcgcagatcaagacga
gcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgctgccc
gccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgct
gctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID

NO:59) .

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:60, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.6. DhCpmFc(-)-G₄S-GDF15:DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-G₄S-GDF15:DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(-) посредством полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:61 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-G₄S-GDF15:DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID

NO:48,

(с) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность GGGGS (SEQ ID NO:61),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидных связей.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первый полипептид содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPFVLDSGSEFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGW
ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCV
PASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:63),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacgcagtccttctctccccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtg
tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagcagc
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatggcgacccggagaacaactacgacaccacgcctccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcagtag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggatccgcgcgaacggagaccactgtccgctcgggcccgggc
gttgcgtgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgg
gccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcg
cgcggtgcccgagccagttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaaga
cgagcctgcaccgcctgaagcccgcacacgggtgccagcgccctgctgcgtg
cccgccagctacaatcccatgggtgctcattcaaaagaccgacacgggggt
gtcgctccagacctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcataat
ga (SEQ ID NO:62).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:63, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.7. DhCpmFc(-)(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(-) посредством полипептидного линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:64 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(+), в кото-

ром две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность:

GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:64),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом последовательности DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE

ALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASL

EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVP

APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:66),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcctctccccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
tggtgagtgagccaggaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtagaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgcgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tggtgagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
agggtggtgatccggaggcgttggaagcgcgcaacggagaccactgtc
cgctcgggcccggcggttgctgcccgtctgcacacgggtccgcgctcgctg
gaagacctgggctgggcccgaattgggtgctgtcgccacgggagggtgcaagt
gacctatgtgcatcggcgcgtgcccagaccagttccgggaggcaaacatgc
acgcgcgagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccagacgggtgcca
gcgccctgctgctgcccggcagctacaatcccaggtgctcattcaaaa
gaccgacaccggggtgtcgctccagacctatgatgacttgtagccaaag
actgccactgcata (SEQ ID NO:65).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:66, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.Е.8. DhCpmFc(-)-(G₄S)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-(G₄S)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), соединенный с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:64 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-(G₄S)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:64, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSARDGDHCPLGPRCCRLHTVRASL
EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV
APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYD DLLAKDCHCI (SEQ ID NO:68),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaacc
caaggacacccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
tggaactgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtagacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacacccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag

tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccggt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggatccggaggcgggtggaagcgcgcgcgacggagaccactgtc
cgctcggggcccggttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgctg
gaagacctgggctgggcccgaattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagt
gacctgtgcatcgccgcgtgcccgagccagttccggggcggaacatgc
acgcgagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgcca
gcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaaaa
gaccgacacccgggtgctgctccagacctatgatgacttgtagccaaag
actgccactgcata (SEQ ID NO:67).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:68, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.9. DhCpmFc(-)-G₄P-GDF15:DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-(G₄P)-GDF15:DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:69 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-(G₄P)-GDF15:DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность GGGGP (SEQ ID NO:69),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPFVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGPARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGW
ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCV
PASYNPMVLIQKTDGTGVSLSQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:71),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgggtg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccg
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
 aggtgggtggacccgcgcgcaacggagaccactgtccgctcgggcccggg
 gttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgg
 gccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgg
 cgctgcccagccagttccgggcgcaaacatgcacgcgcagatcaaga
 cgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgctgcgtg
 cccgccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggt
 gtcgctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID

NO:70) .

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:71, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.10. DhCpmFc(-)-(G₄P)₂-GDF15:DhCpmFc (+).

Определение "DhCpmFc(-)-(G₄P)₂-GDF15:DhCpmFc (+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:72 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую v, содержащую последовательность DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-(G₄P)₂-GDF15:DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность GGGG PGGGP(SEQ ID NO:72),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSGSSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGPARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASL
 EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV
 APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:74),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggctgagggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgctcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctccgt
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcacgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
 aggtggtggacctggaggcggtggaccagcgcgcaacggagaccactgtc
 cgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcacacggtccgcgctcgtg
 gaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggagggtgcaagt
 gacctatgtgcatcggcgctgcccagccagttccgggcggaacatgc
 acgcgcatgcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgcca
 gcgcctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaa
 gaccgacaccggggtgctcgctccagacctatgatgacttgtagccaaag
 actgccactgcatatga (SEQ ID NO:73).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:74, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.11. DhCpmFc(-)-G₄Q-GDF15:DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-G₄Q-GDF15:DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:75 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-G₄Q-GDF15:DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

- (a) две цепи DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,
- (b) две цепи DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,
- (c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность GGGGQ (SEQ ID NO:75),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGQARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGW
ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCV
PASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:77),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacccgtcagtccttctcttcccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctggtgac
tgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtagaca
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcactgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggacagggcgcaacggagaccactgtccgctcgggcccgggc
gttgctgccgtctgcacacggtccgcgctcgctggaagacctgggctgg
gccgattgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgg
cgcggtgcccagccagttccgggaggcaaacatgcacgcgcagatcaaga
cgagcctgcaccgcctgaagcccgcacacggtgccagcgccctgctgctg
cccgccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtg
gtcgctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcatat
ga (SEQ ID NO:76).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:77, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.12. DhCpmFc (-)-(G₄Q)₂-GDF15:DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-(G₄Q)₂-GDF15:DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:78 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-(G₄Q)₂-GDF15:DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность GGGGQGGGGQ (SEQ ID NO:78),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSGSEFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGQGGGGQARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASL
EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV
APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:80),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
tgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtacaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggacagggaggcgggtggacagggcgcaacggagaccactgtc
cgctcggggccggggtgtgctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctg
gaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagt
gacctgtgcatcggcgcgtgcccagccagttccgggcggaacatgc
acgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgcca
gcgcctgtgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaa
gaccgacaccggggtgtcgctccagacctatgatgacttgtagccaaag
actgccactgcatatga (SEQ ID NO:79).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:80, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.13. DhCpmFc (-)-(G₄Q)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-(G₄Q)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает

гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), соединенный с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:78 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-(G₄Q)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:78, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSGSEFLYSDLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGQARDGDHCPGLGPRCCRLHTVRASL
EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV
APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO:82),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacccgtcagtcctcctctcccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggaggagcagtacaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggacagggaggcgggtggacagggcgcgacggagaccactgtc
cgctcggggcccggtgtgctgcccgtctgcacacgggtccgcgctcgctg
gaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagt
gaccatgtgcatcggcgctgcccagccaggtccggggcggaacatgc
acgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgcca
gcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaa
gaccgacaccgggtgtcgctccagacctatgatgacttgttagccaaag
actgccactgcata (SEQ ID NO:81).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последователь-

ностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:82, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.E.14. DhCpmFc(-)-(G₄Q)₂-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+).

Определение "DhCpmFc(-)-(G₄Q)₂-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), соединенный с доменом DhCpmFc(-) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:78 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(Ndel3) с С-концом домена DhCpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)-(G₄Q)₂-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:283,

(b) два домена DhCpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:48,

(c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:78, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(Ndel3) с С-концом домена DhCpmFc(-) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGDHCPGPGRCRLHTVRASLEDL
GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPC
CVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:84),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggaccggtcagtccttcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctgtgtg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggctggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
 aggtggtggacagggaggcgggtggacagggagaccactgtccgctcgggc
 ccgggctgtgtgctgccgtctgcacacggtccgcgctcgtggaagacctg
 ggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgtg
 catcgccgctgcccagcaggttccggggcggaacatgcacgcgcaga
 tcaagacgagcctgcaccgctgaagcccgcacaggtgccagcgcctg
 tgctgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaaaagaccgacac
 cggggtgtcgctccagacctatgatgacttgttagccaaagactgccact
 gcata (SEQ ID NO:83).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:51.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:84, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:47.

II.F. "Charged pair" ("заряженная пара", delHinqe) "cysteine clamp" ("цистеиновый хомут").

Мутацию "cysteine clamp" ("цистеиновый хомут") можно ввести в Fc-домен, такой как домен CpmFc(+), домен CpmFc(-), домен DhCpmFc(+) или домен DhCpmFc(-). Мутация "cysteine clamp", как правило, включает введение цистеина в CH3-домен Fc-домена в конкретном положении посредством мутации так, что при инкубации с другим Fc-доменом, также содержащим цистеин, введенный в CH3-домен в конкретном положении посредством мутации, между двумя Fc-доменами (например, между доменом CpmFc(+), содержащим мутацию "cysteine clamp", и доменом CpmFc(-), содержащим мутацию "cysteine clamp", или между доменом DhCpmFc(+), содержащим мутацию "cysteine clamp", и доменом DhCpmFc(-), содержащим мутацию "cysteine clamp") может образоваться дисульфидная связь ("цистеиновый хомут"). Fc-домен может содержать одну или несколько таких мутаций "cysteine clamp".

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "cysteine clamp" получают посредством введения мутации серина на цистеин (S354C) в первом Fc-домене и мутации тирозина на цистеин (Y349C) во втором Fc-домене.

Определение домен "DhCpmFc(-)(S354C)" в настоящем изобретении означает домен DhCpmFc(-), содержащий мутацию серина на цистеин (S354C). Определение домен "DhCpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает домен DhCpmFc(+), содержащий мутацию серина на цистеин (S354C).

Определение домен "DhCpmFc(-)(Y349C)" в настоящем изобретении означает домен DhCpmFc(-), содержащий мутацию серина на цистеин (Y349C). Определение домен "DhCpmFc(+)(Y349C)" в настоящем изобретении означает домен DhCpmFc(+), содержащий мутацию серина на цистеин (Y349C).

Определение домен "CpmFc(-)(S354C)" в настоящем изобретении означает домен CpmFc(-), содержащий мутацию серина на цистеин (S354C). Определение домен "CpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает домен CpmFc(+), содержащий мутацию серина на цистеин (S354C). Определение домен "CpmFc(-)(Y349C)" в настоящем изобретении означает домен CpmFc(-), содержащий мутацию серина на цистеин (Y349C). Определение домен "CpmFc(+)(Y349C)" в настоящем изобретении означает домен CpmFc(+), содержащий мутацию серина на цистеин (Y349C).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения "cysteine clamp" получают посредством введения мутации лейцина на цистеин (L351C) в первом и Fc-домене.

Определение домен "DhCpmFc(-)(L351C)" в настоящем изобретении означает домен DhCpmFc(-), содержащий мутацию серина на цистеин (L351C). Определение домен "DhCpmFc(+)(L351C)" в настоящем изобретении означает домен DhCpmFc(+), содержащий мутацию серина на цистеин (L351C).

Определение домен "CpmFc(-)(L351C)" в настоящем изобретении означает домен CpmFc(-), содержащий мутацию серина на цистеин (L351C). Определение домен "CpmFc(+)(L351C)" в настоящем изобретении означает домен CpmFc(+), содержащий мутацию серина на цистеин (L351C).

С-терминальный лизин (K447) может быть необязательно удален в домене CpmFc(+), домене CpmFc(-) или в обоих доменах. Данная модификация может иметь преимущество, например, когда пептид является гибридным на С-конце, для уменьшения протеолиза гибридного белка.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом CpmFc(+), содержащим мутацию "cysteine clamp", и (ii)

вторую полипептидную цепь, которая содержит домен CpmFc(-), содержащий мутацию "cysteine clamp". Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с С-концом домена CpmFc(+), содержащего мутацию "cysteine clamp", напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена CpmFc(+), содержащего мутацию "cysteine clamp", соединен с С-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом CpmFc(-), содержащим мутацию "cysteine clamp", и (ii) вторую полипептидную цепь, которая содержит домен CpmFc(+), содержащий мутацию "cysteine clamp". Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с С-концом домена CpmFc(-), содержащего мутацию "cysteine clamp", напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена CpmFc(-), содержащего мутацию "cysteine clamp", соединен с С-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом DhCpmFc(+), содержащим мутацию "cysteine clamp", и (ii) вторую полипептидную цепь, которая содержит домен DhCpmFc(-), содержащий мутацию "cysteine clamp". Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с С-концом домена DhCpmFc(+), содержащего мутацию "cysteine clamp", напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена DhCpmFc(+), содержащего мутацию "cysteine clamp", соединен с С-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую область GDF15, соединенную с доменом DhCpmFc(-), содержащим мутацию "cysteine clamp", и (ii) вторую полипептидную цепь, которая содержит домен DhCpmFc(+), содержащий мутацию "cysteine clamp". Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец области GDF15 соединен с С-концом домена DhCpmFc(-), содержащего мутацию "cysteine clamp", напрямую или посредством полипептидного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения N-конец домена DhCpmFc(-), содержащего мутацию "cysteine clamp", соединен с С-концом области GDF15 напрямую или посредством полипептидного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения предложен тетрамер, содержащий димер, состоящий из двух таких гетеродимеров, в котором две первые полипептидные цепи гетеродимеров соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей. Графическое представление варианта реализации тетрамера, содержащего два гетеродимера, в котором каждый гетеродимер содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, соединенный посредством полипептидного линкера с доменом DhCpmFc(+)(L351C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(-)(L351C), см. на фиг. 5.

II.F.1. DhCpmFc(+)(S354C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(-)(Y349C).

Определение "DhCpmFc(+)(S354C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(-)(Y349C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(+)(S354C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(-)(Y349C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С354 первой полипептидной цепи и С349 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(+)(S354C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(-)(Y349C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит

(a) два домена DhCpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQOPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:85),

(b) два домена DhCpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQOPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:284),

и (c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQOPENNYKTTTPVVKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:88),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gccccagagctgcttggtggaccatccgtgttcctgtttcctccaaagcc
 gaaggacaccctgatgatctcaagaactccggaagtgacttgcgctgctg
 tggacgtgtcacatgaggatccagaggtcaagttcaattggtatgtggac
 ggagtggaagtgcataacgccaagaccaaaccggaagaacagtacaa
 tagcacctaccgctggtgagcgtccttactgtgctccaccaggactggc
 ttaatgggaaggaatacaagtgttaaggtgtccaacaaggccctccccgct
 cccatcgaaaagaccatctcaaaggcaaaggggcaaccaagggaacctca
 agtgtacaccctgcctccgtgcaggaaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacttgctctcgtaagggtcttatcccagcgatattgctgtggaa
 tgggagtgcaaatggccagcccagagaataactacaaaactacccccccgt
 gctgaaatctgatgggtccttcttcttactccaagctgaccgtggaca
 agagccgctggcaacaaggcaatgtctttagctgctcagtgatgcatgag
 gctctccataatcactacactcagaagtcactgtccctgtcacctggcgc
 gcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgc
 acacggtccgcgctgctggaagacctgggctgggcccattgggtgctg
 tcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagacca
 gttccgggagggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcc
 tgaagcccgcacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat
 cccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacct
 tgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:87).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:86),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtagaca
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccgacc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccg
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
 a (SEQ ID NO:89).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:88, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:86.

II.F.2. DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15:DhCpmFc(+)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15:DhCpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первой полипептидной цепи и C354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15:DhCpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:285),

(b) два домена DhCpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:91),

и (c) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPFVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDGTGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:93),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtgcaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgc
 gcgcaacggagaccactgtccgctcgggcccggggtgctgcccgtctgc
 acacggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggcccgatgggtgctg
 tcgccacgggaggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgcgtgcccgagcca
 gttccgggcccgaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcc
 tgaagcccgcacaggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat
 cccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgtcgtccagacct
 tgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:92).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:90),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gccccagagctgcttgggtggaccatccgtgttctctgtttcctccaaagcc
 gaaggacaccctgatgatctcaagaactccggaagtgacttgctgctgctg
 tggacgtgtcacatgaggatccagaggtcaagttcaattggtatgtggac
 ggagtggaagtgcataacgccaaagaccaaaccggaagaacagtacaa
 tagcacctaccgctggtgagcgtccttactgtgctccaccaggactggc
 ttaatgggaaggaatacaagtgtgaaggtgtccaacaaggccctccccgct
 cccatcgaaaagaccatctcaaaggcaaaggggaaccaagggacacctca
 agtgtacaccctgcctccgtgcaggaaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacttgctcgtgaagggttctatcccagcgatattgctgtggaa
 tgggagtgcaaatggccagcccagagaataactacaaaactacccacccgt
 gctgaaatctgatgggtccttcttcttactccaagctgaccgtggaca
 agagccgctggcaacaaggcaatgtctttagctgctcagtgtatgcatgag
 gctctccataatcactacactcagaagtcactgtccctgtctccgggtaa
 a (SEQ ID NO:94) .

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:93, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:90.

II.F.3. DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первого полипептида и C354 второго полипептида.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей. Мутация N3D может быть введена в последовательность GDF15, например, для устранения гетерогенности, вызванной N-деамидированием.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:285,

(b) два домена DhCpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:91, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGPGRCCLHTVRSLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDITGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:96) ,

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacgcgtcagtccttcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcggaggagcagtacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgcgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcacgcgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgc
 gcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccgggcgttgctgccgtctgc
 acacggtccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggccgattgggtgctg
 tcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgcgtgcccgagcca
 gttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcc
 tgaagcccgcacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat
 cccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacct
 tgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:95).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:94.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:96, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:90.

II.F.4. DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С349 первой полипептидной цепи и С354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей. Удаление 3 N-терминальных аминокислот (Ndel3) в последовательности GDF15 можно применять, например, для устранения гетерогенности, вызванной деамидированием аспарагинов или изомеризацией аспарагиновой кислоты.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:285,

(b) два домена DhCpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:91, и

(c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSGSEFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHE
 ALHNYHTQKSLSLSPPGDDHCPGLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
 EVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMV
 LIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:98),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagacaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccaca
 ggtgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgctgtgtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccg
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
 agaccactgtccgctcgggcccggcggttgcgtgccgtctgcacacggtcc
 gcgcgtcgctggaagacctggggtgggcccattgggtgctgtcgccacgg
 gaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgcgtgcccgagccagttccggggc
 ggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccc
 acacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatgggtg
 ctcatcctaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgactt
 gttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:97).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:94.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:98, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:90.

II.F.5. DhCpmFc(-)(Y349C)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(Y349C)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), соединенный с доменом DhCpmFc(-)(Y349C) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:58 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первой полипептидной цепи и C354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(Y349C)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:285,

(b) два домена DhCpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:91,

(с) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:58, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGARDGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWA
DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:100),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
tggtgagtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtacaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca
gcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tggtgagagcaatgggcagccggagaaactacgacaccacgcctcccggt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
tggtgaggtggtgcgcgcgagcggagaccactgtccgctcgggccccggcggt
gctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctggaagacctgggctggggcc
gattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgc
gtgccccgagccagttccggggcgaaacatgcacgcgcagatcaagacga
gcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcgcctgtgctgctgcc
gccagctacaatcccattggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtc
gtccagacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID

NO:99) .

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:94.

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гетеротетрамер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:100, и два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:90.

II.F.6. DhCpmFc(-)(Y349C)-(G₄S)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(Y349C)-(G₄S)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C)" в изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), соединенный с доменом DhCpmFc(-)(Y349C) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:64 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первой полипептидной цепи и C354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(Y349C)-(G₄S)₂-GDF15(N3D):

DhCpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер:

(a) два домена DhCpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:285,

(b) два домена DhCpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:91,

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:64, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с C-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первый полипептид содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGSARDGDHCPLGPRCCRLHTVRASL
EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVP
APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:102),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggtggggaccgtcagtccttctcttcccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggg
tgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagacaa
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatggcgagccggagaaacaactacgacaccacgcctccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggatccggaggcggtggaagcgcgcgacggagaccactgtc
cgctcgggcccggtgtgctgctgctgacacgggtccgcgctgctg
gaagacctgggtggccgattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagt
gacctgtgcatcgcgctgcccagcgaggttccggggcggaacatgc
acgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgcca
gcgcctgctgctgctgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaaaa
gaccgacaccgggtgtcgctccagacctatgatgacttgttagccaaag
actgccactgcata (SEQ ID NO:101).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:94.

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гетеротетрамер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:102, и два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:90.

II.F.7. DhCpmFc(-)(Y349C)-(G₄Q)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(Y349C)-(G₄Q)₂-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобре-

тении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), соединенный с доменом DhCpmFc(-)(Y349C) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:78 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-) (Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+) (S345C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С349 первой полипептидной цепи и С354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(Y349C)-(G₄Q)₂-GDF15(N3D): DhCpmFc(+) (S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+) (S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:285,

(b) два домена DhCpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:91,

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:78, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-)(Y349C) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первый полипептид содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHE

ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGOARDGDHCPGPGRCRLHTVRASL

EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV

APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:104),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttcccccaaaacc
 caaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagca
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccaca
 ggtgtgcacctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
 gcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccg
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtg
 aggtggtggacagggaggcgtggacagggcgcgacggagaccactgtc
 cgctcggggcccggtgctgctgctgacacgggtccgcgctgctg
 gaagacctgggtgggagcattgggtgctgctgcacacgggaggtgcaagt
 gacctgtgcatcggtcggtgcccagccaggtccggggcgcaacatgc
 acgcgcatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgcca
 gcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaa
 gaccgacaccgggtgctgctccagacctatgatgactgttagccaaag
 actgccactgcata (SEQ ID NO:103).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:94.

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гетеротетрамер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:104, и два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:90.

II.F.8. DhCpmFc(-)(L351C)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(+)(L351C).

Определение "DhCpmFc(-)(L351C)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(+)(L351C)" в изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, который соединен с доменом DhCpmFc(-)(L351C) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:64 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-)(L351C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(L351C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C351 первой полипептидной цепи и C351 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(L351C)-(G₄S)₂-GDF15:DhCpmFc(+)(L351C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(L351C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:286),

(b) два домена DhCpmFc(-)(L351C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:106),

(с) две цепи полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:64, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhCpmFc(-) (L351C) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (последовательность линкера подчеркнута двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE

ALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASL

EDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV

APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:108),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcgcgggaactgctggcgccgagcggtgtttctgtttccgccgaaacc

gaaagataccctgatgattagccgcaccccggaagtgcctgctggtgg

tggatgtgagccatgaagatccggaagtgaatttaactggtatgtggat

ggcgtggaagtgcataacgcgaaaaccaaaccgcgcgaagaacagtataa

cagcacctatcgctggtgagcgtgctgaccgtgctgcatcaggattggc

tgaacggcaaagaatataaatgcaaagtgcgaacaaagcgtgccggcg

ccgattgaaaaaacattagcaaagcgaaaggccagccgcgcgaaccgca

ggtgtatacctgcccgcgagccgcgaagaatgacaaaaaccagggtga

gcctgacctgcctggtgaaaggcttttatccgagcgatattgcggtggaa

tgggaaagcaacggccagccggaacaaactatgataccaccccgccggt

gctggatagcgatggcagcttttttctgtatagcgatctgaccgtggata

aaagccgctggcagcagggcaacgtgttttagctgcagcgtgatgcatgaa

gcgctgcataaccattataccagaaaagcctgagcctgagcccgggcg

cgccggcgccagcggcgccggcgccagcgcgcgaacggcgatcattgcc

cgctgggcccggccgctgctgccgcctgcataaccgtgcgcgcgagcctg

gaagatctgggctggcggtggtgctgagcccgcgcaagtgcaggt

gaccatgtgcattggcgctgcccagccagtttcgcgcggcgaacatgc

atgcgcagattaaaaccagcctgcctgcctgaaaccggataaccgtgccg

gcgcgctgctgctgcccgcgagctataaccgatggtgctgattcagaa

aaccgataccggcgtgagcctgcagacctatgatgatctgctggcgaaag

attgccattgcatt (SEQ ID NO:107).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

PIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTPPVLSKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE

ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:105),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggaggagcagtagaa
 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacacctgtcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
 gctggactccgacggtccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
 a (SEQ ID NO:109).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гетеротетрамер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:108, и два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:105.

II.G. HSA.

Определения "HSA" или "сывороточный альбумин человека" в настоящем изобретении означают гибридный белок, содержащий область GDF15, соединенную напрямую или посредством полипептидного линкера с полипептидом сывороточным альбумином человека (HSA). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит два или более полипептидов HSA.

Как правило, N-конец области GDF15 соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом полипептида HSA. Однако согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения N-конец полипептида HSA соединен напрямую или посредством полипептидного линкера с С-концом области GDF15.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков. Графическое представление варианта реализации такого гомодимера см. на фиг. 6. В качестве альтернативы, предложен гетеродимер, который содержит один такой гибридный белок и полипептид GDF15 или мутантный полипептид GDF, соединенные посредством межцепочечной дисульфидной связи между областью GDF15 гибридного белка и полипептидом GDF15 или мутантным полипептидом.

II.G.1. Гетеродимер HSA-(G₄S)₄-GDF15:GDF15.

Определение "HSA-(G₄S)₄-GDF15:GDF15" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:18 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом полипептида HSA, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15.

Как правило, первая и вторая полипептидные цепи соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гетеродимер содержит:

(a) один полипептид HSA (в первом мономере), содержащий последовательность

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA
 KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
 CFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY
 APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
 ASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL
 LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
 DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLLRLA
 KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQQLGE
 YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
 DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK
 EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
 FAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:110),

и (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12, и

(с) один полипептидный линкер (в первом мономере), содержащий последовательность SEQ ID NO:18, который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первый полипептид содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA
 KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
 CFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY
 APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
 ASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL
 LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
 DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLLRLA
 KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQQLGE
 YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
 DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK
 EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
 FAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL GGGGSGGGSGGGGS
GGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
 GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTG
 VSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:112),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaggttgctcatcgatttaaagatttgggagaaga
 aaatttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagt
 gtccatttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgca
 aaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttca
 taccctttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct
 atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaa
 tgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgag
 accagaggttgatgtgatgtgcactgcttttcatgacaatgaagagacat
 ttttgaaaaaatacttatatgaaattgccagaagacatccttacttttat
 gccccggaactccttttcttgctaaaaggtataaagctgcttttacaga
 atgttgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaaagctcgatg
 aacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgccaaacagagactcaagtgt
 gccagtctccaaaaatttgagaaagagctttcaaagcatgggcagtagc
 tcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgcagaagtttccaagt
 tagtgacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatggagatctg
 cttgaatgtgctgatgacaggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaa
 tcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaaatgctgtgaaaaacctctgt
 tggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgct
 gacttgcttctattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaa
 aaactatgctgaggcaaaggatgtcttctggtgcatgtttttgtatgaat
 atgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgcc
 aagacatatgaaacctctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctca
 tgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaaacctcttgggaagagc
 ctcagaatttaatacaacaaaattgtgagctttttgagcagcttgagag
 taaaaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaagtacccca
 agtgtcaactccaactctttagaggtctcaagaaacctaggaagtggtg
 gcagcaaatgttgtaaactcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaa
 gactatctatccgtggtcctgaaccagttatgtgtgttgcatgagaaaac
 gccagtaagtgcagagtcaccaaagtgtgcacagaatccttgggtgaaca
 ggcgacctatgcttttcagctctggaagtcgatgaaacatacgttcccaa
 gagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacactttc
 tgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttgttgagctcgtga
 aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgat
 ttgcagctttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctg
 ctttgccgaggagggtaaaaaacttgttgccggcagtcaggccgccttag
 gcttaggaggtggtggatccggaggcggtggaagcggaggtggtggatct
 ggaggcggtggaagcgcgcgcaacggagaccactgtccgctcgggcccg
 gcgttgctgccgtctgcacacggtccgcgctcgtggaagacctgggct
 gggccgattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatc
 ggcgctgtcccagaccagttccggggcgcaaacatgcacgcgcagatcaa
 gacgagcctgcaccgctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctgcg
 tgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggg
 gtgtcgctccagacctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcat
 atga (SEQ ID NO:111).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:11.

Как обсуждалось выше, предложен гетеродимер, который содержит первую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:112, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:12.

II.G.2. HSA-(G₄S)₄-GDF15.

Определение "HSA-(G₄S)₄-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:18 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-(G₄S)₄-GDF15, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

- (a) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;
- (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и
- (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:18, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:111.

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:112.

II.G.3. HSA-GSPAPAPGS-GDF15.

Определение "HSA-(GSPAPAPGS)-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:113 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-(GSPAPAPGS)-GDF15, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

- (a) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;
- (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и
- (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность GSPAPAPGS (SEQ ID NO:113),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF-15 с С-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI¹AF²AQYLQ³QCPFEDHVKLVNEVTEFA
KTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE⁴IARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFT⁵ECQAADKAACLLPKLDEL⁶RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT⁷KVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLECKECP⁸PLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV⁹VLLLRLLA
KTYETTTLEKCCAAADPH¹⁰ECYAKVFDEFKPLVEEPQNL¹¹IKQNC¹²ELFEQLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYL¹³SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD¹⁴ETYPVK
EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSPAPAPGSARNGDH
CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN
MHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD¹⁵TGVSLQTYDDLLA
KDCHCI (SEQ ID NO:115),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaggttgctcatcgatttaaagatttgggagaaga
 aaatttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagt
 gtccatttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgca
 aaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttca
 taccctttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct
 atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaa
 tgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgag
 accagaggttgatgtgatgtgactgcttttcatgacaatgaagagacat
 ttttgaaaaataacttatatgaaattgccagaagacatccttacttttat
 gccccggaactccttttctttgctaaaagggtataaagctgcttttacaga
 atgttgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaaagctcgatg
 aacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgccaacagagactcaagtgt
 gccagtctccaaaaatttgagaaagagctttcaaagcatgggcagtagc
 tcgcctgagccagagatttcccaaagctgagtttgagaagtttccaagt
 tagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatggagatctg
 cttagatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaa
 tcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaaatgctgtgaaaaacctctgt
 tggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgct
 gacttgcccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaa
 aaactatgctgaggcaaggatgtcttcctgggcagtgttttgatgaat
 atgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgcc
 aagacatatgaaaccactctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctca
 tgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaaacctcttggtggaagagc
 ctgagaatttaatacaacaaaattgtgagctttttgagcagcttgagag
 tacaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaagtacccca
 agtgtaactccaactccttgtagaggtctcaagaaacctaggaaaagtgg
 gcagcaaatgttgtaaacatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaa
 gactatctatccgtggtcctgaaccagttatgtgtgttgcatgagaaaac
 gccagtaagtgcagagtcaccaaagtgtgcacagaatccttggtgaaca
 ggcgaccatgctttttagctctggaagtcgatgaaacatacgttcccaaa
 gagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacactttc
 tgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggtgagctcgtga
 aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgat
 ttcgcagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctg
 ctttgccgaggagggtaaaaaacttggtgcgccagtcaggccgccttag
 gcttaggatccccagctccagctccagggaagcgcgcaacggagaccac
 tgtccgctcgggcccggttgctgccgtctgcacacggtccgcgctc
 gctggaagacctgggctgggctgattgggtgctgtcgccacgggaggtgc
 aagtgaccatgtgcatcgcgcggtgcccagaccagttccgggaggcaaac
 atgcacgcgagatcaagacgagcctgcaccgctgaagcccagacgggt
 gccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattc
 aaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacctatgatgacttgtagcc
 aaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:114).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:115.

