(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202092106 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.30

(22) Дата подачи заявки
2015.10.23

(51) Int. Cl. ***A61K 38/00*** (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ FGF-21 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/068,523; 62/068,514; 62/068,526; 62/068,534; 62/068,296; 62/141,337; 62/141,383**
(32) **2014.10.24; 2014.10.24; 2014.10.24; 2014.10.24; 2014.10.24; 2015.04.01; 2015.04.01**
(33) **US**
(62) **201790895; 2015.10.23**
(71) Заявитель:
БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Морин Пол Е., Кохен Дэниэл, Мухерджи Ранжан, Рейлли Тимоти П., Кристиан Роуз С., Липовсек Даса, Камфаузен Рэй, Крупински Джон (US)

(74) Представитель:
Глухарёва А.О., Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф., Строкова О.В. (RU)

(57) Предусмотрены модифицированные полипептиды FGF-21 и их применения, например, для лечения связанных с фиброзом заболеваний. Раскрыты модифицированные полипептиды FGF-21, которые содержат внутреннюю делецию и необязательно замещающий пептид, необязательно модифицированный, по меньшей мере, посредством одной неканонической аминокислоты и/или необязательно слитый с партнером по слиянию.

202092106 A2

202092106 A2

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ FGF-21 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее раскрытие относится к модифицированным полипептидам FGF-21, содержащим внутреннюю делецию, которая необязательно замещена пептидом, и их применениям для лечения или профилактики заболеваний и нарушений.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Факторы роста фибробластов представляют собой полипептиды, широко экспрессируемые в развивающихся и взрослых тканях (Baird et al., Cancer Cells, 3: 239-243, 1991), которые играют важную роль в многочисленных физиологических функциях (McKeehan et al., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 59:135-176, 1998; Burgess, W. H. et al., Annu. Rev. Biochem. 58:575-606 (1989). В литературе показано, что семейство FGF состоит по меньшей мере из двадцати двух представителей (Reuss et al., Cell Tissue Res., 313: 139-157 (2003)).

Фактор роста фибробластов 21 (FGF-21) описан в литературе (публикация Nishimura et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1492: 203-206 (2000), публикации международной заявки WO 01/36640 и WO 01/18172 и патентная публикация США № 20040259780, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Сообщалось, что в отличие от других FGF, FGF-21 не обладает пролиферативным и туморогенным эффектами (Ornitz and Itoh, Genome Biology 2001, 2(3):reviews3005.1–3005.12).

Некоторые полипептиды FGF-21 и их применения описаны в патентной публикации США № 20010012628, патенте США № 6716626, патентной публикации США № 2004/0259780, публикации международной заявки WO 03/011213, Kharitonenkov et al. J Clin Invest. 2005 Jun, 115 (6): 1627-35, публикации международной заявки WO 03/059270, патентной публикации США № 2005/0176631, публикации международной заявки WO 2005/091944, WO 2007/0293430, патентной публикации США № 2007/0293430, публикации международной заявки WO/2008/121563, патенте США № 4904584, публикациях международной заявки WO 99/67291, WO 99/03887, WO 00/26354 и патенте США № 5219092, каждый из которых полностью включен в настоящий документе посредством ссылки.

Сообщалось, что FGF-21 человека обладает склонностью подвергаться протеолизу in vivo, образовывать агрегаты in vitro, подвергаться дезамидированию (Gimeno and Moller, Trends Endocrinol Metab., 2014, Jun., 25 (6): 303-11; патент США № 8361963; Hecht et al., PLoS One, 2012, 7 (11):e49345, патентная публикация США № 2007/0293430, публикация международной заявки WO 2006/0065582), потенциально ограничивая срок хранения содержащих FGF-21фармацевтических композиций. Агрегаты и дезамидированные формы терапевтических полипептидов могут потенциально повышать иммуногенность (смотрите Департамент здравоохранения и социальных услуг США, «Оценка иммуногенности для терапевтических белковых продуктов», август 2014 г., Subramanyam (ред.), «Информационный бюллетень фокусной группы по иммуногенности протеинов», American Association of Pharmaceutical Scientists, Vol. 1, Issue 3 (December 2011)).

В предыдущей работе, опубликованной как публикация международной заявки WO 2008/121563 и патентная публикация США № 2008/0255045, продемонстрировано, что некоторые полипептиды FGF-21 человека, модифицированные с целью содержания неканонической аминокислоты, связанной с полиэтиленгликолем в определенных положениях, проявляли увеличенный период полужизни *in vivo* и/или сохраненную биологическую активность. Приведенные в качестве примеров полипептиды FGF-21 человека, однако, не включали в себя описанные в настоящем документе делеции или замены последовательностей.

Фиброз представляет собой образование грубоволокнистой соединительной ткани в органе или ткани. Избыточное отложение фиброзной ткани связано с патологическими состояниями, которые могут привести к нарушению функции органа или ткани. Пораженные органы могут включать в себя легкие (легочный фиброз или пневмофиброз), печень (печеночный фиброз или фиброз печени), почку (почечный или ренальный фиброз) и сердце (фиброз сердца). Фиброз может также воздействовать на другие ткани и органы, включая в себя суставы, кожу, кишечник, костный мозг и другие. Иллюстративные фиброзные состояния или заболевания включают в себя, без ограничений, неалкогольный стеатогепатит (NASH), который поражает печень; диабетическое заболевание почек и диабетическую нефропатию, которые поражают почки; и метаболическую сердечную недостаточность, которая влияет на сердце. Например, NASH характеризуется наличием жира, воспаления и повреждения в печени у людей, которые потребляют мало или вообще не потребляют алкоголь, и может привести к циррозу печени. NASH, как правило, диагностируется у страдающих

избыточной массой или страдающих ожирением людей среднего возраста, у которых часто наблюдается повышенное содержания липидов в крови и сахарный диабет или преддиабет.

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся, среди прочего, к проблемам, связанным с активностью и получением полипептидов FGF-21, к получению полипептида FGF-21 с улучшенными биологическими или фармакологическими свойствами, такими как улучшенный терапевтический период полужизни, и способам лечения или профилактики заболеваний и нарушений.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды FGF-21, содержащие полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7, за исключением того, что указанная аминокислотная последовательность содержит: (i) внутреннюю делецию от 2 до 19 аминокислот (например, от 5 до 19 аминокислот), причем указанная внутренняя делеция находится в области, соответствующей аминокислотам от 116 до 134 в SEQ ID NO: 1, причем указанная внутренняя делеция заменяется замещающим пептидом, составляющим в длину от 0 до 12 аминокислот; и (ii) 9 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок.

Также в настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие любой из описанных в настоящем документе модифицированных полипептидов FGF 21 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

В настоящем документе предусмотрены модифицированные полипептиды FGF-21, содержащие полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7, за исключением того, что указанная аминокислотная последовательность содержит: (i) внутреннюю делецию от 2 до 19 аминокислот (например, от 5 до 19 аминокислот), причем указанная внутренняя делеция находится в области, соответствующей аминокислотам от 116 до 134 в SEQ ID NO: 1, причем указанная внутренняя делеция заменяется замещающим пептидом, составляющим в длину от 0 до 12 аминокислот; и (ii) 9 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок; и (iii) партнера по слиянию.

Также в настоящем документе предусмотрены способы регулирования по меньшей мере одного из гомеостаза глюкозы и липидов, поглощения глюкозы, экспрессии GLUT 1 и/или концентрации в сыворотке глюкозы, триглицеридов, инсулина

или глюкагона у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы повышения чувствительности к инсулину, повышения содержания адипонектина, снижения содержания глюкозы в крови, снижения содержания глюкагона, снижения содержания триглицеридов, снижения содержания фруктозамина, снижения содержания холестерина низкой плотности или снижения содержания С-реактивного белка у нуждающегося в этом пациента или в образце крови, сыворотки или другом образце указанного пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения состояния или нарушения, выбранного из ожирения, сахарного диабета, панкреатита, резистентности к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, нарушенной толерантности к глюкозе, неадекватного клиренса глюкозы, высокого содержания глюкозы в крови, резистентности к инсулину типа А, резистентности к инсулину типа С (синдром AKA HAIR-AN), синдрома Рабсона-Менденхолла, синдрома Донохэ или лепрекунизма, гиперандрогенизма, гирсутизма или акантокератодермии и синдрома Прадера-Вилли у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения сахарного диабета типа 1, сахарного диабета типа 2 или ожирения у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения связанного с фиброзом заболевания, предусматривающие введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения связанного с фиброзом заболевания, предусматривающие введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества композиции, содержащей описанный в настоящем документе

модифицированный полипептид FGF-21 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения фиброза или цирроза печени у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Кроме того в настоящем документе предусмотрены способы лечения NASH и/или фиброза печени, предусматривающие введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества композиции, содержащей описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Кроме того в настоящем документе предусмотрены способы снижения жировой фракции печени у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21, причем необязательно указанный пациент подвержен риску развития NASH или у него он был диагностирован.

Кроме того в настоящем документе предусмотрены способы повышения содержания адипонектина (например, общего адипонектина в плазме и/или адипонектина с высокой молекулярной массой) у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21, причем необязательно указанный пациент подвержен риску развития NASH или у него он был диагностирован.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения сердечной недостаточности или фиброза сердца у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения почек или почечного фиброза у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение

пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения фиброза легких у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения связанного с фиброзом заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего одну или несколько неканонических аминокислот, причем указанный модифицированный полипептид FGF-21 обладает идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к человеческому полипептиду FGF-21, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-7 и 201, причем указанное связанное с фиброзом заболевание выбрано из NASH, фиброза печени, диабетической почечной недостаточности, хронического заболевания почек, фиброза почек, фиброза легких, фиброза сердца, сердечной недостаточности и метаболической сердечной недостаточности.

Краткое описание нескольких видов графических материалов

Фиг. 1A-B. Иллюстративные модифицированные полипептидные последовательности FGF-21. Указанные координаты относятся к полипептиду FGF-21 дикого типа SEQ ID NO: 1. Полные полипептиды каждый включают в себя N-концевую последовательность MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY, после которой следует указанная аминокислота в положении 108, а затем указанная последовательность области, обозначенная «Аминокислоты 109-149», за которой следует последовательность PGILAPQPPDVGSSDPLSM, а затем указанная последовательность области, обозначенная «Аминокислоты 169-181». Полные аминокислотные последовательности модифицированных полипептидов FGF-21 также показаны в примере 4 ниже.

Фиг. 2. Иллюстративная кривая зависимости доза-эффект для активности FGF21 *in vitro* (измеренной с помощью FGF21-зависимого фосфорилирования внеклеточно

регулируемой киназы (ERK) 1/2 в основанном на клетках анализе) для пегилированного соединения 1 и пегилированного соединения 2.

Фиг. 3. Репрезентативные результаты дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), выполненной для оценки термической стабильности модифицированных полипептидов FGF-21. В этом примере было показано, что пегилированное соединение 2 характеризуется температурой точки перехода («Tm»), которая приблизительно на 8 градусов выше, чем у пегилированного соединения 1. Термическая обратимость составляла > 95% (не показана).

Фиг. 4. Репрезентативные результаты флуоресценции при термическом сканировании (TSF), выполненном для оценки термической стабильности модифицированных полипептидов FGF-21. На этой фигуре было показано, что соединение 10 характеризуется температурой точки перехода («Tm»), которая приблизительно на 8°C выше, чем у соединения 1 (характеризующегося последовательностью FGF-21 дикого типа, за исключением того, что включен N-концевой метионин для экспрессии в *E. coli*).

Фиг. 5. Левая панель: измерение дезамидирования с течением времени (указано с помощью гетерогенности заряда) при 25°C для пегилированного соединения 1 и пегированного соединения 2. Пегированное соединение 2 демонстрирует сниженное образования гетерогенности заряда, свидетельствующее о значительно замедленном дезамидировании. Правая панель: измерение образования агрегатов с течением времени (измеренное посредством эксклюзионной хроматографии) при 40°C для пегилированного соединения 1 и пегированного соединения 2 в буфере сахароза/гистидин при pH 7,0 и концентрации белка 7,5 мг/мл. Пегилированное соединение 2 демонстрирует сниженное образование агрегатов. Вместе эти результаты прогнозируют большую стабильность при хранении и способность быть составленным в более высокой концентрации для пегилированного соединения 2 по сравнению с пегированным соединением 1.

Фиг. 6. Измерение образования агрегатов с высокой молекулярной массой (HMW) с течением времени для модифицированных полипептидов FGF-21 при pH 6,5 в буфере сахароза/гистидин (верхняя панель), при pH 7,0 в буфере сахароза/гистидин (средняя панель) и при pH 8,3 в буфере сахароза/TRIS (нижняя панель). Образование агрегата HMW было более выраженным при pH 6,5 и pH 7,0, чем при pH 8,3. Большинство вариантов FGF-21 демонстрировало снижение образования агрегатов HMW по

сравнению с пегилированным соединением 1, хотя для нескольких соединений образование агрегатов HMW было сходно с соединением 1или выше него.

Фиг. 7. Измерение склонности к дезамидированию (определенного путем образования кислых вариантов с течением времени) для модифицированных полипептидов FGF-21 при pH 6,5 в буфере сахароза/гистидин (верхняя панель), при pH 7,0 в буфере сахароза/гистидин (средняя панель) и при pH 8,3 в буфере сахароза/TRIS (нижняя панель). По сравнению с пегилированным соединением 1 все показанные соединения демонстрировали образования кислых вариантов со сниженным зарядом, что указывает на снижение дезамидирования.

Фиг. 8. Измерение растворимости модифицированных полипептидов FGF-21. Относительно более низкое образование агрегатов с высокой молекулярной массой при заданной концентрации полипептида указывает на большую растворимость, что будет приводить к способности быть составленным в большей концентрации. Наблюдения за концентрацией белка и процентной долей видов исследуемых соединений с высокой молекулярной массой (HMW), определенных с помощью анализа фильтрации в реакторе идеального вытеснения в буфере PBS при pH 7,2. Линеаризованный наклон линии, подгоняемой к каждому из этих наблюдений, использовали в качестве оценки склонности белков к агрегации.

Фиг. 9. Процент доноров с ответом пролиферации CD4+ Т-клеток после инкубации в течение 7 дней белка и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Контрольные белки представляют собой экспрессируемые E. coli белки с известными свойствами активации Т-клеток. Сравнение непегилированных модифицированных соединений FGF-21 с соединением 1 (характеризующимся последовательностью FGF-21 дикого типа, за исключением того, что N-концевой метионин включен для экспрессии в *E. coli*). «ConA» представляет собой сокращение для конкавалина A, известного иммуногенного белка.

Фиг. 10. Фармакокинетический анализ пегилированного соединения 1 и пегилированного соединения 2 после однократного подкожного введения 0,05 мг/кг для мышей *ob/ob*. Содержание модифицированных соединений FGF-21 измеряли в виде как целых, так и интактных на С-конце (активных) полипептидов. Пегилированное соединение 2 демонстрировало гораздо более высокую общую AUC для интактной на С-конце формы, чем пегилированное соединение 1, что указывает на значительно сниженный протеолиз in vivo пегилированного соединения 2. Результаты показаны графически на верхней панели, а фармакокинетические параметры приведены в таблице

в нижней левой панели (пегилированное соединение 1) и нижней правой панели (пегилированное соединение 2).

Фиг. 11A-B. Фармакокинетический анализ пегированного соединения 1 и пегилированного соединения 2 после введения яванским макакам. Содержание модифицированных соединений FGF-21 измеряли как в виде целых (A), так и в виде (B) интактных на C-конце (активных) полипептидов. Пегилированное соединение 2 демонстрировало гораздо более высокую общую AUC для интактной на C-конце формы, чем пегилированное соединение 1, что указывает на значительно сниженный протеолиз in vivo пегированного соединения 2.