II.G.4. HSA-GS(PAPAP)₂GS-GDF15.

Определение "HSA-GS(PAPAP)₂GS-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:116 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-GS (PAPAP)₂GS-GDF15, соединенных посредством междоцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

- (a) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;
- (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и
- (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность GSPAPAPP APAPGS (SEQ ID NO:116),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF-15 с C-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI~~AF~~AQYLQ~~Q~~CPFEDHVKLVNEVTEFA
 KTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
 CFLQHKKDDNP~~N~~LPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFY
 APELLFFAKRYKAAFT~~EC~~QAAADKAACLLPKLDEL~~R~~DEGKASSAKQRLKC
 ASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT~~K~~VHTECCHGDL
 LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPA
 DLP~~S~~LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV~~V~~LLRLA
 KTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL~~I~~KQNC~~E~~LFEQLGE
 YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
 DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD~~E~~TYVPK
 EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
 FAAFVEKCKADDKETCF~~AE~~EGKKLVAASQAALGL~~G~~SPAPAPPAPAPGSA
 RNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
 FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD~~T~~GVSLQTY

DDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:118),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaggttgctcatcgatttaagatttgggagaaga
 aaatttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagt
 gtccatttgaagatcatgtaaaattagtgatgaagtaactgaatttgca
 aaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttca
 taccctttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct
 atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaa
 tgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgag
 accagaggttgatgtgatgtgcactgctttcatgacaatgaagagacat
 ttttgaaaaatacttatatgaaattgccagaagacatccttacttttat
 gccccggaactccttttctttgctaaaaggataaagctgcttttacaga
 atgttgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaaagctcgatg
 aacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgccaaacagagactcaagtgt
 gccagtctccaaaaatttgagaaagagctttcaaagcatgggcagtagc
 tcgcctgagccagagatttcccaaagctgagtttgagaagtttccaagt
 tagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatggagatctg
 cttgaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaa
 tcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctctgt
 tggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgct
 gacttgccctcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaa
 aaactatgctgaggcaaaggatgtcttcctgggcatgtttttgtatgaat
 atgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgcc
 aagacatatgaaacctctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctca
 tgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaacctcttgaggaaagc
 ctgagaatttaatacaacaaaatttgtagctttttgagcagcttgagag
 taaaaattccagaatgcgctattagttcggttacaccaagaaagtaccca
 agtgtcaactccaactcttgtagaggtctcaagaaacctaggaaaagtgg
 gcagcaaatgttgtaaacatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaa
 gactatctatccgtggtcctgaaccagttatgtgtgttgcatgagaaaaac
 gccagtaagtgcagagtcaccaaagtctgcacagaatccttggtgaaca
 ggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatgaaacatacggttcccaa
 gagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacacttct
 tgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggtgagctcgtga
 aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgat
 ttctgcagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctg
 ctttgccgaggagggtaaaaaacttggtgcgccagtcaggccgccttag
 gcttaggatccccagctccagctccacccgcacctgccccggaagcgcg
 cgcaacggagaccactgtccgctcgggcccgggctgtgctgccgtctgca
 cacggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccagttgggtgctgt
 cgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgctgcccagaccag
 ttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcct
 gaagcccagacaggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatc
 ccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgtccagacctat
 gatgacttggttagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:117).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:118.

II.G.5. HSA-GSAAQAAQGS-GDF15.

Определение "HSA-GSAAQAAQGS-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который

содержит последовательность SEQ ID NO:119 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-GSAAQAAQQGS-GDF15, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гомодимер содержит:

(a) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;

(b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и

(c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность GSAAQAAQQGS (SEQ ID NO:119),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFA
KTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDL
LECADRADLAKYICENQDISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLA
KTYETTTLEKCCAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK
EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSAAQAAQQGSARNG
DHCP LGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:121),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaggttgctcatcgatttaagatttgggagaaga
aaatttcaaagccttggtgattgaccttgctcagtatcttcagcagt
gtccatttgaagatcatgtaaaattagtgaaatgaagtaactgaatttgca
aaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttca
taccctttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct
atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaa
tgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaacctccccgattggtgag
accagaggttgatgtgatgtgcactgcttttcatgacaatgaagagacat
ttttgaaaaatacttatatgaaattgccagaagacatccttacttttat
gccccggaactccttttcttgctaaaaggatataaagctgcttttacaga
atgttgccaagctgctgataaagctgcctgctgttgccaagctcgatg
aacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgccaacagagactcaagtgt
gccagctctccaaaaatttgagaaagagctttcaaagcatgggcagtagc
tcgcctgagccagagatttcccaaagctgagtttgagaagtttccaagt
tagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatggagatctg
cttgaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaa

tcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctctgt
 tggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaatgatgagatgcctgt
 gacttgccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaa
 aaactatgctgaggcaaaaggatgtcttcctgggcatgtttttgatgaat
 atgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgcc
 aagacatatgaaaccactctagagaagtgtgtgccgctgcagatcctca
 tgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaaaccctcttggaagagc
 ctcaagaatttaatacaaaaaattgtgagctttttgagcagcttgagag
 taaaaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaagtacccca
 agtgtcaactccaactctttagaggtctcaagaaacctaggaaaagtgg
 gcagcaaatgttgtaaaccatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaa
 gactatctatccgtggtcctgaaccagttatgtgtgttgcagagaaaaac
 gccagtaagtgcagagtcaccaaagtgtgcacagaatccttggtgaaca
 ggcgaccatgcttttcagctctggaagtgcgatgaaacatacggttccaaa
 gagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacactttc
 tgagaaggagagacaaaatcaagaaacaaactgcacttgttgagctcgtga
 aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgat
 ttgcgagctttttagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctg
 ctttgccgaggagggtaaaaaacttgttgccggcagtcaggccgccttag
 gcttaggatccgcccgtcaggctgcacagcaaggaagcgcgcgcaacgga
 gaccactgtccgctcgggcccgggctgtgcccgtctgcacacggtccg
 cgcgtcgtggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacggg
 aggtgcaagtgcacatgtgcacgctgcccgcgtgcccagccagttccgggcg
 gcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccga
 cacggtgccagcgcctgtgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgc
 tcattcaaaagaccgacaccggggtgtcgtccagacctatgatgacttg
 ttagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:120) .

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:121.

II.G.6. HSA-GS (AAQAAQQ)₂GS-GDF15.

Определение "HSA-GS (AAQAAQQ)₂GS-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:122 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-GS(AAQAAQQ)₂GS-GDF15, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

- (a) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;
- (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и
- (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность

GSAAQAAQQAAQAAQQGS (SEQ ID NO:122) ,

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF-15 с C-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA
KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLLRLA
KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEDQNLIKQNC ELFQLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK
EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL GSAAQAAQAAQAAQ
QGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA
CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS
LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:124),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaggttgctcatcgatttaaagatttgggagaaga
aaatttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagt
gtccatttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgca
aaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttca
taccctttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct
atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaa
tgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgag
accagaggttgatgtgatgtgactgcttttcatgacaatgaagagacat
ttttgaaaaataacttatatgaaattgccagaagacatccttacttttat
gccccggaactccttttcttgctaaaagggtataaagctgcttttacaga
atgttgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaaagctcgatg
aacttcgggatgaaggggaaggcttcgtctgccaacagagactcaagtgt
gccagctctccaaaaatttgagaaagagctttcaaagcatgggcagtagc
tcgcctgagccagagatttcccaaagctgagtttgagaagtttccaagt
tagtgacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatggagatctg
cttgaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaa
tcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaaatgctgtgaaaaacctctgt
tggaataatcccactgcattgccgaagtggaaatgatgagatgcctgct
gacttgccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaa
aaactatgctgaggcaaaggatgtcttcctgggcatgtttttgtatgaat
atgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgcc
aagacatatgaaacctctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctca
tgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaaacctctgtggaagagc
ctcagaatttaatacaacaaaaattgtgagctttttgagcagcttgagag
tacaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaagtacccca
agtggtcaactccaactcttgtagaggctcaagaaacctaggaaaagtgg
gcagcaaatgttgtaaacatcctgaagcaaaaagaatgcctgtgcagaa
gactatctatccgtggctcctgaaccagttatgtgtgttgcatgagaaaac
gccagtaagtgcagagtcaccaaagtctgcacagaatccttggtgaaca
ggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatgaaacatacgttcccaaa
gagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacactttc
tgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttgttgagctcgtga
aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgat
ttcgcagctttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctg
ctttgccgaggagggtaaaaaacttgttgccggccagtcaggccgccttag
gcttaggatccgcccgtcagggtgcacagcaagcagcccaagcagctcag
caggggaagcgcgcgcaacggagaccactgtccgctcgggcccggcggttg
ctgccgtctgcacacggctccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggccc
attgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgcg
tgcccagccagttccggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgag
cctgcaccgcctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccg
ccagctacaatcccattggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgtcg
ctccagacctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID

NO:123) .

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:124.

II.G.7. HSA-GGNAEAAAKEAAAKEAAAKAGG-GDF15.

Определение "HSA-GGNAEAAAKEAAAKEAAAKAGG-GDF15" в настоящем изобретении означа-

ет гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:125 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-GGNAEAAAKEAAAKEAAAKAGG-GDF15, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

- (a) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;
- (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и
- (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность:

GGNAEAAAKEAAAKEAAAKAGG (SEQ ID NO:125),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF-15 с С-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFA
KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLLRLA
KTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG E
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPK
EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAALGLGGNAEAAAKEAAAKE
AAAKEAAAKAGGARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVL
IQKTDGTGVSLSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:127),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaagggtgctcatcgatttaaagatttgggagaaga
aaatttc aaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagt
gtccatttgaagatcatgtaaaattagtgaaatgaagtaactgaatttgca
aaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttca
taccctttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct
atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaa
tgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgag
accagaggttgatgtgatgtgcactgcttttcatgacaatgaagagacat
ttttgaaaaataacttatatgaaattgccagaagacatccttacttttat
gccccggaactcctttttcttgctaaaaaggtataaagctgcttttacaga
atgttgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaagctcgatg
aacttcgggatgaagggaggcttcgtctgccaacagagactcaagtgt
gccagtctccaaaaatttggagaaagagctttcaagcatgggcagtagc
tcgcctgagccagagatttcccaaagctgagtttgagaagtttccaagt
tagtgacagatcttacc aaagtcacacggaatgctgccatggagatctg
cttgaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaa
tcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctctgt

tggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgct
 gacttgccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaa
 aaactatgctgaggcaaaggatgtcttcctgggcatgtttttgatgaat
 atgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttggc
 aagacatatgaaaccactctagagaagtgtgtgccgctgcagatcctca
 tgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaaacctcttgggaagagc
 ctgagaatttaatacaaaaaattgtgagctttttgagcagcttgagag
 taaaaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaagtacccca
 agtgtcaactccaactctttagaggtctcaagaaacctaggaaaagtgg
 gcagcaaatgttgtaaacatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaa
 gactatctatccgtggtcctgaaccagttatgtgtgttgcatgagaaaac
 gccagtaagtgcagagtcaccaaagtgtgcacagaatccttggtgaaca
 ggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatgaaacatacgttcccaa
 gagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacactttc
 tgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttgttgagctcgtga
 aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgat
 ttgcgagctttttagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctg
 ctttgccgaggagggtaaaaaacttgttgccgagtcaggccgccttag
 gcttaggaggcaacgccgaggctgccgctaaggaagccgctgccaaggag
 gccgcagcaaaagaggctgcagctaaggccggaggagcgcgcaacggaga
 ccaactgtccgctcgggccggggtgtgctgctgacacgggtccgctg
 cgtcgtggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggag
 gtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagccagttccgggccc
 aaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccagaca
 cgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctc
 attcaaaagaccgacaccggggtgtcgtccagacctatgatgacttgtt
 agccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:126).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:127.

II.G.8. HSA-(G₄S)₆-GDF15.

Определение "HSA-(G₄S)₆-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:128 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-(G₄S)₆-GDF15, соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гомодимер содержит:

- (a) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;
- (b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и
- (c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность:

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:128),

каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF-15 с С-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA
 DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA
 KTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
 CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY
 APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKC
 ASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL
 LECADDRADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
 DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLA
 KTYETTL EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE
 YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
 DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK
 EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
 FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGS
GGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS
 PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
 MVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:130),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaggttgctcatcgatttaaagatttgggagaaga
 aaatttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagt
 gtccatttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgca
 aaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttca
 taccctttttggagacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacct
 atggtgaaatggctgactgctgtgcaaaaacaagaacctgagagaaatgaa
 tgcttcttgcaacacaaaagatgacaacccaaacctccccgattggtgag
 accagaggttgatgtgatgtgcactgcttttcatgacaatgaagagacat
 ttttgaaaaataactttatatgaaattgccagaagacatccttacttttat
 gccccggaactccttttcttgctaaaaaggataaaagctgcttttacaga
 atgttgccaagctgctgataaagctgcctgctgttgccaaagctcgtatg
 aacttcgggatgaaggggaaggcttcgtctgccaaacagagactcaagtgt
 gccagtctccaaaaatttgagaaagagctttcaaagcatgggcagtagc
 tcgcctgagccagagatttcccaaagctgagtttgcaagaagtttccaagt
 tagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatggagatctg
 cttgaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgtgaaaa
 tcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctctgt
 tggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaatgatgagatgcctgct
 gacttgcttccattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaa
 aaactatgctgaggcaaggatgtcttcctgggcatgtttttgtatgaat
 atgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgcc
 aagacatatgaaacctctagagaagtgtgtgccgctgcagatcctca
 tgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaaacctcttggtgaagagc
 ctcaagaatttaatacaaaaaattgtgagctttttgagcagcttgagag
 taaaaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaagtacccca
 agtgtcaactccaactcttgtagaggtctcaagaaacctaggaaaagtgg
 gcagcaaatgttgtaaaccatcctgaagcaaaaagaatgccctgtgcagaa
 gactatctatccgtggtcctgaaccagttatgtgtgttgcatgagaaaac
 gccagtaagtgcagagtcaccaaagctgcacagaatccttggtgaaca
 ggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatgaaacatacgttcccaa
 gagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagatatatgcacactttc
 tgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggtgagctcgtga
 aacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttatggatgat
 ttgcagctttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggagacctg
 ctttgccgaggagggtaaaaaacttggtgcgccagtcaggccgccttag
 gcttaggaggtggtggtctgtagggcggtggaagcgaggcggtggtatcc
 ggaggcggtggaagcgagggtggtggtatctgtagggcggtggaagcgcg
 caacggagaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcaca
 cgggtccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggcccagattgggtgctgctg
 ccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgcgtgcccgagccagtt
 ccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctga
 agcccgacacgggtgccagcgccctgctgctgctgcccgcagctacaatccc
 atggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgtcgctccagacctatga
 tgacttgtagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:129).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:130.

II.G.9. HSA-GS(AAQAAQQ)₂GS-GDF15(N3D).

Определение "HSA-GS(AAQAAQQ)₂GS-GDF15(N3D)" в настоящем изобретении означает гибри-

ный белок, содержащий полипептид GDF15(N3D), соединенный с полипептидом HSA посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:122 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом полипептида HSA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два гибридных белка HSA-GS(AAQAQQ)₂GS-GDF15(N3D), соединенных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

- (а) два полипептида HSA (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:110;
- (b) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52; и
- (с) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:122, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом полипептида HSA посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFA
KTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPNLPRLVPRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLA
KTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAE
DYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPK
EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSAAQAAQAAQAAQ
QGSARDGDHCPGLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA
CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS
LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:242),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gatgcacacaagagtgaggttgctcatcgatttaagatttg
gagaagaaaatttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatctt
cagcagtggtccatttgaagatcatgtaaaattagtgaaatgaagtaactga
atttgcaaaaacatgtgttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaat
cacttcatacccttttttgagacaaattatgcacagttgcaactcttcgt
gaaacctatggtgaaatggctgactgctgtgcaaaacaagaacctgagag
aaatgaatgcttcttgcaacacaaagatgacaacccaaacctccccgat
tggtgagaccagaggttgatgtgatgtgactgcttttcatgacaatgaa
gagacatttttgaaaaatacttatatgaaattgccagaagacatcctta
cttttatgccccggaactccttttctttgctaaaaggtataaagctgctt
ttacagaatggtgccaagctgctgataaagctgcctgcctgttgccaag
ctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgccaacagagact
caagtggtgccagtcctcaaaaatttgagaaagagctttcaaagcatggg
cagtagctgcctgagccagagatttcccaaagctgagtttgagaagtt
tccaagtttagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatgg
agatctgcttgaaatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatct

```

gtgaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaa
cctctgttggaataatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagat
gcctgtgacttgccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatg
tttgcaaaaactatgctgaggcaaggatgtcttctgggcatgtttttg
tatgaatatgcaagaaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgag
acttgccaagacatatgaaaccactctagagaagtgtgtgccgctgcag
atcctcatgaatgctatgccaaagtgttcgatgaatttaaacctcttgtg
gaagagcctcagaatttaatacaaaaaaattgtgagctttttgagcagct
tgagaggtacaaattccagaatgcgctattagttcgttacaccaagaaag
taccccaagtgtcaactccaactctttagaggtctcaagaaacctagga
aaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctgaagcaaaaagaatgccctg
tgcaagaagactatctatccgtggctcctgaaccagttatgtgtgttgcatg
agaaaacgccagtaagtgcagaggtcaccaaatgctgcacagaatccttg
gtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtgcagtaaacatacgt
tcccaaagagtttaagtctgaaacattcaccttccatgcagatatatgca
cactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggtgag
ctcgtgaaacacaaagcccaaggcaacaaaagcaactgaaagctgttat
ggatgatttgcagctttttagagagaagtgtgcaaggctgacgataagg
agacctgctttgccgaggagggtaaaaaacttggtgcgccagtcaggcc
gccttaggcttaggatccgccgctcagggtgcacagcaagcagcccaagc
agctcagcagggaagcgcgcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccgc
ggcgttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgctggtggaagacctgggc
tgggccgattgggtgctgctgcacacgggaggtgcaagtaccatgtgcat
cggcgcgtgcccagccagttccggggcggaacatgcacgcgcagatca
agacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcgcctgctgc
gtgcccgcagctacaatcccagtggtgctcattcaaaagaccgacaccgg
gggtgctgctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgca
ta (SEQ ID NO:241).

```

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два гибридных белка, содержащих последовательность SEQ ID NO:242.

П.Н. Конструкции с мутациями для корректирования аффинности связывания с FcγR.

Было обнаружено, что определенные мультимеры с мутацией "charged pair" (delHinge) демонстрируют связывание с рецептором Fcγ (FcγR), в частности с FcγRI и FcγRIII. См., например, пример 7. В некоторых случаях аффинность связывания с FcγR была сравнима с аффинностью, наблюдаемой для мультимеров, содержащих шарнирную область. Данный факт стал неожиданностью, поскольку рецептор Fcγ взаимодействует с шарнирной областью, а данные мультимеры представляют собой мультимеры "del-Hinge", как описано выше, в которых отсутствует шарнирная область целиком или ее часть. Мутационный анализ остатков Fc, вовлеченных в связывание с FcγR, позволил предположить, что основной сайт взаимодействия расположен в шарнирной области и CH2-домене (Tamm A., 1997, *Int. Rev. Immunol.* 16:57-85). См. также публикации Radaev S. et al., *J. Biol. Chem.* 276:16469-16477; Sondermann P. et al., 2000, *Nature* 406:267-273.

Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), иммунный ответ, опосредованный преимущественно клетками естественными киллерами (natural killer, NK), у человека зависит от взаимодействия FcγR, в особенности FcγRIIIA человека, с Fc-доменом антитела или Fc-содержащего белка. При ADCC связывание Fc с FcγRIII на поверхности клетки NK активирует клетку NK, которая высвобождает перфорины и гранзимы.

Соответственно, предложены конструкции, содержащие дополнительные модификации для модулирования взаимодействия конструкции с FcγR. Согласно одному ряду вариантов реализации настоящего изобретения мутацию аспарагина на глицин (N297G) вводят в нативную Fc или вариант Fc, в том числе в различные Fc-домены, описанные выше. В результате мутации N297G удаляют консервативный сайт N-гликозилирования в CH2-домене.

Согласно другому ряду вариантов реализации настоящего изобретения дополнительные N-терминальные аминокислотные остатки удаляют из Fc-домена, из которого была удалена шарнирная область целиком или ее часть. Например, аминокислотную последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:303)

получают посредством делеции аминокислотных остатков, N-терминальных относительно G236 Fc-домена IgG1 дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения C-терминальный лизин (K447) в данном варианте Fc может быть необязательно удален. Аминокислотную последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:304)

получают посредством делеции аминокислотных остатков, N-терминальных относительно G237 Fc-домена IgG1 дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения C-терминальный лизин (K447) в данном варианте Fc может быть необязательно удален. Аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTKQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:305)

получают посредством делеции аминокислотных остатков, N-терминальных относительно P238 Fc-домена IgG1 дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения C-терминальный лизин (K447) в данном варианте Fc может быть необязательно удален.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(-), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(-)(N297G)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(+), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(+)(N297G)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(-)(Y349C), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(+)(S354C), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(+)(N297G)(S354C)").

Согласно другому варианту реализации изобретения предложен домен DhCpmFc(+)(Y349C), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(+)(N297G)(Y349C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(-)(S354C), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(-)(N297G)(S354C)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(+)(L351C), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(+)(N297G)(L351C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(-)(L351C), в который была введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(-), в который была введена мутация аланина на цистеин (A287C) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(-)(A287C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(+), в который была введена мутация аланина на цистеин (A287C) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(+)(A287C)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен DhCpmFc(-), в который была введена мутация лейцина на цистеин (L306C) (в настоящей заявке данный домен называют "DhCpmFc(-)(L306C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен

называют "GG-Dh2CpmFc(+)(N297G)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен GG-Dh2CpmFc(-), в который была введена мутация тирозина на цистеин (Y349C) (в настоящей заявке данный домен называют "GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен GG-Dh2CpmFc(+), в который была введена мутация серина на цистеин (S354C) (в настоящей заявке данный домен называют "GG-Dh2CpmFc(+)(S354C)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен GG-Dh2CpmFc(+), в который была введена мутация тирозина на цистеин (Y349C) (в настоящей заявке данный домен называют "GG-Dh2CpmFc(+)(Y349C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен GG-Dh2CpmFc(-), в который была введена мутация серина на цистеин (S354C) (в настоящей заявке данный домен называют "GG-Dh2CpmFc(-)(S354C)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен Dh2CpmFc(-), в котором к N-концу был добавлен глицин (в настоящей заявке данный домен называют "Dh3CpmFc(-)(N297G)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен Dh2CpmFc(+), в котором к N-концу был добавлен глицин (в настоящей заявке данный домен называют "Dh3CpmFc(+)(N297G)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен Dh3CpmFc(-), в который была введена мутация тирозина на цистеин (Y349C) (в настоящей заявке данный домен называют "Dh3CpmFc(-)(Y349C)"). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен домен Dh3CpmFc(+), в который была введена мутация серина на цистеин (S354C) (в настоящей заявке данный домен называют "Dh3CpmFc(+)(S354C)").

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в DhMonoFc-домен введена мутация аспарагина на глицин (N297G) (в настоящей заявке называют "DhMonoFc(N297G)").

II.H.1. DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с C-концом домена DhCpmFc(-)(N297G), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSAFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:287),

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSAFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:132),

и (c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSAFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPGLPGRCRRLHTVRSLEDLGWADWVLSRP
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMV
LIQKTDGTGVSQTQYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:134),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtacgg
 gagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccg
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
 agaccactgtccgctcggggccggcgttgctgacctctgcacacggtcc
 gcgctgctggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgg
 gaggtgcaagtgacctgtgcatcgccgctgcccagccagttccgggc
 ggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgctgaagccc
 acacggtgccagcgcctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtg
 ctcatcctaaaagaccgacaccgggtgctgctccagacctatgatgactt
 gtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:133) .

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:131) ,

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcctcttccccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtgg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtacgg
 gagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtacaccctgccccatcccgggaaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccg
 gctgaagtccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
 atga (SEQ ID NO:135) .

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:134, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:131.

II.H.2. DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую последователь-

ность GDF15(N3D), N-конец которой соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:287,

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:132, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
PMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:137),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacggtcagtccttctcttccccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgtggtgg
tgagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgctggaggagcagtagcg
gagcagtagcgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgc
gcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccggcggtgctgcccgtctgc
acacgggtccgcgctgctggaagacctggggtggccgattgggtgctg
tcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgcgcgctgcccagacca
gttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcc
tgaagcccagacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat
cccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgctgctccagacct
tgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:136).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:135.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:137, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:131.

II.Н.3. DhCpmFc(-)(N297G)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид

GDF15(N3D), соединенный с доменом DhCpmFc(-)(N297G) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:58 и который соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G).

Согласно определенным вариантам реализации изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)-G₄-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:287,

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:132,

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52, и

(d) два полипептидных линкера (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:58, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15(N3D) с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G) посредством пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPFVLDSGSEFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGARDGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWA
DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:139),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacgcgtcagctctcctcttccccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtgg
tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacgg
gagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaaactacgacaccacgcctcccggt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
aggtggtggagcgcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccggggtt
gctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggcc
gattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgc
gtgcccagaccagttccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacga
gcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgcgtgcc
gccagctacaatcccatggtgctcatcctcaaaagaccgacaccgggtgtc
gctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID

NO:138) .

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:135.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:139, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:131.

II.Н.4. DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Nde13):DhCpmFc(+)(N297G)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Nde13):DhCpmFc(+)(N297G)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Nde13), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С349 первой полипептидной цепи и С354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Nde13):DhCpmFc(+)(N297G)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

```

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSAFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:288),

```

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

```

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSAFLYSLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:141),

```

и (c) два полипептида GDF15(Nde13) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

```

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSAFLYSLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPGLPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMV
LIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:143),

```

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggaccgtcagtccttctcttcccccaaaacc
 caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgtgtg
 tggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagagcagtacgg
 cagcacgtaccgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
 tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
 ggtgtgcaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagacaactacgacaccacgcctcccg
 gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgg
 agaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcacacggtcc
 gcgcgtcgctggaagacctgggctggccgattgggtgctgtcgccacgg
 gaggtgcaagtgacatgtgcatcgccgctgcccagccagttccgggc
 ggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccc
 acacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccgccagctacaatcccatggg
 ctcatcctcaaaagaccgacacccgggtgtcgctccagacctatgatgactt
 gttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:142).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:140),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gccccagagctgcttgggtggaccatccgtgttcctgtttcctccaaagcc
 gaaggacaccctgatgatctcaagaactccggaagtgacttgctgcgtcg
 tggacgtgtcacatgaggatccagaggtcaagttcaattggatgtggac
 ggagtggaaagtgcataacgccaagaccaaaccgccaagaacagtacgg
 gagcacctaccgctgggtgagcgtccttactgtgctccaccaggactggc
 ttaatgggaaggaatacaagtgtgaaggtgtccaacaaggccctccccgt
 cccatcgaaaagaccatctcaaaggcaaaggggaaccaaggggaacctca
 agtgtacaccctgcctccgtgcaggaaggagatgaccaagaaccaggtca
 gcctgacttgctcgtgaagggttctatcccagcgatattgctgtggaa
 tgggagtcaaattggccagcccagagaataactacaaaactacccacccgt
 gctgaaatctgatgggtccttcttcttactccaagctgaccgtggaca
 agagccgctggcaacaaggcaatgtctttagctgctcagtgatgcatgag
 gctctccataatcactacactcagaagtcactgtccctgtctccgggtaa
 a (SEQ ID NO:144).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:143, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:140.

II.H.5. DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(S354C).

Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первой полипептидной цепи и C354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(N297G)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(а) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:288,

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C), содержащих последовательность SEQ ID NO:141, и

(с) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVL
SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
PMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:146),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtgg
tggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagcgg
gagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtgcaccctgcccccatcccgggagagatgaccaagaaccaggtca
gcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tggtgagagcaatgggcagccggagagaacaactacgacaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgc
gcgcgacggagaccactgtccgctcggggcccggtgtgctgccgtctgc
acacgggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggccgattgggtgctg
tcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgcgctgcccagacca
gttccggggcgcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcc
tgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat
cccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacct
tgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:145).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:140, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:144.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:146, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:140.

II.Н.6. DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L351C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L351C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержа-

щую полипептид GDF15(Nde13), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(L351C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(L351C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C351 первой полипептидной цепи и C351 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(Nde13): DhCpmFc(+)(N297G)(L351C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(а) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(L351C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:289),

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(L351C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:148),

и (с) два полипептида GDF15(Nde13) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGARNGDHCPLGPRCCRLHTRASLEDLGWADWVL
SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
PMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:150),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcgccggaactgctggcgccgagcgtgtttctgtttccgccgaaacc
gaaagataccctgatgattagccgcaccccggaagtgcctgctggtg
tgatgtgagccatgaagatccggaagtgaatttaactggtatgtggt
ggcgtggaagtgcataacgcgaaaacaaaccgcgcgaagaacagtatgg
cagcacctatcgctggtgagcgtgctgaccgtgctgcatcaggattggc
tgaacggcaagaataataaatgcaaagtgcgaacaaagcgtgccggcg
ccgattgaaaaaacattagcaaagcgaaaggccagccgcgaaccgca
ggtgtatacctgcccgcgagccgcaaagaatgacaaaaaccaggtga
gcctgacctgcctggtgaaaggcttttatccgagcgatattgcggtgga

tgggaaagcaacggccagccggaaaacaactataaaaccaccccgccggt
gctgaaaagcgatggcagcttttttctgtatagcaaactgaccgtggata
aaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatgatgaa
gcgctgcataaccattatacccagaaaagcctgagcctgagcccgggcgc
gcgcaacggcgatcattgcccgctggggccgggcccgtgctgccgcctgc
ataccgtgcgcgcgagcctggaagatctgggctgggcgattgggtgctg
agcccgcggaagtgcaggtgaccatgtgcattggcgctgcccagagcca
gtttcgcgggcgaacatgcatgcgagattaaaaccagcctgcatcgcc
tgaaaccgggataccgtgccggcgccgtgctgctgcccggcgagctataac
ccgatgggtgctgattcagaaaaccgataccggcgctgagcctgcagaccta
tgatgatctgctggcgaaagattgccattgcatt (SEQ ID NO:149).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTIKAKGQPREPQVYTCPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:147),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggacgcgtcagcttctcttccccccaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgg
tgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtagc
gagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacacctgtcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtca
gcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggaca
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaa
a (SEQ ID NO:151).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:150, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:147.

II.Н.7. DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L351C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L351C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(L351C) посредством пептидной связи, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(L351C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C351 первой полипептидной цепи и C351 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L351C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(L351C) (в каждом гетеродимере), содержащих последователь-

ность SEQ ID NO:289,

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(L351C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:148, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTKISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTRVRSLEDLGWADWVL
SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYN
PMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:153),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcgcccgaactgctggcgcccgagcgtgtttctgtttccgccgaaacc
gaaagataccctgatgattagccgcaccccggaagtgacctgctggtgg
tggtatgtgagccatgaagatccggaagtgaatttaactggtatgtggat
ggcgtggaagtgcataacgcgaaaaccaaaccgcgcgaagaacagtatgg
cagcacctatcgctggtgagcgtgctgacctgctgcatcaggattggc
tgaacggcaagaatataaatgcaaagtgcgaacaaagcgtgccggcg
ccgattgaaaaaacatttagcaaagcgaaaggccagccgcgcaaccgca
ggtgtatacctgcccgcgagccgcaagaatgacaaaaaacagggtga
gcctgacctgcctggtgaaaggcttttatccgagcgatattgcggtgaa
tgaggaaagcaacggccagccggaacaaactataaacaccccgccggt
gctgaaaagcgatggcagcttttttctgtatagcaaactgacctggata
aaagccgctggcagcagggcaacgtgttagctgcagcgtgatgcataa
gcgctgcataaccattataccagaaaaagcctgagcctgagccggggcg
gcgcatggcgatcattgcccgcgtggcccgggccgctgctgccgcctgc
atacctgctgcgcgagcctggaagatctgggctggcggtggtgctg
agcccgcgcaagtgcaggtgacctgtgcatggcgctgcccagacca
gtttcgcgggcgcaacatgcattgcgcagattaaaaccagcctgcacgcc
tgaaaccggataccgtgccggcgccgtgctgctgcccggcgagctataac
ccgatggtgctgattcagaaaaccgataccggcgtgagcctgcagaccta
tgatgatctgctggcgaaagattgccattgcatt (SEQ ID NO:152).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:147, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:151.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:153, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:147.

II.Н.8. DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(L306C).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(L306C) (в каждом гетеродимере), содержащих последо-

вательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:290),

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:268),

и (c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALPAP
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPGLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSR
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMV
LIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:269),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttcccc
caaaacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgc
gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataattgcaagacaaagccgaggagagc
agtacggcagcagctaccgtgtggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccct
cccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
aaccacaggtgtacaccctgccccatcccgaggagatgaccaagaac
caggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
cgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacgacaccacgc
ctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctacc
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtggagaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcac
acgggtccgcgctcgtggaagacctgggtgggcccattgggtgctgtc
gccacgggaggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgctgccgagccagt
tccgggcccgaacatgcacgcgagatcaagacgagcctgcaccgcctg
aagcccgacacgggtgccagcgcctgctgctgcccgcagctacaatcc
catggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgtccagacctatg
atgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:270).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTV LHQDLNKGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:267),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggaccgtcagtccttctcttcccc
 caaaacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgc
 gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
 cgtggacggcgtggaggtgcataattgcaagacaaagccgaggaggagc
 agtacggcagcacgtaccgtgtggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccct
 cccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
 aaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgctgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
 cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
 ctcccgctgtgaagtccgacggctccttcttctctatagcaagctcacc
 gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
 gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
 cgggtaaa (SEQ ID NO:271).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:269, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:267.

II.Н.9. DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(L306C).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(а) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(L306C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:290,

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:268, и

(с) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTV LHQDLNKGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPPV LKSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYN
 PMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:272),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcttcccc
 caaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgc
 gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
 cgtggacggcgtggaggtgcataattgcaagacaaagccgaggagagc
 agtacggcagcacgtaccgtgtggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaagccct
 cccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
 aaccacaggtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
 cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgc
 ctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcacc
 gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
 gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
 cgggtgcgcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccggcggtgctgc
 cgtctgcacacggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccattg
 ggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgcgtgcc
 cgagccagttccggcgcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctg
 caccgctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcag
 ctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacccgggtgctcgtcc
 agacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:273).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:267, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:271.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:272, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:267.

II.Н.10. DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(I306C)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALP
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:291),

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALP
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:275),

и (с) два полипептида GDF15(NdeI3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSR
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMV
LIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:276),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttcctcttcccc
caaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgc
gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtg
cgtggacggcgtggaggtgcataattgcaagacaaagccgaggagagc
agtacggcagcagctaccgtgtggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccct
ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
aaccacaggtgtgcaccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaac
caggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
cgtggagtgaggagcaatgggcagccggagagaacaactacgacaccacgc
ctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcacc
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
gcatgaggctctgcacaaccactacgcgagaagagcctctccctgtctc
cgggtggagaccactgtccgctcggggccggcggttgctgccgtctgcac
acggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggagcattgggtgctgtc
gccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagagccagt
tccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctg
aagcccagacaggtgccagcgccctgctgcgtgcccagcagctacaatcc
catggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacctatg
atgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:277).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:274),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttcccc
 caaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgc
 gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
 cgtggacggcgtggaggtgcataattgcaagacaaagccgaggaggagc
 agtacggcagcacgtaccgtgtggtcagcgtctgcaccgtgctccaccag
 gactggcttaatgggaaggaatacaagtgttaaggtgtccaacaaggccct
 ccccgctcccatcgaaaagaccatctcaaggcaaaggggcaaccaaggg
 aacctcaagtgtacaccctgcctccgtgcaggaaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacttgtctcgtgaagggttctatcccagcgatattgc
 tgtggaatgggagtgaaatggccagcccagagaataactacaaaactacc
 caccgtgctgaaatctgatgggtccttcttcttactccaagctgacc
 gtggacaagagccgctggcaacaaggcaatgtctttagctgctcagtgat
 gcatgaggctctccataatcactacactcagaagtcactgtccctgtctc
 cgggtaaa (SEQ ID NO:278).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:276, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:274.

II.H.11. DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C).

Определение "DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:291,

(b) два домена DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:275, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNCKTKPREEQYGSTYRVVSVCTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 PIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:279),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccc
 caaaaccaaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgc
 gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggt
 cgtggacggcgtggaggtgcataattgcaagacaagccgaggagagc
 agtacggcagcacgtaccgtgtggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccct
 cccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
 aaccacaggtgtgcaccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatccagcgacatcgc
 cgtggagtgggagagcaatgggagccggagacaactacgacaccacgc
 ctcccgctgtggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcacc
 gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
 gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
 cgggtgcgcgcgacggagaccactgtccgctcgggcccggcggttgcgc
 cgtctgcacacggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggcccattg
 ggtgctgtcggccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgctgcc
 cgagccagttccgggcccgaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctg
 caccgcctgaagcccgcacgggtgccagcgcctgctgctgcccgcag
 ctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgtcc
 agacctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:280).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:274, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:278.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:279, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:274.

II.H.12. Dh2CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+).

Определение "Dh2CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит

(a) два домена Dh2CpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:292),

(b) два домена Dh2CpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:155),

и (c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGGDHCPGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
 IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
 TVGSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:157),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttcctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctc
 ccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccacgaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc
 ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaag
 gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccg
 gagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctt
 cttcctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 cagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccactgtccgctcggggc
 cgggcgttgctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctggaagacctgg
 gctggggccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgc
 atcggcgcgctgcccagagccagttccggggcggaacatgcacgcgcagat
 caagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacacggtgccagcgccctgct
 gcgtgcccgcagctacaatcccattggtgctcattcaaaagaccgacacc
 ggggtgtcgctccagacctatgatgacttggttagccaaagactgccactg
 cata (SEQ ID NO:156).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLSKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:154),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttcctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctc

ccggacccttgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcacccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc
 ccggaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaag
 gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccg
 gagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctgaagtccgacggctcctt
 cttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 cagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO:158)

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:157, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:154.

II.Н.13. Dh2CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+).

Определение "Dh2CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-) посредством пептидной связи, и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:292,

(b) два домена Dh2CpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:155, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGARDGDHCPGLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
 TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQK
 TDTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:160),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagttcttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
 ccggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc
 ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaag
 gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccg
 gagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctt
 cttcctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacag
 cagaagagcctctcctgtctccgggtgcgcgcgacggagaccactgtcc
 gctcgggccccggcggtgtgctgctgacacgggtccgcgcgtcgctgg
 aagacctgggctggccgattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagt
 accatgtgcatcggcgcgtgcccagccagttccgggcggaacatgca
 cgcgcatgcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccacacgggtgccag
 cgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaag
 accgacacgggggtgctgctccagacctatgatgactgttagccaaaga
 ctgccactgcata (SEQ ID NO:159).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:154, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:158.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:160, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:154.

II.Н.14. Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(S354C).

Определение "Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С349 первой полипептидной цепи и С354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:293),

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:162),

и (c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
QKSLSLSPGGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
GVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:164),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
ccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc
ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcag
cgtcctcacctgctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
gcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgcaccctgccccatc
ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
gagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctt
cttcctctatagcgacctcacctggacaagagcaggtggcagcagggga
acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
cagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccactgtccgctcgggcc
cgggcgttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgctggaagacctgg
gctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgc
atcggcgcggtgcccagccagttccgggcggaacatgcacgcgcagat
caagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgct
gcgtgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacc
ggggtgctcgctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactg
cata (SEQ ID NO:163).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLSKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:161),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccatccgtgttcctgtttcctccaaagccgaaggacaccctgatgatctc
aagaactccggaagtgacttgctgctgctggacgtgtcacatgaggatc
cagaggtcaagttcaattggtatgtggacggagtggaagtgcataacgcc
aagaccaaaccggaagaacagtacaatagcacctaccgctgggtgag
cgtccttactgtgctccaccaggactggcttaatgggaaggaataacaagt
gtaaggtgtccaacaaggccctccccgctcccatcgaaaagaccatctca
aaggcaaaggggcaaccaagggaacctcaagtgtacacctgcctccgtg
caggaaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacttgtctcgtgaagg
gcttctatcccagcgatattgctgtggaatgggagtcaaattggccagccc
gagaataactacaaaactaccccaccgctgctgaaatctgatgggtcctt
cttcctttactccaagctgaccgtggacaagagccgctggcaacaaggca
atgtctttagctgctcagtgatgcatgaggctctccataatcactacact
cagaagtcactgtccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:165).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:164, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:161.

II.Н.15. Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(S354C).

Определение "Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С349 первой полипептидной цепи и С354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:293,

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:162, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQK
TDTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:167),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttcctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctc
ccggacccttgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc
ctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcag

cgctcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
gcaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgcaccctgcccccatc
ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccg
gagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctt
cttcctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
cagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgacggagaccactgtcc
gctcgggccccggcggttgcctgctgcacacgggtccgcgctcgtgg
aagacctgggctgggcccattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagt
accatgtgcatcgccgctgcccagccagttccgggcccgaacatgca
cgcgcatgcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccacacgggtgccag
cgccctgctgctgcccgcagctacaatcccattggtgctcattcaaaag
accgacacgggggtgctgctccagacctatgatgacttgtagccaaaga
ctgccactgcata (SEQ ID NO:166).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения второй мономер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:161, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:165.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:167, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:161.

II.H.16. CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):CpmFc(+)(N297G).

Определение "CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+)(N297G)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена CpmFc(-)(N297G), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен CpmFc(+)(N297G).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):CpmFc(+)(N297G), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(а) два домена CpmFc(+)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность (часть шарнирной области включена в скобки)

(DKTHTCPPCP) APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:294),

(b) два домена CpmFc(-)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность (часть шарнирной области включена в скобки)

(DKTHTCPPCP) APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:169),

и (с) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

(DKTHTCPPCP) APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPLGPGRCRLHTVRASLE
 DLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPA
 PCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:171),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcc
 tggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctc
 atgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagcca
 cgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
 ataatgccaagacaaagccgaggagcagtagcggcagcacgtaccgt
 gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagga
 gtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaa
 ccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctg
 ccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
 ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgctgctggactccgac
 ggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggca
 gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacc
 actacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccactgtccg
 ctcgggcccggtgctgctgcacacgggtccgcgcgtcgctgga
 agacctgggtgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtga
 ccatgtgcatcggcgcgtgcccagagccagttccggggcggaacatgcac
 gcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccagacacggtgccagc
 gccctgctgctgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaaaaga
 ccgacaccgggtgctgctccagacctatgatgacttgttagccaaagac
 tgccactgcata (SEQ ID NO:170).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

(DKTHTCPPCP) APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:168),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcc
 tggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctc
 atgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagcca
 cgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
 ataatgccaagacaaagccgaggagcagtagcggcagcacgtaccgt
 gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagga

gtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgagaaaa
 ccattctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctg
 cccccatcccgaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
 ggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgaagtccgac
 ggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
 gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacc
 actacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:172).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:171, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:168.

II.H.17. CpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):CpmFc(+)(N297G).

Определение "CpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+)(N297G)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена CpmFc(-)(N297G), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен CpmFc(+)(N297G).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров CpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):CpmFc(+)(N297G), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена CpmFc(+)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:294,

(b) два домена CpmFc(-)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:169, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

(DKTHTCPPCP) APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGLPGRCCLHTVRA
 SLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
 T VPARCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:174),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcc
 tggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaaccaaggacacctc
 atgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagcca
 cgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
 ataatgccaagacaaagccgaggagcagtagcgagcacgtaccgt
 gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaatggcaagga
 gtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaa
 ccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctg
 ccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
 ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
 ggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgac
 ggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggca
 gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaacc
 actacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgacggagac
 cactgtccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcacacggtccgcgc
 gtcgctggaagacctgggtgggcccgttggtgctgctgccacgggagg
 tgcaagtgacctgtgcatcgccgctgcccagccagttccgggcccga
 aacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcac
 ggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctca
 ttcaaaagaccgacaccgggtgctgctccagacctatgatgacttgta
 gccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:173).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:168, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность SEQ ID NO:172.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:174, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:168.

II.H.18. Dh2CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G).

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(N297G), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:295),

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPVLDSGDSFFLYSLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:176),

и (c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
GVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:178),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
ccggacccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagacc
ctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgggaggagcagtagcgggagcacgtaccgtgtggtag
cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
gcaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc
ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccg
gagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctt
cttcctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
cagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccactgtccgctcgggcc
cgggcgttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgctggaagacctgg
gctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgaccatgtgc
atcggcgcggtgcccgagccagttccgggcggcaaacatgcacgcgcagat
caagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgct
gcgtgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacc
gggtgtcgctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactg
cata (SEQ ID NO:177).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTPPVLSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:175),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
 ccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgcgaggagcagtagcgggagcacgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatc
 ccggaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaag
 gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
 gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgaagtccgacggctcctt
 ctctcttatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 cagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEQ ID NO:179).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:178, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:175.

II.H.19. Dh2CpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G).

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(N297G), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:295,

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(N297G) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:176, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность:

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
 TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQK
 TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:181),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
 ccggacccctgaggtcacatgctgtgtgtggacgtgagccacgaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgcgaggagcagtagcgggagcacgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcacctgctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc
 ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtggtcaaag
 gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccg
 gagaacaactacgacaccacgcctcccgctgctggactccgacggctcctt
 cttcctctatagcgacctcacctggtgacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 cagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgacggagaccactgtcc
 gctcgggccccggcggtgctgcccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgtgg
 aagacctgggctgggcccattgggtgctgtgccacgggaggtgcaagt
 accatgtgcatcggcgcgtgcccagccagttccgggcccgaacatgca
 cgcgcatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccag
 cgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaag
 accgacacgggggtgctgctccagacctatgatgacttgtagccaaaga
 ctgccactgcata (SEQ ID NO:180).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:175, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:179.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:181, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:175.

II.H.20. Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C).

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом полипептида Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первой полипептидной цепи и C354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Ndel3):h2CpmFc(+)(N297G)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLKSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:296),

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:183),

и (с) два полипептида GDF15(Nde13) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPGGDHCPGLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
 IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
 GVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:185),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctc
 ccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgaggagcagtagcgcagcagcgtaccgtgtggtcag
 cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgcaccctgccccatc
 ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaa
 gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
 gagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcctt
 ctctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacg
 cagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccactgtccgctcggggc
 cgggcgttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgctggaagacctgg
 gctggggccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgc
 atcgggcgcgtgcccagccagttccggggcggaacatgcacgcgcagat
 caagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacaggtgccagcgccctgct
 gcgtgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacc
 ggggtgtcgtccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactg
 cata (SEQ ID NO:184).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTPPVLSKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:182),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccatccgtgttcctgtttcctccaaagccgaaggacaccctgatgatctc
aagaactccggaagtgacttgctgctcgtggacgtgtcacatgaggatc
cagaggtcaagttcaattggtatgtggacggagtggaagtgcataacgcc
aagaccaaaccggaagaacagtagcgggagcacctaccgctggtgag
cgtccttactgtgtctccaccaggactggcttaatgggaaggaatacaagt
gtaaggtgtccaacaaggccctccccgtcccatcgaaaagaccatctca
aaggcaaaggggcaaccaagggaacctcaagtgtacacctgcctccgtg
caggaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacttgctcgtgaagg
gcttctatcccagcgatattgctgtggaatgggagtc aaatggccagccc
gagaataactacaaaactacccaccgctgctgaaatctgatgggtcctt
cttcctttactccaagctgaccgtggacaagagccgctggcaacaaggca
atgtcttttagctgtcagtgatgcatgaggctctccataatcactacact
cagaagtcactgtccctgtctccggtaaa (SEQ ID NO:186).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:185, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:182.

II.H.21. Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C).

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первого полипептида и C354 второго полипептида.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:296,

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:183, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQK
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:188),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
 ccggacccttgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccagaagacc
 ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgaggaggagcagtagcgggagcagtagcgtggtcag
 cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
 gcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgcaccctgccccatc
 ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaag
 gcttctatcccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
 gagaacaactacgacaccacgcctcccgctgctggactccgacggctcctt
 ctctcttatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga
 acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacg
 cagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgagcagaccactgtcc
 gctcgggcccggttgctgcgtctgcacacgggtccgcgcgtcgtgg
 aagacctgggtggccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagt
 accatgtgcatcggcgcgtgcccagccagttccggcgccaaacatgca
 cgcgagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccag
 cgccctgctgctgcccgcagctacaatcccaggtgctcattcaaaag
 accgacaccgggtgctgctccagacctatgatgacttgtagccaaaga
 ctgccactgcata (SEQ ID NO:187).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:186.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:188, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:182.

II.H.22. Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C).

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C287 первого мономера и C306 второго мономера.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит:

(a) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:297),

(b) два Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:192),

и (с) два полипептида GDF15(Nde13) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT
 QKSLSLSPGGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
 IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
 TVGSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:194),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctca
 tgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca
 taattgcaagacaaagccgaggagcagtagcgcagcacgtaccgtg
 tggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
 tacaagtgcagggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaac
 catctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgc
 ccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgagtgaggagagcaatgg
 gcagccggagagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacg
 gctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca
 ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccactgtccgc
 tcgggccccggcggtgtgctgcccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctgaa
 gacctgggctgggcccattgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtgc
 catgtgcatcggcgcgtgcccagccagttccgggcccgaacatgcacg
 cgcatgacgaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacgggtgccagcg
 ccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaagac
 cgacaccgggggtgtcgctccagacctatgatgacttgttagccaaagact
 gccactgcata (SEQ ID NO:193).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPV LKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:191),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttcccccaaaacccaaggacacctca
 tgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca
 taattgcaagacaaagccgcgggaggagcagtagcgacgtacacctg
 tggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
 tacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaac
 catctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgc
 ccccatcccggaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
 gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctgaagtccgacg
 gctccttctctctctatagcaagctcacctggacaagagcaggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaacca
 ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:195).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:194, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:191.

II.Н.23. Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C).

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C287 первой полипептидной цепи и C306 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит:

- (a) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:297,
- (b) два домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:192, и
- (c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTVTLHQDLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGARDGDHCPGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
 TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQK
 TDTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:197),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttcttcttcccccaaaacccaaggacaccctca
 tgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca
 taattgcaagacaaagccgcgggaggagcagtaggcagcacgtaccgtg
 tggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
 tacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaac
 catctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgc
 ccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
 gcagccggagaaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacg
 gtccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca
 ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgacggagacc
 actgtccgctcggggcccggttgctgccgtctgcacacggctccgcgcg
 tcgctggaagacctgggtgggctgattgggtgctgtcgccacgggaggt
 gcaagtgaccatgtgcatcgccgcgtgcccgagccagttccgggcccga
 acatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacg
 gtgccagcgcctgtgctgctgcccgccagctacaatcccatggtgctcat
 tcaaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacctatgatgacttgtag
 ccaagactgccactgcata (SEQ ID NO:196).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:191, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:195.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:197, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:191.

II.Н.24. Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C)

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С287 первой полипептидной цепи и С306 второй полипептидной цепи и между С349 первой полипептидной цепи и С349 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит:

(а) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:298),

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPG (SEQ ID NO:199),

и (с) два полипептида GDF15(Nde13) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPGGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
 IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
 TVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:201),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctca
 tgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactgtacgtggacggcgtggaggtgca
 taattgcaagacaaaagccgaggagcagtagggcagcacgtaccgtg
 tggtcagcgtctgcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
 tacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaac
 catctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgcaccctgc
 ccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
 gcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacg
 gctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca
 ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccactgtccgc
 tcggggccggcggttgcgtgccgtctgcacacggtcggcgctcgtctggaa
 gacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgc
 catgtgcatcgggcggtgccgagccagttccggggcggaacatgcacg
 cgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcg
 ccctgctgcgtgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaagac
 cgacaccggggtgctgcgtccagacctatgatgacttgtagccaaagact
 gccactgcata (SEQ ID NO:200).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTVHLDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:198),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctca
 tgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca
 taattgcaagacaaaagccgcgaggagcagtagcgcagcacgtaccgtg
 tggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
 tacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaac
 catctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgc
 ccccatgccgaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
 gcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgaagtccgacg
 gctccttcttctctatagcaagctcacctggacaagagcaggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaacca
 ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO:202).

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:201, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:198.

II.Н.25. Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C).

Определение "Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первый мономер, содержащий полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C287 первой полипептидной цепи и C306 второй полипептидной цепи и между C349 первой полипептидной цепи и C349 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит:

(а) два домена Dh2CpmFc(+)(N297G)(L306C)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:298,

(b) два домена Dh2CpmFc(-)(N297G)(A287C)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:199, и

(с) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность (SEQ ID NO:52).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNC
 KTKPREEQYGSTYRVVSVCTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVCTLPFSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGARDGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
 TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQK
 TDTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:204),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctca
 tgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca
 taattgcaagacaaagccgcgaggagcagtagcggcagcagctacgtg
 tggtcagcgtctgcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
 tacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaac
 catctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgcaccctgc
 ccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgg
 gcagccggagaaactacgacaccacgcctcccgtgctggactccgacg
 gctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcaggtggcag
 caggggaaagctcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca
 ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgacggagacc
 actgtccgctcgggcccggggttgcgtgcgtctgcacacgggtccgcgcg
 tcgctggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggt
 gcaagtgacctgtgcatcgggcgctgcccagccagttccgggcccga
 acatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccacacg
 gtgccagcgccctgctgcgtgcccgcagctacaatcccatggtgctcat
 tcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgacttgtag
 ccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:203).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:198, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:202.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:204, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:198.

II.Н.26. GG-Dh2CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):GG-Dh2CpmFc(+).

Определение "GG-Dh2CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):GG-Dh2CpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена GG-Dh2CpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен GG-Dh2CpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров GG-Dh2CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):GG-Dh2CpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(а) два домена GG-Dh2CpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:299),

(b) два домена GG-Dh2CpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYDTTPVLSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:206),

и (с) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная

цепь содержит аминокислотную последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNNH
YTQKSLSLSPGGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT
DTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:208),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggtggcccgctcagtccttcctcttccccccaaaacccaaggaca
ccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
ggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgt
accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
tgctgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
caatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggact
ccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccact
gtccgctcgggccccggcggttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcg
ctggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgca
agtgaccatgtgcatcggcgctgcccagccagttccgggcggaaca
tgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacggtg
ccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattca
aaagaccgacaccgggtgctgctccagacctatgatgacttgtagcca
aagactgccactgcata (SEQ ID NO:207).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSR
WQQGNVFSVSMHEALHNNHNTQKSLSLSPGGDHCPGPRCCRLHTVRAS
LEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV
PAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:243),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggaatggagctgggtctttctcttcttctcgtcagtaacgactggtgt
ccactccggtggcccgtcagtcttctcttccccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgaggagcagtagacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagacaactacgacaccacgcctcccgtgctggact
 ccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccact
 gtccgctcgggcccggcggttctgctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcg
 ctggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgca
 agtgacctgtgcatcgccgcgtgcccagccagttccgggaggaaaca
 tgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccacacggtg
 ccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccattggtgctcattca
 aaagaccgacaccggggtgtcgtccagacctatgatgacttgtagcca
 aagactgccactgcata (SEQ ID NO:244).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNN
 YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:205),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggtggcccgtcagtcttctcttccccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgaggagcagtagacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctgaagt
 ccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID
 NO:209).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:245),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggaatggagctgggtctttctcttcttctcgtcagtaacgactggtgt
ccactccgggtggcccgctcagtccttctcttcccccaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
 agccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaagccgaggagcagtagacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatcccgaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgctgtggtcaaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctgaagt
 ccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID

NO:246) .

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:208, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:205.

II.H.27. GG-Dh2CpmFc(-)-GDF15(N3D):GG-Dh2CpmFc(+).

Определение "GG-Dh2CpmFc(-)-GDF15(N3D):GG-Dh2CpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена GG-Dh2CpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен GG-Dh2CpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров GG-Dh2CpmFc(-)-GDF15(N3D):GG-Dh2CpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена GG-Dh2CpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:299,

(b) два домена GG-Dh2CpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:206, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH
 YTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV
 QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLI
 QKTDTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:211),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggtggcccgctcagtccttcttcttccccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgctgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgctgctggact
 ccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgacg
 gagaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcacacggtc
 cgcgctcgctggaagacctgggctgggcccgattgggtgctgtcgccacg
 ggaggtgcaagtgacctgtgcatcgcgcggtgcccagccagttccggg
 cggcaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccc
 gacacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccattggt
 gctcattcaaaagaccgacaccggggtgctcgctccagacctatgatgact
 tgtttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:210).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTV
 RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKP
 DTVPAAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID

NO:247),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggaatggaactggtctttctcttcttctcctgtcagtaacgactggtgt
 ccactccggtggcccgctcagttcttcttccccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
 agccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataaatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcacggtcctgcaccaggactggtgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgctgtgtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgctgctggact
 ccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgacg
 gagaccactgtccgctcgggcccggcggtgtgtgccgtctgcacacggtc
 cgcgcgctcgctggaagacctgggctgggcccagattgggtgctgtcgccacg
 ggaggtgcaagtgcacatgtgcatcgccgcgtgcccgagccagttccggg
 cggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccc
 gacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccattggt
 gctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgact
 tgttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:248).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:205, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:209.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:245, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:246.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:211, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:205.

II.H.2. GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):GG-Dh2CpmFc(+)(S354C).

Определение "GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):GG-Dh2CpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен GG-Dh2CpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первой полипептидной цепи и C354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):GG-Dh2CpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два GG-Dh2CpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNH
 YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:300),

(b) две цепи GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:213),

и (с) два полипептида GDF15(Nde13) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT
 DTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:215),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggtggcccgctcagtccttctcttccccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgaggagcagtagacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgca
 ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgcttggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggact
 ccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccact
 gtccgctcggggccggcggttgctgcccgtctgcacacgggtccgcgcgtcg
 ctggaagacctgggctgggcccgaattgggtgctgtcgccacgggaggtgca
 agtgaccatgtgcatcggcgcgtgcccagccagttccgggcccgaaca
 tgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccacacgggtg
 ccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcatcca
 aaagaccgacaccgggtgctgctccagacctatgatgacttgtagcca
 aagactgccactgcata (SEQ ID NO:214).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSR
 WQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPLGPGRCRLHTVRAS
 LEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTP
 PAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:249),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность

подчеркнута)

atggaatggagctgggtctttctcttcttctctgtcagtaacgactgggtgt
ccactccgggtggcccgtcagttcttcttcttcccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtagacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgca
 ccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaaactacgacaccacgcctcccgtgctggact
 ccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggagaccact
 gtccgctcgggccccggcggttgctgacctgacacgggtccgcgcgtcg
 ctggaagacctgggctgggctgattgggtgctgtcgccacgggaggtgca
 agtgacctgtgcatcggcgctgcccagccagttccgggaggaaaca
 tgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgctgaagcccgacacgggtg
 ccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattca
 aaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgacttgtagcca
 aagactgccactgcata (SEQ ID NO:250).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNH
 YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:212),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggtggcccgtcagttcttcttcttcccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtagacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatgccggaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctgaagt
 ccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID
 NO:216).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:251),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggaatggagctgggtctttctcttctctcctgtcagtaacgactggtgt
ccactccgggtggcccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgcccccatgccggaaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgctgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggagag
 caatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgaagt
 ccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID

NO:252) .