Фиг. 12. Изменение содержания гликированного гемоглобина (HbA1c) в сравнении с несущей средой на 21-й день исследования с применением многократных доз у мышей ob/ob.

Фиг. 13. Масса тела в течение 21 дня исследования с применением многократных доз у мышей ob/ob.

Фиг. 14. Процент изменения массы тела в течение 21 дня исследования с применением многократных доз у мышей ob/ob.

Фиг. 15. Концентрации инсулина в плазме в течение 21 дня исследования с применением многократных доз у мышей ob/ob.

Фиг. 16. Концентрация глюкозы в плазме в течение 21 дня исследования с применением многократных доз у мышей ob/ob.

Фиг. 17. Изменение концентраций глюкозы в плазме AUC в течение 21 дня исследования с применением многократных доз у мышей ob/ob, выраженное в виде процентной разницы от обработанных несущей средой контролей.

Фиг. 18. Концентрации триглицеридов в плазме в течение 21 исследования с применением многократных доз у мышей ob/ob.

Фиг. 19. Изменения массы тела в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 20. Общее потребление пищи в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 21. Масса тела в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 22. Масса печени в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 23. Оотношение массы печени к массе тела в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 24. Глюкоза цельной крови в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 25. АЛТ в плазме в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 26. Триглицерид плазмы в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 27. Общий холестерин плазмы в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 28. Триглицерид печени в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 29. Холестерин печени в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 30A-B. Репрезентативные микрофотографии окрашенных HE срезов печени в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 31. Оценка активности NAFLD в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 32A. Оценка стеатоза в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 32B. Оценка дольчатого воспаления в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 32C. Оценка разбухания гепатоцитов в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 33A-B. Репрезентативные микрофотографии окрашенных сириусом красным срезов печени в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 34. Площадь фиброза в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 35A-B. Репрезентативные микрофотографии F4/80-иммуноокрашенных срезов печени в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 36. Площадь воспаления в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 37A-B. Репрезентативные микрофотографии окрашенных масляным красным срезов печени в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 38. Площадь отложения жира в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic.

Фиг. 39A-D. Относительная экспрессия гена в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. Результаты экспрессии для (A) альфа-SMA, (B), TIMP-1, (C) коллагена типа 1 и (D) TGF-β.

Фиг. 40A-D. Иллюстративные модифицированные полипептидные последовательности FGF-21, слитые с доменом Fc, PKE аднектином или полипептидом сывороточного альбумина человека. «Организация слияния» описывает общую ориентацию слитого белка от N- к C-концу, которая предназначена для иллюстрации, но не для ограничения, соответствующей полипептидной последовательности. HuSA(C34A): модифицированный человеческий сывороточный альбумин, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 321; HuSA(C34A; des Leu-585): модифицированный человеческий сывороточный альбумин, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 322; PKE (1): аднектин PKE, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 319; PKE (2): аднектин PKE, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 320. L с последующим номером обозначает линкер; FGF-21 (Cmp. 2) обозначает последовательность FGF-21, содержащую внутренний пептид с делецией и замещением (в частности, соединение 2), и FGF-21 (Cmp. 1) обозначает последовательность FGF-21, лишенную указанного пептида с делецией и замещением (конкретно, Соединение 1). FGF-21 (Cmp. 1) и FGF-21 (Cmp. 2) могут содержать или не содержать N-концевой метионин, содержащийся в соединениях 1 и 2. Вариантные формы полипептидных последовательностей Fc идентифицированы в скобках, например, Fc (hIgG1a_191). Обозначения FGF-21-1aa (Cmp. 2) и FGF-21-3aa (Cmp. 2) относятся к последовательности соединения 2, модифицированной путем делеции указанного количества аминокислот (1 или 3, соответственно) с его C-конца.

Фиг. 41. Измерение растворимости модифицированных полипептидов FGF-21, слитых с партнером по слиянию аднектином. Относительно более низкое образование агрегатов с высокой молекулярной массой при заданной концентрации полипептида указывает на большую растворимость, что привело бы к способности быть составленным в большей концентрации. Наблюдения за концентрацией белка по отношению к

процентной доле видов исследуемых соединений с высокой молекулярной массой (HMW), определенных с помощью анализа фильтрации в реакторе идеального вытеснения в буфере PBS при pH 7,2. Линеаризованный наклон линии, подгоняемой к каждому из этих наблюдений, использовали в качестве оценки склонности белков к агрегации.

Фиг. 42A-B. Масса тела групп лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, подвергнутых воздействию несущей средой или ПЭГ-соединением 1 («PEG-Cmpd») в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, подвергнутых воздействию средой или ПЭГ-соединением 1 в течение 9-15 недель.

Фиг. 43A-B. Масса печени групп лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, подвергнутых воздействию несущей средой или ПЭГ-соединением 1 в течение 9-12недель. B. Сравнение мышей, подвергнутых воздействию несущей средой или ПЭГ-соединением 1 в течение 9-15 недель. Масса печени была значительно снижена ($p < 0,001$) у мышей, подвергнутых воздействию более 9-15 недель.

Фиг. 44A-B. Соотношение массы печени к телу в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. Соотношение массы печени к массе тела было значительно уменьшено ($p<0,01$ и $p<0,001$, соответственно) для мышей, получавших воздействие в течение более чем 9-12 недель или 9-15 недель.

Фиг. 45A-B. Масса правой почки в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель.

Фиг. 46A-B. Масса левой почки в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель.

Фиг. 47 A-B. Глюкоза цельной крови в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение

мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. Глюкоза цельной крови была значительно уменьшена ($p < 0,05$) у мышей, получавших воздействие более 9-15 недель.

Фиг. 48A-B. АЛТ плазмы в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. АЛТ плазмы была значительно снижена ($p<0,01$) у мышей, получавших воздействие более 9-15 недель.

Фиг. 49A-B. Триглицерид плазмы в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель.

Фиг. 50A-B. Общий холестерин плазмы в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель.

Фиг. 51A-B. Триглицерид печени в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. Триглицериды печени были значительно уменьшены ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно) для мышей, получавших воздействие более 9-12 недель или 9-15 недель.

Фиг. 52A-B. Холестерин печени в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. Уровень холестерина печени был значительно снижен ($p<0,01$ и $p<0,001$, соответственно) для мышей, получавших воздействие более 9-12 недель или 9-15 недель.

Фиг. 53A-H. Репрезентативные микрофотографии окрашенных HE срезов печени мышей, получавших в течение 9-12 недель несущую среду (A-B) или ПЭГ-соединение 1 (C-D), и в течение 9-15 недель несущую среду (E-F) или ПЭГ-соединение 1 (G-H).

Фиг. 54A-B. Показатель активности NAFLD в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение

мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. Показатель активности NAFLD был значительно снижен ($p<0,01$ и $p<0,001$, соответственно) для мышей, получавших воздействие в течение 9-12 недель или 9-15 недель.

Фиг. 55A-H. Репрезентативные микрофотографии окрашенных сириусом красным срезов печени мышей, получавших в течение 9-12 недель несущую среду (A-B) или ПЭГ-соединение 1 (C-D), и в течение 9-15 недель несущую среду (E-F) или ПЭГ-соединение 1 (G-H) .

Фиг. 56A-B. Итоговая площадь фиброза печени в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. Площадь фиброза была значительно уменьшена ($p<0,05$) для мышей, получавших ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель.

Фиг. 57A-H. Репрезентативные микрофотографии F4/80-иммуноокрашенной печени мышей, получавших в течение 9-12 недель несущую среду (A-B) или ПЭГ-соединение 1 (C-D), и в течение 9-15 недель несущую среду (E-F) или ПЭГ-соединение 1 (G-H).

Фиг. 58A-B. Итоговая площадь воспаления в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель.

Фиг. 59A-H. Репрезентативные микрофотографии окрашенных масляным красным срезов печени мышей, получавших в течение 9-12 недель несущую среду (A-B) или ПЭГ-соединение 1 (C-D), и в течение 9-15 недель несущую среду (E-F) или ПЭГ-соединение 1 (G-H).

Фиг. 60A-B. Итоговая площадь отложения жира в группах лечения в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. A. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-12 недель. B. Сравнение мышей, получавших несущую среду или ПЭГ-соединение 1 в течение 9-15 недель. Площадь отложения жира была значительно снижена для мышей, получавших воздействие более 9-12 недель или 9-15 недель (оба $p <0,001$).

Фиг. 61. Измерения общего содержания адипонектина в сыворотке в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. Общее

содержание адипонектина в сыворотке было значительно увеличено у мышей, получавших ПЭГ-соединение 1 в дозе 3,0 мг/кг, по сравнению с мышами, получавшими несущую среду, в образцах конечной плазмы у мышей, получавших воздействие от 5 до 9 недель или от 7 до 9 недель ($p<0,001$, критерий Даннетта).

Фиг. 62. Измерения общего содержания адипонектина в сыворотке в исследовании с использованием мышиной модели NASH института Stelic. Общее содержание адипонектина в сыворотке было значительно увеличено у мышей, получавших ПЭГ-соединение 1 в дозе 3,0 мг/кг, по сравнению с мышами, получавшими несущую среду, в образцах конечной плазмы у мышей на 12-й и 15-й неделях ($p<0,05$, критерий Даннетта).

Фиг. 63. Кривые концентрации-ответа для трех вариантов FGF21: меченное His на N-конце соединение 1 (His-Cmpd 1), ПЭГ-соединение 1 (PEG-Cmpd 1) и ПЭГ-соединение 2 (PEG-Cmpd 2) в 5 часовом анализе Elk1-люциферазы. Значения взяты из 6 независимых экспериментов с 3 или 4 повторами на эксперимент. Значения Z' варьировали от 0,6 до 0,9, что указывает на приемлемое качество анализа ($Z' > 0,5$).

Фиг. 64. Активность вариантов FGF-21, измеренная в клеточном анализе Elk1-люциферазы. Каждая точка данных указывает на отдельную репликацию, а горизонтальная полоса представляет собой среднее значение. Значения выражаются в виде десятичного логарифма измеренного значения EC_{50} в молях.

Фиг. 65. Влияние единичных однократных доз ПЭГ-соединения 2 на процентное изменение массы тела у мышей C57BL/6J. Мышей C57BL/6J подвергали воздействию либо несущей среды (250 мМ сахароза/20 мМ Трис, pH 8,3), либо ПЭГ-соединения 2 в дозе 0,03, 0,1, 0,3 или 1,0 мг/кг, n = 10/группа. Определяли процентное изменение масс тела у мышей линии C57BL/6J в начале (0), через 24, 48, 72 и 144 ч после введения дозы подкожно. Все значения представляют собой среднее ± SEM *$P<0,05$, ***$P<0,001$, ****$P<0,0001$, по сравнению с несущей средой (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта).

Фиг. 66A. Влияние единичных однократных доз ПЭГ-соединения 2 на общий адипонектин плазмы у мышей C57BL/6J. Определяли концентрации общего адипонектина в плазме в начале (0), через 24, 48, 72 и 144 ч после введения дозы подкожно. Не голодающих мышей C57BL/6J подвергали воздействию либо несущей среды (250 мМ сахароза/20 мМ Трис, pH 8,3), либо ПЭГ-соединения 2 в дозе 0,03, 0,1, 0,3 или 1,0 мг/кг, n = 10/группа. Все значения представляют собой среднее ± SEM

*P<0,05, ***P<0,001, ****P<0,0001 по сравнению с несущей средой (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта).

Фиг. 66B. Влияние единичных однократных доз ПЭГ-соединения 2 на процентное изменение общего адипонектина плазмы у мышей C57BL/6J. Мышей C57BL/6J подвергали воздействию либо несущей среды (250 мМ сахароза/20 мМ Трис, pH 8,3), либо ПЭГ-соединения 2 при 0,03, 0,1, 0,3 или 1,0 мг/кг, n = 10/группа. Концентрация общего адипонектина в плазме определялась в начале, через 24, 48, 72 и 144 ч после введения подкожно, и определялось процентное изменение относительно исходного значения. Все значения представляют собой среднее ± SEM *P<0,05, ***P<0,001, ****P<0,0001 по сравнению с несущей средой (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта).

Фиг. 67A. Влияние вариантов FGF-21 на общий адипонектин плазмы у мышей C57BL/6J. Получение как ПЭГ-соединения 2, так и ПЭГ-соединения 20 приводило к значительному увеличению содержания общего адипонектина в плазме через 6 дней после введения дозы в дозах 0,3 и 1 мг на кг массы тела (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

Фиг. 67B. Влияние вариантов FGF-21 на общий адипонектин плазмы у мышей C57BL/6J. Доза ПЭГ-соединения 2, соединения 105 и соединения 112, составляющая 54,3 нмоль/кг, значительно увеличивала процентное изменение общего адипонектина по сравнению с процентным изменением общего адипонектина у получавших несущую среду контролей в дни 3 и 6.

Фиг. 67C. Влияние вариантов FGF-21 на общий адипонектин плазмы у мышей C57BL/6J. Обе дозы 18,1 и 54,3 нмоль/кг соединения 182 значительно увеличивали процентное изменение общего адипонектина плазмы (по сравнению с процентным изменением, наблюдаемым у получавших несущую среду контролей) в дни 3 и 6.

Фиг. 67D. Влияние вариантов FGF-21 на общий адипонектин плазмы у мышей C57BL/6J. Как соединение 171, так и соединение 181 значительно увеличивали процентное изменение от исходного общего содержания адипонектина в плазме на 3-й и 6-й дни после введения дозы зависимым от дозы образом по сравнению с получавшим несущую среду контролем.

Фиг. 67E. Влияние вариантов FGF-21 на общий адипонектин плазмы у мышей C57BL/6J. Процентное изменение от исходного уровня общего адипонектина плазмы (по сравнению с несущей средой) было значительно увеличено соединением 170 в дни 3 и 6 при дозе 18,1 нмоль/кг и 54,3 нмоль/кг.

Фиг. 67F. Влияние вариантов FGF-21 на общий адипонектин плазмы у мышей C57BL/6J. ПЭГ-соединение 1 в дозе 10 мг/кг значительно увеличивало процентное изменение от исходного уровня общего адипонектина плазмы, по сравнению с получавшими несущую среду контролями в дни 3 и 6.

Фиг. 68. Влияние ПЭГ-соединения 2 на альбуминурию (ACR мочи). # $P<0,05$, заболевание (unix db/db, несущая среда, n = 9-10) в сравнении с нормой (db/m lean, n = 10-12). * $P<0,05$, ПЭГ-соединение 2 (n = 13-14) в сравнении с несущей средой. Дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннетта для каждой пары в отдельных временных точках. Данные выражены как среднее ± S.E.M.

Фиг. 69. Содержание сердечного гидроксипролина (HP) показано на 3-й неделе воздействия изопротеренолом и ПЭГ-соединением 2. Каждая точка данных представляет собой индивидуальное общее содержание HP в сердце мышей, нормализованное к белку. *: $P<0,05$, по отношению к Sham + несущая среда, **: $P<0,05$, по отношению к Iso + несущая среда (однофакторный дисперсионный анализ, за которым следует тест Бонферрони).

Фиг. 70A-C. Влияние вариантов FGF-21 на общий адипонектин сыворотки (фиг. 70A), сывороточный высокомолекулярный (HMW) адипонектин (фиг. 70B) и отношение HMW адипонектина к общему адипонектину (фиг. 70C) в исследовании мышей Stelic NASH. Все значения представляют собой среднее ± SEM.

Фиг. 71A-B. Масса печени (фиг. 71A) и отношение массы печени к массе тела (BW) (фиг.71B) на животной модели NASH.