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:215, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:212.

II.Н.29. GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):GG-Dh2CpmFc(+)(S354C).

Определение "GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):GG-Dh2CpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен GG-Dh2CpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С349 первой полипептидной цепи и С354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):GG-Dh2CpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена GG-Dh2CpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:300,

(b) два домена GG-Dh2CpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:213, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV
 QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLI
 QKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:218),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggtggcccgctcagtccttctcttccccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgca
 ccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgctgtggtcaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgctggact
 ccgacggctccttcttctctatagcgacctcacgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgcgacg
 gagaccactgtccgctcgggcccggcggttgtgccgtctgcacacggtc
 cgcgcgtcgctggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacg
 ggaggtgcaagtaccatgtgcatcgccgcgtgcccagccagttccggg
 cggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccc
 gacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccattggt
 gctcattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgact
 tgttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:217).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSR
 WQQGNVFSQSVSMHEALHNHNTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLHTV
 RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKP
 DTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:253),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggaatggagctgggtcttctcttcttctcctgtcagtaacgactgggtg
ccactccgggtggcccgctcagtccttcttcttccccccaaaacccaaggaca
 ccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
 ggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgt
 accgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggc

aaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgca
 ccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgcttggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagag
 caatgggagcgggagaaactacgacaccacgcctcccgtgctggact
 ccgacggctccttcttctctatagcgacctcacctgggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgcgagcag
 gagaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgcccgtctgcacacggtc
 cgcgcgctcgtggaagacctgggctgggcccgaattgggtgctgtcgccacg
 ggaggtgcaagtgacctgtgcatcgcgcggtgcccagccagttccggg
 cggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagccc
 gacacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccattggt
 gctcattcaaaagaccgacacggggtgctgctccagacctatgatgact
 tgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:254).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:218.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VH21, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:251, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:252.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:218, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:212.

II.H.30. Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+).

Определение "Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh3CpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh3CpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh3CpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:301),

(b) два домена Dh3CpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:220),

и (c) два полипептида GDF15(Ndel3) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGGDHCPGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTM
 CIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
 TGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:222),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggcccgctcagtccttctcttcccccaaaaccca
 aggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatccaagacaaagccgaggaggagcagtagacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacagg
 tgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgc
 tggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggag
 accactgtccgctcgggcccggcggttctgctgacctctgcacacggctccg
 gcgtcgctggaagacctgggtgggcccattgggtgctgctcgccacggga
 ggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgctgcccagccagttccgggccc
 caaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgac
 acggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccaggtgct
 cattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgacttgt
 tagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:221).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDK
 SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPGPRCCRLHTVR
 ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
 TVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:255),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggacatgaggggtgcccgcctcagctcctggggcctcctgctgctgtggct
gagaggtgcccgcctgtggcccgctcagctcttctcttcccccaaaaccca
aggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtg
gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgctggaggagcagtacaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
catcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacagg
tgtacaccctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
ggagagcaatgggcagccgggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgc
tggaactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggag
accactgtccgctcgggcccggcggttgcctgacctgacacgggtccgc
gcgtcgctggaagacctgggtgggcccattgggtgctgctgccacggga
gggtgcaagtgaccatgtgcatcgccgcgtgcccgagccagttccgggcgg
caaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgac
acgggtgccagcgccctgctgcgtgcccgccagctacaatcccatggtgct
cattcaaaagaccgacaccggggtgctgctccagacctatgatgacttgt
tagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:256).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:219),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gccccgctcagctcttctcttcccccaaaaccca
aggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtg
gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgctggaggagcagtacaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
catcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacagg
tgtacaccctgcccccatccgggaaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
ggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgc
tgaagtccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
(SEQ ID NO:223).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:257),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggacatgaggggtgcccgctcagctcctggggctcctgctgctgtggct
gagaggtgcgcgctgtggcccgctcagctcttctcttccccccaaaaccca
 aggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtgggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagcagtagacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
 tgtacaccctgcccccatcccggaaggagatgaccaagaaccaggctcagc
 ctgacctgctgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgc
 tgaagtcgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID

NO:258) .

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:222, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:219.

II.Н.31. Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+).

Определение "Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh3CpmFc(-), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh3CpmFc(+).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh3CpmFc(+) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:301,

(b) два Dh3CpmFc(-) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:220, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGARDGDHCPGGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQ
 VTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQ
 KTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:225),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

atggacatgaggggtgcccgtcagctcctggggctcctgctgctgtggct
gagaggtgcgcgctgtggcccggtcagtccttcttccccccaaaaccca
aggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggtg
gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
catcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
tgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
ggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgctg
tggtactccgacggctccttcttctctatagcgacctaccgtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgc
gcgacggagaccactgtccgctcgggccccggcggttgctgccgtctgcac
acggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtc
gccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagccagct
tccggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctg
aagcccgacacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcc
catggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgctgctccagacctatg
atgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:224).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGPGRCRLH
TVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRL
KPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ

ID

NO:259),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggacatgaggggtgcccgcctcagctcctgaggctcctgctgctgtggt
 gagaggtgagcgcctgtggcccgctcagttcttctcttccccccaaaaccca
 aggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
 tgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagc
 ctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgc
 tggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgc
 gcgacggagaccactgtccgctcggggcccggttgcgtgccgtctgcac
 acggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtc
 gccacgggaggtgcaagtgacatgtgcatcgccgcgtgcccgagccagt
 tccggcgccgaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctg
 aagcccgacacgggtgccagcgcctgctgcgtgcccgccagctacaatcc
 catggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgctcgtccagacctatg
 atgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:260).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:219, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:223.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:257, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:258.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:225, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:219.

II.H.32. Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(S354C).

Определение "Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(Ndel3), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh3CpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh3CpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между C349 первого полипептида и C354 второго полипептида.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения тетрамер содержит:

- (a) два домена Dh3CpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность
 GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
 SKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:302),

- (b) два домена Dh3CpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 SKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY
 TQKSLSLSPG (SEQ ID NO:227),

и (с) два полипептида GDF15(Nde13) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:55.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 SKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY
 TQKSLSLSPGGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTM
 CIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
 TGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:229),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

atggacatgaggggtgcccgctcagctcctggggctcctgctgctgtggct
 gagaggtgcgcgctgtggccgctcagtccttctcttcccccaaaaccca
 aggcacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
 tgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagc
 ctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgc
 tggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggag
 accactgtccgctcgggccccggcggttgctgccgtctgcacacgggtccgc
 gcgtcgctggaagacctgggtgggcccattgggtgctgtcgccacggga
 ggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgcgtgcccagccagttccgggccc
 caaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccagc
 acggtgccagcgccctgctgcgtgcccgccagctacaatcccatggtgct
 cattcaaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacctatgatgacttgt
 tagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:228).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGDHCPGPGRCRLHTVR
 ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
 TVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:261),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggacatgaggggtgcccgctcagctcctggggctcctgctgctgagct
gagaggtgcgcgctgtggcccgctcagctcttctcttcccccaaaaccca
 aggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
 tgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagc
 ctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgc
 tggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtggag
 accactgtccgctcgggccccggcggttgcctgctgcacacggtccgc
 gcgtcgctggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacggga
 ggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgctgcccagagccagttccgggagg
 caaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgc
 acggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatgggtgct
 cattcaaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacctatgatgacttgt
 tagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:262).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:226),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggcccgctcagtccttctcttccccccaaaaccca
 aggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
 tgtacaccctgcccccatgccggaaggagatgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgc
 tgaagtccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggg
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
 (SEQ ID NO: 230) .

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRLGARCGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:263) ,

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggacatgagggatcccgctcagctcctggggctcctgctgctgtggct
gagaggtgcgcgctgtggcccgctcagtccttcttccccccaaaaccca
 aggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
 tgtacaccctgcccccatgccggaaggagatgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgc
 tgaagtccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggg
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID
 NO:264) .

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:229, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:226.

II.H.33. Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+)(S354C).

Определение "Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+)(S354C)" в настоящем изобретении означает гетеродимер, который содержит (i) первую полипептидную цепь, содержащую полипептид GDF15(N3D), N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена Dh3CpmFc(-)(Y349C), и (ii) вторую полипептидную цепь, содержащую домен Dh3CpmFc(+)(S354C). Мутации "cysteine clamp" позволяют соединить первую и вторую полипептидные цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи между С349 первой полипептидной цепи и С354 второй полипептидной цепи.

Согласно определенным вариантам реализации изобретения предложен тетрамер, который содержит димер, состоящий из двух гетеродимеров Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D): Dh3CpmFc(+)(S354C), в котором две первые полипептидные цепи каждого гетеродимера соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими областями GDF15 данных цепей.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения тетрамер содержит:

(a) два домена Dh3CpmFc(+)(S354C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:302,

(b) два домена Dh3CpmFc(-)(Y349C) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:227, и

(c) два полипептида GDF15(N3D) (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:52.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVCTLPFSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGARDGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQ
VTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQ
KTDGTGVSILQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 232),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

ggcccgtcagtccttcctcttcccccaaaaccca
aggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtg
gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
tgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
ggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgc
tggaactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagggc
tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgc
gcgacggagaccactgtccgctcggggccggcggttgctgccgtctgcac
acggtccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggccgattgggtgctgtc
gccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgcgcggtgcccgagccagt
tccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctg
aagcccgacacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccgccagctacaatcc
catggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacctatg
atgacttgtagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:231).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность (сигнальная последовательность подчеркнута)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDK
 SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGARDGDHCPGPRCCRLH
 TVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRL
 KPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID

NO:265),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты (сигнальная последовательность подчеркнута)

atggacatgaggggtgcccgcctcagctcctggggcctcctgctgctgagct
gagaggtgcccgcctggtggcccgctcagctcttctcttccccccaaaaccca
 aggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacgg
 cgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtacaaca
 gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccc
 catcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagg
 tgtgcaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagc
 ctgacctgctgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgcctcccgtgc
 tggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggc
 tctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtgcgc
 gcgacggagaccactgtccgctcgggcccggcggtgctgcccgtctgcac
 acgggtccgcgctgctggaagacctgggtgggcccattgggtgctgtc
 gccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagaccagt
 tccgggcccgaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctg
 aagcccgacacgggtgccagcgccctgctgctgcccggccagctacaatcc
 catggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgtccagacctatg
 atgactgttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:266).

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:226, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:230.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения, в котором применяется сигнальная последовательность VK1, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:263, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:264.

Как обсуждалось выше, предложен тетрамер, содержащий две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:232, и две полипептидные цепи, которые содержат последовательность SEQ ID NO:226.

II.H.34. DhMonoFc (N297G)-GDF15.

Определение "DhMonoFc(N297G)-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, N-конец которого соединен напрямую с С-концом домена DhMonoFc (N297G) посредством пептидной связи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, связанных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими полипептидами GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации изобретения гомодимер содержит:

(а) два домена DhMonoFc(N297G) (в каждом мономере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSGDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:233);

и (b) два полипептида GDF15 (в каждом гетеродимере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPVLDSGDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYN
 PMVLIQKTDGTGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:235),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggaccgtcagtccttcttcttcccc
 caaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgc
 gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgga
 cgtggacggcggtgaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagc
 agtacggcagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccct
 cccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
 aaccacaggtgaccaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgctgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
 cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagacaactacgacaccacgc
 ctcccggtgctggactccgacggctccttcttcttctatagcgacctcacc
 gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
 gcatgaggtcttgcaaacactacacgcagaagagcctctccctgtctc
 cgggtgcgcgcaacggagaccactgtccgctcgggcccggcggttgctgc
 cgtctgcacacggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccattg
 ggtgctgtgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcc
 cgagccaggttccggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctg
 caccgcctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgtgctgctgcccgcag
 ctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgctcgtcc
 agacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata (SEQ ID NO:234).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:235.

II.Н.35. DhMonoFc (N297G)-(G₄S)₄-GDF15.

Определение "DhMonoFc(N297G)-(G₄S)₄-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с доменом DhMonoFc(N297G) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:18 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhMonoFc(N297G) посредством пептидной связи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, связанных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими полипептидами GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

(а) два домена DhMonoFc(N297G) (в каждом мономере), содержащих последовательность

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPFVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:236);

(b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и

(c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:18, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом домена DhMonoFc (N297G) посредством пептидных связей.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой):

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYDTTPFVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRC
 CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTS
 LHLRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI (SEQ ID

NO:238),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggaccgtcagtcctcctcctccccc
 caaaacccaaggacacccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgc
 gtggtggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtg
 cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagc
 agtacggcagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccct
 cccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
 aaccacaggtgaccacccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
 cgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacgacaccacgc
 ctcccgctgctggactccgacggctccttctcctctatagcgacctcacc
 gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
 gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
 cgggtggaggtggtggatccggaggcggtggaagcggaggtggtggatct
 ggaggcggtggaagcgcgcgaacggagaccactgtccgctcgggcccgg
 gcgttgctgccgtctgcacacggctccgcgcgtcgctggaagacctgggct
 gggccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatc
 ggcgctgccccgagccagttccggcgccgaaacatgcacgcgcagatcaa
 gacgagcctgcaccgcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgtgcg
 tgcccgccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggg
 gtgtcgctccagacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata (SEQ

ID NO:237).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:238.

II.Н.36. DhMonoFc(N297G)-G₄-GDF15.

Определение "DhMonoFc(N297G)-G₄-GDF15" в настоящем изобретении означает гибридный белок, содержащий полипептид GDF15, соединенный с доменом DhMonoFc(N297G) посредством линкера, который содержит последовательность SEQ ID NO:58 и который соединяет N-конец полипептида GDF15 с C-концом домена DhMonoFc(N297G) посредством пептидной связи.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, содержащий два таких гибридных белка, связанных посредством межцепочечной дисульфидной связи между соответствующими полипептидами GDF15 данных белков.

Более конкретно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гомодимер содержит:

(a) два домена DhMonoFc(N297G) (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:236;

(b) два полипептида GDF15 (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:12; и

(c) два полипептидных линкера (в каждом мономере), содержащих последовательность SEQ ID NO:58, каждый из которых соединяет N-конец полипептида GDF15 с С-концом домена DhMonoFc(N297G) посредством пептидных связей.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность (линкер подчеркнут двойной чертой)

APELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNYHTQKSLSLSPPG~~GGGG~~GARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWA
DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTGVS~~LQ~~TYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:240),

которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcacctgaactcctgggggaccgtcagtccttctcttcccc
caaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgc
gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgaggaggagc
agtacggcagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccct
cccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag
aaccacaggtgaccaccctgccccatcccgaggagatgaccaagaac
caggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc
cgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacgacaccacgc
ctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctatagcgacctcacc
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtggaggtggaggcgcgaacggagaccactgtccgctcgggccc
ggcgcttgctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctggaagacctggg
ctgggccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgca
tcggcgctgcccagccagttccggggcggaacatgcacgcgcagatc
aagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacacggtgccagcgccctgctg
cgtgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaaaagaccgacaccg
gggtgtcgtccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgc
ata (SEQ ID NO:239).

Как обсуждалось выше, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен гомодимер, который содержит два мономера, содержащих последовательность SEQ ID NO:240.

III. Полипептиды GDF15 и конструкции, содержащие GDF15, в том числе мутантные формы GDF15.

Как раскрыто в настоящей заявке, полипептиды GDF15 (в том числе полноразмерная и зрелая формы GDF15 человека) и конструкции, содержащие GDF15, описанные в настоящем изобретении, можно сконструировать и/или получить с применением стандартных молекулярно-биологических методик образования мутантной формы полипептидов GDF15 и конструкций, предложенных в настоящей заявке. В различных примерах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую мутантную форму полипептидов GDF15 и конструкции, предложенные в настоящей заявке, которые могут содержать все последовательности SEQ ID NO:4, 8 или 12 или их часть, можно выделить и/или амплифицировать из геномной ДНК или кДНК с применением соответствующих олигонуклеотидных праймеров. Праймеры могут быть сконструированы на основе последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотной последо-

вательности, предложенных в настоящей заявке, согласно стандартным методикам амплификации методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Затем амплифицированную нуклеиновую кислоту мутантного полипептида GDF15 можно клонировать в подходящий вектор и охарактеризовать посредством анализа последовательности ДНК.

Олигонуклеотиды для применения в качестве зондов при выделении или амплификации всех или части мутантных форм полипептидов GDF15 и конструкций, предложенных в заявке, могут быть сконструированы и получены с применением стандартных методик синтеза, например приборов для автоматического синтеза ДНК, или могут быть выделены из более протяженной последовательности ДНК.

III.A. Полипептидная и полинуклеотидная последовательности GDF15.

GDF15 экспрессируется *in vivo* в виде непрерывной аминокислотной последовательности, содержащий сигнальную последовательность, продомен и активный домен.

Аминокислотная последовательность полноразмерного GDF15 человека длиной 308 аминокислот представляет собой

```
MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSELHSED
SRFRELKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGH
LHLRISRALPEGLPEASRLHRLFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARP
QAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNG
DHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDL
LAKDCHCI (SEQ ID NO:4)
```

и кодируется последовательностью ДНК

```
atgcccggaagaactcaggacggtgaatggctctcagatgctcctggt
gttgctggtgctctcgtggctgccgcatggggcgccctgtctctggccg
aggcgagccgcgcaagtttcccggaaccctcagagttgcactccgaagac
tccagattccgagagttgcggaacgctacaggacctgctaaccaggt
gcgggccaaccagagctgggaagattcgaacaccgacctcgtcccgccc
ctgcagtcgagatactcacgccagaagtgcggctgggatccggcgccac
ctgcacctgcgtatctctcgggccccttcccgaggggtcccgagggc
ctcccgcccttcacggggtctgttccggctgtcccgacggcgctcaaggt
cgtgggacgtgacacgaccgctgcggcgctcagctcagccttgcaagacc
caggcgcccgctgcacctgcgactgtcgccgcccgtcgagtcgga
ccaactgctggcagaatcttcgtccgcacggccccagctggagttgact
tgccggccgcaagccgccagggggcgccgagagcgctgcgcgcaacggg
gaccactgtccgctcgggcccggggttgctgccgtctgcacacggtccg
cgcgctcgtggaagacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacggg
aggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagccagttccgggcg
gcaaacatgcacgcgagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccga
cacggtgccagcgccctgctgcgtgcccgcagctacaatcccatggtgc
tcattcaaaagaccgacaccggggtgtcgctccagacctatgatgacttg
ttagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:3).
```

Аминокислотная последовательность полноразмерного GDF15 мыши длиной 303 аминокислоты представляет собой

```
MAPPALQAQPPGGSQLRFLFLLLLLLLLLSWPSQGDALAMPEQRPSGPES
QLNADELGRFQDLRLHANQSREDSNSEPSDPAPVIRILSPEVRLGSHG
QLLLRVNRASLSQGLPEAYRVHRAALLLTPTARPWDITRPLKRALSRLGP
RAPALRLRLTPPPDLAMLPSSGGTQLELRLRVAAGRGRSAHANPRDSCPL
GPGRCCHLETQATLEDLGWSDWVLSRQLQLSMCVGECPHLYRSANTHA
QIKARLHGLQDPKVPAPCCVPSSYTPVVLHRTDSGVSLQTYDDLVARGC
HCA (SEQ ID NO:6)
```

и кодируется последовательностью ДНК

atggccccgcccgcgtccaggcccagcctccaggcggtctcaactgag
gttcctgctgttcctgctgctgttgctgctgctgctcatggccatcgc
agggggacgcccctggcaatgctgaacagcgaccctccggccctgagtc
caactcaacgcccagcagctacggggcgcttcaggacctgctgagccg
gctgcatgccaaccagagccgagaggactcgaactcagaaccaagtctg
accagctgtccggatactcagtccagaggtgagattgggtccacggc
cagctgctactccgcgtcaaccgggctcgctgagtcagggtctccccga
agcctaccgctgcaccgagcgctgctcctgctgacgccgacggcccgcc
cctgggacatcactaggcccctgaagcgtgctgctcagcctccggggaccc
cgtgctcccgattacgctgcgctgacgccgctccggacctggctat
gctgccctctggcgacgcagctggaactgcttacgggtagccgcg
gcagggggcgccgaagcgcgcatgcgcaccaagagactcgtgcccactg
ggctccggggcgctgctgtcacttgagactgtgcaggcaactcttgaaga
cttgggctggagcgactgggtgctgtccccgcgccagctgcagctgagca
tgtgctggggcgagtgctcccccactgtatcgctccgcgaacacgcatgcg
cagatcaaagcacgctgcatggcctgcagcctgacaaggtgctgcccc
gtgctgtgtccctccagctacaccccggtggttcttatgcacaggacag
acagtggtgtgtcactgcagacttatgatgacctggtggccggggctgc
cactgcgcttga (SEQ ID NO:5).

Аминокислотная последовательность GDF15 человека после отщепления сигнальной последовательности длиной 29 остатков представляет собой

LSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRLKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTD
LVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRLFRSLP
TASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQ
LELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASY
NPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:8)

и кодируется последовательностью ДНК

ctgtctctggccgaggcgagccgcgcaagtttccgggaccctcagagtt
gcactccgaagactccagattccgagagttgcggaacgctacaggacc
tgctaaccaggctgcgggccaaccagagctgggaagattcgaacaccgac
ctcgtcccgccccctgcagtcggatactcacgccagaagtgcggctggg
atccggcgcccacctgcacctgcgtatctctcgggccgcccctcccgagg
ggctccccgaggcctcccgcttcaccgggctctgttcggctgtccccg
acggcgtcaaggtcgtgggacgtgacacgaccgctgcggcgtcagctcag
ccttgcaagaccccaggcgcccgctgcacctgcgactgtcgcggccgc
cgctcgagtcggaccaactgctggcagaatcttcgtccgcacggccccag
ctggagttgcacttgcgccgcaagccgcccaggggcgccgcagagcgcg
tgcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccggttgctgccgtc
tgcacacgggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccattgggtg
ctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctatgtgcatcggcgctgcccag
ccagttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcacc
gcctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccggcagctac
aatcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccggggtgtcgtccagac
ctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:7)

Аминокислотная последовательность GDF 15 мыши после отщепления сигнальной последовательности длиной 32 остатка представляет собой

SQGDALAMPEQRPSGPESQLNADELGRFQDLLSRLHANQSREDSNSEPS
 PDPAVRILSPEVRLGSHGQLLLRVNRASLSQGLPEAYRVHRALLLLTPTA
 RPWDITRPLKRALSLRGPRAPALRLRLTPPPDLAMLPSGGTQLELRRLVA
 AGRGRRSAHAHPRDSCPLGPGRCCHLETQATLEDLGWSDWVLSPRQLQL
 SMCVGECPHLYRSANTHAQIKARLHGLQPDKVPAPCCVPSSYTPVVMHR
 TDSGVSLQTYDDLVARACHA (SEQ ID NO:10)

и кодируется последовательностью ДНК

tcgcagggggacgccctggcaatgcctgaacagcgaccctccggccctga
 gtcccaactcaacgccgacgagctacggggtcgcttccaggacctgctga
 gccggctgcatgccaccagagccgagaggactcgaactcagaaccaagt
 cctgaccagctgtccgatactcagtcagaggtgagattgggggtcca
 cggccagctgctactccgcgtcaaccgggctcgctgagtcagggtctcc
 ccgaagcctaccgctgcaccgagcgctgctcctgctgacgccgacggcc
 cgccccctgggacatcactaggccccctgaagcgtgcgctcagcctccgggg
 accccgtgctcccgcatcagcctgcgctgacgccgctccggacctgg
 ctatgctgccctctggcgacgcagctggaactgcgcttacgggtagcc
 gccggcagggggcgccgaagcgcgcatgcgacccaagagactcgtgcc
 actgggtccggggcgctgctgctcacttgagactgtgcaggcaactcttg
 aagacttgggtggagcgactgggtgctgtccccgcgacgctgcagctg
 agcatgtgcgtggcgagtgctcccccactgtatcgctccgcgaacacgca
 tgcgcgagatcaaagcacgcctgcatggcctgcagcctgacaaggtgcctg
 ccccgctgctgtgtccccctccagctacacccgggtgttcttatgcacagg
 acagacagtgggtgtgtcactgcagacttatgatgacctgggtggccgggg
 ctgccactgcgcttga (SEQ ID NO:9)

Биологически активная форма GDF15 содержит гомодимер, содержащий два зрелых мономера GDF15, каждый из которых содержит SEQ ID NO:12. Мономер, который подвергается гомодимеризации с образованием димера нативного зрелого GDF15 человека, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты

gcgcgcaacggggaccactgtccgctcggggccggcggttgctgccgtct
 gcacacgggtccgcgctcgctggaagacctgggctgggcccattgggtgc
 tgtgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagac
 cagttccggggcgaaacatgcacgcgagatcaagacgagcctgcaccg
 cctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctaca
 atcccatggtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgtcgctccagacc
 tatgatgacttgtagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID NO:11)

и содержит аминокислотную последовательность

ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPS
 QFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS
 LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:12).

Таким образом, "димер нативного зрелого GDF15 человека" содержит два ковалентно связанных мономера, содержащих SEQ ID NO:12.

Аминокислотная последовательность рекомбинантной активной формы GDF15 человека, который содержит гомодимер, содержащий в каждом мономере девять цистеинов для образования одной междо-почечной дисульфидной связи и четырех внутрипочечных дисульфидных связей, представляет собой (последовательность показана с необязательным N-терминальным остатком метионина в скобках)

(M) ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGA
 CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS
 LQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:189)

и кодируется последовательностью ДНК (показана с необязательным кодоном N-терминального метионина в скобках)

```
(atg) gcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccgggcgttgctgc
cgtctgcacacggtccgcgctcgtggaagacctgggctgggccgattg
ggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgcgtgcc
cgagccagttccggggcgcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctg
caccgcctgaagcccgcacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcag
ctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgctgctcc
agacctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcatataa (SEQ ID
```

NO:190) .

Аминокислотная последовательность рекомбинантной активной формы GDF15 мыши, который содержит гомодимер, содержащий в каждом мономере девять цистеинов для образования одной межцепочечной дисульфидной связи и четырех внутрицепочечных дисульфидных связей, представляет собой

```
(M) SAHANPRDSCPLGPGRCCHLETVQATLEDLGWSDWVLSRQLQLSMC
VGECPHLYRSANTHAQIKARLHGLQPKVPAPCCVPSSYTPVVLHMRDTS
GVSLQTYDDLVARGCHCA (SEQ ID NO:14)
```

и кодируется последовательностью ДНК

```
(atg) agcgcgcgatgcgcacccaagagactcgtgcccactgggtccgggg
cgctgctgtcacctggagactgtgcaggcaactcttgaagacttgggctg
gagcgactgggtgtgtccccgcgcagctgcagctgagcatgtgctggt
gcgagtgtccccacctgtatcgctccgcgaacacgcatgcgagatcaaa
gcacgcctgcatggcctgcagcctgacaaggtgcctgccccgtgctgtgt
ccccccagctacaccccggtggttcttatgcacaggacagacagtgggtg
tgtcactgcagacttatgatgacctgggtggcccggggctgccactgcgct
tga (SEQ ID NO:13) .
```

Как указано в настоящей заявке, термин "полипептид GDF15" означает полипептид GDF, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4, 8 и 12 человека. Термин "мутантный полипептид GDF15", однако, включает полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности существующих в природе последовательностей полипептида GDF, например, SEQ ID NO: 4, 8 и 12, одной или несколькими аминокислотами, вследствие чего данная последовательность по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 4, 8 и 12. Полипептиды GDF15 могут быть получены посредством введения одной или нескольких аминокислотных замен, консервативных или неконсервативных, а также с применением природных или несуществующих в природе аминокислот в конкретных положениях полипептида GDF15, или посредством удаления конкретных остатков или совокупностей остатков.

"Консервативная аминокислотная замена" может включать замену нативного остатка аминокислоты (т.е. остатка, обнаруженного в данном положении последовательности полипептида GDF15 дикого типа) ненативным остатком (т.е. остатком, который не обнаруживается в данном положении последовательности полипептида GDF15 дикого типа), вследствие чего наблюдается незначительное влияние либо отсутствие влияния на полярность или заряд аминокислотного остатка в данном положении. Консервативные аминокислотные замены также включают несуществующие в природе аминокислотные остатки (как определено в настоящей заявке), которые, как правило, встраивают посредством химического синтеза пептидов, а не синтеза в биологических системах. Данные остатки включают пептидомиметики и другие обратимые или инвертированные формы групп аминокислот.

Существующие в природе остатки можно разделить на классы на основании общих свойств боковых цепей:

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

Дополнительные группы аминокислот могут также быть получены с применением принципов, описанных, например, в руководстве Creighton (1984) PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES (2d Ed. 1993), W.H. Freeman and Company. В некоторых случаях может быть полезна дополнительная характеристика замен на основе двух или более из таких свойств (например, замена "небольшим полярным" остатком, таким как остаток Thr, может представлять собой высококонсервативную замену в соответствующем контексте).

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

Синтетические, редкие или модифицированные аминокислотные остатки, обладающие известными аналогичными физиологическими свойствами с остатками из вышеописанных групп, можно использовать в качестве "консервативной" замены для конкретного остатка аминокислоты в последовательности. Например, остаток D-Arg может выступать в качестве замены для типичного остатка L-Arg. Также возможен случай, при котором конкретную замену можно описать в контексте двух или нескольких из вышеописанных классов (например, замена небольшим и гидрофобным остатком означает замену одной аминокислоты остатком (остатками), которые обнаружены в обоих вышеописанных классах или другими синтетическими, редкими или модифицированными остатками, о которых в данной области техники известно, что они обладают аналогичными физиологическими свойствами с такими остатками, удовлетворяющими обоим определениям).

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид GDF15, предложенный в настоящей заявке, в том числе последовательности, которые являются вырожденными SEQ ID NO: 3, 7, 11 и 15, и последовательности, которые кодируют варианты полипептида согласно SEQ ID NO: 4, 8 и 12, составляют другие аспекты настоящего изобретения.

III.B. Векторы, пригодные для экспрессии полипептидов GDF15 и конструкций, содержащих GDF15, в том числе мутантные формы GDF15.

Для экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид, содержащий область GDF15, соответствующие кодирующие последовательности, например SEQ ID NO: 3, 7 и 11, можно клонировать в подходящий вектор, а после введения в подходящий хозяин последовательность можно экспрессировать для получения кодируемого полипептида согласно стандартным методикам клонирования и экспрессии, известным в данной области техники (например, которые описаны в руководстве Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Настоящее изобретение также относится к таким векторам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

"Вектор" означает переносчик для доставки, который (a) способствует экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид; (b) способствует получению полипептида из нуклеиновой кислоты; (c) способствует трансфекции/трансформации целевых клеток нуклеиновой кислотой; (d) способствует репликации последовательности нуклеиновой кислоты; (e) способствует стабильности нуклеиновой кислоты; (f) способствует обнаружению нуклеиновой кислоты и/или трансформированных/трансфицированных клеток; и/или (g) иным образом наделяет нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, предпочтительной биологической и/или физико-химической функцией. Вектор может представлять собой любой подходящий вектор, в том числе хромосомные, нехромосомные векторы и векторы на основе синтетической нуклеиновой кислоты (последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая подходящий набор контрольных элементов экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, ДНК фага, бакуловируса, плазмиды дрожжей, векторы, полученные из комбинаций плазмид и ДНК фага, и векторы на основе вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК).

Можно получить рекомбинантный вектор экспрессии для экспрессии полипептида, содержащего область GDF15, в прокариотических (например, *E. coli*) или эукариотических клетках (например, клетки насекомых, применение бакуловирусных векторов экспрессии, клеток дрожжей или клеток млекопитающих). Типичные клетки-хозяева включают хозяев, которых, как правило, используют для клонирования и экспрессии, в том числе штаммы *Escherichia coli* TOP10F', TOP10, DH10B, DH5a, HB101, W3110, BL21(DE3) и BL21 (DE3)pLysS, BLUESCRIPT (Stratagene), векторы линий клеток млекопитающих CHO, CHO-K1, HEK293, 293-EBNA pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264: 5503-5509 (1989); векторы pET (Novagen, Madison Wis.). В качестве альтернативы, рекомбинантный вектор экспрессии можно транскрибировать и транслировать *in vitro*, например, с применением регуляторной последовательности промотора T7 и полимеразы T7, а также системы трансляции *in vitro*. Вектор предпочтительно содержит промотор, расположенный выше сайта клонирования, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид. К примерам промоторов, которые можно включать и выключать, относятся lac-промотор, T7-промотор, trc-промотор, tac-промотор и trp-промотор.

Таким образом, в настоящей заявке предложены векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий область GDF15, которые облегчают экспрессию полипептида или конструкции, представляющей интерес. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения векторы содержат функционально связанную нуклеотидную последовательность, регулирующую экспрессию полипептида, содержащего область GDF15. Вектор может содержать или быть связанным с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами, облегчающими экспрессию. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, промотор/энхансер CMV IE человека, промотор RSV, промотор SV40, промотор SL3-3, промотор MMTV или промотор HIV LTR, промотор EF1alpha, промотор CAG), эффективные поли (A) терминирующие

последовательности, точка начала репликации (origin) плазмидного продукта в *E.coli*, ген устойчивости к антибиотикам в качестве селектируемого маркера и/или соответствующий сайт клонирования (например, полилинкер). Векторы также могут содержать индуцибельный промотор, а не конститутивный промотор, такой как CMV IE. Согласно одному аспекту настоящего изобретения нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую полипептид, содержащий область GDF15, функционально связана с тканеспецифичным промотором, который стимулирует экспрессию последовательности в соответствующей с метаболической точки зрения ткани, такой как ткань печени или поджелудочной железы.

III.C. Клетки-хозяева.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты и векторы, раскрытые в настоящей заявке. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения вектор или нуклеиновая кислота встроены в геном клетки-хозяина, тогда как согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения вектор или нуклеиновая кислота являются внехромосомными.

Предложены рекомбинантные клетки, такие как клетки дрожжей, бактерий (например, *E.coli*) и млекопитающих (например, иммортализованные клетки млекопитающих), содержащие такую нуклеиновую кислоту, вектор или комбинации какого-либо одного или всех перечисленных компонентов. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения клетки содержат не встроенную нуклеиновую кислоту, например, плазмиду, космиду, фagemиду или линейный элемент экспрессии, которые содержат кодирующую последовательность для экспрессии полипептида, содержащего область GDF15.

Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий область GDF15, можно ввести в клетку-хозяин посредством трансформации или трансфекции. Способы трансформации клетки вектором экспрессии хорошо известны.

Нуклеиновая кислота, которая кодирует полипептид, содержащий область GDF15, может быть расположена в клетке-хозяине или животном-хозяине и/или доставлена в клетку-хозяин или животное-хозяин посредством вирусного вектора. В качестве вектора можно применять любой подходящий вирусный вектор. Вирусный вектор может содержать любое количество вирусных полинуклеотидов самих по себе или в комбинации с одним или несколькими вирусными белками, которые облегчают доставку, репликацию и/или экспрессию нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в желаемой клетке-хозяине. Вирусный вектор может представлять собой полинуклеотид, содержащий вирусный геном целиком или его часть, конъюгат вирусного белка/нуклеиновой кислоты, вирусоподобную частицу (ВПЧ) или интактную вирусную частицу, содержащую нуклеиновые кислоты вируса и нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, содержащий область GDF15. Вирусный вектор на основе вирусной частицы может содержать вирусную частицу дикого типа или модифицированную вирусную частицу. Вирусный вектор может представлять собой вектор, который требует присутствия другого вектора или вируса дикого типа для репликации и/или экспрессии (например, вирусный вектор может представлять собой хелпер-зависимый вирус), такой как ампликон аденовирусного вектора. Как правило, такие вирусные векторы состоят из вирусной частицы дикого типа либо вирусная частица модифицирована по содержанию в ней белка и/или нуклеиновой кислоты для увеличения трансгенной мощности или способствования трансфекции и/или экспрессии нуклеиновой кислоты (примеры таких векторов включают ампликоны герпесвируса/ампликоны AAB, аденоассоциированного вируса). Как правило, вирусный вектор аналогичен вирусу и/или получен из вируса, который в норме инфицирует человека. Подходящие в этом отношении частицы вирусных векторов включают, например, частицы аденовирусного вектора (в том числе любой вирус семейства *Adenoviridae* или вирус, полученный из вируса семейства *Adenoviridae*), векторные частицы на основе аденоассоциированного вируса (AAB вектор) или другие парвовирусы и частицы парвовирусных векторов, папилломавирусные векторные частицы, флавивирусные векторы, альфавирусные векторы, герпесвирусные векторы, поксвирусные векторы, ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы.

III.D. Выделение полипептида GDF15, конструкции, содержащей полипептид GDF15 или мутантную форму полипептида GDF15.

Полипептид, содержащий область GDF15, можно выделить с применением стандартных способов очистки белка. Полипептид, содержащий область GDF15, можно выделить из клетки, которая была сконструирована для экспрессии полипептида, содержащего область GDF15, например, из клетки, которая в природе не экспрессирует нативный GDF15.

Способы очистки белка, которые можно применять для выделения полипептида, содержащего область GDF15, а также необходимые вещества и реактивы, известны в данной области техники. Примеры способов очистки полипептида, содержащего область GDF15, предложены в настоящей заявке в примерах ниже. Дополнительные способы очистки, которые можно применять для выделения полипептида, содержащего область GDF15, можно найти в публикациях, таких как Bootcov M.R., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11514-9, Fairlie W.D., 2000, *Gene* 254: 67-76.

IV. Фармацевтические композиции, содержащие полипептид GDF15, конструкцию, содержащую полипептид GDF15 или мутантную форму полипептида GDF15.

Предложены фармацевтические композиции, содержащие мономер или мультимер, содержащий

полипептид, который содержит область GDF15. Такие полипептидные фармацевтические композиции могут содержать терапевтически эффективное количество полипептида, который содержит мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, в смеси с фармацевтически или физиологически приемлемым веществом для приготовления лекарственной формы, выбранным в соответствии с путем введения. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "физиологически приемлемый носитель" в настоящей заявке означает одно или несколько веществ для приготовления лекарственной формы, подходящих для осуществления или улучшения доставки мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, в тело субъекта-человека или субъекта, отличного от человека. Данный термин включает любые и все растворители, дисперсионную среду, покрывающие вещества, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и вещества, отсрочивающие всасывание, а также подобные вещества, которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или несколько носителей, которые выбраны из воды, солевого раствора, фосфатно-буферного раствора, декстрозы, глицерола, этанола и подобных растворителей, а также комбинации указанных носителей. В некоторых случаях в фармацевтическую композицию предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннитол, сорбитол, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие вещества или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, увеличивающие срок хранения или эффективность мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, могут также выступать в качестве носителя или могут образовывать составную часть носителя. Подходящие фармацевтически приемлемые носители являются предпочтительно нетоксичными по отношению к реципиенту в применяемых дозах и концентрациях.

Фармацевтическая композиция может содержать вещество (вещества) для приготовления лекарственной формы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, степени растворения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции. Подходящие вещества для приготовления лекарственной формы включают, но не ограничены ими, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин), антимикробные средства, антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидрогенсульфит натрия), буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратный, фосфатный буферы или другие органические кислоты), наполнители (такие как маннитол или глицин), хелатирующие вещества (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)), комплексообразующие вещества (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-β-циклодекстрин), наполнители, моносахариды, дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины), белки (такие как свободный сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины), окрашивающие, вкусовые вещества и разбавители, эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон), полипептиды с низкой молекулярной массой, солеобразующие противоионы (такие как натрий), консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода), растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль), сахароспирты (такие как маннитол или сорбитол), суспендирующие вещества, поверхностно-активные вещества или смачивающие вещества (такие как Pluronic; ПЭГ; сложные эфиры сорбитана; полисорбаты, такие как Полисорбат 20 или Полисорбат 80; Triton; трометамин; лецитин; холестерол или тилоксапол), вещества, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбитол), вещества, увеличивающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов - предпочтительно хлорид натрия или калия, - или маннитол, сорбитол), носители для доставки, разбавители, вспомогательные вещества и/или фармацевтические вспомогательные средства (см., например, руководство REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 19th edition, (1995); Berge et al., J. Pharm. Sci., 66(1), 1-19 (1977)). Дополнительные соответствующие принципы, способы и вещества описаны, например, в руководствах Lieberman et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS-DISPERSE SYSTEMS (2nd ed., vol. 3, 1998); Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS & DRUG DELIVERY SYSTEMS (7th ed. 2000); Martindale, THE EXTRA PHARMACOPEIA (31st edition), Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES (16th-20th and subsequent editions); The Pharmacological Basis Of Therapeutics, Goodman and Gilman, Eds. (9th ed.-1996); Wilson and Gisvolds, TEXTBOOK OF ORGANIC MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, Delgado and Remers, Eds. (10th ed., 1998). Принципы приготовления в состав фармацевтически приемлемых композиций также описаны, например, в руководствах Aulton, PHARMACEUTICS: THE SCIENCE OF DOSAGE FORM DESIGN, Churchill Livingstone (New York) (1988), EXTEMPORANEOUS ORAL LIQUID DOSAGE PREPARATIONS, CSHP (1998)).

Оптимальная фармацевтическая композиция будет определена специалистом в данной области техники в зависимости от, например, предполагаемого пути введения, формата доставки и желаемой дозы (см., например, руководство Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше). Такие композиции могут оказывать влияние на физиологическое состояние, стабильность, скорость высвобождения in vivo, скорость клиренса in vivo полипептида GDF15, конструкции, содержащей полипептид GDF15 или му-

тантную форму полипептида GDF15.

Первичный наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может иметь водную либо неводную природу. Например, подходящий наполнитель или носитель для инъекции может представлять собой воду, физиологический солевой раствор или искусственную спинномозговую жидкость, в которые можно добавлять другие вещества, общепринято используемые в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный со свободным сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные примеры наполнителей. Другие примеры фармацевтических композиций включают буфер Tris приблизительно pH 7,0-8,5 или ацетатный буфер приблизительно pH 4,0-5,5, которые могут дополнительно содержать сорбитол или его подходящий аналог. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиции, содержащие полипептид GDF15, конструкцию, содержащую полипептид GDF15 или мутантную форму полипептида GDF15, могут быть получены в форме для хранения посредством смешивания избранной композиции желаемой степени чистоты с необязательными средствами для приготовления лекарственной формы (Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в форме лиофилизованной таблетки или водного раствора. Более того, продукт, содержащий мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, можно приготовить в состав в форме лиофилизата с применением соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции на основе полипептида могут быть выбраны для парентеральной доставки. В качестве альтернативы, композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через желудочно-кишечный тракт, например, для пероральной доставки. Приготовление такой фармацевтически приемлемой композиции соответствует компетенции специалиста в данной области техники.

Компоненты лекарственной формы присутствуют в концентрациях, которые являются приемлемыми для участка введения. Например, буферы применяют для поддержания pH композиции на физиологическом уровне или на уровне незначительно более низкого pH, как правило, в диапазоне pH от приблизительно 5 до приблизительно 8.

Если предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции для применения согласно настоящему изобретению могут находиться в форме апиrogenного, приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего желаемый полипептид GDF15, конструкцию, содержащую полипептид GDF15 или мутантную форму полипептида GDF15, в фармацевтически приемлемом наполнителе. В особенности подходящий наполнитель для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которой полипептид GDF15, конструкция, содержащая мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, приготовлены в состав в виде стерильного изотоничного раствора, надлежащим образом консервированного. Получение другого препарата может включать приготовление желаемой молекулы в состав со средством, таким как инъеклируемые микросферы, разлагаемые биологическим способом частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), бусины или липосомы, обеспечивающие контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который затем можно доставить посредством инъекции с замедленным всасыванием. Также можно применять гиалуроновую кислоту, которая может способствовать большей длительности циркуляции. Другие подходящие способы введения желаемой молекулы включают применение имплантируемых устройств для доставки лекарственных препаратов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическую композицию можно приготовить в состав для ингаляции. Например, мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, можно приготовить в состав в виде сухого порошка для ингаляции. Растворы для ингаляции, содержащие мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, можно также приготовить в состав с распыляющим веществом для доставки в форме аэрозоля. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения растворы можно распылять. Легочное введение также описано в международной публикации № WO 94/20069, в которой описана легочная доставка белков, модифицированных химическим способом.

Также предполагают, что определенные составы можно вводить пероральным путем. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мономер или мультимер, который содержит полипептид, содержащий область GDF15, который вводят таким способом, можно приготовить в состав с добавлением таких носителей, которые обычно применяют при составлении твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы, либо без добавления данных носителей. Например, можно разработать капсулу для высвобождения активной части состава в определенном участке желудочно-кишечного тракта, когда биологическая доступность является максимальной и пресистемная деградация является минимальной. Можно добавлять дополнительные средства для облегчения всасывания мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15. Также можно применять разбавители, ароматизирующие вещества, воски с низкой температурой плавления, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие вещества, вещества для улучшения распадаемости таблеток и связывающие вещества.

Другая фармацевтическая композиция может содержать эффективное количество мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, в смеси с нетоксичными

вспомогательными веществами, подходящими для производства таблеток. Посредством растворения таблеток в стерильной воде или в другом подходящем наполнителе можно получить растворы в форме одной дозы. Подходящие вспомогательные вещества включают, но не ограничены ими, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связывающие вещества, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; или смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции, содержащие мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, будут очевидными специалисту в данной области техники, в том числе составы с замедленной или контролируемой доставкой, содержащие мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15. Методики приготовления множества других составов с замедленной или контролируемой доставкой, таких как применение носителей на основе липосом, разлагаемых биологическим способом микрочастиц или пористых бусин и инъекций с замедленным всасыванием, также известны специалисту в данной области техники (см. например, международную публикацию № WO 93/15722, в которой описаны пористые полимерные микрочастицы с контролируемым высвобождением для доставки фармацевтических композиций, а также публикации Wischke & Schwendeman, 2008, *Int. J. Pharm.* 364: 298-327 и Freiberg & Zhu, 2004, *Int. J. Pharm.* 282: 1-18, в которых обсуждается получение и применение микросфер/микрочастиц). Как описано в настоящей заявке, гидрогель представляет собой пример состава с замедленной или контролируемой доставкой.

Дополнительные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые полимерные матрицы в форме формованных изделий, например, пленок, или микрокапсулы. Матрицы для замедленного высвобождения могут содержать полиэферы, гидрогели, полилактиды (патент США № 3773919 и европейский патент № 0058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 22: 547-56), поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) (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-гидроксимасляную кислоту (европейский патент № 0133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также содержать липосомы, которые могут быть получены любым из способов, известных в данной области техники. См., например, публикации Epstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3688-92; и европейские патенты № 0036676, 0088046 и 0143949.

Фармацевтическая композиция, содержащая мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, которую используют для введения *in vivo*, как правило, должна быть стерильной. Стерильность можно обеспечить посредством фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Если композиция является лиофилизованной, стерилизацию с применением данного способа можно провести до или после лиофилизации и восстановления. Композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизованной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, поддающуюся прокалыванию с помощью иглы для подкожных инъекций.

После приготовления фармацевтической композиции в состав ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или в виде дегидрированного или лиофилизованного порошка. Такие составы можно хранить в форме, готовой к применению, или в форме (например, лиофилизованной), требующей восстановления перед введением.

Согласно конкретному варианту реализации настоящее изобретение направлено на наборы для получения единицы для введения однократной дозы. Наборы могут содержать каждый первый контейнер, содержащий высушенный белок, и второй контейнер, содержащий водный состав. Также в объем настоящего изобретения включены наборы, содержащие однокамерные или многокамерные преднаполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью либо шприцы с лиофилизатом).

Эффективное количество фармацевтической композиции, которая содержит мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, предназначенной для терапевтического применения, зависит, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области техники понимает, что соответствующие уровни доз для лечения будут, таким образом, отчасти варьировать в зависимости от доставляемой молекулы, показания, по которому применяют мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, пути введения и размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста и общего здоровья) пациента. Соответственно, врач может титровать дозу и модифицировать путь введения для достижения оптимального терапевтического эффекта. Типичная доза может варьировать от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг или более в зависимости от факторов, упомянутых выше. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения доза может находиться в диапазоне от 0,1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг; или от 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг; или составлять 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100, 200 или до приблизительно 10 мг/кг.

Частота введения дозы зависит от параметров фармакокинетики мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, в применяемом составе. Как правило, врач вводит композицию до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая обеспечивает желаемый эффект.

Вследствие этого композицию можно вводить в виде единичной дозы, в виде двух или более доз (которые могут содержать одинаковое количество желаемой молекулы или могут не содержать одинакового количества желаемой молекулы) в течение времени или в виде непрерывной инфузии посредством имплантируемого устройства или катетера. Последующую корректировку соответствующей дозы общепринятым способом может осуществить средний специалист в данной области техники, и такая корректировка соответствует задачам, регулярно выполняемым средним специалистом в данной области техники. Соответствующие дозы могут быть установлены с применением соответствующих данных доз-ответ.

Пути введения фармацевтической композиции находятся в соответствии с известными способами и включают, например, пероральный путь; введение посредством инъекции, внутривенный, интраперитонеальный, интрацеребральный (интрапаренхиматозный), интрацеребровентрикулярный, внутримышечный, внутриглазной, внутриартериальный, интрапортальный или внутриочаговый пути; введение с применением систем с замедленным высвобождением (которые можно также инъектировать); или введение с применением имплантируемых устройств. При необходимости композиции можно вводить посредством болюсной инъекции или непрерывно посредством инфузии, либо с применением имплантируемого устройства.

В качестве альтернативы или дополнительно, композицию можно вводить местно посредством имплантации мембраны, губки или другого соответствующего материала, в который была абсорбирована или инкапсулирована желаемая молекула. В случае применения имплантируемого устройства такое устройство можно имплантировать в любую подходящую ткань или орган, и доставка желаемой молекулы может осуществляться посредством диффузии, болюсного введения с высвобождением в течение времени или непрерывного введения.

Для доставки лекарственного препарата, например, мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, с predetermined скоростью, вследствие чего концентрация лекарственного препарата может поддерживаться на желаемом терапевтически эффективном уровне в течение длительного периода, можно применять множество различных подходов. В одном примере можно применять гидрогель, содержащий полимер, такой как желатин (например, желатин быка, желатин человека или желатин из другого источника) или существующий в природе или полученный синтетическим способом полимер. В гидрогеле можно применять любое процентное содержание полимера (например, желатина), например 5, 10, 15 или 20%. Выбор соответствующей концентрации может зависеть от множества факторов, таких как желаемый терапевтический профиль и профиль фармакокинетики терапевтической молекулы.

Примеры полимеров, которые могут содержаться в гидрогеле, включают полиэтиленгликоль ("ПЭГ"), полиэтиленоксид, полиэтиленоксид-со-полипропиленоксид, блок-сополимеры или случайные сополимеры со-полиэтиленоксида, поливинилалкоголь, поли(винилпирролидинон), поли(аминокислоты), декстран, гепарин, полисахариды, полиэфиры и подобные полимеры.

Другим фактором, который следует учитывать при получении составов на основе гидрогеля, является степень перекрестного сшивания гидрогеля и средства, образующего поперечные сшивки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения перекрестного сшивания можно достичь посредством реакции метакрилирования, в которой используют метакриловый ангидрид. В некоторых случаях высокая степень образования перекрестных сшивок может быть желательной, тогда как в других предпочтительной является меньшая степень образования перекрестных сшивок. В некоторых случаях большая степень перекрестного сшивания обеспечивает более длительное замедленное высвобождение. Большая степень перекрестного сшивания может обеспечивать получение более жесткого гидрогеля и более длительный период, в течение которого осуществляется доставка лекарственного препарата.

Для получения гидрогеля с желаемыми свойствами можно применять любое соотношение полимера к средству, образующему поперечные сшивки (например, метакриловому ангидриду). Например, соотношение полимера к средству, образующему поперечные сшивки, может составлять, например, 8:1, 16:1, 24:1 или 32:1. Например, когда полимер гидрогеля представляет собой желатин, а средство, образующее поперечные сшивки, представляет собой метакрилат, для метакрилового ангидрида:желатина можно применять соотношения 8:1, 16:1, 24:1 или 32:1.

V. Терапевтические применения полипептида GDF15, конструкции, содержащей полипептид GDF15 или мутантную форму полипептида GDF15.

Мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, можно применять для лечения, диагностики или облегчения метаболического состояния или нарушения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения метаболическое нарушение, которое подвергают лечению, представляет собой диабет, например диабет 2 типа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения метаболическое состояние или нарушение представляет собой ожирение. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения метаболическое состояние или нарушение представляет собой дислипидемию, увеличение уровней глюкозы, увеличение уровней инсулина или диабетическую нефропатию. Например, метаболическое состояние или нарушение, которое можно лечить или облегчать с применением мономера или мультимера, содержащего полипептид, который со-

держит область GDF15, включает состояние, при котором субъект-человек имеет уровень глюкозы в крови натошак 125 мг/дл или более, например 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200 или более 200 мг/дл. Уровни глюкозы в крови можно определить в состоянии после приема пищи или натошак либо случайным образом. Метаболическое состояние или нарушение может также включать состояние, при котором субъект подвержен увеличенному риску развития метаболического состояния. В случае субъекта-человека такие состояния включают уровень глюкозы в крови натошак 100 мг/дл. Состояния, которые можно лечить с применением фармацевтической композиции, содержащей мутантный полипептид GDF15, можно также найти в публикации American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes Care-2011, American Diabetes Association, Diabetes Care Vol. 34, No. Supplement 1, S11-S61, 2010.

При практическом применении метаболическое нарушение или состояние, такое как диабет 2 типа, увеличение уровней глюкозы, увеличение уровней инсулина, дислипидемия, ожирение или диабетическая нефропатия, можно лечить посредством введения пациенту, который нуждается в таком лечении, терапевтически эффективной дозы полипептида GDF15, конструкции, содержащей мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15. Введение можно осуществлять, как описано в настоящей заявке, например, посредством внутривенной (ВВ) инъекции, интраперитонеальной (ИП) инъекции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции или пероральным путем в форме таблетки или жидкого состава. В некоторых случаях терапевтически эффективную или предпочтительную дозу мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, может определить врач. Терапевтически эффективная доза мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, зависит, среди прочего, от графика введения, разовой дозы вводимого средства, от того, вводят ли мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, в комбинации с другими терапевтическими средствами, иммунного статуса и здоровья реципиента. Термин "терапевтически эффективная доза" в настоящей заявке означает количество мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, которое вызывает биологический или медицинский ответ в системе ткани, животном или человеке, причем указанный ответ определяет исследователь, врач лечебного дела или другой врач, и указанный ответ включает смягчение или облегчение симптомов заболевания или нарушения, которое подвергают лечению. Т.е. данный термин означает количество мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, которое поддерживает наблюдаемый уровень одного или нескольких желаемых биологических или медицинских ответов, например уменьшения уровней глюкозы, инсулина, триглицерида или холестерина в крови; уменьшения массы тела; или улучшение толерантности к глюкозе, расхода энергии или чувствительности к инсулину.

Следует отметить, что терапевтически эффективная доза мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, может также варьировать в зависимости от желаемого результата. Таким образом, например, в случаях, при которых показано уменьшение уровня глюкозы в крови, доза мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, будет соответствующим образом выше дозы, при которой желательно относительно уменьшение уровня глюкозы в крови. И наоборот, в случаях при которых показан больший уровень глюкозы в крови, доза мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, будет соответствующим образом меньше дозы, при которой желателен относительно больший уровень глюкозы в крови.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой человека, уровень глюкозы в крови у которого составляет 100 мг/дл или больше и который может получать лечение мономером или мультимером, содержащим полипептид, который содержит область GDF15.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ согласно настоящему изобретению включает первый измеряемый исходный уровень одного или нескольких значимых с точки зрения метаболизма соединений, таких как глюкоза, инсулин, холестерол, липид, у субъекта. Затем фармацевтическую композицию, содержащую мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, вводят субъекту. После желаемого периода времени снова определяют уровень одного или нескольких значимых с точки зрения метаболизма соединений (например, глюкозы, инсулина, холестерина, липида в крови) у субъекта. Затем два уровня можно сравнить для определения относительного изменения значимых с точки зрения метаболизма соединений у субъекта. В зависимости от результата данного сравнения можно вводить другую дозу фармацевтической композиции, содержащей мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, для достижения желаемого уровня одного или нескольких значимых с точки зрения метаболизма соединений.

Следует отметить, что фармацевтическую композицию, содержащую мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, можно вводить совместно с другим соединением. Природа и свойства соединения, которое совместно вводят с мономером или мультимером, содержащим полипептид, который содержит область GDF15, зависят от природы состояния, которое подвергают лечению или которое необходимо облегчить. Неограничивающий перечень примеров соединений, которые можно вводить в комбинации с фармацевтической композицией, содержащей мономер или мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, включают розиглитазон, пиог-

литазон, репаглинид, натеглитинид, метформин, экзенатид, стиаглиптин, прамлинтид, глипизид, глиме-приридеакарбозу и миглитол.

VI. Наборы.

Также предложены наборы для реализации раскрытых способов на практике. Такие наборы могут содержать фармацевтическую композицию, такую как композиции, описанные в настоящей заявке, в том числе нуклеиновые кислоты, кодирующие пептиды или белки, предложенные в настоящей заявке, векторы и клетки, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и фармацевтические композиции, которые содержат такие соединения, содержащие нуклеиновую кислоту, которые могут быть предложены в стерильном контейнере. Необязательно в наборы могут также включаться или быть доступными пациенту или организации, оказывающей медицинские услуги, инструкции относительно того, как применять предложенную фармацевтическую композицию для лечения метаболического нарушения.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения набор включает (а) фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество мономера или мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15; и (b) один или несколько контейнеров для фармацевтической композиции. Такой набор может также включать инструкции по его применению; инструкции могут быть приспособлены к конкретному метаболическому нарушению, которое подвергают лечению. Инструкции могут описывать процесс применения и природу материалов, предоставленных в наборе. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения наборы включают инструкции для пациента по проведению введения для лечения метаболического нарушения, такого как увеличение уровней глюкозы, увеличение уровней инсулина, ожирение, диабет 2 типа, дислипидемия или диабетическая нефропатия.

Инструкции могут быть напечатаны на носителе, таком как бумага или пластик и т.д., и могут быть представлены в наборах в виде листка-вкладыша, на этикетке контейнера набора или его компонентов (например, присоединены к упаковке) и т.д. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения инструкции предложены в виде файла с данными для электронного хранения, представленного на подходящем машиночитаемом носителе информации, например, диске CD-ROM, дискете и т.д. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения фактические инструкции в наборе отсутствуют, однако предложены способы получения инструкций из удаленного источника, например, через интернет. Пример такого варианта реализации представляет собой набор, который включает веб-адрес, по которому можно увидеть инструкции и/или с которого можно загрузить инструкции.

Часто желательно, чтобы некоторые или все компоненты набора были упакованы в соответствующую упаковку для поддержания стерильности. Компоненты набора можно упаковать в элемент, содержащий набор, для получения отдельной простой в применении единицы, причем указанный элемент, содержащий набор, например, коробка или аналогичная структура, может представлять собой герметичный контейнер, например, для дополнительного сохранения стерильности некоторых или всех компонентов набора, либо может представлять собой негерметичный контейнер.

Примеры

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и полученные результаты, предложены исключительно с иллюстративной целью, и их не следует истолковывать как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1. Получение молекулы FC-GDF15.