Фиг. 72. Влияние вариантов FGF-21 на животной модели NASH. После воздействия пегилированным соединением 1 («PEG-Cmpd 1»), пегилированным соединением 2 («PEG-Cmpd 2») или соединением 170 («Cmpd 170») у животных оценивали массу тела (фиг. 72A), массу печени (фиг. 72B), отношение масс печени к массе тела (фиг. 72C), триглицерид печени (фиг. 72D), ALT плазмы (фиг. 72E), холестерин печени (фиг. 22F) и триглицериды плазмы (фиг. 72G). Статистически значимые отличия от получавших несущую среду контролей приведены ниже. n.s.: не обнаружена статистически значимая разница (т.е. $P\geq0,05$).

Подробное описание настоящего изобретения

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения единственные формы включают в себя ссылку на множественные формы, если контекст

явно не указывает иное. Так, например, ссылка на «FGF-21», «полипептид FGF-21» или «модифицированный полипептид FGF-21» представляет собой ссылку на один или несколько таких белков и включает в себя их эквиваленты, известные обычным специалистам в настоящей области техники и т. д.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, характеризуются тем же значением, которое обычно понимается специалистом в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Нормогликемия: в настоящем раскрытии термины нормогликемия или эугликемия относятся к состоянию с нормальной концентрацией глюкозы в крови. Иллюстративная нормальная концентрация глюкозы в крови у людей составляет от 70 мг/дл до 99 мг/дл натощак у взрослых и от 70 до 140 мг/дл у взрослых после приема пищи. Устойчивая нормогликемия относится к поддержанию нормогликемии в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере один день, по меньшей мере два дня, по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере две недели, по меньшей мере один месяц или более длительный период, например, во время постоянного лечения модифицированным полипептидом FGF-21 согласно настоящему изобретению.

Термин «удлиняющий период полужизни фрагмент» (также упоминаемый в настоящем документе как «HLEM») относится к фармацевтически приемлемому фрагменту, домену или молекуле, ковалентно связанной («конъюгированной» или «слитой») с описанным в настоящем документе модифицированным полипептидом FGF-21 необязательно посредством неканонической аминокислоты непосредственно или через линкер, который предотвращает или смягчает протеолитическую деструкцию in vivo или другую уменьшающую активность химическую модификацию модифицированного полипептида FGF-21, увеличивает период полужизни и/или улучшает или изменяет другие фармакокинетические или биофизические свойства, включающие в себя, без ограничения, увеличение скорости абсорбции, снижение токсичности, улучшение растворимости, уменьшение агрегации белков, повышение биологической активности и/или селективности мишеней модифицированного полипептида FGF-21, повышение технологичности и/или снижение иммуногенности модифицированного полипептида FGF-21 по сравнению с веществом сравнения, таким как неконъюгированная форма модифицированного полипептида FGF-21 или полипептида FGF-21 дикого типа. Термин «удлиняющий период полужизни фрагмент» включает в себя небелковые удлиняющие период полужизни фрагменты, такие как

водорастворимый полимер, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или дискретный ПЭГ, гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), липид, разветвленную или неразветвленную ацильную группу, разветвленную или неразветвленную С8-С30 ацильную группу, разветвленную или неразветвленную алкильную группу и разветвленную или неразветвленную С8-С30 алкильную группу; и белковые удлиняющие период полужизни фрагменты, такие как сывороточный альбумин, трансферрин, аднектины (например, альбуминсвязывающие или расширяющие фармакокинетические свойства (PKE) аднектины), Fc-домен и неструктурированный полипептид, такой как полипептид XTEN и PAS (например, конформационно-неупорядоченные полипептидные последовательности, состоящие из аминокислот Pro, Ala и/или Ser) и фрагмент любого из вышеперечисленных. Исследование кристаллической структуры представителя(ей) семейства FGF-21 или FGF и его взаимодействия с рецептором FGF может указывать на то, какие определенные аминокислотные остатки имеют боковые цепи, которые полностью или частично доступны для растворителя. Боковая цепь неканонической аминокислоты в этих положениях может направляться от поверхности белка и попадать в растворитель и, таким образом, быть связана, например, с водорастворимым полимером.

Используемый в настоящем документе термин «связывающий альбумин фрагмент» относится к любой химической группе, способной связываться с альбумином, то есть характеризоваться связывающей альбумин аффинностью, например, альбуминсвязывающий или PKE аднектин.

«Аффинность связывания альбумина» может определяться несколькими способами, известными в настоящей области техники. В одном способе измеряемое соединение радиоактивно метят, например, 125I или 3H, и инкубируют с иммобилизованным альбумином (Kurtzhals et al., Biochem.J., 312, 725-731 (1995)). Рассчитывается связывание соединения относительно стандарта. В другом способе родственное соединение представляет собой радиоактивно меченное, и его связывание с альбумином, иммобилизованным, например, на шариках SPA (шарики для сцинтилляционного анализа сближения, PerkinElmer, номер в каталоге RPNQ0001), конкурирует с сериями разведений измеряемого соединения. Значение EC50 для конкуренции представляет собой меру аффинности соединения. В третьем способе аффинность рецептора или активность соединения измеряют при различных концентрациях альбумина, и сдвиг относительной аффинности или активности соединения в зависимости от концентрации альбумина отражает его аффинность к альбумину.

Термин «термическая стабильность» относится к способности полипептида противостоять разворачиванию при нагревании. Как правило, чем выше термическая стабильность молекулы, тем выше температура, которая требуется для разворачивания полипептида. Иллюстративные способы определения термостабильности полипептида представляют собой дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) и способы термического сканирования флуоресценции, описанные в примере 6. Термостабильность можно определить по отношению к сравниваемому соединению, например, для идентификации полипептида, характеризующегося повышенной термостабильностью.

Термин «агрегация» относится к тенденции полипептида образовывать нековалентно связанные комплексы с другими молекулами (такими как другие молекулы одного и того же полипептида), образуя при этом комплексы с высокой молекулярной массой. Иллюстративные способы измерения образования агрегатов включают в себя аналитическую эксклюзионную хроматографию, как описано в примере 7. Относительные количества агрегации могут быть определены относительно сравниваемого соединения, например, для идентификации полипептида, характеризующегося сниженной агрегацией.

Термин «дезамидирование» относится к тенденции аминокислотных остатков в полипептиде спонтанно подвергаться реакции дезамидирования, тем самым изменяя химическую структуру аминокислоты и потенциально влияя на функцию полипептида. Иллюстративные способы измерения дезамидирования включают в себя динамическое капиллярное изоэлектрофокусирование (icIEF), как описано в примере 7 в настоящем документе. Относительное количество дезамидирования может быть определено относительно сравниваемого соединения, например, для идентификации полипептида, характеризующегося сниженным дезамидированием.

Термин «протеолиз *in vivo*» относится к расщеплению полипептида при его введении в живую систему (например, при введении в организм), которое может быть результатом действия протеаз, находящихся в указанном организме. Протеолиз может потенциально влиять на биологическую активность или период полужизни полипептида. Например, FGF-21 дикого типа может подвергаться расщеплению на С-конце, приводя к усеченному, неактивному полипептиду. Иллюстративный способ измерения протеолиза *in vivo* FGF-21 представляет собой основанный на среднемасштабном исследовании (MSD) электрохемилюминесцентный иммуносорбентный анализ (ECLIA), описанный в примере 10 в настоящем документе. Относительное количество протеолиза

in vivo может быть определено относительно соединения сравнения, например, для идентификации полипептида, характеризующегося сниженным протеолизом *in vivo*.

Термин «растворимость» относится к количеству вещества, которое может раствориться в другом веществе, например, количеству немодифицированного или модифицированного полипептида FGF-21, который может раствориться в водном растворе. Иллюстративный способ измерения растворимости немодифицированного или модифицированного полипептида FGF-21 представляет собой тест на растворимость в реакторе идеального вытеснения, описанный в примере 8. Относительную растворимость можно определить относительно сравниваемого соединения, например, для идентификации полипептида, характеризующегося повышенной растворимостью.

Термин «биологическая активность» относится к способности молекулы воздействовать на любые физические или биохимические свойства биологической системы, путь, молекулу или взаимодействие, относящиеся к организму, включая в себя, без ограничения, вирусы, бактерии, бактериофаг, транспозон, прион, насекомых, грибы, растения, животных и людей. Например, в контексте немодифицированного или модифицированного FGF-21 биологическая активность предусматривает любую из функций, выполняемых FGF-21, как описано в настоящем документе. Иллюстративные способы определения того, обладает ли молекула по меньшей мере одной биологической активностью FGF-21 дикого типа (такой как полипептид FGF-21 дикого типа из SEQ ID NO: 1), могут включать в себя анализ *in vitro*, описанный в примере 5, или анализ *in vitro*, описанный в примере 17. Относительный уровень биологической активности может быть определен относительно соединения сравнения, например, для идентификации полипептида, обладающего биологической активностью или обладающего достаточно высокой биологической активностью для предполагаемого терапевтического применения, например, характеризующегося EC50, который менее чем в 5 раз, в 10 раз, менее чем в 20 раз, менее чем в 50 раз или менее чем в 100 раз выше, чем EC50 соединения сравнения.

Описанное в настоящем документе соединение сравнения может характеризоваться другой последовательностью, не имеющей модификации, такой как описанная в настоящем документе модификация. Например, соединение сравнения может характеризоваться такой же модифицированной полипептидной последовательностью FGF-21 без внутренней делеции, без замещающего пептида или без партнера по слиянию. Иллюстративные соединения сравнения включают в себя без ограничения полипептид FGF-21 дикого типа из SEQ ID NO: 1, модифицированный

полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 201 или другое соединение сравнения. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение сравнения может содержать по меньшей мере одну неканоническую аминокислоту, которая может быть связана с описанным в настоящем документе линкером, полимером, биологически активной молекулой, пептидом, полипептидом или с удлиняющим период полужизни фрагментом (например, ПЭГ). Согласно некоторым вариантам осуществления соединение сравнения может содержать по меньшей мере одну неканоническую аминокислоту, которая может не быть связана с описанным в настоящем документе линкером, полимером, биологически активной молекулой, пептидом, полипептидом или с удлиняющим период полужизни фрагментом (например, ПЭГ). Согласно некоторым вариантам осуществления соединение сравнения может содержать дополнительные аминокислотные замены, делеции и/или вставки. Согласно некоторым вариантам осуществления сравнение может быть проведено с пегилированной или непегилированной формой полипептида; в первом случае сравнение может быть проведено с полипептидом, содержащим или не содержащим неканоническую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение сравнения может содержать внутреннюю делецию, которая необязательно заменена пептидом (например, таким же пептидом с внутренней делецией и замещением в соединении, с которым сравнивается соединение сравнения), но без партнера по слиянию.

Термин «Fc», «домен Fc» или «область Fc» относится к домену Fc или его фрагменту. Fc может представлять собой нативную область Fc, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в природе, или вариантную область Fc, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности нативной области Fc по меньшей мере одной аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной областью Fc или с областью Fc исходного полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно двадцати, приблизительно от одной до десяти или от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен, делеций или вставок в нативной области Fc или в области Fc исходного полипептида. Область Fc в настоящем документе может обладать идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к нативной области Fc и/или области Fc исходного полипептида. Согласно некоторым

вариантам осуществления область Fc может характеризоваться идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 90%, по отношению к нативной области Fc и/или области Fc исходного полипептида. Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc может характеризоваться идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 95%, по отношению к нативной области Fc и/или области Fc исходного полипептида. Иллюстративные аминокислотные последовательности областей Fc включают в себя SEQ ID NO: 302 и 323-335. Иллюстративные домены или фрагменты областей Fc включают в себя полипептиды SEQ ID NO: 303-309.

Используемый в настоящем документе термин «функциональная область Fc» относится к домену Fc или его фрагменту, который сохраняет способность связывать FcRn.

Термин «соответствующий» относится к положению («положению, соответствующему» или «соответствующему положению») или к области («области, соответствующей» или «соответствующей области») внутри полипептидной или полинуклеотидной последовательности, которая идентифицируется путем сравнения с эталонной последовательность. Эталонная последовательность может представлять собой последовательность дикого типа или немодифицированную последовательность, такую как полипептид FGF-21 дикого типа SEQ ID NO: 1. Соответствующее положение или область могут быть идентифицированы путем выравнивания последовательности с эталонной последовательностью. Например, «положение, соответствующее аминокислоте 108 в SEQ ID NO:1», в последовательности относится к положению в последовательности, которое находится в той же колонке выравнивания, что и аминокислота 108 в SEQ ID NO: 1, когда эта последовательность выровнена с SEQ ID NO: 1. При выравнивании аминокислота или нуклеотид может соответствовать или не соответствовать аминокислоте или нуклеотиду в соответствующем положении в эталонной последовательности. При ссылке на делецию соответствующей области выравнивание может содержать пропуски в колонках выравнивания, соответствующие каждому положению в удаленной области, если удаленная область не была заменена замещающим пептидом, который может потенциально выровняться с частью удаленной области. Таким образом, для делеции, замененной замещающим пептидом, замещающий пептид может быть исключен из последовательности при выполнении выравнивания, так что выравнивание должно содержать пробелы по всей удаленной области.

Альтернативно, замещающий пептид, если он присутствует, может быть проигнорирован при идентификации соответствующей области.

Выравнивание, используемое для идентификации соответствующего положения или соответствующей области, может быть получено с использованием обычного алгоритма выравнивания, такого как Blast (Altschul et al., J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10), Smith-Waterman (Smith and Waterman, J Mol Biol. 1981 Mar 25;147(1):195-7) или Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53). Алгоритм Needleman-Wunsch может использоваться для получения наиболее эффективного глобального выравнивания (то есть выравнивания, содержащего каждый остаток в обеих последовательностях, хотя выравнивание может начинаться и/или заканчиваться пробелами). Не зависимо от того, используется ли Blast, Smith-Waterman или Needleman-Wunsch, наиболее эффективное выравнивание может быть определено с использованием параметров «по умолчанию», таких как использование матрицы подсчета BLOSUM62, штраф за открытие пропуска в последовательности, равный 11, и штраф за продолжение пропуска, равный 1, и (при использовании Blast для парного выравнивания) размер слова 3.

«Область» относится к непрерывной части полипептидной или полинуклеотидной последовательности. Область может быть идентифицирована двумя положениями внутри полипептида или полинуклеотида, которые определяют начальное и конечное положения области в последовательности. Если не указано иное, область включает в себя положения, определяющие область в эталонной последовательности, то есть включает в себя заданные начальную и конечную положения. Например, область 119-130 в SEQ ID NO: 1 относится к части SEQ ID NO: 1, начиная с аминокислоты 119 и заканчивая аминокислотой 130, включая в себя аминокислоты 119 и 130, которая имеет последовательность PGNKSPHRDPAP (SEQ ID NO: 73).

Термин «делеция» относится к удалению одной или нескольких (или определенного количества) смежных аминокислот или нуклеотидов из полипептида или полинуклеотида. «Внутренняя делеция» относится к делеции, которая не включает в себя N- или С-конец полипептида или 5'- или 3'-конец полинуклеотида. Делеция или внутренняя делеция могут быть идентифицированы путем указания начального и конечного положения делеции относительно эталонной последовательности. Что касается модифицированного полипептида FGF-21, ссылка на внутреннюю делецию, как правило, указывает на делецию области относительно эталонного полипептида FGF-21, такую как делеция области, соответствующей положениям полипептида FGF-21 дикого

типа с SEQ ID NO: 1, например, положениям аминокислот 119-130 в SEQ ID NO: 1 (т.е. PGNKSPHRDPAP (SEQ ID NO: 73)).

«Замещающий пептид» относится к аминокислотам, которые вставлены вместо внутренней делеции или другой делеции внутри полипептида. Длина замещающего пептида может отличаться от длины внутренней делеции. Иллюстративные замещающие пептиды могут содержать один или несколько остатков глицина, серина и гистидина, а в некоторых случаях и дополнительные аминокислотные остатки, такие как лизин и пролин. Однако следует понимать, что замещающий пептид не ограничивается последовательностями, содержащими эти конкретные аминокислоты, а скорее может включать в себя любую природную аминокислоту или неканоническую аминокислоту. Замещающий пептид может иметь любую длину, например, одну аминокислоту (то есть составлять в длину 1 аминокислоту), две или более аминокислот или три или более аминокислот. Замещающий пептид, составляющий в длину нуль аминокислот, означает отсутствие замещающего пептида. Согласно некоторым вариантам осуществления замещающий полипептид может составлять в длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления замещающий полипептид может составлять в длину 1-10, 1-7, 1-5 или 1-3 аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления замещающий полипептид может составлять в длину 2-7, 2-5 или 2-3 аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления замещающий полипептид может составлять в длину 3 аминокислоты. Иллюстративные замещающие пептиды включают в себя последовательности G, GG, SG, GSG, GGH, SGG, GSGH (SEQ ID NO:343), HSG, HHSG (SEQ ID NO:344), HGSH (SEQ ID NO:345), GSGP (SEQ ID NO:346), HGG, HSGG (SEQ ID NO:347) и HGSG (SEQ ID NO:348). Дополнительные иллюстративные замещающие пептиды включают в себя последовательности K, DKS, HKS, D, Q, KDS и KDSQ (SEQ ID NO:349).

«Партнер по слиянию» относится к пептиду или полипептиду, слитому с описанным в настоящем документе модифицированным полипептидом FGF-21. Партнер по слиянию может быть слит с модифицированным полипептидом FGF-21 на N- и/или C-конце. Иллюстративные партнеры по слиянию включают в себя, без ограничения, альбумин, трансферрин, аднектины (например, альбуминсвязывающие или расширяющие фармакокинетические свойства (PKE) аднектины), Fc-домен и неструктурированный полипептид, такой как полипептид XTEN и PAS (например, конформационно-неупорядоченные полипептидные последовательности, состоящие из аминокислот Pro, Ala и/или Ser) или фрагмент любого из вышеперечисленных. Партнер

по слиянию может быть слит с модифицированным полипептидом FGF-21 для любых целей, включая в себя, без ограничения, очистку, выполнимость производства, удлинение периода полужизни, повышенные биофизические свойства (например, растворимость или стабильность), сниженную иммуногенность или токсичность и т. д.

«Связывающий пептид» относится к аминокислотной последовательности, характеризующейся слиянием с другими пептидами или полипептидами своих N- и C-концов. Связывающий пептид может присутствовать в слитом белке, например, характеризующемся слитыми концами (в любом порядке) с модифицированным полипептидом FGF-21 и партнером по слиянию. Иллюстративные связывающие пептиды могут содержать от 0 аминокислот (то есть, не содержать связывающего пептида) до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 или 100 аминокислот или более. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может содержать от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 10, от 1 до 5, от 2 до 40, от 2 до 30, от 2 до 20, от 2 и 10, от 5 до 40, от 5 до 30, от 5 до 20 или от 5 до 10 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может содержать от 5 до 20 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может содержать от 10 до 20 аминокислот. Некоторые иллюстративные связывающие пептиды, описанные в настоящем документе, могут быть богаты сериновыми и глициновыми остатками, однако следует понимать, что связывающий пептид не ограничивается такими последовательностями. Иллюстративные связывающие пептиды включают в себя следующие последовательности: GAGGGGSG (SEQ ID NO:74), EPKSSD (SEQ ID NO:75), D, ESPKAQASSVPTAQPQAEGLA (SEQ ID NO:76), ELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO:77), GQPDEPGGS (SEQ ID NO:78), GGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:79), ELQLEESAAEAQEGELE (SEQ ID NO:80), GSGSG (SEQ ID NO:81), GSGC (SEQ ID NO:82), AGGGGSG (SEQ ID NO:83), GSGS (SEQ ID NO:84), QPDEPGGS (SEQ ID NO:85), GSGSGS (SEQ ID NO:86), TVAAPS (SEQ ID NO:87), KAGGGGSG (SEQ ID NO:88), KGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:89), KQPDEPGGS (SEQ ID NO:90), KELQLEESAAEAQDGELD (SEQ ID NO:91), KTVAAPS (SEQ ID NO:92), KAGGGGSGG (SEQ ID NO:93), KGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO:94), KQPDEPGGSG (SEQ ID NO:95), KELQLEESAAEAQDGELDG (SEQ ID NO:96), KTVAAPSG AGGGGSGG (SEQ ID NO:97), AGGGGSG (SEQ ID NO:98), GSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO:99), QPDEPGGSG (SEQ ID NO:100), TVAAPSG (SEQ ID NO:301) , GGGGSGGGSGGGGGSGGGSGGGGSGGGS (SEQ ID NO:350), PSPEPPTPEPPSPEP

(SEQ ID NO:351), ELQLEESAAEAQEGELE (SEQ ID NO:352), SSGGGGSGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:353), GS (SEQ ID NO: 354), GGGGS (SEQ ID NO: 355), EEEEDEEEED (SEQ ID NO: 356), PSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 357), GSHHHHHHHHGS (SEQ ID NO: 358), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 359), GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 360), GSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 361), PSTPPTPSPSTPPTPSPS (SEQ ID NO: 362), RGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP (SEQ ID NO: 363), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 364), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 365), PSTPPTPSPSTPPTPSPSPSTPPTPSPSTPPTPSPS (SEQ ID NO: 366), PSPEP (SEQ ID NO: 367), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 368), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 369), PTPEPPSPEPPTPEPPSPEP (SEQ ID NO: 370), PSPEPGGGSPTPEP (SEQ ID NO: 371), PSPEPEEEDPTPEP (SEQ ID NO: 372), PSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 373), PTPEPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPPSPEP (SEQ ID NO: 374), PTPEPPSPEPPTPEPGGGGSPSPEPPTPEPPSPEP (SEQ ID NO: 375), PSPEPTPEPSPEPPTPEPSPEPTPEP (SEQ ID NO: 376), GETGS (SEQ ID NO: 377), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 378), GETGSSGEGT (SEQ ID NO: 379), GETGSSGEGTGSTGS (SEQ ID NO: 380), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 381), GETGSSGEGTGSTGSGAGES (SEQ ID NO: 382) и GETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGS (SEQ ID NO: 383), т.е., SEQ ID NO:74-100, 301 и 350-383.

Термин «связанное с фиброзом заболевание» включает в себя заболевания, нарушения и состояния, при которых наблюдается фиброз или про которые известно или предполагается, что с ними связан фиброз или способствует этиологии, прогрессированию или симптомам заболевания, или про которые известно или предполагается, что фиброз возникает по мере прогрессирования заболевания. Фиброз может воздействовать на орган или ткань, такие как поджелудочная железа, легкое, сердце, почка, печень, глаза, нервная система, костный мозг, лимфатические узлы, эндомиокард или забрюшинное пространство. Иллюстративные связанные с фиброзом заболевания, включают в себя, без ограничения, неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени, прецирроз, цирроз, диффузную паренхиматозную болезнь легкого, кистозный фиброз, легочный или пульмонарный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, идиопатический легочный фиброз, инъекционный фиброз, почечный или ренальный фиброз, хроническое заболевание почек, диабетическую нефропатию,

очаговый сегментный гломерулосклероз, мембранную нефропатию, нефропатию IgA, миелофиброз, сердечную недостаточность, метаболическую сердечную недостаточность, фиброз сердца, катаракту с фиброзом задней капсулы хрусталика, катаракту, рубцы глаз, фиброз поджелудочной железы, фиброз кожи, кишечный фиброза, фиброз предсердий, фиброз средостения, болезнь Крона, забрюшинный фиброз, келоид, нефрогенный системный фиброз, склеродермию, системный склероз, артрофиброз, синдром Пейрони, контрактуру Дюпюитрена, диабетическую невропатию, адгезивный капсулит, алкогольную болезнь печени, гепатостатит, вирусный гепатит, билиарное заболевание, первичный хемохроматоз, связанный с лекарственными средствами цирроз печени, криптогенный цирроз печени, болезнь Вильсона и недостаточность альфа 1-антитрипсина, интерстициальное легочное заболевание (ILD); фиброзное заболевание легких; дегенерация желтого пятна; ретинопатию сетчатки; витреальную ретинопатию, миокардиальный фиброз, офтальмопатию Грейвса, индуцированный лекарственными средствами эрготизм, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз/рестеноз, гипертрофические рубцы, первичный или идиопатический миелофиброз и воспалительное заболевание кишечника (включая в себя, без ограничения, коллагенозный колит). Согласно некоторым вариантам осуществления связанные с фиброзом заболевания могут включать в себя фиброз печени, почек или ренальный фиброз, легочный или пульмональный фиброз и сердечный фиброз или фиброз миокарда. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может представлять собой фиброз печени. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может представлять собой NASH.

Фраза «осложненная форма ожирения» (также иногда называемая «патологическим ожирением»), как правило, относится к состоянию подмножества страдающих ожирением индивидуумов, у которых также имеются осложнения, связанные с ожирением или вызванные ожирением. Ожирение может быть определено путем определения индекса массы тела (масса в килограммах, деленная на квадрат роста в метрах), индекс массы тела 30 м/кг^2 или более указывает на ожирение. Иллюстративные осложнения, возникающие при осложненном с медицинской точки зрения ожирении, могут включать в себя один или несколько случаев сахарного диабета типа 2, гипертонию, обструктивное апноэ во время сна, заболевание коронарной артерии и другие сердечно-сосудистые заболевания (включая в себя заболевание коронарной артерии, инсульт и застойную сердечную недостаточность) и дислипидемию.

Дополнительные осложнения, которые могут присутствовать, включают в себя неалкогольную жировую болезнь печени (такую как стеатоз, стеатогепатит или цирроз), респираторное заболевание, обструктивное апноэ во время сна, синдром ожирения-гиповентиляции, астму, рестриктивную болезнь легких, злокачественную опухоль, остеоартрит, желчно-каменную болезнь, гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь, гинекологические аномалии, бесплодие, аномальные менструации, венозный застой, проблемы с кожей, опрелость, целлюлит, повышенный риск осложнений во время операции или беременности, недержание мочи и идиопатическую внутричерепную гипертензию. Осложненная форма ожирения также может быть связана с синдромом Прадера-Вилли.

Термин «по существу очищенный» относится к немодифицированному или модифицированному полипептиду FGF-21, который может быть по существу или значительно свободен от компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с белком, как обнаружено в его естественной среде, то есть нативной клетке или клетке-хозяине в случае рекомбинантно произведенных немодифицированных или модифицированных полипептидов FGF-21. Немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21, который может быть по существу свободным от клеточного материала, включает в себя препараты белка, содержащие менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 25%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 4%, менее чем приблизительно 3%, менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1% (по сухой массе) загрязняющего белка. Когда немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21 или его вариант рекомбинантно производится клетками-хозяевами, белок может присутствовать в количестве приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1% или менее от сухой массы клеток. Когда немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21 или его вариант рекомбинантно производится клетками-хозяевами, этот белок может присутствовать в культуральной среде в количестве приблизительно 5 г/л, приблизительно 4 г/л, приблизительно 3 г/л, приблизительно 2 г/л, приблизительно 1 г/л, приблизительно 750 мг/л, приблизительно 500 мг/л, приблизительно 250 мг/л, приблизительно 100 мг/л, приблизительно 50 мг/л, приблизительно 10 мг/л или приблизительно 1 мг/л или менее

от сухой массы клеток. Таким образом, «по существу очищенный» немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21, полученный способами согласно настоящему изобретению, может характеризоваться степенью чистоты, составляющей по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, точнее, степенью чистоты по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85% и более конкретно, степенью чистоты по меньшей мере приблизительно 90%, степенью чистоты по меньшей мере приблизительно 95%, степенью чистоты по меньшей мере приблизительно 99% или выше, как определено подходящими способами, такими как анализ SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC и капиллярный электрофорез.

«Рекомбинантная клетка-хозяин» или «клетка-хозяин» относится к клетке, которая содержит экзогенный полинуклеотид, независимо от способа, используемого для введения, например, прямого поглощения, трансдукции, f-спаривания или других способов, известных в настоящем области техники для создания рекомбинантных клеток-хозяев. Экзогенный полинуклеотид может поддерживаться в виде неинтегрированного вектора, например, плазмиды, или, альтернативно, может быть интегрирован в геном хозяина.

Используемый в настоящем документе термин «среда» или «среды» включает в себя любую культуральную среду, раствор, твердую, полутвердую или жесткую подложку, которая может поддерживать или содержать любую клетку-хозяина, включая в себя бактериальные клетки-хозяева, клетки-хозяева дрожжей, клетки-хозяева насекомых, клетки-хозяева растений, клетки-хозяева эукариот, клетки-хозяева млекопитающих, клетки CHO, прокариотические клетки-хозяева, клетки *E. coli* или клетки-хозяева Pseudomonas и содержимое клеток. Таким образом, этот термин может охватывать среду, в которой была выращена клетка-хозяин, например, среду, в которую был секретирован немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21, включая в себя среду либо до стадии пролиферации, либо после нее. Термин также может охватывать буферы или реагенты, которые содержат лизаты клеток-хозяев, такие как в случае, когда немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21 производится внутриклеточно, и клетки-хозяева лизируют или разрушаются для высвобождения немодифицированного или модифицированного полипептида FGF-21.

Термин «противодиабетическое средство» означает любое лекарственное средство, которое применимо при лечении, предупреждении или ином уменьшении тяжести любого нарушения метаболизма глюкозы или любых его осложнений, включая в себя любые состояния, заболевание или осложнения, описанные в настоящем документе. Противодиабетические средства включают в себя инсулин, тиазолидиндионы, сульфонилмочевины, производные бензойной кислоты, ингибиторы альфа-глюкозидазы или тому подобное. Предлагаемые в настоящем изобретении противодиабетические композиции могут быть способны снижать уровни HbA1c по меньшей мере на 10% или по меньшей мере на 50% от исходного уровня. Противодиабетические средства включают в себя потенцирующие инсулин средства, такие как, включая в себя, без ограничения, низкомолекулярные потенцирующие инсулин средства, таурин, альфа-липоевую кислоту, экстракт тутового дерева, хром, глутамин, Enicostemma littorale Blume, Scoparia dulcis, экстракт эстрагона, Andrographis paniculata, изомальт, трегалозу или D-маннозу, которые могут дополнительно усиливать секрецию или активность инсулина.

Используемый в настоящем документе термин «модифицированный полипептид FGF-21», «модифицированный фактор роста фибробластов 21» или «модифицированный FGF-21» и его формы используются взаимозаменяемо и включают в себя такие полипептиды и белки, которые отличаются от FGF-21 дикого типа (например, человеческого FGF-21 дикого типа из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5) и, как правило, содержат по меньшей мере одну биологическую активность фактора роста фибробластов 21, а также аналоги FGF-21, изоформы FGF-21, миметики FGF-21, фрагменты FGF-21, гибридные белки FGF-21, слитые белки, олигомеры и мультимеры, гомологи, варианты паттерна гликозилированного, варианты сплайсинга и мутеины, независимо от их биологической активности. Термин «модифицированный полипептид FGF-21» и «модифицированный FGF-21» охватывает полипептиды FGF-21, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, добавлений или делеций. Например, модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению содержат внутреннюю делецию, включая в себя те внутренние делеции, показанные на фиг. 1, и другие, описанные в настоящем документе.

Термин «модифицированный полипептид FGF-21» также охватывает полиморфизмы (например, встречающиеся в природе варианты последовательности FGF-21). Например, «P-форма» FGF-21 содержит пролин (P) в положении 174 (положение 146 в зрелом полипептиде SEQ ID NO:1), в то время как «L-форма» содержит

лейцин (L) в положении 174 (положение 146 в зрелом полипептиде SEQ ID NO: 5). Иллюстративные полипептидные последовательности P-формы FGF-21 содержатся в SEQ ID NO: 1-4, тогда как иллюстративные полипептидные последовательности L-формы FGF-21 содержатся в SEQ ID NO: 5-7.