Слияния GDF15 с последовательностями "knob/holeFc", "HemiFc", "charged pair" (delHinge) Fc и "charged pair" (delHinge) "cysteine clamp" Fc стабильно экспрессировали в бессывороточной, адаптированной к росту в суспензии клеточной линии CHO-K1. Молекулы GDF15-FC клонировали в стабильный вектор экспрессии, содержащий ген резистентности к пуromицину, тогда как Fc-цепи клонировали в вектор экспрессии, содержащий ген резистентности к гигромицину (Selexis, Inc.). Плазмиды трансфицировали в соотношении 1:1 с применением липофектамина LTX, и селекцию клеток проводили через 2 дня после трансфекции в запатентованной среде роста, содержащей 10 мкг/мл пуromицина и 600 мкг/мл гигромицина. Среду меняли 2 раза в неделю при проведении селекции. Когда жизнеспособность клеток достигала приблизительно 90%, культуру масштабировали до масштаба серийной продукции с подпиткой. Клетки высевали в концентрации 1е6/мл в запатентованной продуктивной среде и подпитку проводили в дни 3, 6 и 8. Кондиционную среду (КС), образуемую клетками, собирали в день 10 и фильтровали. Конечные показатели жизнеспособности, как правило, составляли приблизительно 90%.

Fc-GDF15 из отфильтрованной кондиционной среды выделяли с применением двухэтапной хроматографической процедуры.

Приблизительно 5 л КС наносили непосредственно на колонку GE MabSelect SuRe, которую предварительно уравнивали фосфатно-буферным раствором (ФБР) Дульбекко. Связавшийся белок подвергали трем этапам промывки: первый - 3 объемами колонки (ОК) ФБР; следующий - 1 ОК 20 mM Tris, 100 mM хлорида натрия, pH 7,4; и, наконец, 3 ОК 500 mM L-аргинина, pH 7,5. В результате данных этапов промывки были удалены не связавшиеся или слабо связавшиеся компоненты среды и примеси клеток-хозяев. Затем колонку повторно уравнивали 5 ОК 20 mM Tris, 100 mM хлорида натрия при pH 7,4, в результате чего УФ-поглощение возвращалось к базовой линии. Целевой белок элюировали 100

мМ уксусной кислотой при pH 3,6 и собирали в общей массе. Общую массу белка быстро титровали в диапазоне pH от 5,0 до 5,5 1 М Tris-HCl, pH 9,2.

Затем общую массу белка с откорректированным значением pH наносили на колонку GE SP Sepharose HP, которую предварительно уравнивали 20 мМ MES при pH 6,0. После этого связавшийся белок промывали 5 ОК буфера для уравнивания, после чего элюировали 20 ОК с линейным градиентом 0-50% 0-400 мМ хлорида натрия в 20 мМ MES при pH 6,0. Фракции собирали во время элюирования и анализировали методом аналитической эксклюзионной хроматографии (Superdex 200) для определения соответствующих фракций для сбора гомогенного продукта. Хроматография SP HP удаляет родственные примеси продукта, такие как свободный Fc, агрегированные формы и мультимеры FC-GDF15.

Затем посредством диализа проводили смену буфера общей массы SP HP на 10 мМ ацетат натрия, 5% пролин, pH 5,2. Продукт концентрировали до концентрации приблизительно 15 мг/мл с применением устройства для центрифугирования Sartorius Vivaspin 20 с отсечением по молекулярной массе десять килодальтон. После этого проводили стерилизующую фильтрацию продукта, и полученный в результате раствор, содержащий молекулы очищенного FC-GDF15, хранили при температуре 5°C. Подлинность и чистоту конечных продуктов оценивали с применением масс-спектрального анализа, электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Способ очистки, описанный выше, применяли для очистки гибридных белков DhMonoFc-GDF15. Однако было обнаружено, что введение в DhMonoFc-GDF15 мутации H6D вызывало образование растворимых агрегатов при элюировании SP. Вследствие этого очистка DhMonoFc-GFF15(H6D) включала дополнительный этап эксклюзионной хроматографии (Superdex 200 с применением 20 мМ фосфата, 250 мМ NaCl, pH 6,8), после которого следовало нанесение на Q-sepharose HP и элюирование градиентом от 0 до 0,6 М NaCl в 20 мМ tris, pH 8,5.

Пример 2. Получение молекул GDF15-HSA и DhMonoFc.

Слияние GDF15 с последовательностями HSA и DhMonoFc стабильно экспрессировали в клетках CHO-S (Invitrogen). Для каждой из конструкций, образующих гомодимеры, кодирующую последовательность клонировали в стабильный вектор экспрессии, содержащий ген устойчивости к пуромицину (Selexis, Inc.). В случае гетеродимера HSA-(G₄S)₄-GDF15:GDF15 последовательность слияния HSA-(G₄S)₄-GDF15 клонировали в вектор экспрессии, содержащий ген устойчивости к пуромицину, и последовательность GDF15 клонировали в вектор экспрессии, содержащий ген устойчивости к гигромицину. Родительские клетки CHO-S поддерживали в среде CD-CHO (Invitrogen) с добавлением 8 мМ L-глутамин и трансфицировали 4 мкг ДНК плазмиды с применением набора для трансфекции Lipofectamine LTX (Invitrogen) согласно инструкциям производителя. В случае гетеродимера HSA-(G₄S)₄-GDF15:GDF15 две плазмиды смешивали перед трансфекцией в соотношении 1:1. Стабильные линии клеток подвергали селекции с применением 10 мкг/мл пуромицина (гомодимеры) или 10 мкг/мл пуромицина и 400 мкг/мл гигромицина (гетеродимер). После восстановления, которое определяли по показателю жизнеспособности >90% с применением счетчика Vi-Cell (Beckman Coulter), стабильные линии клеток CHO-S размножали и высевали для периодической продукции во встряхиваемых колбах либо для продукции с подпиткой в биореакторах WAVE (GE Healthcare). Для обоих процессов клетки высевали в концентрации 1е6 жизнеспособных клеток/мл в продуктивной среде. Продукты периодического процесса собирали посредством центрифугирования в день 6, тогда как продукты процесса с подпиткой подпитывали в дни 3, 6 и 8. КС, образованную клетками, собирали посредством центрифугирования в день 10 и фильтровали.

Гибридные белки HSA-GDF15 очищали от отфильтрованной кондиционной среды с применением двух этапов хроматографии. Отфильтрованную кондиционную среду, содержащую гибридный белок HSA-GDF15, наносили на колонку Cibracon Blue Sepharose HP, уравновешенную 20 мМ фосфатом, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Затем колонку промывали буфером для уравнивания до получения базового уровня УФ-поглощения. Продукт и загрязняющие вещества элюировали буфером, содержащим 20 мМ фосфат, 2 М NaCl, а затем элюаты собирали и анализировали методом ПААГ-ДСН (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) с окрашиванием кумасси для определения того, какие фракции элюата содержат полипептид, мигрирующий с предполагаемой молекулярной массой гибридного белка HSA-GDF15. После этапа с применением Blue Sepharose объединенные фракции, содержащие продукт, диализовали против 10 мМ Tris, pH 8,0. Этап диализа позволял гибриднему белку HSA-GDF15 связаться при нанесении на анион-обменную хроматографическую смолу. Итоговым этапом хроматографии являлась хроматография на Q-Sepharose HP с применением линейного градиента (от 0 до 0,6 М NaCl в 10 мМ Tris, pH 8,0) для элюирования связавшегося гибридного белка. Элюат собирали с Q-Sepharose HP в виде фракций, а затем анализировали методом ПААГ-ДНС и аналитической эксклюзионной хроматографии для определения соответствующих фракций для объединения. Анализ методами ЖХМС (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия) и ПААГ-ДСН проводили для подтверждения подлинности каждого белка. Затем посредством диализа проводили смену буфера в полученной общей массе на 10 мМ ацетат натрия, 9% сахарозу, pH 4,5, продукт подвергали стерилизующей фильтрации, после чего хранили при температуре 5°C или замораживали.

Гибридные белки DhMonoFc-GDF15 очищали, как описано в примере 2 выше для других гибридных белков FC-GDF15.

Пример 3. Подавление потребления пищи у прожорливых мышей ob/ob с применением полипептидов Fc, гибридных с GDF15, и полипептидов HSA, гибридных с GDF15.

GDF15 уменьшает потребление пищи у прожорливых мышей ob/ob; анализ потребления пищи применяли для оценки эффективности различных форм аналогов GDF15. Поскольку период полужизни полипептида GDF15 человека у мыши, согласно наблюдениям, составляет приблизительно 3 ч, для увеличения периода полужизни белка применяли стратегию слияния с Fc. Были получены различные мультимеры, содержащие полипептид, который содержит область GDF15, и активность данных мультимеров *in vivo* анализировали посредством введения мультимера прожорливым мышам ob/ob, дефицитным по лептину, и измерения способности конкретного мультимера, содержащего полипептид, который содержит область GDF15, подавлять потребление пищи у данных животных. Исследуемый мультимер, содержащий полипептид, который содержит область GDF15, вводили мышам ob/ob возрастом 7-8 недель (Jackson Laboratory) посредством подкожной инъекции в день 0 в 16-17 ч. После инъекции животных переносили в клетки, количество пищи в которых было предварительно измерено, и потребление пищи измеряли на следующий день в 9-10 ч.

Результаты иллюстративных экспериментов представлены на фиг. 6-53. Данные эксперименты свидетельствуют, что описанные мультимеры, содержащие области GDF15, демонстрируют уменьшение потребления пищи мышами ob/ob с большей активностью, чем нативный зрелый гомодимер чGDF15.

Пример 4. Хроническая эффективность конструкций GDF15 у мышей DIP.

Определенные мультимеры, содержащие области GDF15, вводили хронически и подкожно мышам DIO один раз в неделю. Конструкции продемонстрировали эффективность улучшения различных параметров метаболизма, в том числе массы тела, уровней глюкозы в крови и толерантности к глюкозе, уровней инсулина в сыворотке, уровней холестерина в сыворотке, уровней триглицерида в сыворотке и пероральной толерантности к липидам.

Пример 5. Активность конструкций GDF15 *in vivo*.

Самцов C57B1/6 кормили рационом с высоким 60%-ным содержанием жиров в течение 15 недель и разделяли на различные группы лечения, причем до начала лечения животные каждой группы имели одинаковую массу тела и уровни глюкозы, инсулина, триглицерида и холестерина. Животным подкожно вводили белки или наполнитель (буфер) еженедельно в течение 5 недель. Использовали три различных уровня доз белков: 10, 1, 0,1 нмоль/кг, что эквивалентно 1,25, 0,125, 0,0125 мг/кг. Исследования проводили в течение 5 недель, последнюю дозу вводили в день 28.

Массу тела измеряли еженедельно в течение 5 недель лечения и вымывания лекарственного препарата. Один пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ) проводили через 2 недели после первой инъекции белка на животных, которые находились натошак в течение 4 ч. Другой пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ) проводили через 5 недель после первой инъекции белка на животных, которые находились натошак в течение 16 ч. При проведении ПТТГ животным пероральным путем вводили раствор глюкозы 2 г/кг, и уровни глюкозы измеряли во временных точках 0, 15, 30, 60, 120 мин с применением глюкометра AlphaTRAK (Abbott). Рассчитывали площадь под кривой (area under curve, AUC) уровней глюкозы во время ПТТГ для сравнения толерантности к глюкозе различных групп лечения. Образцы сыворотки отбирали через 3 недели после первой инъекции белка и применяли для измерения уровней инсулина, триглицерида и холестерина, а также уровней исследуемых соединений. Уровни инсулина измеряли с применением набора для иммуноанализа (Alpco). Уровни триглицерида и холестерина измеряли с применением ферментативных анализов (Wako).

Результаты представлены на фигурах 54-59 (звездочки показывают статистическую значимость). Данные эксперименты продемонстрировали, что описанные мультимеры, содержащие области GDF15, уменьшают AUC уровней глюкозы во время ПТТГ (фиг. 55 и 59), уменьшают массу тела (фиг. 54) уменьшают уровни инсулина (фиг. 56), уменьшают уровни холестерина (фиг. 58) и уменьшают уровни триглицеридов (фиг. 57).

Пример 6. Температурная стабильность конструкций GDF15.

Температурную стабильность избранных конструкций GDF15 оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии на системе MicroCal Capillary VP-DSC, в которой разницу температур между эталонной ячейкой и ячейкой с образцом непрерывно измеряют и калибруют к единицам мощности. Канал данных называют в настоящей заявке "сигнал PM" или "разница мощности" (PM) между эталонной ячейкой и ячейкой с образцом. Разворачивание молекулы белка выглядит на термограмме ДСК как эндотермический переход и может быть охарактеризовано с помощью средних точек температурного перехода (T_m). Образцы нагревали в диапазоне от 10 до 100°C со скоростью нагревания 60°C/ч. Время предварительного сканирования составляло 15 мин, период фильтрации составлял 10 с. Концентрации, которые применяли в экспериментах методом ДСК, составляли приблизительно 1,0 мг/мл. Анализ данных для коррекции базовой линии и определения значений T_m проводили с применением программного обеспечения MicroCal Origin 7.

В частности, димер DhCpmFc(-)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+) сравнивали с димером Dh3CpmFc(-)-

GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+); димер DhCpmFc(-)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+) сравнивали с димером Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+); димер DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):DhCpmFc(+) (S354C) сравнивали с димером Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+) (S354C); и димер DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+) (S354C) сравнивали с димером Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+) (S354C). Результаты представлены на фиг. 61. Данные эксперименты свидетельствуют, что домены "Dh3CpmFc" характеризуются большей стабильностью, чем соответствующие домены "DhCpmFc".

Пример 7. Анализ связывания рецептора Fcγ.

Активность связывания с рецепторами Fcγ избранных конструкций GDF15 анализировали на приборе BIA3000. Каждый рецептор Fcγ захватывали на поверхности CM5, покрытой антителом против His (уровень удерживания захвата ~ 200 ЕО, единиц ответа). Конструкции GDF15 разводили до концентрации 250 нМ в буфере для образца (0,1 мг/мл БСА, 0,005% P20, ФБР). Каждую конструкцию GDF15 инъецировали над поверхностями с рецептором Fcγ и захваченными антителами против His со скоростью 50 мкл/мин в течение 3 мин. После 5-минутной диссоциации в приборном буфере для анализа (0,005% P20 в ФБР) поверхность каждого рецептора Fcγ регенерировали инъекцией 8 мМ глицина, pH 1,5, 1М NaCl в течение 30 с с последующей инъекцией 10 мМ глицина, pH 1,5 в течение 30 с. Полученные в результате сенсограммы анализировали с применением программного обеспечения BIAcore BIAEvaluation (v. 4.1). Ответы связывания в единицах ЕО считывали за 10 с до окончания инъекции.

В частности, связывание с FcγRI, FcγRIIA и FcγRIIА определяли для димера DhCpmFc(-)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+), димера DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):DhCpmFc(+) (S354C); димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+); димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3):Dh3CpmFc(+) (S354C); димера Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+); и димера Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D):Dh3CpmFc(+) (S354C). Результаты представлены на фиг. 60. Данные эксперименты свидетельствуют, что домены "Dh3CpmFc" по существу устраняют связывание с FcγRI, FcγRIIA и FcγRIIА.

Несмотря на то что настоящее изобретение было описано в отношении различных вариантов реализации, следует понимать, что различные вариации и модификации будут очевидными специалисту в данной области техники. Вследствие этого предполагают, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные вариации, которые относятся к заявленному объему настоящего изобретения. Кроме того, заголовки разделов используются в настоящей заявке исключительно с организационной целью, и их не следует истолковывать как ограничивающие описываемый предмет изобретения.

Все публикации, ссылки на которые содержатся в настоящей заявке, явным образом включены посредством ссылки в настоящую заявку для любой цели.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный белок для лечения метаболического нарушения, содержащий область фактора дифференцировки и роста 15 (GDF15), где область GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 97%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 4, 8 или 12, где указанная область связана посредством полипептидного линкера с Fc-доменом с последовательностью SEQ ID NO: 220 или Fc-доменом с последовательностью SEQ ID NO: 227.

2. Гибридный белок по п.1, отличающийся тем, что указанный Fc-домен имеет аминокислотную последовательность 227.

3. Гибридный белок по п.2, отличающийся тем, что указанная область GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 97%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 12 и содержит мутацию в положении 3.

4. Гибридный белок по п.3, где мутацией в положении 3 является мутация N3D.

5. Гибридный белок по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанная область GDF15 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 8, 12, 25, 52 или 55.

6. Гибридный белок по п.1, отличающийся тем, что указанный гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222, 225, 229 или 232.

7. Гибридный белок по п.1, отличающийся тем, что указанный полипептидный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 30, 34, 40, 58, 61, 64, 69, 72, 75, 78, 113, 116, 119, 122, 125 или 128.

8. Гибридный белок по любому из пп.1-7, где метаболическое нарушение представляет собой диабет, ожирение, дислипидемию или диабетическую нефропатию.

9. Димер для лечения метаболического нарушения, содержащий (i) первый белок, содержащий гибридный белок по любому из пп.1-8, и (ii) второй белок, содержащий Fc-домен.

10. Димер по п.9, отличающийся тем, что второй белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219, 226, 301 или 302.

11. Димер по п.9 или 10, отличающийся тем, что указанный первый белок и указанный второй белок соединены нековалентным образом.

12. Димер по п.9 или 10, отличающийся тем, что указанный первый белок и указанный второй бе-

лок соединены ковалентным образом.

13. Димер по п.9 или 10, отличающийся тем, что указанный первый белок и указанный второй белок соединены посредством дисульфидной связи.

14. Димер по любому из пп.9-13, где метаболическое нарушение представляет собой диабет, ожирение, дислипидемию или диабетическую нефропатию.

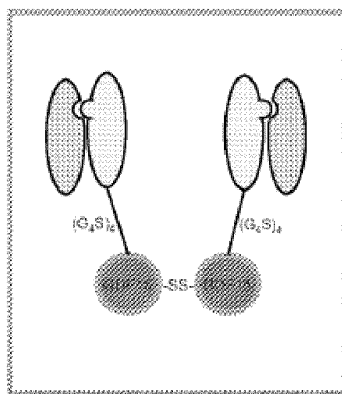
15. Тетрамер для лечения метаболического нарушения, содержащий (i) первый димер по любому из пп.9-14 и (ii) второй димер по любому из пп.9-14, где указанный первый димер и указанный второй димер соединены посредством межцепочечной дисульфидной связи между областью GDF15 первого димера и областью GDF15 второго димера.

16. Тетрамер по п.15, где метаболическое нарушение представляет собой диабет, ожирение, дислипидемию или диабетическую нефропатию.

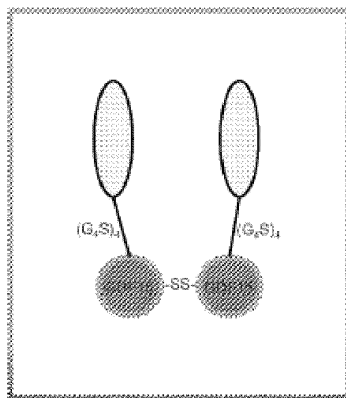
17. Применение гибридного белка по любому из пп.1-8, димера по любому из пп.9-14 или тетрамера по любому из пп.15, 16 для лечения метаболического нарушения.

18. Применение гибридного белка по любому из пп.1-8, димера по любому из пп.9-14 или тетрамера по любому из пп.15, 16 для лечения диабета, ожирения, дислипидемии или диабетической нефропатии.

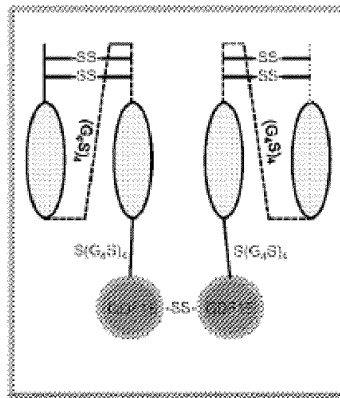
19. Применение гибридного белка по любому из пп.1-8, димера по любому из пп.9-14 или тетрамера по любому из пп.15, 16 для уменьшения потребления пищи, массы тела, уровней инсулина, уровней триглицерида, уровней холестерина или уровней глюкозы у субъекта.



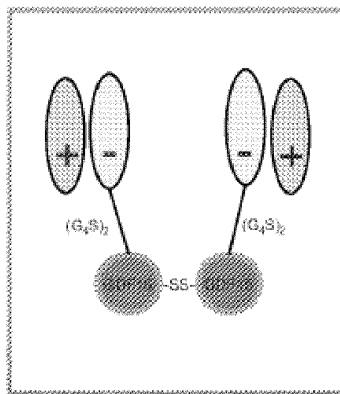
Фиг. 1



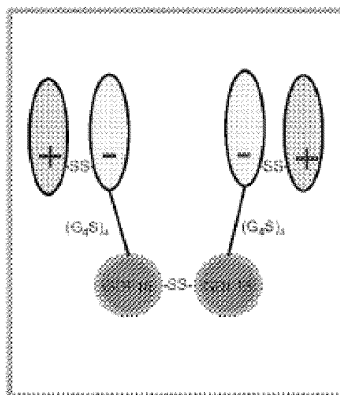
Фиг. 2



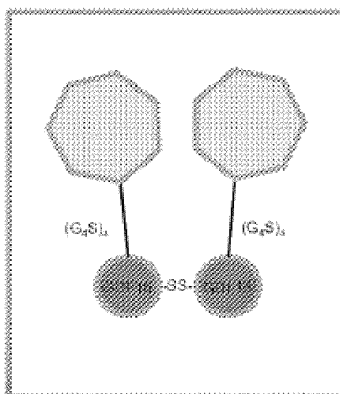
Фиг. 3



Фиг. 4



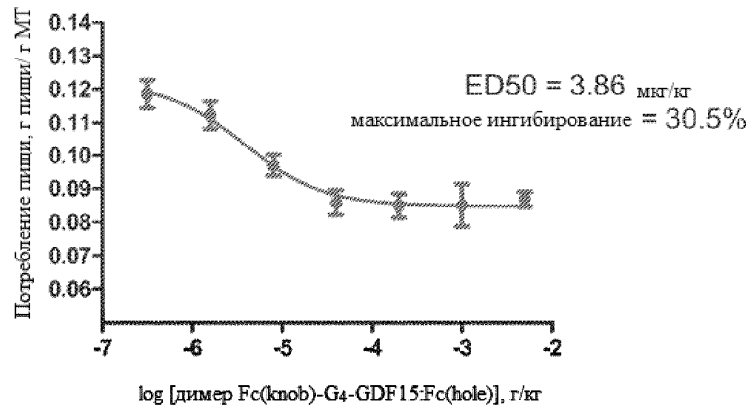
Фиг. 5



Фиг. 6

Анализ потребления пищи

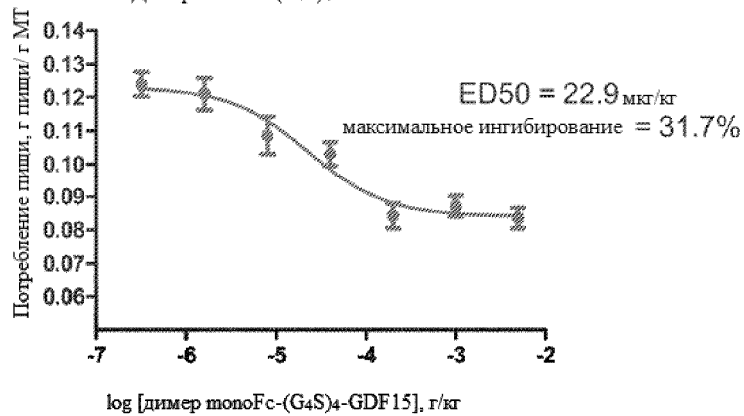
Димер Fc(knob)-G4-GDF15:Fc(hole)



Фиг. 7

Анализ потребления пищи

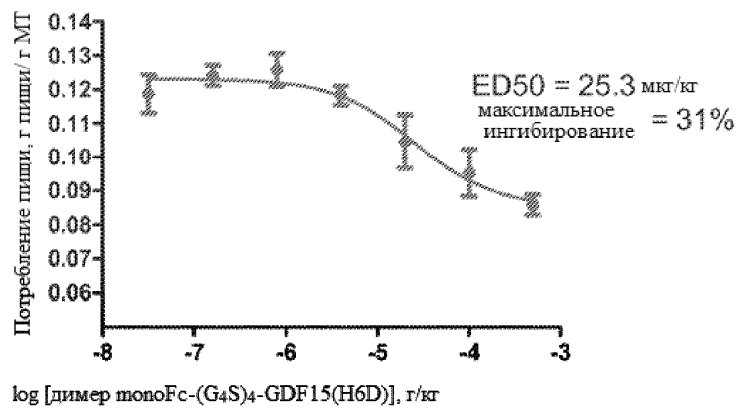
Димер моноFc-(G4S)4-GDF15



Фиг. 8

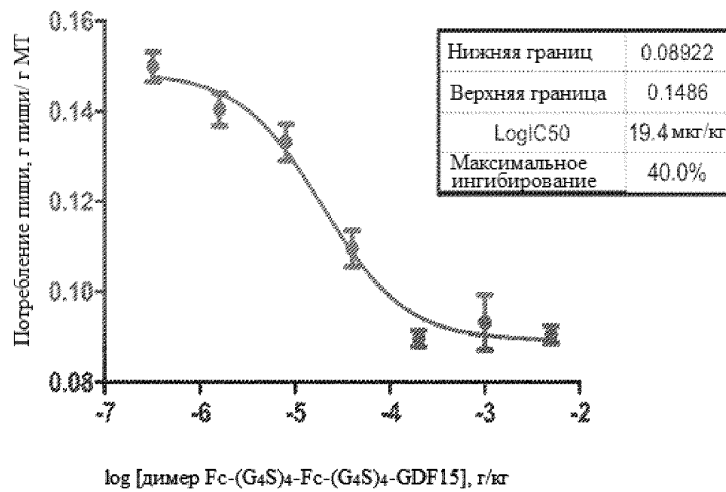
Анализ потребления пищи

Димер моноFc-(G4S)4-GDF15(H6D)



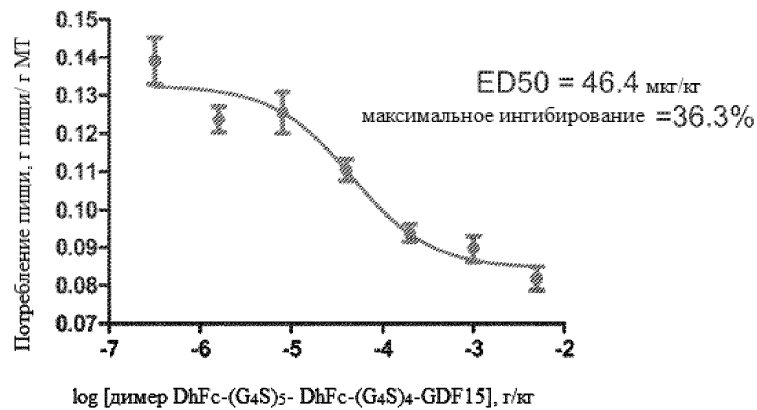
Фиг. 9

Анализ потребления пищи

Димер Fc-(G4S)₄-Fc-(G4S)₄-GDF15

Фиг. 10

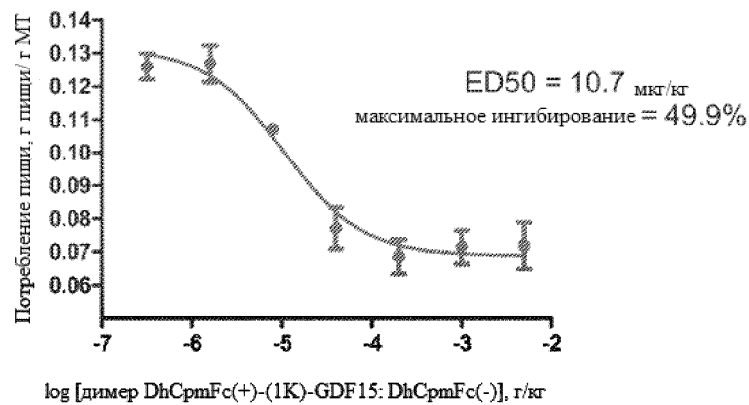
Анализ потребления пищи

Димер DhFc-(G4S)₅- DhFc-(G4S)₄-GDF15

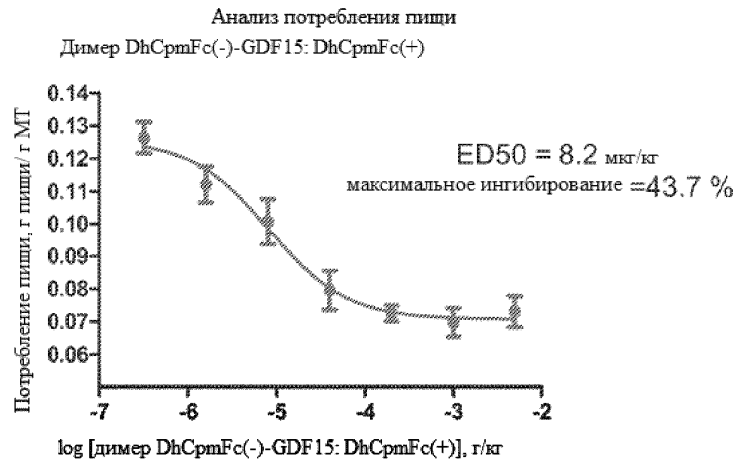
Фиг. 11

Анализ потребления пищи

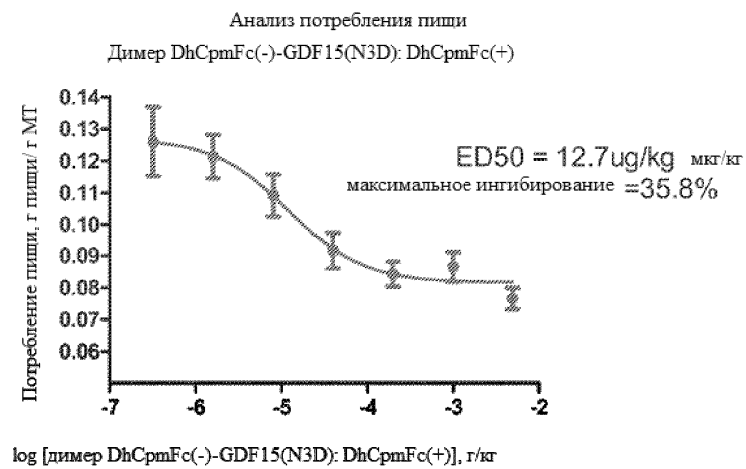
Димер DhCpmFc(+)-(1K)-GDF15: DhCpmFc(-)