Были описаны замены в широком разнообразии аминокислотных положений в природном FGF-21. Замены, включающие в себя, без ограничения, такие, которые модулируют растворимость или стабильность, увеличивают активность агонистов, увеличивают период полужизни in vivo или in vitro, повышают резистентность к протеазе, превращают полипептид в антагонист, снижают иммуногенность или токсичность, способствуют очистке или выполнимости производства и т.д., охватываются термином «модифицированный полипептид FGF-21» или «модифицированный FGF-21». В некоторых случаях замены неканонических аминокислот могут быть объединены с другими добавлениями, заменами или делециями в пределах модифицированного полипептида FGF-21 для воздействия на другие биологические признаки модифицированного полипептида FGF-21 относительно другого полипептида FGF-21 (например, полипептида FGF-21 дикого типа из SEQ ID NO: 1, модифицированного полипептида FGF-21 из SEQ ID NO: 201 или другого полипептида FGF-21, такого как тот же самый полипептид FGF-21 без указанного добавления, замены или делеции или другого немодифицированного или модифицированного полипептида FGF-21). В некоторых случаях другие добавления, замены или делеции могут повысить стабильность (включая в себя, без ограничения, устойчивость к протеолитической деградации) модифицированного полипептида FGF-21 или увеличить аффинность модифицированного полипептида FGF-21 к его рецептору. В некоторых случаях другие добавления, замены или делеции могут увеличить фармацевтическую стабильность модифицированного полипептида FGF-21. В некоторых случаях другие добавки, замены или делеции могут увеличить растворимость (включая в себя, без ограничения, при экспрессии в *E. coli* или других клетках-хозяевах) модифицированного полипептида FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления добавления, замены или делеции могут увеличивать растворимость полипептида после экспрессии в *E. coli* или других рекомбинантных клетках-хозяевах. Согласно некоторым вариантам осуществления сайты выбирают для замены кодируемой или неприродной аминокислотой в дополнение к другому сайту для введения неприродной аминокислоты, что приводит к увеличению растворимости полипептида после экспрессии в *E.coli* или других рекомбинантных клетках-хозяевах.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 содержат другое добавление, замену или делецию, которая модулирует аффинность к рецептору полипептида FGF-21, связывающим белкам или связывающему лиганду, модулирует сигнальную трансдукцию после связывания с рецептором FGF-21, модулирует период полужизни в русле крови, модулирует высвобождение или биодоступность, облегчает очистку или улучшает или изменяет конкретный путь введения. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 содержат добавление, замену или делецию, что увеличивает аффинность модифицированного FGF-21 к его рецептору. Аналогично, модифицированные полипептиды FGF-21 могут содержать химически или ферментативно расщепляемые последовательности, последовательности расщепления протеазой, реакционноспособные группы, связывающие антитела домены (включая в себя, без ограничения, FLAG или поли-His) или другие последовательности на основе аффинности (включая в себя, без ограничения, FLAG, поли-His, GST и т.д.) или связывающие молекулы (включая в себя, без ограничения, биотин), которые улучшают обнаружение (включая в себя, без ограничения, GFP), очистку, транспортировку через ткани или клеточные мембраны, высвобождение или активацию пролекарства, уменьшение размера модифицированного FGF-21 или другие признаки полипептида.

Для последовательностей FGF-21, в которых нет лидерной последовательности, смотрите SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 5 в настоящем документе. Для последовательностей FGF-21 с лидерной последовательностью смотрите SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию по существу идентичны SEQ ID NO: 1-7 или любой другой последовательности полипептида FGF-21. Были идентифицированы множественные полиморфизмы FGF-21. Лейцин или пролин были описаны в том же положении в патентной публикации США № 20010012628 и патенте США № 6716626. N-концевые лидерные или сигнальные последовательности, которые отличаются 1 аминокислотой (лейцин), показаны в патенте США № 6716626 и патентной публикации США № 20040259780. Варианты или мутанты полипептида FGF-21 включают в себя, без ограничения, варианты, раскрытые в патенте США № 6716626; патентных публикациях США № 2005/0176631, 2005/0037457, 2004/0185494, 2004/0259780, 2002/0164713 и 2001/0012628; публикациях международных заявок WO 01/36640; WO 03/011213; WO 03/059270; WO 04/110472; WO 05/061712; WO 05/072769; WO 05/091944; WO 05/113606;

WO 06/028595; WO 06/028714; WO 06/050247; WO 06/065582; WO 06/078463; WO 01/018172; WO09/149171; WO10/042747; WO 12/066075; WO11/154349; WO13/052311; WO13/188181, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «модифицированный полипептид FGF-21» также включает в себя биологически активные фрагменты, биологически активные варианты и стереоизомеры встречающегося в природе FGF-21, а также варианты агониста, миметика и антагониста встречающегося в природе FGF-21 и его полипептидных слияний. Слияния, содержащие дополнительные аминокислоты на аминоконце, карбоксильном конце или и там и там, охватываются термином «модифицированный полипептид FGF-21». Иллюстративные слияния включают в себя, без ограничения, например, метионил FGF-21, в котором метионин связан с N-концом FGF-21, представляя собой результат рекомбинантной экспрессии зрелой формы FGF-21, лишенной лидерного или сигнального пептида или его части (метионин связан с N-концом FGF-21, представляя собой результат рекомбинантной экспрессии, например, в E. coli), слияния с целью очистки (включая в себя, без ограничения, полигистидиновые или аффинные эпитопы), слияния со связывающими сывороточный альбумин пептидами, такими как PKE аднектин, и слияния с сывороточными белками, такими как сывороточный альбумин и слитые белки, содержащие FGF-21 и одну или несколько других молекул («партнер по слиянию»), включая в себя, без ограничения, сывороточный альбумин, домен Fc, константную область иммуноглобулина, неструктурированный полипептид и аднектин и их фрагмент. Любые подобные фрагменты могут быть получены из белков стандартными биохимическими способами или путем экспрессии полинуклеотида, кодирующего фрагмент.

За исключением случаев, где указано иное, в целом используемые в настоящем документе термины «полипептид FGF-21», «фактор роста фибробластов 21» и «FGF-21» охватывают как немодифицированный полипептид (т.е. дикого типа) FGF-21, так и модифицированный полипептид FGF- 21.

Термин «модифицированный полипептид FGF-21» включает в себя полипептиды, конъюгированные с полимером, таким как ПЭГ, и может необязательно содержать одно или несколько дополнительных производных цистеина, лизина или других остатков. Кроме того, модифицированный полипептид FGF-21 может содержать линкер или полимер, причем аминокислота, с которой конъюгирован линкер или полимер, может быть неприродной аминокислотой согласно настоящему изобретению или может быть

конъюгирована с канонической аминокислотой с применением известных в настоящем уровне техники способов, таких как соединение с лизином или цистеином.

Термин «модифицированный полипептид FGF-21» также включает в себя гликозилированные модифицированные FGF-21, такие как, без ограничения, полипептиды, гликозилированные в любом положении аминокислоты, N-связанные или O-связанные гликозилированные формы полипептида. Варианты, содержащие однонуклеотидные изменения, также рассматриваются как биологически активные варианты полипептида FGF-21. Кроме того, включены варианты сплайсинга. Термин «модифицированный полипептид FGF-21» также включает в себя гетеродимеры полипептида FGF-21, гомодимеры, гетеромультимеры или гомомультимеры любого одного или нескольких немодифицированных или модифицированных полипептидов FGF-21 или любого другого полипептида, белка, углевода, полимера, малой молекулы, линкера, лиганда или другой биологически активной молекулы любого типа, связанной химическими средствами или экспрессируемой в виде слитого белка, а также полипептидные аналоги, содержащие, например, специфические делеции или другие модификации, но сохраняющие биологическую активность.

Все ссылки на положения аминокислот в немодифицированном или модифицированном FGF-21, описанном в настоящем документе, основаны на соответствующем положении в SEQ ID NO: 1, если не указано иначе (т.е. когда указано, что сравнение основано на SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7 или другой последовательности FGF-21). Например, аминокислота в положении 77 в SEQ ID NO: 1 представляет собой аргинин, и соответствующий аргинин находится в SEQ ID NO: 2 в положении 87. Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что положения аминокислот, соответствующие положениям в SEQ ID NO: 1, можно легко идентифицировать в любой другой молекуле FGF-21, такой как SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 и 7. Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что положения аминокислот, соответствующие положениям в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или любой другой последовательности FGF-21, могут быть легко идентифицированы в любой другой молекуле FGF-21, такой как слияния, варианты, фрагменты и т. д. FGF-21. Например, программы выравнивания последовательностей, такие как BLAST, могут использоваться для выравнивания и идентификации конкретного положения в белке, которое соответствует положению в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или другой последовательности FGF-21. Замены, делеции или добавления аминокислот, описанных в настоящем документе в отношении SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или другой

последовательности FGF-21, предназначены также для обозначения замен, делеций или добавок в соответствующие положения в слияниях FGF-21, вариантах, фрагментах и т.д., описанных в настоящем документе или известных в настоящей области техники, и прямо охватываются настоящим раскрытием.

Термин «модифицированный FGF-21 полипептид» или «модифицированный FGF-21» охватывает полипептиды FGF-21, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций. Например, модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему изобретению могут состоять из модификаций с одной или несколькими природными аминокислотами, необязательно в сочетании с одной или несколькими модификациями неприродных аминокислот. Иллюстративные замены, вставки или делеции в широком разнообразии положений аминокислот в полипептидах FGF-21 (включая в себя описанные в настоящем документе и другие), включая в себя, без ограничения, замены, которые модулируют фармацевтическую стабильность, которые модулируют одну или несколько биологических активностей полипептида FGF-21, например, без ограничения, увеличивают активность агониста, увеличивают растворимость полипептида, снижают восприимчивость к протеазе, уменьшают дезамидирование, превращают полипептид в антагонист, уменьшают иммуногенность или токсичность или облегчают очистку или выполнимость производства и т.д., охватываются термином «модифицированный полипептид FGF-21».

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 дополнительно содержат дополнительную вставку, замену или делецию, которая модулирует биологическую активность модифицированного полипептида FGF-21. Например, добавления, замены или делеции могут модулировать одно или несколько свойств или активностей модифицированного FGF-21. Например, добавления, замены или делеции могут модулировать аффинность к рецептору полипептида FGF-21, модулировать время циркуляции, модулировать терапевтический период полужизни, модулировать стабильность полипептида, модулировать расщепление протеазами, модулировать дозу, модулировать высвобождение или биодоступность, облегчать очистку, уменьшать дезамидирование, улучшать срок хранения или улучшать или изменять конкретный путь введения. Аналогично, модифицированные полипептиды FGF-21 могут содержать последовательности расщепления протеазами, реакционноспособные группы, антителосвязывающие домены (включая в себя, без ограничения, FLAG или поли-His) или другие последовательности

на основе аффинности (включая в себя, без ограничения, FLAG, поли-His, GST и т.д.) или связанные молекулы (включая в себя, без ограничения, биотин), которые улучшают обнаружение (включая в себя, без ограничения, GFP), очистку или другие характеристики полипептида.

Термин «модифицированный полипептид FGF-21» также охватывает гомодимеры, гетеродимеры, гомомультимеры и гетеромультимеры, которые образуются через партнеров по слиянию, такие как домены Fc, или которые связаны, включая в себя, без ограничения, таковые, связанные прямо через боковые цепи неканонических аминокислот, либо с теми же самыми или другими боковыми цепями неканонических аминокислот, либо с боковыми цепями природных аминокислот, или опосредованно через линкер. Иллюстративные линкеры включают в себя, без ограничения, небольшие органические соединения, водорастворимые полимеры различной длины, такие как полиэтиленгликоль или полидекстран, или полипептиды различной длины.

«Неканоническая аминокислота» относится к аминокислоте, которая не представляет собой одну из 20 общих аминокислот или пирролизин или селеноцистеин. Другие термины, которые могут быть использованы как синонимы для термина «неканоническая аминокислота», представляют собой «неприродная аминокислота», «не находящаяся в природе аминокислота» и различные их варианты. Термин «неканоническая аминокислота» также включает в себя, без ограничения, аминокислоты, которые происходят путем модификации (например, посттрансляционных модификаций) кодируемой аминокислоты (включая в себя, без ограничения, 20 общих аминокислот или пирролизин и селеноцистеин), но сами по себе не включены в растущую полипептидную цепь трансляционным комплексом. Примеры таких неканонических аминокислот включают в себя, без ограничения, *N*-ацетилглюкозаминил-L-серин, *N*-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.

«Группа модификации на аминоконце» относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к аминоконцу полипептида. Аналогично, «группа модификации на карбоксильном конце» относится к любой молекуле, которая может быть присоединена к карбоксильному концу полипептида. Группы модификации концов включают в себя, без ограничения, различные водорастворимые полимеры, пептиды или такие белки, как сывороточный альбумин, домен Fc, константную область иммуноглобулина, неструктурированный полипептид, аднектин или его фрагмент или другие фрагменты, которые увеличивают время полужизни пептидов в сыворотке (*in vivo*).

Термины «функциональная группа», «активный фрагмент», «активирующая группа», «уходящая группа», «реакционноспособный сайт», «химически реакционноспособная группа» и «химически реакционноспособный фрагмент» используются в настоящей области техники и в настоящем документе для обозначения различных определяемых частей или единиц молекулы. Эти термины представляют собой синонимы в настоящей области химии и используются в настоящем документе для обозначения частей молекул, которые выполняют определенную функцию или активность и представляют собой реакционноспособные с другими молекулами.

Термин «связь» или «линкер» используется в настоящем документе для обозначения групп или связей, которые, как правило, образуются в результате химической реакции и, как правило, представляют собой ковалентные связи. Гидролитически стабильные связи означают, что связи по существу стабильны в воде и не реагируют с водой при применимых значениях pH, включая в себя, без ограничения, в физиологических условиях в течение продолжительного периода времени, возможно, даже неопределенно долго. Гидролитически нестабильные или деградируемые связи означают, что связи деградируют в воде или в водных растворах, включая в себя, например, кровь. Ферментативно нестабильные или разлагаемые связи означают, что связь может разрушаться одним или несколькими ферментами. Как понятно в настоящем уровне техники, ПЭГ и родственные полимеры могут включать в себя деградируемые связи в остове полимера или в линкерной группе между остовом полимера и одной или несколькими концевыми функциональными группами полимерной молекулы. Например, эфирные связи, образованные реакцией карбоновых кислот ПЭГ или активированных карбоновых кислот ПЭГ со спиртовыми группами на биологически активном средстве, как правило, гидролизуются в физиологических условиях для высвобождения средства. Другие гидролитически разрушаемые связи включают в себя, без ограничения, карбонатные связи; иминные связи, полученные в результате реакции амина и альдегида; фосфорно-эфирные связи, образованные взаимодействием спирта с фосфатной группой; гидразоновые связи, которые представляют собой продукт реакции гидразида и альдегида; ацетальные связи, которые представляют собой продукт реакции альдегида и спирта; ортоэфирные связи, которые представляют собой продукт реакции формиата и спирта; пептидные связи, образованные аминогруппой, включая в себя, без ограничения, на конце такого полимера, как ПЭГ, и карбоксильной группой пептида; и олигонуклеотидные связи, образованные группой фосфорамидита, включая в себя, без ограничения, на конце полимера и 5'-гидроксильную группу олигонуклеотида.

Термин «биологически активная молекула», «биологически активный фрагмент» или «биологически активное средство» при использовании в настоящем документе означает любое вещество, которое может воздействовать на любые физические или биохимические свойства биологической системы, путь, молекулу или взаимодействие, связанное с живым организмом. В частности, при использовании в настоящем документе биологически активные молекулы включают в себя, без ограничения, любое вещество, предназначенное для диагностики, лечения, смягчения, воздействия или профилактики заболеваний у людей или других животных, или иным образом повышения физического или психического благополучия людей или животных. Примеры биологически активных молекул включают в себя, без ограничения, пептиды, белки, ферменты, низкомолекулярные лекарственные средства, углеводы, неорганические атомы или молекулы, красители, липиды, нуклеозиды, радионуклиды, олигонуклеотиды, токсоиды, токсины, полисахариды, нуклеиновые кислоты, пептиды, полипептиды, белки и их части, полученные или происходящие из вирусов, бактерий, насекомых, животных или любых других клеток или типов клеток, липосом, микрочастиц и мицелл.

Термин «заместители» включает в себя, без ограничения, «неинтерферирующие заместители». «Неинтерферирующие заместители» представляют собой такие группы, которые дают стабильные соединения. Подходящие неинтерферирующие заместители или радикалы включают в себя, без ограничения, галоген, C_1-C_{10} алкил, C_2-C_{10} алкенил, C_2-C_{10} алкинил, C_1-C_{10} алкокси, C_1-C_{12} аралкил, C_1-C_{12} алкарил, C_3-C_{12} циклоалкил, C_3-C_{12} циклоалкенил, фенил, замещенный фенил, толуол, ксилол, бифенил, C_2-C_{12} алкоксиалкил, C_2-C_{12} алкоксиарил, C_7-C_{12} арилоксиалкил, C_7-C_{12} оксиарил, C_1-C_6 алкилсульфинил, C_1-C_{10} алкилсульфонил, --$(CH_2)_m$--O--(C_1-C_{10} алкил), где m равно 1-8, арил, замещенный арил, замещенный алкокси, фторалкил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, нитроалкил, -NO_2, --NRC(O)--(C_1-C_{10} алкил), --C(O)--(C_1-C_{10} алкил), C_2-C_{10} алкилтиоалкил, --C(O)O--(C_1-C_{10} алкил)), --OH, --SO_2, =S, --COOH, --NR_2, карбонил, --C(O)--(C_1-C_{10} алкил)-CF3, --C(O)—CF3, --C(O)NR2, --(C_1-C_{10} алкил)-S--(C_6-C_{10} арил), -C(O)--(C_1-C_{10} арил), --$(CH_2)_m$--O--(--$(CH_2)_m$--O--(C_1-C_{10} алкил), где каждый m составляет от 1 до 8, --C(O)NR_2, --C(S)NR_2, -- SO_2NR_2, --NRC(O)NR_2, --NRC(S)NR_2, их солей и т.п. Каждый R, используемый в настоящем документе, представляет собой H, алкил или замещенный алкил, арил или замещенный арил, аралкил или алкарил.

Используемый в настоящем документе термин «водорастворимый полимер» относится к любому полимеру, который растворим в водных растворителях. Связывание

водорастворимых полимеров с модифицированными полипептидами FGF-21 может приводить к изменениям, включающим в себя, без ограничения, повышенный или модулированный период полужизни в сыворотке (*in vivo*) или увеличенный или модулированный терапевтический период полужизни относительно немодифицированной формы, модулированную иммуногенность или токсичность, модулированные характеристики физической ассоциации, такие как агрегация и образование мультимеров, измененное связывание с рецепторами, измененное связывание с одним или несколькими партнерами по связыванию и изменение димеризации или мультимеризации рецептора. Водорастворимый полимер может обладать или не обладать собственной биологической активностью и может быть использован в качестве линкера для прикрепления модифицированного FGF-21 к другим веществам, включая в себя, без ограничения, один или несколько немодифицированных или модифицированных полипептидов FGF-21 или одну или несколько биологически активных молекул. Подходящие полимеры включают в себя, без ограничения, полиэтиленгликоль, пропиональдегид полиэтиленгликоля, моно-C1-C10 алкокси или его арилоксипроизводные (описанные в патенте США № 5252714, который включен в настоящий документ посредством ссылки), монометоксиполиэтиленгликоль, дискретный ПЭГ, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиаминокислоты, малеиновый ангидрид дивинилового эфира, *N*-(2-гидроксипропил)метакриламид, декстран, производные декстрана, включающие в себя декстрансульфат, полипропиленгликоль, сополимер полипропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированный полиол, гепарин, фрагменты гепарина, полисахариды, олигосахариды, гликаны, целлюлозу и производные целлюлозы, включая в себя, без ограничения, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу, крахмал и производные крахмала, полипептиды, полиалкиленгликоль и их производные, сополимеры полиалкиленгликолей и их производных, поливинилэтиловые эфиры и альфа-бета-поли[(2-гидроксиэтил)-DL-аспартамид и т.п. или их смеси. Примеры таких водорастворимых полимеров включают в себя, без ограничения, полиэтиленгликоль и сывороточный альбумин.

Используемый в настоящем документе термин «полиалкиленгликоль» (ПЭГ) или «поли(алкенгликоль)» относится к полиэтиленгликолю, (поли(этиленгликолю)), полипропиленгликолю, полибутиленгликолю и их производным. Термин «полиалкиленгликоль» охватывает как линейные, так и разветвленные полимеры, и средние молекулярные массы от 0,1 кДа до 100 кДа. Другие иллюстративные варианты

осуществления перечислены, например, в коммерческих каталогах поставщиков, таких как каталог Shearwater Corporation «Полиэтиленгликоль и производные для биомедицинских применений» (2001).

Используемые в настоящем документе термины «модулированный период полужизни в сыворотке» или «модулированный период полужизни *in vivo*» и аналогичные термины относятся к положительному или отрицательному изменению периода полужизни в кровотоке модифицированного FGF-21 по сравнению с веществом сравнения, таким как его немодифицированная форма. Период полужизни в сыворотке можно измерить, отбирая образцы крови в различные моменты времени после введения модифицированного FGF-21 и определяя концентрацию этой молекулы в каждом образце. Соотношение концентрации в сыворотке во времени позволяет рассчитать период полужизни в сыворотке. Желательно, чтобы период полужизни в сыворотке (*in vivo*) был по меньшей мере приблизительно в два раза больше, но может быть полезным меньшее увеличение, например, когда оно обеспечивает удовлетворительную схему дозирования или позволяет избежать токсического эффекта. Согласно некоторым вариантам осуществления увеличение может быть по меньшей мере приблизительно трехкратным, по меньшей мере приблизительно пятикратным или по меньшей мере приблизительно десятикратным.

Используемый в настоящем документе термин «модулированный терапевтический период полужизни» означает положительное или отрицательное изменение в периоде полужизни в сыворотке или *in vivo* терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, описанного в настоящем документе, относительно вещества сравнения, такого как его немодифицированная форма или FGF-21 дикого типа. Терапевтический период полужизни измеряется путем измерения фармакокинетических и/или фармакодинамических свойств молекулы в различные моменты времени после введения. Увеличенный терапевтический период полужизни желательно делает возможным конкретную благоприятную схему дозирования, конкретную полезную общую дозу или избегает нежелательного эффекта. Согласно некоторым вариантам осуществления увеличенный терапевтический период полужизни представляет собой результат увеличенной активности, увеличенного или уменьшенного связывания модифицированной молекулы с ее мишенью, увеличенного или уменьшенного распада молекулы ферментами, такими как протеазы, или увеличенного или уменьшенного другого параметра или механизма действия

немодифицированной молекулы или увеличенного или уменьшенного опосредованного рецептором клиренса молекулы.

Термин «выделенный» применительно к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок не содержат по меньшей мере некоторых клеточных компонентов, с которыми он связан в естественном состоянии, или что нуклеиновая кислота или белок был сконцентрирован до уровня, превышающего концентрацию его in vivo или in vitro продукции. Он может находиться в гомогенном состоянии. Выделенные вещества могут быть в сухом или полусухом состоянии или в растворе, включая в себя, без ограничения, водный раствор. Оно может быть компонентом фармацевтической композиции, которая содержит дополнительные фармацевтически приемлемые носители и/или вспомогательные вещества. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют с использованием способов аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который представляет собой преобладающий вид, присутствующий в препарате, по существу является очищенным. В частности, выделенный ген отделяют от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белок, отличный от представляющего интерес гена. Термин «очищенный» означает, что нуклеиновая кислота или белок дают по существу одну полосу в электрофоретическом геле. В частности, это может означать, что нуклеиновая кислота или белок являются по меньшей мере на 85% чистыми, по меньшей мере на 90% чистыми, по меньшей мере на 95% чистыми, по меньшей мере на 99% или более чистыми.

Термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеозидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Если специально не ограничено, этот термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают схожими связывающими свойствами, что и эталонная нуклеиновая кислота, и метаболизируют аналогично природным нуклеотидам. Если специально не ограничено, этот термин также относится к олигонуклеотидным аналогам, включающим в себя PNA (пептидонуклеиновую кислоту), аналогам ДНК, используемым в антисмысловой технологии (фосфоротиоаты, фосфорамидаты и тому подобное). Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также подразумеваемым образом охватывает ее консервативно модифицированные

варианты (включая в себя, без ограничения, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также указанную последовательность.

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. То есть описание, направленное на полипептид, в равной степени применимо к описанию пептида и описанию белка, и наоборот. Термины применяются к природным аминокислотным полимерам, а также к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой неканонические аминокислоты. Используемые в настоящем документе термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая в себя полноразмерные белки, где аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

«Консервативно модифицированные варианты» относятся к аминокислотным последовательностям, содержащим консервативные замены. Иллюстративные консервативно модифицированные варианты включают в себя замены, делеции или вставки в последовательность нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в полипептидной последовательности или кодируемой полипептидной последовательности, например, до 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот или до 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% или 3,5% аминокислот в полипептидной последовательности или кодируемой полипептидной последовательности, которая необязательно может представлять собой или может включать в себя замену аминокислоты(аминокислот) химически подобной аминокислотой(ами). Таблицы консервативных замен, предусматривающие функционально подобные аминокислоты, известны специалистам в настоящей области техники. Такие консервативно модифицированные варианты представляют собой дополнение и не исключают полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей раскрытых модифицированных полипептидов FGF-21.

Таблицы консервативных замен, предусматривающие функционально подобные аминокислоты, известны специалистам в настоящей области техники. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые представляют собой консервативные замены друг для друга:

1) Аланин (A), глицин (G);
2) Аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
3) Аспарагин (N), глутамин (Q);
4) Аргинин (R), лизин (K);

5) Изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);

6) Фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);

7) Серин (S), треонин (T); а также

8) Цистеин (C), метионин (M)

(смотрите, например, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)

Термины «идентичная» или «идентичность» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Последовательности «по существу идентичны», если они содержат процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов (то есть идентичность составляет приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% в определенной области), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или в определенной области, измеренной с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей (или других алгоритмов, доступных специалистам в настоящей области техники) или ручного выравнивания и визуального контроля. Идентичность может существовать в области или окне сравнения, длина которых составляет по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот или нуклеотидов, или в области длиной 75-100 аминокислот или нуклеотидов или, если не указано, по всей последовательности полинуклеотида или полипептида. Используемое в настоящем документе «окно сравнения» включает в себя ссылку на сегмент любого из числа смежных положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, как правило, от приблизительно 50 до приблизительно 200, более обычно от приблизительно 100 до приблизительно 150, в которых последовательность может быть сравнена с эталонной последовательностью с таким же числом смежных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Примеры алгоритмов, которые могут быть подходящими для определения процента идентичности последовательностей и подобия последовательности, представляют собой алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.* (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 и Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно, а также алгоритмы Smith-Waterman (Smith and Waterman, J Mol Biol. 1981 Mar 25;147(1):195-7) или Needleman-Wunsch (Needleman and

Wunsch, J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53), которые могут выполняться с параметрами по умолчанию, например, как описано в этих соответствующих публикациях.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к животному, согласно некоторым вариантам осуществления - млекопитающему, а согласно другим вариантам осуществления - человеку, который является объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Животное может представлять собой животное-компаньона (например, собаки, кошки и т.п.), сельскохозяйственное животное (например, коровы, овцы, свиньи, лошади и т.п.) или лабораторное животное (например, крысы и тому подобное).

Используемый в настоящем документе термин «эффективное количество» относится к такому количеству вводимого соединения (например, описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21), которое может в некоторой степени облегчить один или несколько симптомов заболевания, состояния или нарушения. Композиции, содержащие описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21, можно вводить для профилактического, усиливающего и/или терапевтического лечения.

Термины «усиливать» или «усиливающий» означают увеличение или удлинение активности или продолжительности желаемого эффекта. Таким образом, в отношении усиления эффекта терапевтических средств термин «усиление» относится к способности увеличивать или продлевать активность или продолжительность действия других терапевтических средств в системе.

Используемый в настоящем документе термин «модифицированный» относится к любым изменениям, выполненным в данном полипептиде, таким как изменения длины полипептида, аминокислотной последовательности, химической структуры, котрансляционной модификации или посттрансляционной модификации полипептида. Форма «(модифицированный)» означает, что обсуждаемые полипептиды представляют собой необязательно модифицированные, то есть рассматриваемые полипептиды могут быть модифицированы или немодифицированы.

Термин «посттрансляционно модифицированный» относится к любой модификации природной или неприродной аминокислоты, которая происходит с такой аминокислотой после ее включения в полипептидную цепь. Этот термин охватывает, только в качестве примера, котрансляционные модификации *in vivo*, котрансляционные модификации *in vitro* (такие как в бесклеточной трансляционной системе), посттрансляционные модификации *in vivo* и посттрансляционные модификации *in vitro*.

В профилактических применениях содержащие модифицированный полипептид FGF-21композиции вводят пациенту, который подвержен риску развития конкретного заболевания, нарушения или состояния. Такое количество определяется как «профилактически эффективное количество».

В терапевтических применениях композиции, содержащие модифицированный полипептид из неприродных аминокислот, вводят пациенту, уже страдающему заболеванием, состоянием или нарушением, в количестве, достаточном для лечения или по меньшей мере частичного задержания или облегчения симптомов заболевания, нарушения или состояния. Такое количество определяется как «терапевтически эффективное количество» и может зависеть от тяжести и течения заболевания, нарушения или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента и реакции на лекарственные средства, а также решения лечащего врача. Специалисты в настоящей области техники полагают, что для определения таких терапевтически эффективных количеств путем рутинного экспериментирования (например, клинического испытания с повышением дозы) можно определить такие терапевтически эффективные количества.

Термин «лечение» используется для обозначения профилактических и/или терапевтических процедур.

Представленные в настоящем документе полипептиды с неканоническими аминокислотами могут включать в себя меченные изотопами соединения с одним или несколькими атомами, замещенными атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличающееся от атомной массы или массового числа, обычно встречающегося в природе.

Все изомеры, включая в себя, без ограничения, диастереомеры, энантиомеры и их смеси рассматриваются как часть описанных в настоящем документе композиций. Согласно дополнительным или дальнейшим вариантам осуществления полипептиды с неканоническими аминокислотами метаболизируются при введении в организм, нуждающийся в получении метаболита, который затем используется для получения желаемого эффекта, включая желаемый терапевтический эффект. Согласно дальнейшим или дополнительным вариантам осуществления предусмотрены активные метаболиты полипептидов неканонических аминокислот.

I. Обзор

В раскрытии предусмотрены модифицированные молекулы FGF-21, содержащие внутреннюю делецию и необязательно содержащие по меньшей мере одну неприродную аминокислоту. Показано, что иллюстративные варианты осуществления модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих внутреннюю делецию, проявляют по меньшей мере одно преимущество, включая в себя, без ограничения, повышенную термостабильность, улучшенную растворимость, сниженное дезаминирование, улучшенную выполнимость производства, улучшенный период полужизни in vivo полноразмерной биологически активной формы, сохраняя при этом уровень биологической активности, сравнимый с полипептидом FGF-21 без внутренней делеции.