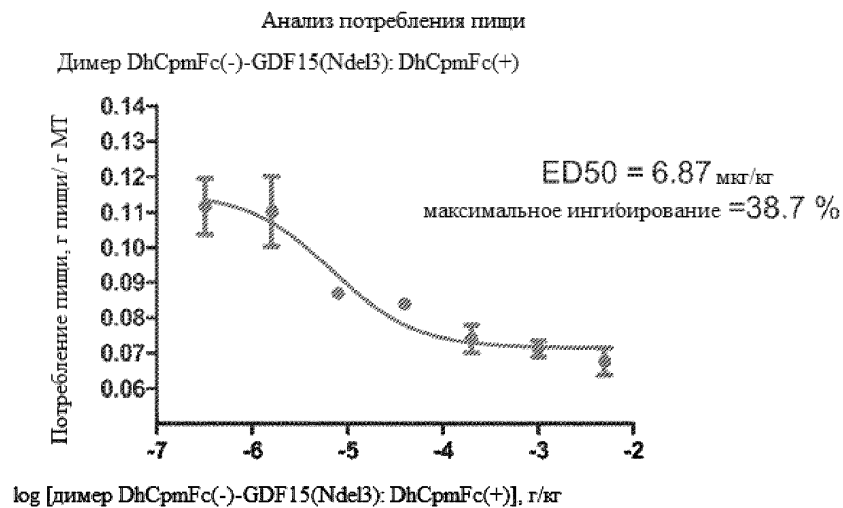
Фиг. 12



Фиг. 13



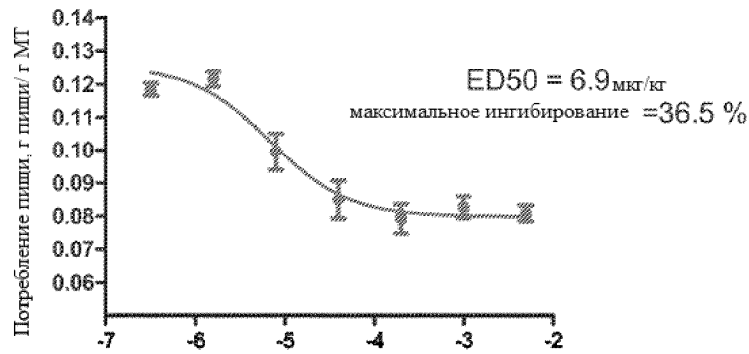
Фиг. 14



Фиг. 15

Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)-G4-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)

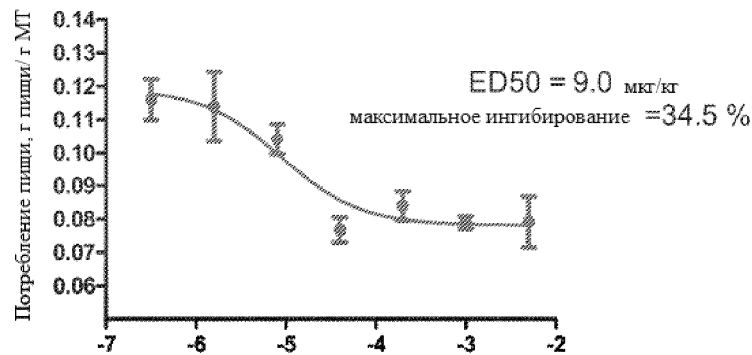


log [димер DhCpmFc(-)-G4-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)], г/кг

Фиг. 16

Анализ потребления пищи

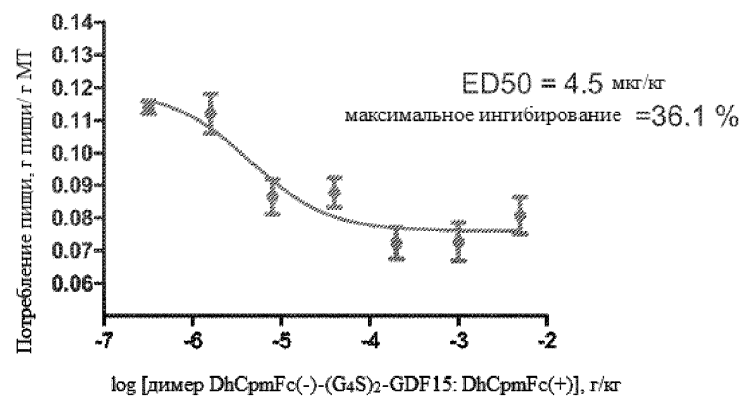
Димер DhCpmFc(-)-G4S-GDF15: DhCpmFc(+)



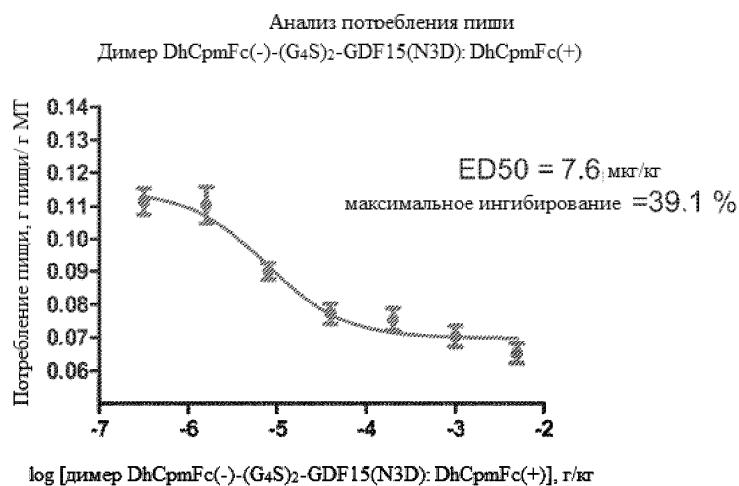
log [димер DhCpmFc(-)-G4S-GDF15: DhCpmFc(+)], г/кг

Фиг. 17

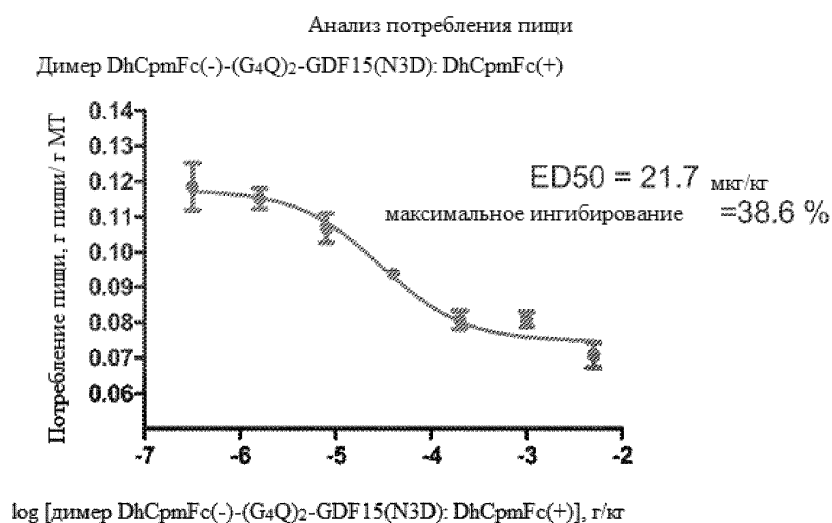
Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)-(G4S)₂-GDF15: DhCpmFc(+)log [димер DhCpmFc(-)-(G4S)₂-GDF15: DhCpmFc(+)], г/кг

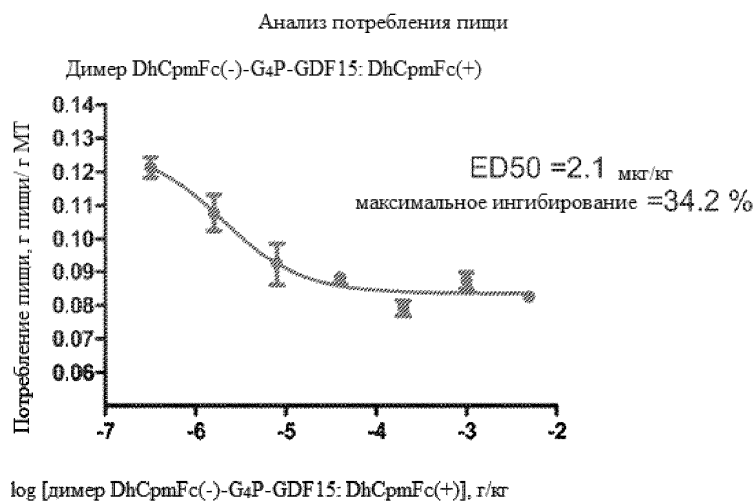
Фиг. 18



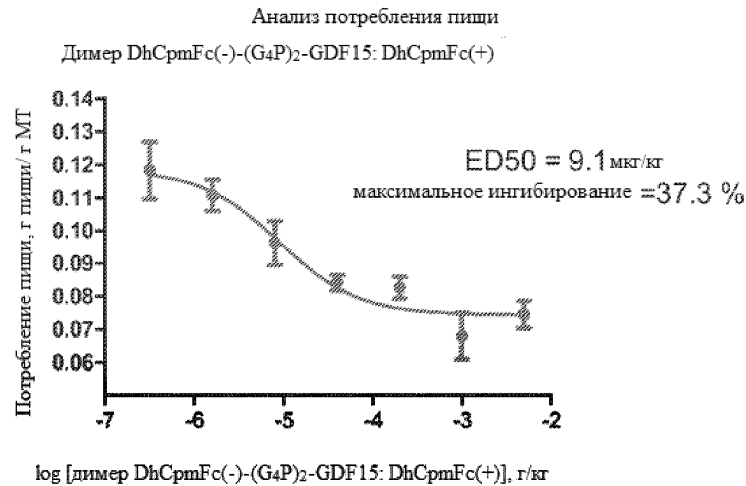
Фиг. 19



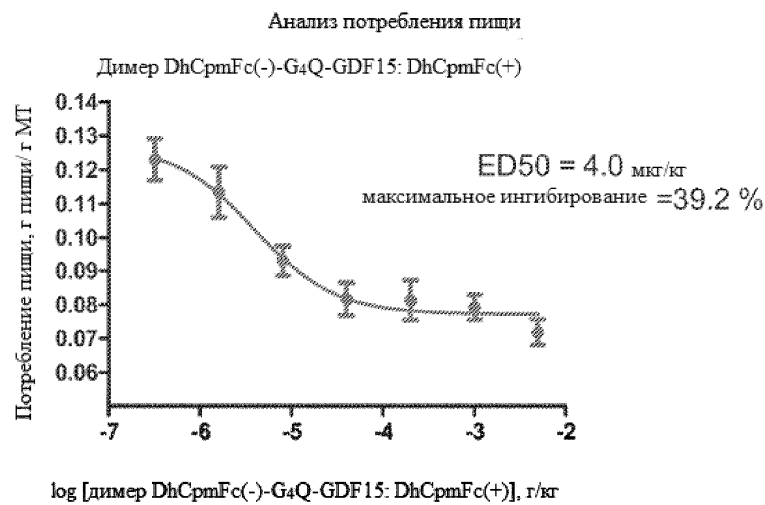
Фиг. 20



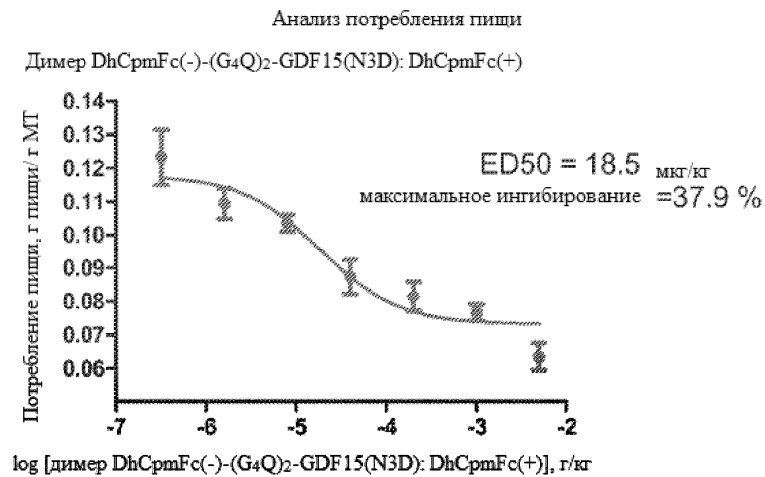
Фиг. 21



Фиг. 22

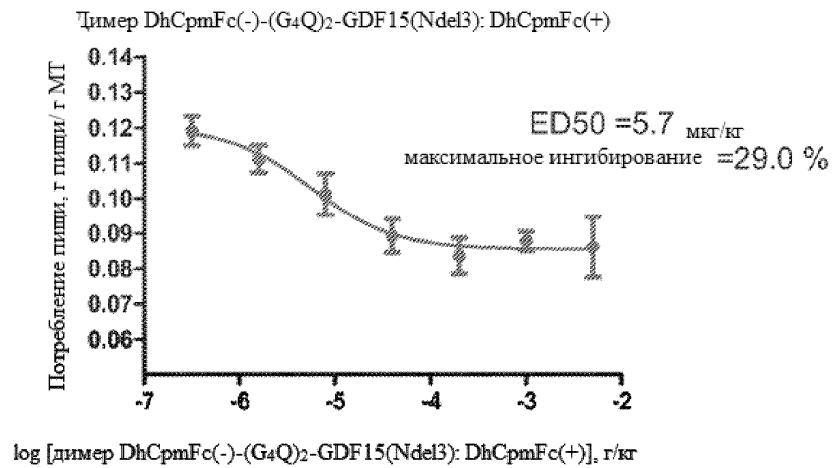


Фиг. 23



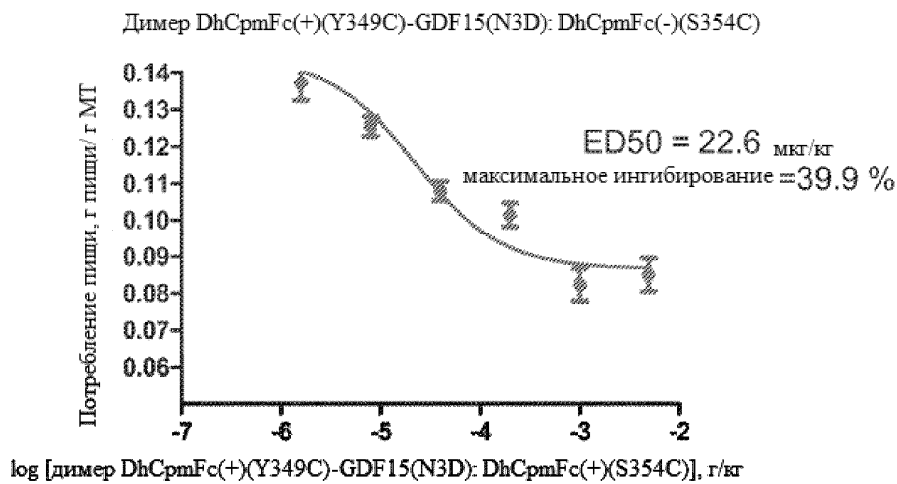
Фиг. 24

Анализ потребления пищи



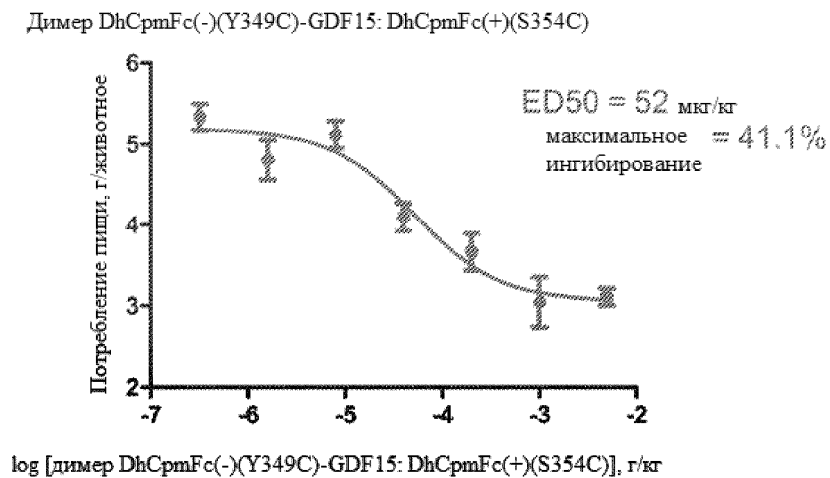
Фиг. 25

Анализ потребления пищи



Фиг. 26

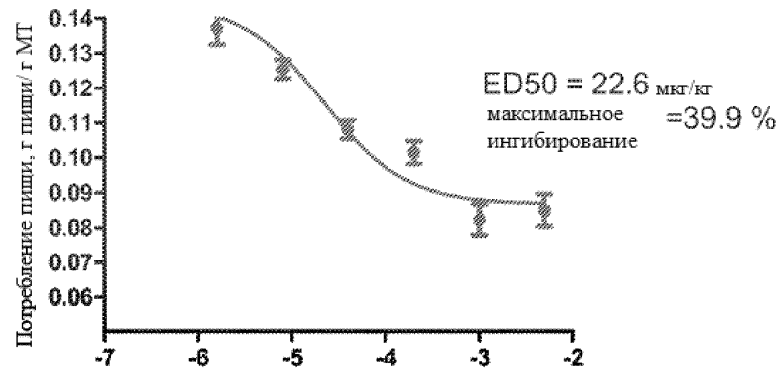
Анализ потребления пищи



Фиг. 27

Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)

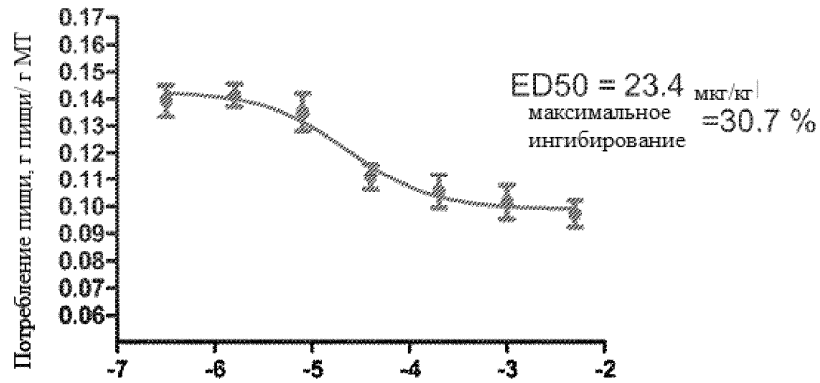


log [димер DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)], г/кг

Фиг. 28

Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3): DhCpmFc(+)(S354C)

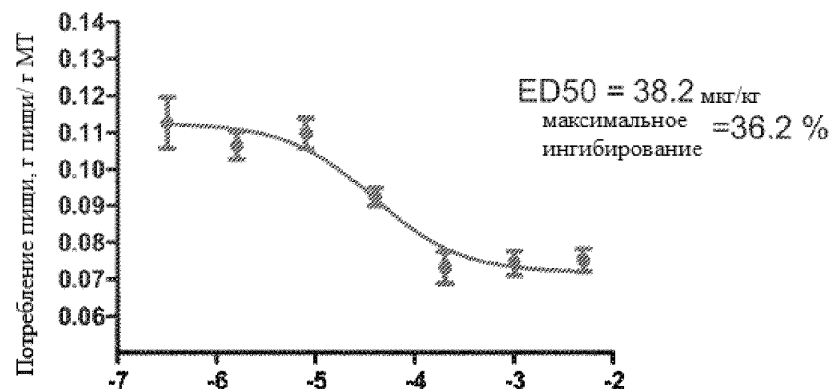


log [димер DhCpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3): DhCpmFc(+)(S354C)], г/кг

Фиг. 29

Анализ потребления пищи

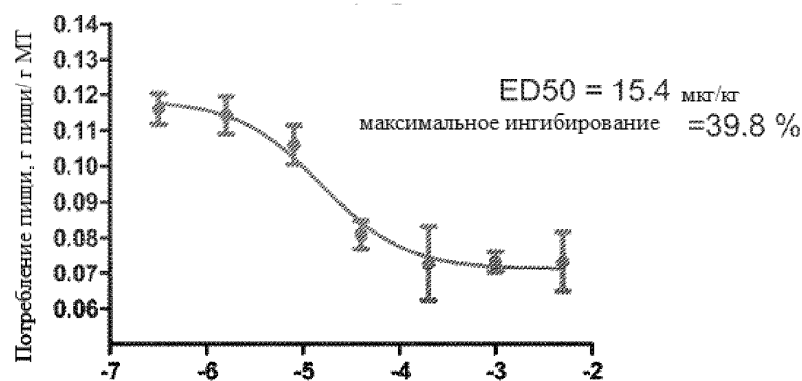
Димер DhCpmFc(-)(Y349C)-G4-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)



log [димер DhCpmFc(-)(Y349C)-G4-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)], г/кг

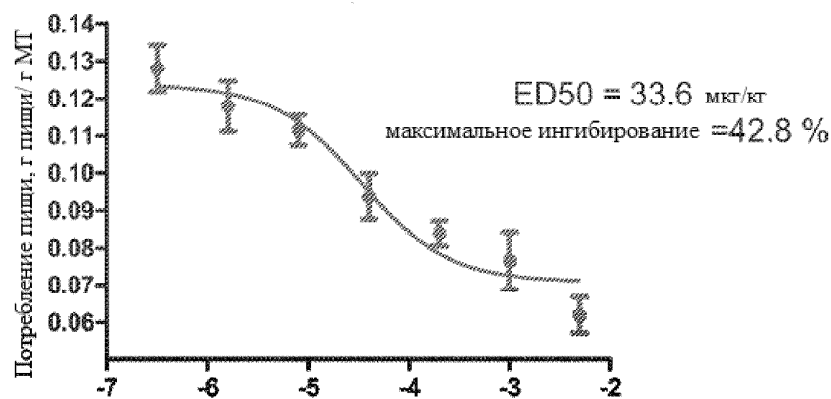
Фиг. 30

Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)(Y349C)-(G4S)₂-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)log [димер DhCpmFc(-)(Y349C)-(G4S)₂-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)], г/кг

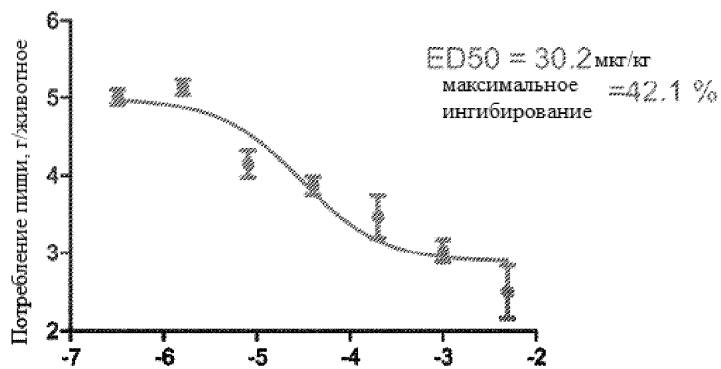
Фиг. 31

Анализ потребления пищи

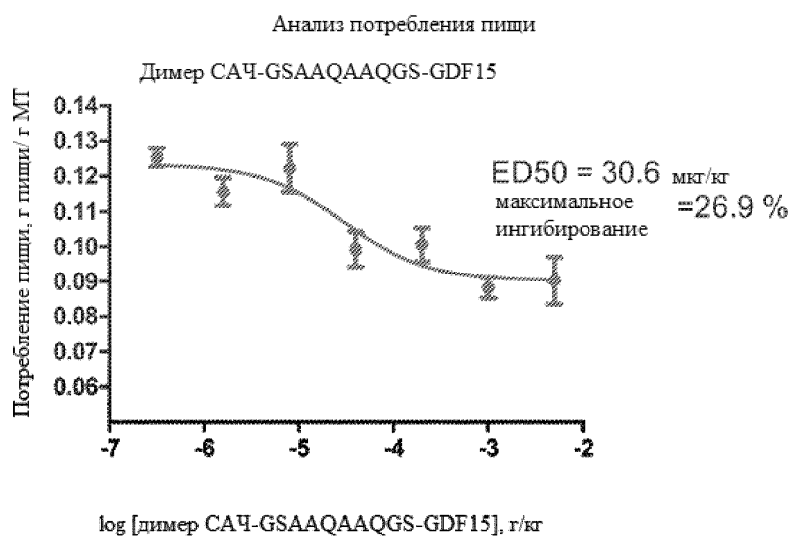
Димер DhCpmFc(-)(Y349C)-(G4Q)₂-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)log [димер DhCpmFc(-)(Y349C)-(G4Q)₂-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(S354C)], г/кг

Фиг. 32

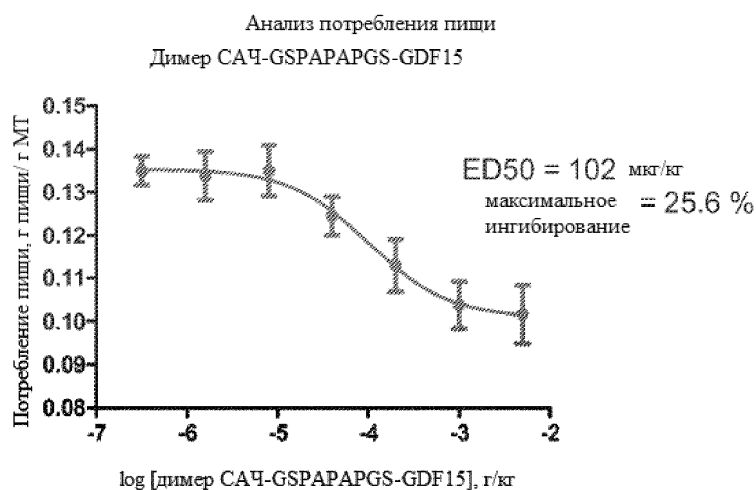
Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)(L351C)-(G4S)₂-GDF15: DhCpmFc(+)(L351C)log [димер DhCpmFc(-)(L351C)-(G4S)₂-GDF15: DhCpmFc(+)(L351C)], г/кг

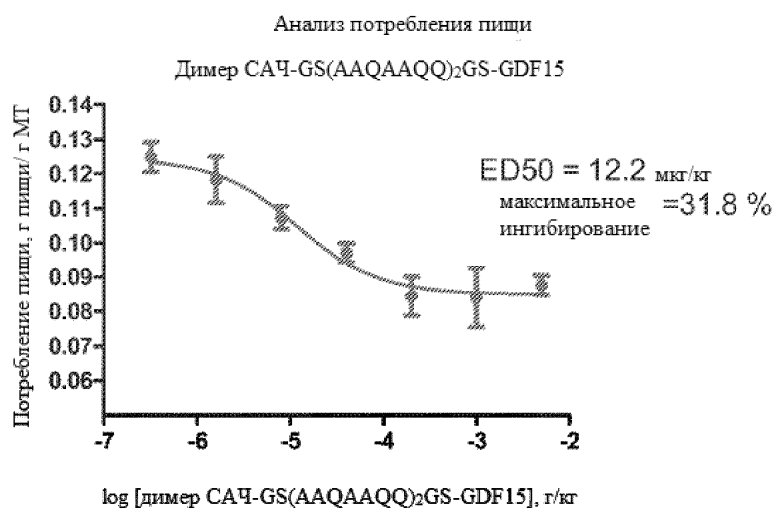
Фиг. 33



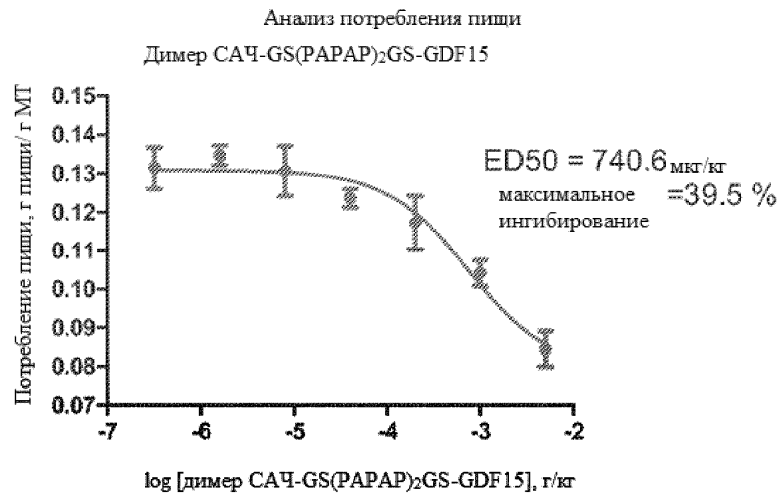
Фиг. 34



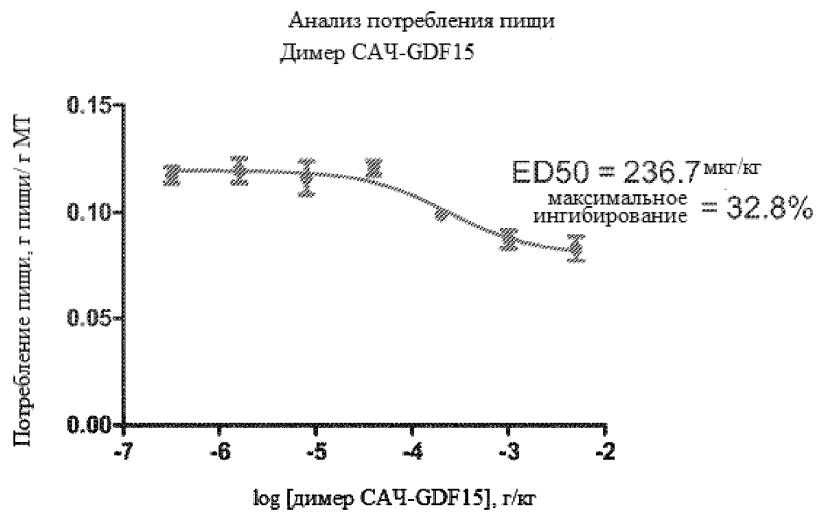
Фиг. 35



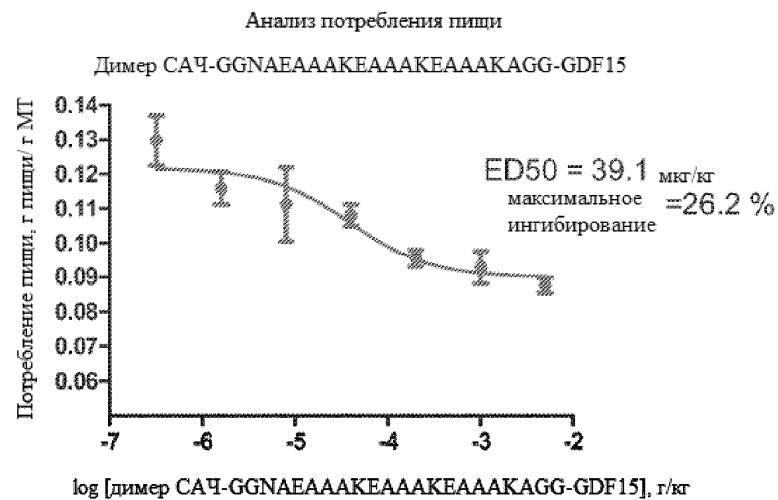
Фиг. 36



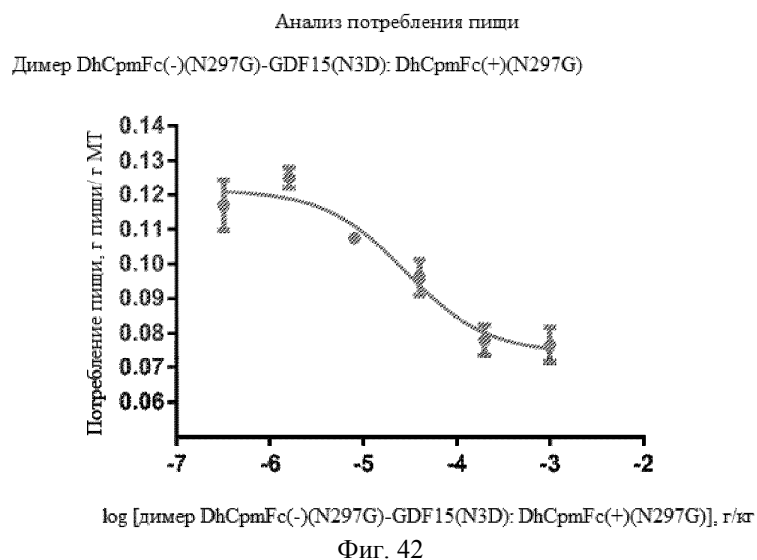
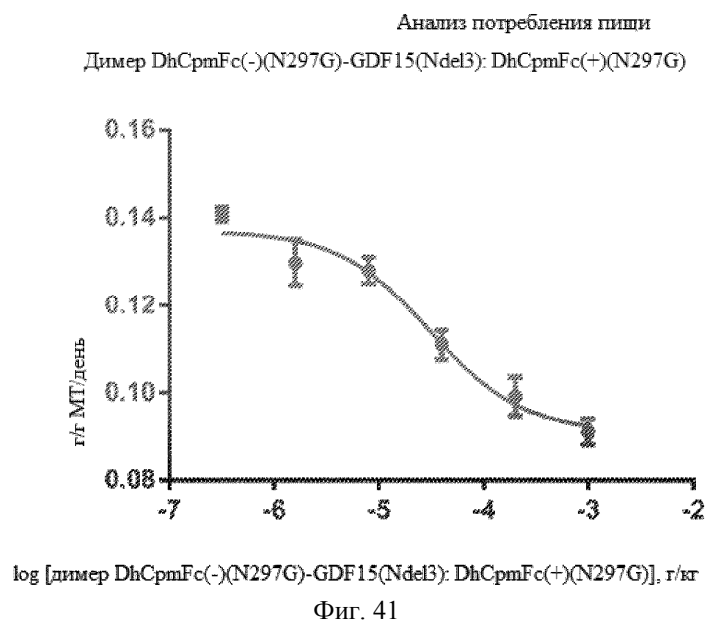
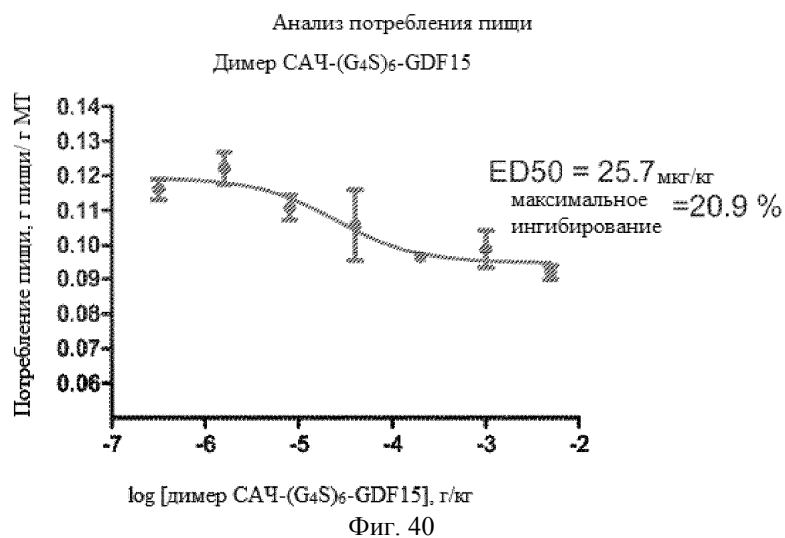
Фиг. 37



Фиг. 38

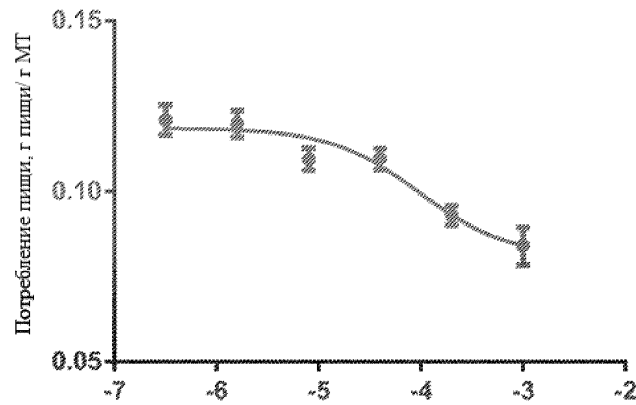


Фиг. 39



Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Ndel3): DhCpmFc(+)(N297G)(S354C)

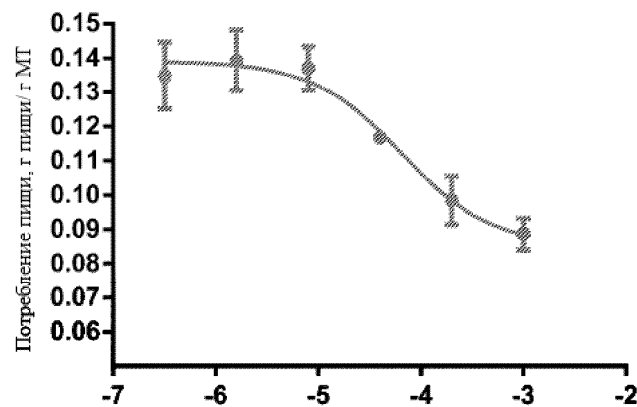


log [димер DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(Ndel3): DhCpmFc(+)(N297G)(S354C)], г/кг

Фиг. 43

Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(N297G)(S354C)

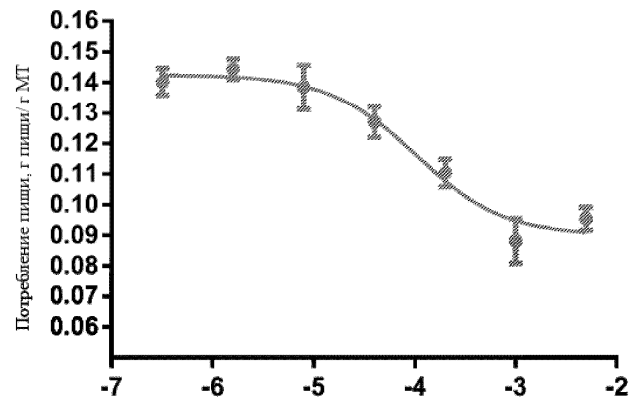


log [димер DhCpmFc(-)(N297G)(Y349C)-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(N297G)(S354C)], г/кг

Фиг. 44

Анализ потребления пищи

Димер DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(Ndel3): DhCpmFc(+)(N297G)(L351C)

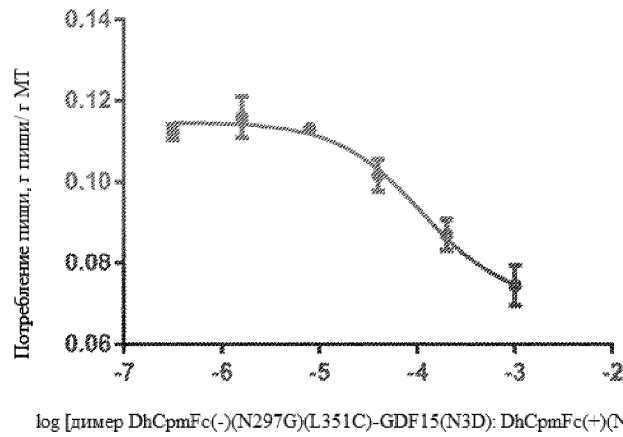


log [димер DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(Ndel3): DhCpmFc(+)(N297G)(L351C)], г/кг

Фиг. 45

Анализ потребления пищи

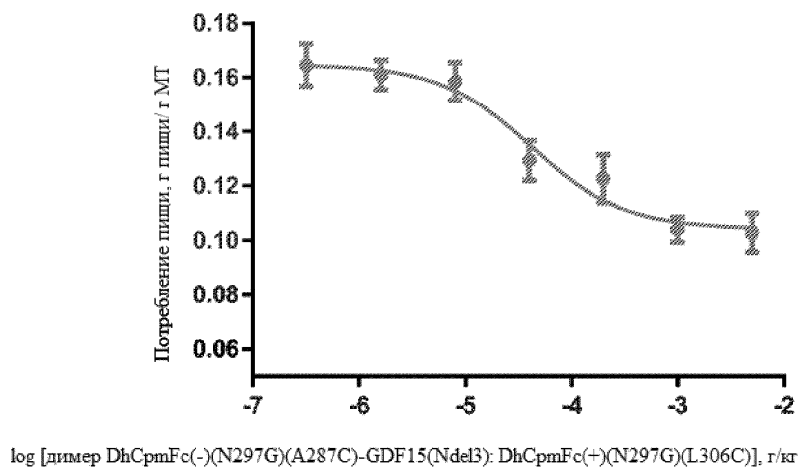
Димер DhCpmFc(-)(N297G)(L351C)-GDF15(N3D): DhCpmFc(+)(N297G)(L351C)



Фиг. 46

Анализ потребления пищи

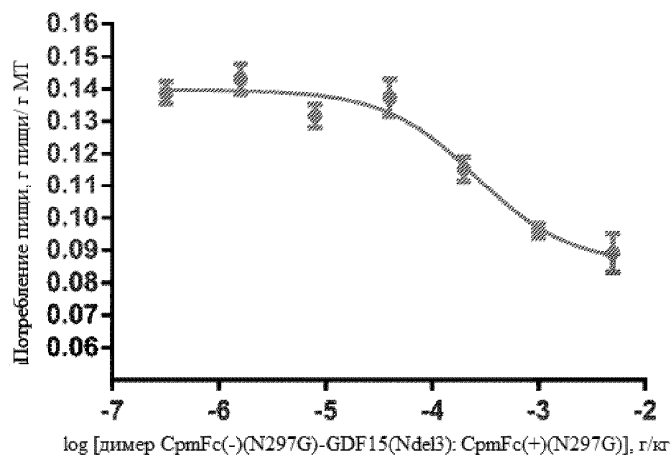
Димер DhCpmFc(-)(N297G)(A287C)-GDF15(Ndel3): DhCpmFc(+)(N297G)(L306C)



Фиг. 47

Анализ потребления пищи

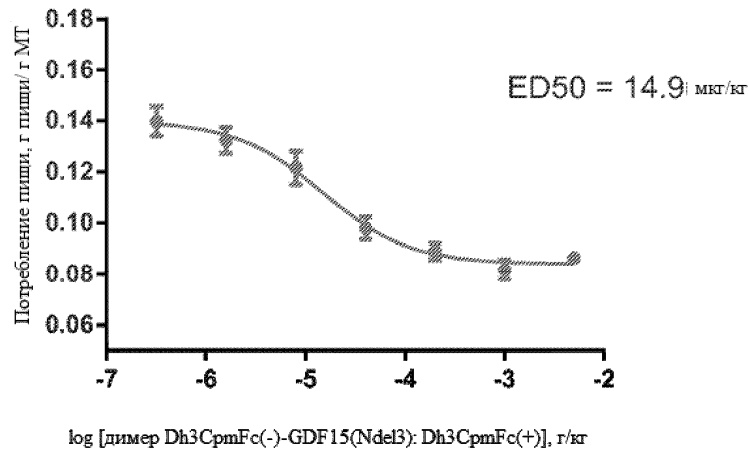
Димер CpmFc(-)(N297G)-GDF15(Ndel3): CpmFc(+)(N297G)



Фиг. 48

Анализ потребления пищи

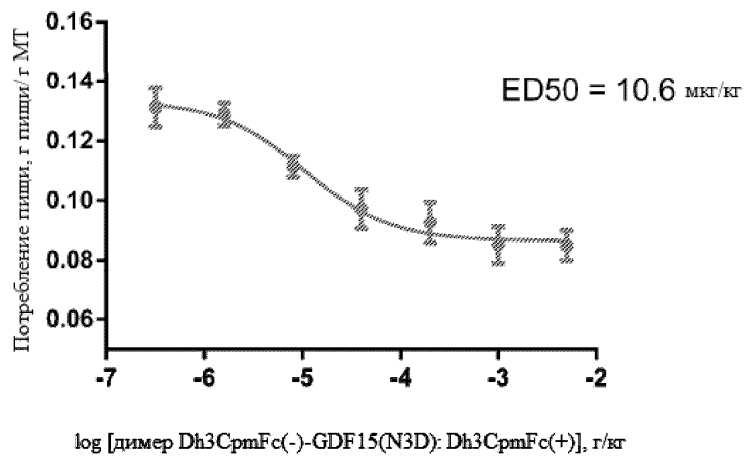
Димер Dh3CpmFc(-)-GDF15(Ndel3): Dh3CpmFc(+)



Фиг. 49

Анализ потребления пищи

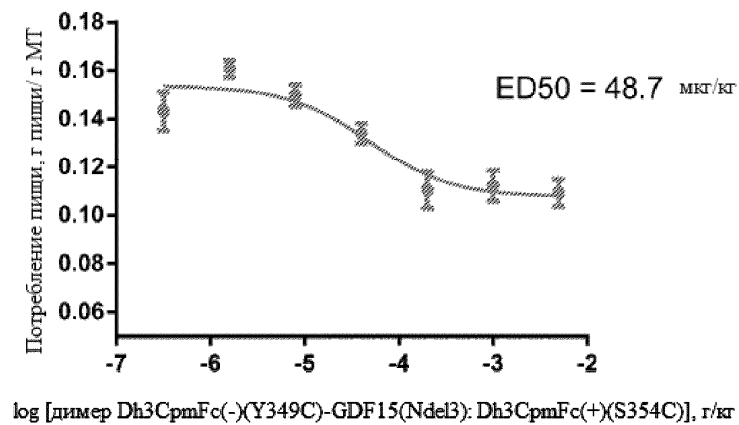
Димер Dh3CpmFc(-)-GDF15(N3D): Dh3CpmFc(+)



Фиг. 50

Анализ потребления пищи

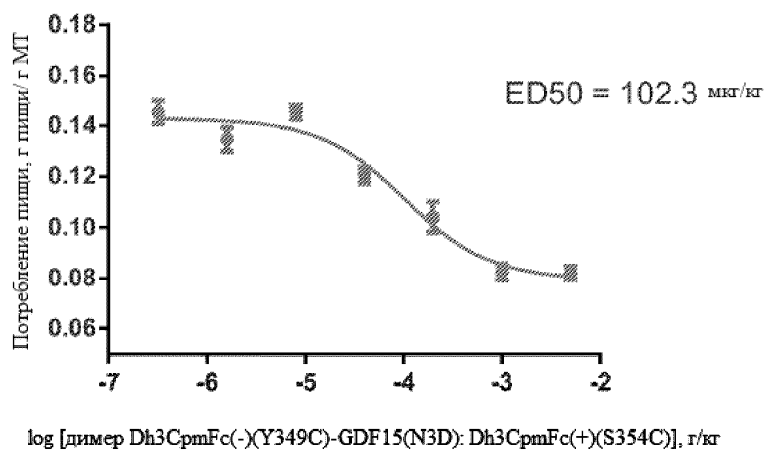
Димер Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(Ndel3): Dh3CpmFc(+)(S354C)



Фиг. 51

Анализ потребления пищи

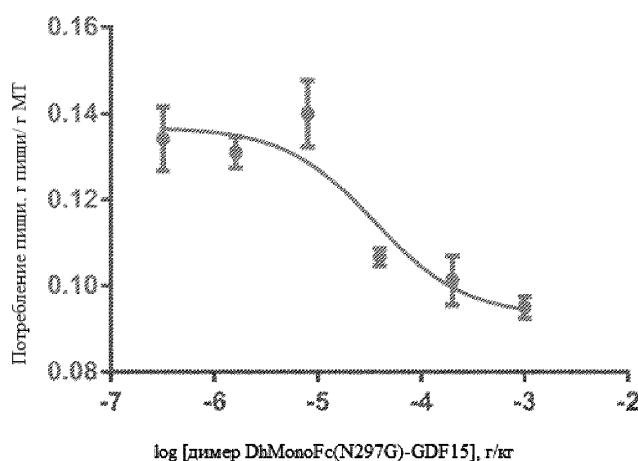
Димер Dh3CpmFc(-)(Y349C)-GDF15(N3D): Dh3CpmFc(+)(S354C)



Фиг. 52

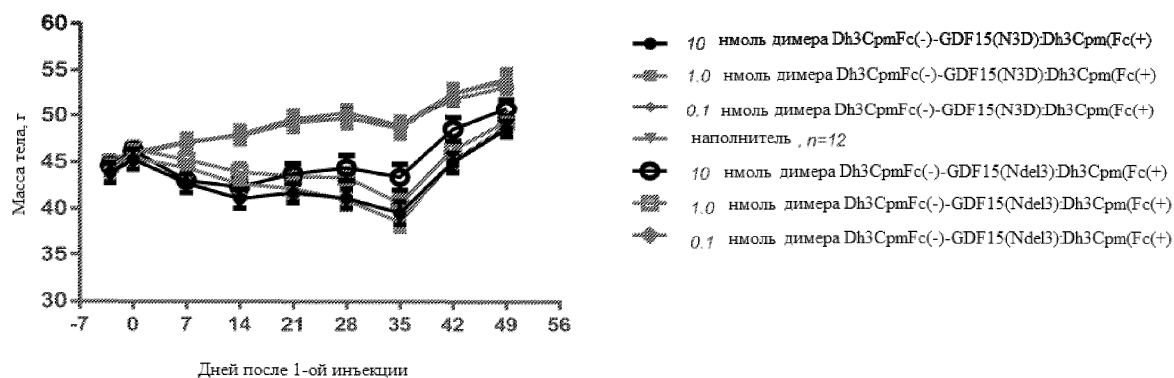
Анализ потребления пищи

Димер DhMonoFc(N297G)-GDF15

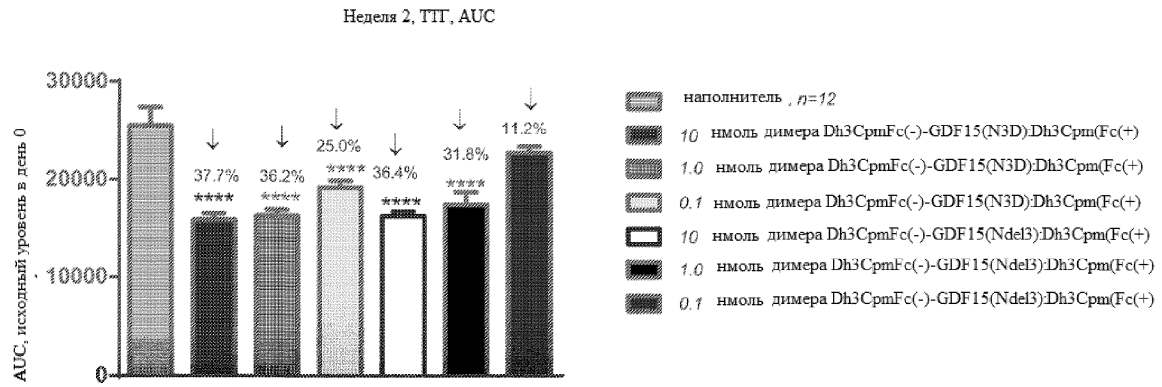


Фиг. 53

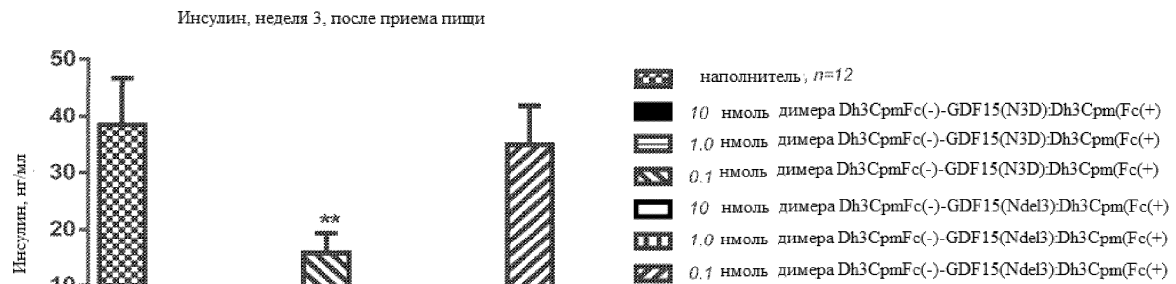
Масса тела



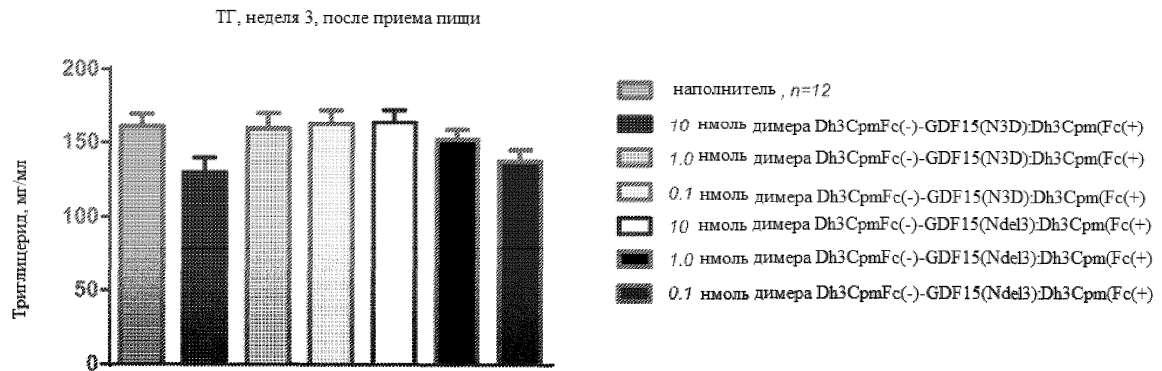
Фиг. 54



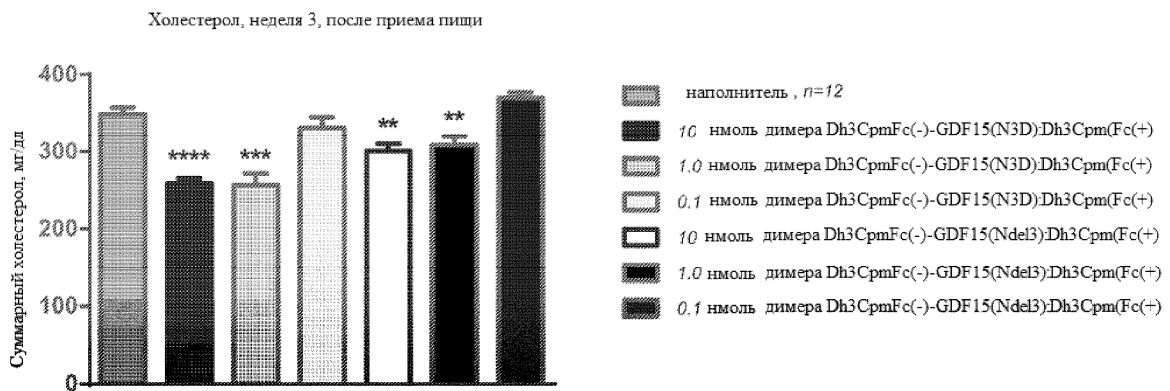
Фиг. 55



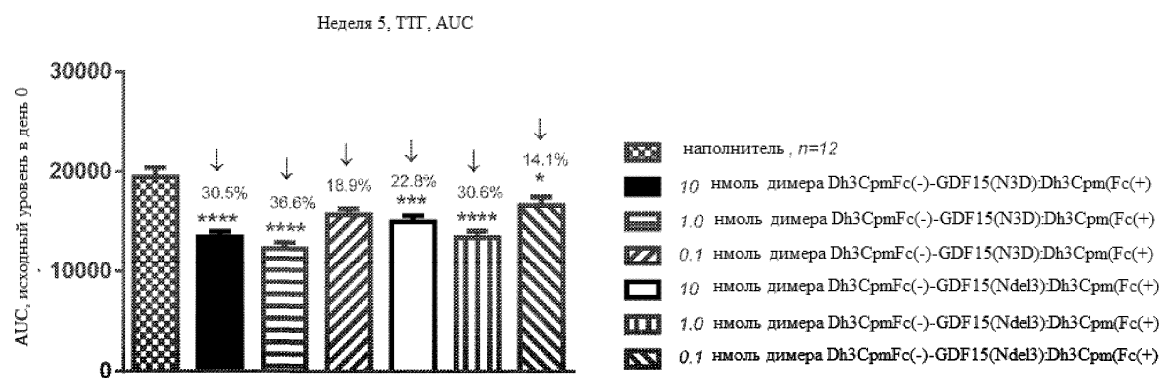
Фиг. 56



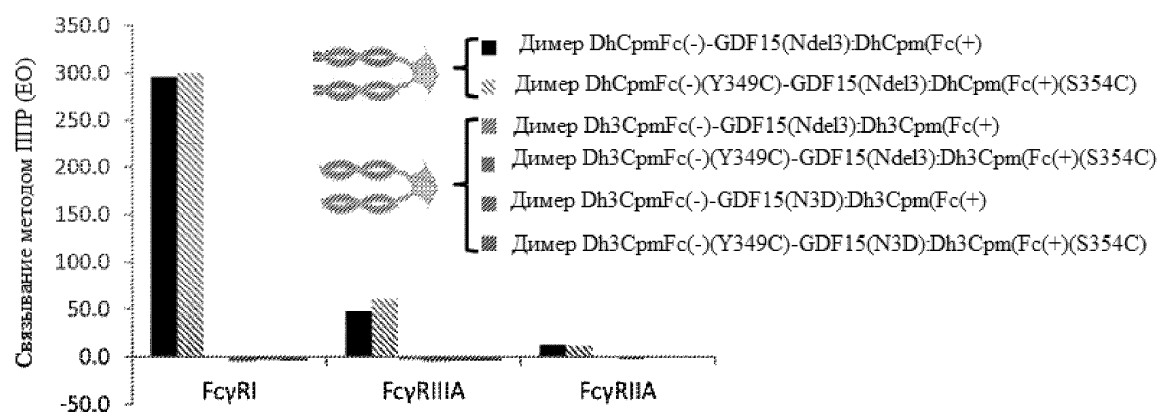
Фиг. 57



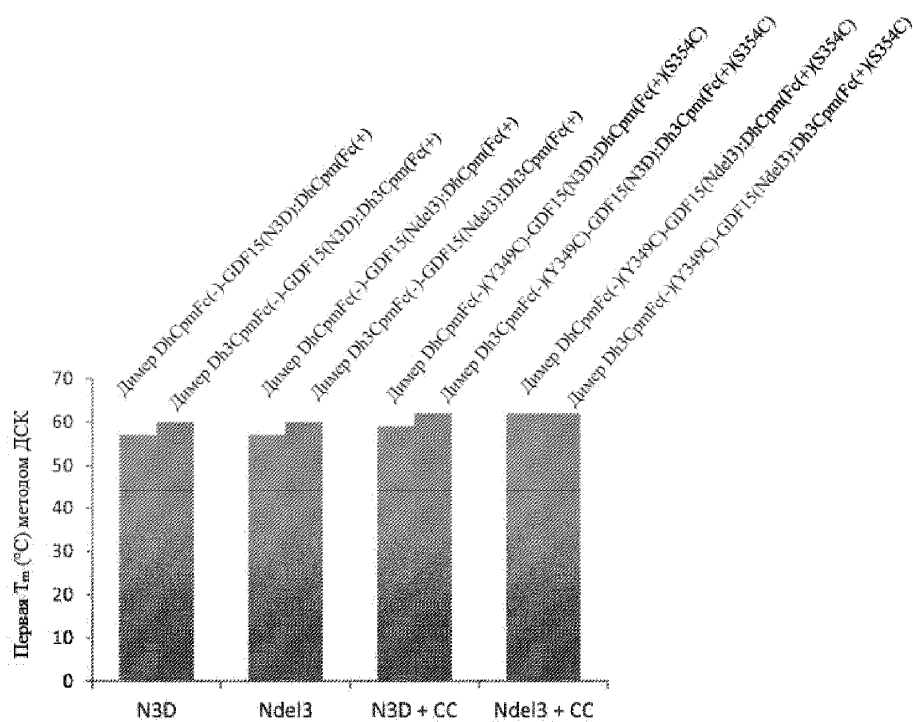
Фиг. 58



Фиг. 59



Фиг. 60



Фиг. 61



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2