Дезамидирование уменьшалось, а срок хранения и чистота улучшались в модифицированных полипептидах FGF-21, содержащих удаленную область и необязательно заменяемую пептидом (смотрите фиг. 1). Показано, что иллюстративные модифицированные последовательности уменьшают событие дезамидирования, которое может произойти во время хранения молекулы. В дополнение к уменьшению дезамидирования эта модификация также повышала термическую стабильность и/или растворимость белка в растворе и дополнительно минимизировала склонность к агрегации белков по сравнению с полипептидами FGF-21 дикого типа или FGF-21 дикого типа, лишенными этой делеции. Уменьшение дезамидирования, повышение термической стабильности, повышение растворимости и/или снижение агрегации указывают на превосходные характеристики состава, такие как более длительный срок хранения и более высокая степень чистоты, а также композиция с большей концентрацией. Кроме того, уменьшение склонности к дезамидированию позволяет использовать больший диапазон вариантов состава; в противном случае должны быть выбраны условия приготовления, чтобы уменьшить дезамидирование, что потенциально может привести к другим нежелательным характеристикам состава. Кроме того, непредсказуемо и неожиданно, что модифицированный полипептид FGF-21, содержащий внутреннюю делецию между 5 и 19 смежными аминокислотами и замещающий пептид, может сохранять биологическую функцию FGF-21 и характеризоваться по меньшей мере одним из следующего: уменьшенное дезамидирование, увеличенная термическая стабильность, повышенная растворимость и уменьшенная агрегация.

Другая иллюстративная модификация уменьшает протеолитическое отсечение *in vivo* десяти С-концевых аминокислот от белка. Эта модификация продлевает период

полужизни в крови интактной активной молекулы, что приводит к снижению общей дозы и менее частому дозированию. Иллюстративная модификация, которая уменьшает протеолитическое отсечение, представляет собой точечную мутацию, G170E, хотя могут быть также использованы и другие модификации.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен модифицированный полипептид FGF 21, содержащий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-7, за исключением того, что указанная аминокислотная последовательность может содержать: (i) внутреннюю делецию от 2 до 19 аминокислот (например, от 5 до 19 аминокислот), причем указанная внутренняя делеция находится в области, соответствующей аминокислотам с 116 по 134 из SEQ ID NO: 1, причем указанная внутренняя делеция заменена замещающим пептидом, составляющим в длину от 0 до 12 аминокислот; и (ii) 9 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать по меньшей мере одну неканоническую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 72, 77, 86, 87, 91, 108, 110, 126, 131 или 146 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 77, 91, 108 или 131 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 72 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 77 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 86 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 87 в SEQ ID NO:

1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 91 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 110 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 126 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 131 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота находится в положении, соответствующем аминокислоте 146 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота представляет собой производное фенилаланина. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может представлять собой паразамещенное, ортозамещенное или метазамещенное производное фенилаланина. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота представляет собой п-ацетил-L-фенилаланин. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота представляет собой п-ацетил-L-фенилаланин, включенный в положение, соответствующее аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен модифицированный полипептид FGF 21, содержащий полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7, за исключением того, что указанная аминокислотная последовательность может содержать: (i) внутреннюю делецию от 2 до 19 аминокислот (например, от 5 до 19 аминокислот), причем указанная внутренняя делеция находится в области, соответствующей аминокислотам с 116 по 134 из SEQ ID NO: 1, причем указанная внутренняя делеция заменена замещающим пептидом, составляющим в длину от 0 до 12 аминокислот; (ii) 9 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок; (iii) неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1, которая может содержать паразамещенное, ортозамещенное или метазамещенное производное фенилаланина, такое как п-ацетил-L-фенилаланин.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанный модифицированный полипептид FGF-21 может содержать замещение глутаминовой кислоты на глицин в положении, соответствующем аминокислоте 170 в SEQ ID NO: 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может содержать или включать в себя область, соответствующую аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный модифицированный полипептид FGF-21 может быть связан с полимером, водорастворимым полимером или полиэтиленгликолем, таким как полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещенный пептид характеризуется последовательностью G, GG, SG, GSG, GGH или SGG. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещенный пептид характеризуется последовательностью GSG.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или меньшее количество дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 8 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 7 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 6 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 5 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам

осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 4 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 3 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 2 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать 1 дополнительную аминокислотную замену, делецию и/или вставку. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать замену или делецию аминокислоты, соответствующей аминокислоте G170 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать замену глутаминовой кислоты на глицин в положении, соответствующем аминокислоте 170 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая не может содержать дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, содержащей внутреннюю делецию от 4 до 19, от 4 до 18, от 4 до 17, от 4 до 16, от 4 до 15, от 4 до 14, от 4 до 13, от 4 до 12, от 4 до 11, от 4 до 10, от 4 до 9, от 4 до 8, от 4 до 7 или от 4 до 6 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может

составлять от 4 до 14 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 4 до 12 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 4 до 10 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 4 до 8 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 4 до 6 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 5 до 19, от 5 до 18, от 5 до 17, от 5 до 16, от 5 до 15, от 5 до 14, от 5 до 13, от 5 до 12, от 5 до 11, от 5 до 10, от 5 до 9, от 5 до 8, от 5 до 7 или от 5 до 6 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 5 до 14 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 5 до 12 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 6 до 19, от 6 до 18, от 6 до 17, от 6 до 16, от 6 до 15, от 6 до 14, от 6 до 13, от 6 до 12, от 6 до 11, от 6 до 10, от 6 до 9, от 6 до 8 или от 6 до 7 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 6 до 14 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 6 до 12 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 7 до 19, от 7 до 18, от 7 до 17, от 7 до 16, от 7 до 15, от 7 до 14, от 7 до 13, от 7 до 12, от 7 до 11, от 7 до 10, от 7 до 9 или от 7 до 8 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 7 до 14 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 7 до 12 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 8 до 19 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 8 до 14 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная внутренняя делеция может составлять от 8 до 12 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию из 12 аминокислот. Согласно некоторым вариантам

осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию из 13 аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанная в настоящем документе внутренняя делеция может содержать положение, соответствующее аминокислоте 121 в SEQ ID NO:1.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию, причем:

i) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 116 до аминокислоты 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

ii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 117 до аминокислоты 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

iii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 118 до аминокислоты 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

iv) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 119 до аминокислоты 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

v) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 120 до аминокислоты 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее, или

vi) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 121 до аминокислоты 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию, причем:

i) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 122 до аминокислоты 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

ii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 123 до аминокислоты 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

iii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 124 до аминокислоты 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

iv) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 125 до аминокислоты 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

v) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 126 до аминокислоты 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

vi) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 127 до аминокислоты 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

vii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 128 до аминокислоты 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

viii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 129 до аминокислоты 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее, или

ix) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 130 до аминокислоты 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию, причем:

i) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 116 до аминокислоты 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130 , 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

ii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 117 до аминокислоты 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

iii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 118 до аминокислоты 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

iv) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 119 до аминокислоты 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

v) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 120 до аминокислоты 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

vi) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 121 до аминокислоты 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

vii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 122 до аминокислоты 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

viii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 123 до аминокислоты 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

ix) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 124 до аминокислоты 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

x) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 125 до аминокислоты 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

xi) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 126 до аминокислоты 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

xii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 127 до аминокислоты 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

xiii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 128 до аминокислоты 129, 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

xiv) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 129 до аминокислоты 130, 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

xv) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 130 до аминокислоты 131, 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

xvi) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 131 до аминокислоты 132, 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее;

xvii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 132 до аминокислоты 133 или 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее, или

xviii) указанная внутренняя делеция находится в пределах области от аминокислоты 133 до аминокислоты 134 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию, причем указанная внутренняя делеция находится в области, соответствующей аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию, причем указанная внутренняя делеция содержит область, соответствующую аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO:1 или состоит из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к модифицированному полипептиду FGF-21, содержащему полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7, за исключением того, что указанная аминокислотная последовательность может содержать: (i) внутреннюю делецию области, соответствующей аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO:1, причем указанная внутренняя делеция заменена замещающим пептидом, составляющим в длину от 0 до 12 аминокислот; (ii) 9 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок и (iii) неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO:1, которая может содержать паразамещенное, ортозамещенное или метазамещенное производное фенилаланина, такое как п-ацетил-L-фенилаланин. Указанный модифицированный полипептид FGF-21 может содержать замену глутаминовой кислоты на глицин в положении, соответствующем аминокислоте 170 в SEQ ID NO:1. Указанный модифицированный полипептид FGF-21 может быть связан с полимером, водорастворимым полимером или полиэтиленгликолем, таким как полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа. Согласно некоторым

вариантам осуществления указанный замещенный пептид характеризуется последовательностью G, GG, SG, GSG, GGH или SGG. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещенный пептид характеризующийся последовательностью GSG.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать замещающий полипептид. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид составляет в длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид составляет в длину 2-8 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид составляет в длину 2-5 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид составляет в длину 3 аминокислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид содержит остатки серина, гистидина и/или глицина. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид содержит остатки серина и/или глицина. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид характеризуется последовательностью G, GG, SG, GSG, GGH или SGG. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид характеризуется последовательностью GSG.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию в пределах области, соответствующей аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO:1, и замещающий пептид характеризующийся последовательностью GSG.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к модифицированному полипептиду FGF-21, содержащему полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7, за исключением того, что указанная аминокислотная последовательность может содержать: (i) внутреннюю делецию от 2 до 19 аминокислот (например, от 5 до 19 аминокислот), причем указанная внутренняя делеция находится в области, соответствующей аминокислотам 116-134 в SEQ ID NO:1, причем указанная внутренняя делеция заменена замещающим пептидом, характеризующимся последовательностью G, GG, SG, GSG, GGH или SGG; (ii) 9 или менее дополнительных аминокислотных замен,

делеций и/или вставок; (iii) неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO:1, которая может содержать паразамещенное, ортозамещенное или метазамещенное производное фенилаланина, такое как п-ацетил-L-фенилаланин. Указанный модифицированный полипептид FGF-21 может содержать замену глутаминовой кислоты на глицин в положении, соответствующем аминокислоте 170 в SEQ ID NO:1. Указанная внутренняя делеция может содержать область, соответствующую аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO:1, или состоять из нее. Указанный модифицированный полипептид FGF-21 может быть связан с полимером, водорастворимым полимером или полиэтиленгликолем, таким как полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид характеризуется последовательностью GSG.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать внутреннюю делецию, которая содержит область, соответствующую аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO:1, замещающий пептид, характеризующийся последовательностью GSG, замещение глутаминовой кислоты на глицин в положении, соответствующем аминокислоте 170 в SEQ ID NO:1, и, необязательно, неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO:1, которое может содержать паразамещенное, ортозамещенное или метазамещенное производное фенилаланина, такое как п-ацетил-L-фенилаланин.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 202 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 202 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 97%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 202 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам

осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 98%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 202 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 99%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 202 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может содержать или состоять из полипептида SEQ ID NO: 202 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может содержать полипептид SEQ ID NO: 202 или состоять из него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может содержать полипептид SEQ ID NO: 202 без N-концевого метионина или состоять из него.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может быть по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентична полипептиду с SEQ ID NO: 102 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 102 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 97%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 102 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 98%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 102 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 99%, по отношению к полипептиду с SEQ ID NO: 102 с N-концевым метионином или без него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может содержать полипептид с SEQ ID NO: 102 с N-концевым метионином или без него или состоять из него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность

может содержать полипептид SEQ ID NO: 102 или состоять из него. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аминокислотная последовательность может содержать полипептид SEQ ID NO: 102 без N-концевого метионина или состоять из него.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может дополнительно содержать партнера по слиянию. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать связывающий пептид, составляющий в длину 0-50 аминокислот между указанной аминокислотной последовательностью и партнером по слиянию. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может характеризоваться аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:74-100, 301 и 350-383. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может характеризоваться аминокислотной последовательностью GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:360).

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может дополнительно содержать связывающий пептид, который связывает указанную аминокислотную последовательность и указанного партнера по слиянию. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может составлять в длину от 0 до 100, от 2 до 80, от 2 до 60, от 2 до 50, от 2 до 40, от 2 до 30, от 2 до 20, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6 или от 2 до 4 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 74-100, 301 и 350-383, или состоять из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий пептид может содержать аминокислотную последовательность GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 360) или состоять из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления партнера по слиянию выбирают из сывороточного альбумина, домена Fc, константной области иммуноглобулина, неструктурированного полипептида и аднектина и его фрагментов. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию содержит константную область иммуноглобулина или константную область модифицированного иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию может содержать неструктурированный полипептид, причем указанный неструктурированный полипептид содержит полипептид XTEN или PAS. Согласно некоторым вариантам

осуществления полипептид PAS может характеризоваться аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 310-316, или аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична ей.

Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию содержит домен Fc или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc может характеризоваться аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 302 и 323-335, или ее фрагменту, такому как полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 303-309. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию может содержать домен Fc или фрагмент Fc, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 302 и 323-335. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc может характеризоваться аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 302 и 323-335, или ее фрагменту. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc может характеризоваться аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:302. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc может характеризоваться аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:302. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:302.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать или состоять из полипептида, который по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен полипептиду, выбранному из SEQ ID NO:475-487. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO:475, или состоит из него. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO:475, или состоит из него. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, который по меньшей мере на 96% идентичен SEQ ID NO:475, или состоит из него. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, который по меньшей мере на 97% идентичен SEQ ID

NO:475, или состоит из. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, который по меньшей мере на 98% идентичен SEQ ID NO:475, или состоит из него. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, который по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO:475, или состоит из него. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид SEQ ID NO:475 или состоит из него.

Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию может содержать аднектин. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию может содержать альбуминсвязывающий или PKE аднектин. Согласно некоторым вариантам осуществления PKE аднектин может содержать полипептид, который по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен SEQ ID NO: 320. Согласно некоторым вариантам осуществления PKE аднектин может содержать полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 320. Согласно некоторым вариантам осуществления PKE аднектин может содержать полипептид SEQ ID NO: 320. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать или состоять из полипептида, который по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен полипептиду, выбранному из SEQ ID NO:401-423. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен полипептиду, выбранному из SEQ ID NO:401-423, или состоять из него. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, выбранный из SEQ ID NO:401-423, или состоять из него.

Согласно некоторым вариантам осуществления PKE аднектин может содержать полипептид, который по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен SEQ ID NO: 319. Согласно некоторым вариантам осуществления PKE аднектин может содержать полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 319. Согласно некоторым вариантам осуществления PKE аднектин может содержать полипептид SEQ ID NO: 319. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать или состоять из полипептида, который по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен полипептиду, выбранному из SEQ ID NO: 452-474. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид,

который по меньшей мере на 95% идентичен полипептиду, выбранному из SEQ ID NO: 452-474, или состоять из него. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 452-474, или состоять из него.

Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию содержит сывороточный альбумин или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию содержит альбумин человеческой сыворотки или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию может содержать полипептид, который по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 321 или 322. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию может содержать полипептид SEQ ID NO: 321 или 322. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, который по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен полипептиду, выбранному из SEQ ID NO:424-432, 434-437, 440-443 и 446-451. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, который по меньшей мере на 95% идентичен полипептиду, выбранному из SEQ ID NO:424-432, 434-437, 440-443 и 446-451. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, выбранный из: SEQ ID NO:424-432, 434-437, 440-443 и 446-451.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен модифицированный полипептид FGF-21, содержащий полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7, за исключением того, что указанная аминокислотная последовательность может содержать: (i) внутреннюю делецию от 2 до 19 аминокислот (например, от 5 до 19 аминокислот), причем указанная внутренняя делеция находится в пределах области, соответствующей аминокислотам с 116 по 134 в SEQ ID NO:1, причем указанная внутренняя делеция заменена замещающим пептидом, составляющим в длину от 0 до 12 аминокислот, и (ii) 9 или менее дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок; причем указанный модифицированный полипептид FGF-21 дополнительно содержит партнера по слиянию. Указанный партнер по слиянию может содержать домен Fc или его фрагмент. Указанный модифицированный полипептид FGF-21 может содержать замену глутаминовой кислоты на глицин в положении, соответствующем аминокислоте 170 в SEQ ID NO: 1. Указанная внутренняя делеция может содержать область, соответствующую аминокислотам 119-130 в SEQ ID NO:1, или состоять из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид содержит последовательность G, GG, SG, GSG, GGH или SGG. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный замещающий пептид содержит последовательность GSG. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит связывающий пептид между указанной аминокислотной последовательностью и партнером по слиянию, причем указанный связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:360) или состоит из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать неканоническую аминокислоту, которая может быть связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой, пептидом, полипептидом или удлиняющим период полужизни фрагментом. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать неканоническую аминокислоту, которая может быть связана с удлиняющим период полужизни фрагментом. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный удлиняющий период полужизни фрагмент содержит водорастворимый полимер. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный удлиняющий период полужизни фрагмент выбирают из полиэтиленгликоля (ПЭГ), монометокси-ПЭГ (МПЭГ), неструктурированного полипептида, аднектина, сывороточного альбумина, человеческого сывороточного альбумина, домена Fc, константной области иммуноглобулина, фрагмента любого из вышеприведенного, липида, разветвленной или неразветвленной ацильной группы, разветвленной или неразветвленной C8-C30 ацильной группы, разветвленной или неразветвленной алкильной группы и разветвленной или неразветвленной C8-C30 алкильной группы. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая может содержать неканоническую аминокислоту, которая может быть связана с неструктурированным полипептидом, выбранным из полипептида XTEN или PAS. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный удлиняющий период полужизни фрагмент содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ) или монометоксиполиэфир (МПЭГ). Согласно некоторым вариантам осуществления

указанный удлиняющий период полужизни фрагмент содержит разветвленный или многослойный полиэтиленгликоль (ПЭГ) или другой разветвленный или многослойный водорастворимый полимер. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный удлиняющий период полужизни фрагмент содержит фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ) или монометокси-ПЭГ (МПЭГ), характеризующийся средней молекулярной массой от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 100 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный удлиняющий период полужизни фрагмент содержит фрагмент полиэтиленгликоля или монометокси-ПЭГ (МПЭГ), характеризующийся средней молекулярной массой:

i) от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 100 кДа;

ii) от приблизительно 1 кДа до 50 кДа;

iii) от приблизительно 10 кДа до 40 кДа;

iv) от приблизительно 20 кДа до 30 кДа;

v) от приблизительно 0,050 кДа до приблизительно 100 кДа или

vi) приблизительно 100 кДа, 95 кДа, 90 кДа, 85 кДа, 80 кДа, 75 кДа, 70 кДа, 65 кДа, 60 кДа, 55 кДа, 50 кДа, 45 кДа, 40 кДа, 35 кДа, 30 кДа, 25 кДа, 20 кДа, 15 кДа, 10 кДа, 9 кДа, 8 кДа, 7 кДа, 6 кДа, 5 кДа, 4 кДа, 3 кДа, 2 кДа, 1 кДа, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да или 100 Да.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанный удлиняющий период полужизни фрагмент содержит полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный удлиняющий период полужизни фрагмент содержит неполиэтилгликолевый водорастворимый полимер или олигосахарид.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанная в настоящем документе указанная неканоническая аминокислота может содержать карбонильную группу, аминооксигруппу, гидразидную группу, гидразиновую группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота содержит карбонильный фрагмент и связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом, который содержит аминоокси, гидразиновый, гидразидный или семикарбазидный фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота содержит аминоокси, гидразиновый, гидразидный или семикарбазидный фрагмент, который связан с линкером, полимером, биологически

активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом через амидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота содержит алкиновую часть, которая связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом через азидный фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота содержит азидную часть, которая связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом, содержащим алкиновый фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота содержит азидную или алкиновую часть, которая связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом через амидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом через оксимную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом через оксимную связь, причем указанная оксимная связь характеризуется структурой, которая представляет собой результат реакции карбонильной группы и аминооксигруппы. Согласно некоторым вариантам осуществления указанная по меньшей мере одна неканоническая аминокислота связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом через оксимную связь, причем указанная оксимная связь характеризуется структурой, которая представляет собой результат реакции карбонильной группы, содержащейся в указанной неканонической аминокислоте, и аминооксигруппы, содержащейся в указанном линкере, полимере, биологически активной молекуле или удлиняющем период полужизни фрагменте.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 обладает по меньшей мере одной биологической активностью человеческого полипептида FGF 21 дикого типа, характеризующегося аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 обладает по меньшей мере одним из следующего: повышенная термическая стабильность, уменьшенная агрегация,

уменьшенный протеолиз *in vivo*, уменьшенное дезамидирование и повышенная растворимость, по сравнению с полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции или FGF- 21, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO: 201, или по сравнению с тем же модифицированным полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции и замещающего пептида. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 обладает по меньшей мере одним из следующего: повышенная термическая стабильность, уменьшенная агрегация, уменьшенный протеолиз *in vivo*, уменьшенное дезамидирование и повышенная растворимость, по сравнению с пегилированным полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции, непегилированным полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции, полипептидом FGF-21, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, непегилированным полипептидом FGF-21, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, пегилированной SEQ ID NO: 201 или по сравнению с тем же модифицированным полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции и замещающего пептида.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 можно сравнить с пегилированным полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 можно сравнить с непегилированным полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 можно сравнить с полипептидом FGF-21, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 можно сравнить с SEQ ID NO: 201. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 можно сравнить с пегилированной SEQ ID NO: 201. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF- 21 можно сравнить с тем же модифицированным полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции и замещающего пептида.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 демонстрирует увеличение точки перехода (температуры плавления, Tm) на 2°C-12°C, 2°C-10°C, 2°C-8°C, 4°C-8°C, 4°C-10°C, 4°C-12°C или 6°C-8°C по сравнению с немодифицированным полипептидом FGF-

21, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:201, или полипептидом FGF-21 без указанной внутренней делеции.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична полипептиду из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 202, 205, 206, 210, 211, 212, 219, 220, 221, 222 или 223. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична полипептиду из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 202, 205, 206, 210, 211, 212, 219, 220, 221, 222 или 223. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 98% идентична полипептиду из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 202, 205, 206, 210, 211, 212, 219, 220, 221, 222 или 223. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична полипептиду из SEQ ID NO: 102 или SEQ ID NO: 202. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична полипептиду из SEQ ID NO: 102 или SEQ ID NO: 202 .Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 98% идентична полипептиду из SEQ ID NO: 102 или SEQ ID NO: 202. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид,

характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 202. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 202, причем pAF в SEQ ID NO:202 может быть связан с полиэтиленгликолем. Согласно некоторым вариантам осуществления полиэтиленгликоль может характеризоваться средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся наличием N-концевого метионина (который может присутствовать после экспрессии в некоторых системах, таких как E. coli). Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид без N-концевого метионина, например, в результате обработки для удаления сигнального пептида, содержащего N-концевой метионин, например, в системе экспрессии на основе клеток млекопитающих. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может включать в себя любую из описанных в настоящем документе последовательностей или их вариантов, но с пропуском N-концевого метионина, например, любую из SEQ ID NO: 101-132, 201-202, 205-206, 210-212, 219-223 или любой из описанных в настоящем документе их вариантов, модифицированных или слитых форм с пропущенным или отсутствующим N-концевым метионином. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может включать в себя любую из описанных в настоящем документе последовательностей или их вариантов, например, любую из SEQ ID NO: 401-487 или любой из описанных в настоящем документе их вариантов, модифицированных или слитых форм с добавленным или присутствующим N-концевым метионином. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 202 без N-концевого метионина. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 202 (необязательно без N-концевого метионина), причем pAF в SEQ ID NO: 202 связан с полиэтиленгликолем со средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102 без N-концевого метионина. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102 без N-концевого метионина и домена Fc или его фрагмента. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102 и наличием домена Fc или его фрагмента. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать SEQ ID NO: 475.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрен вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрена клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, такую как CHO или HEK. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой бактерию, такую как *E. coli*. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения модифицированного полипептида FGF-21, содержащего культивирование описанной в настоящем документе клетки-хозяина и выделение указанного модифицированного полипептида FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения модифицированного полипептида FGF-21, содержащего

неканоническую аминокислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота кодируется селекторным кодоном. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает культивирование описанной в настоящем документе клетки-хозяина, причем указанная клетка-хозяин содержит ортогональную тРНК, которая распознает указанный селекторный кодон и вводит указанную неканоническую аминокислоту в указанный модифицированный полипептид FGF-21, и выделение указанного модифицированного полипептида FGF-21.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрена композиция, содержащая описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрена композиция, содержащая модифицированный полипептид FGF-21, содержащий полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 202, причем pAF в SEQ ID NO: 202 может быть связан с полиэтиленгликолем, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления полиэтиленгликоль характеризуется средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая модифицированный полипептид FGF-21, содержащий полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102 без N-концевого метионина, слитой с доменом Fc или его фрагментом, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая модифицированный полипептид FGF-21, содержащий SEQ ID NO: 475, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Согласно некоторым вариантам в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, и по меньшей мере одно другое активное средство. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство представляет собой противодиабетическое средство, контролирующее холестерин средство, противовоспалительное средство, средство против ожирения, антигипертензивное средство или противофиброзное средство. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство представляет собой

агонист GLP-1 или инсулин. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство представляет собой инсулин быстрого действия, короткого действия, прямого действия, среднего действия или длительного действия, хумалог, лизпро, новолог, апидра, хумулин, аспарт, человеческий инсулин, NPH, ленте, ультраленте, лантус, гларгин, левемир, детемир; эксенатид (Баета/Бидурион), лираглутид (Виктоза), ликсисенатид (Ликсумия), албиглутид (Танзеум), эксенатид длительного высвобождения (LAR), таспоглютид, албиглутид, LY2189265 (Дулаглютид); орлистат (Ксеникал), ингибитор липазы поджелудочной железы, налтрексон, фентермин, топирамат (Qsymia), лордасерин (Белвик), налтрексон и бупропион (Contravene), римонабант (Акомплия), антагонист каннабиноидных рецепторов, сибутрамин (Меридиа), лоркасерин, римонабант, прамлинтид, фентермин, топирамат, бупропион или глюкоманнан.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ регулирования по меньшей мере одного из гомеостаза глюкозы и липидов, поглощения глюкозы, экспрессии GLUT 1 и/или концентраций глюкозы, триглицеридов, инсулина или глюкагона в сыворотке у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ увеличения чувствительности к инсулину, повышения содержания адипонектина, снижения содержания глюкозы в крови, снижения содержания глюкагона, снижения содержания триглицеридов, снижения содержания фруктозамина, снижения содержания холестерина низкой плотности или снижения содержания С-реактивного белка у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества раскрытого в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения состояния или нарушения, выбранного из ожирения, сахарного диабета, панкреатита, резистентности к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, нарушенной толерантности к глюкозе, неадекватного клиренса глюкозы, высокого содержания глюкозы в крови и синдрома Прадера-Вилли у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества

модифицированного раскрытого в настоящем документе полипептида FGF-21 или раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения связанного с инсулином состояния или нарушения, выбранного из резистентности к инсулину типа A, резистентности к инсулину типа C (синдром AKA HAIR-AN), синдрома Рабсона-Менденхолла, синдрома Донохью или лепречаунизма, гиперандрогенизма, гирсутизма или акантокератодермии у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества раскрытого в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения диабета типа 1 или диабета типа 2 у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества раскрытого в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или раскрытой в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения ожирения у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества раскрытого в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или раскрытой в настоящем документе композиции.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения связанного с фиброзом заболевания, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21 или композиции, содержащей модифицированный полипептид FGF-21, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может влиять на орган или ткань, такую как поджелудочная железа, легкое, сердце, почка, печень, глаза, нервная система, костный мозг, лимфатические узлы, эндомиокард и/или забрюшинный промежуток. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может представлять собой фиброз печени или предцирроз. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может быть выбрано из: неалкогольного стеатогепатита (NASH), цирроза печени, диффузного паренхиматозного заболевания легких, кистозного фиброза, легочного фиброза, прогрессирующего массивного фиброза, идиопатического легочного фиброза, инъекционного фиброза, фиброза почек, хронического заболевания почек,

диабетического заболевания почек, фокального сегментного гломерулосклероза, мембранной нефропатии, нефропатии IgA, миелофиброза, сердечной недостаточности, метаболической сердечной недостаточности, сердечного фиброза, катаракты с фиброзом задней капсулы хрусталика, катаракты, окулярного рубцевания, фиброза поджелудочной железы, фиброза кожи, фиброза кишечника, стриктуры кишечника, фиброза эндомиокарда, фиброза предсердий, фиброза средостения, болезни Крона, забрюшинного фиброза, келоида, нефрогенного системного фиброза, склеродермии, системного склероза, артрофиброза, синдром Пейрони, контрактуры Дюпюитрена, диабетической невропатии, адгезивного капсулита, алкогольной болезни печени, гепатостатита, вирусного гепатита, желчной болезни, первичного гемохроматоза, криптогенного цирроза печени, болезни Вильсона, а также дефицита альфа 1-антитрипсина, интерстициального легочного заболевания (ILD), фиброзно-легочного заболевания человека, фиброза печени, дегенерации желтого пятна, ретинальной ретинопатии, витреальной ретинопатии, фиброза миокарда, офтальмопатии Грейва, индуцированного лекарственными средствами эрготизма, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза/рестеноза, гипертрофических рубцов, первичного или идиопатического миелофиброза и воспалительного заболевания кишечника (включая в себя, без ограничения, коллагенозный колит). Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание представляет собой результат одного или нескольких из следующего: заболевание легких, злокачественная опухоль легкого, лекарственная терапия, химиотерапия или лучевая терапия. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание представляет собой результат одного или нескольких из следующего: старение, сердечный приступ, инфаркт миокарда, повреждение миокарда или дисфункция левого желудочка. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может быть выбрано из фиброза почек, гломерулярного нефрита, хронического заболевания почек, хронической почечной недостаточности и нефрита, связанного с системной волчанкой, злокачественной опухоли, физических препятствий, токсинов, метаболического заболевания, иммунологических заболеваний или диабетической нефропатии. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание представляет собой результат одного или нескольких из следующего: травма, повреждение позвоночника, инфекция, хирургическое вмешательство, ишемическое повреждение, сердечный приступ, ожоги, воздействие загрязнителей окружающей среды, пневмония, туберкулез или острый респираторный дистресс-синдром. Согласно некоторым

вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может быть выбрано из легочного фиброза, интерстициального заболевания легких, фиброза легких человека, идиопатического легочного фиброза, фиброза печени, фиброза сердца, фиброза миокарда, дегенерации желтого пятна сетчатки, ретинопатии сетчатки, витреальной ретинопатии, офтальмопатии Грейва, индуцированного лекарственными средствами эрготизма, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза/рестеноза, келоидов и гипертрофических рубцов, первичного или идиопатического миелофиброза, воспалительного заболевания кишечника, коллагенозного колита, глазных рубцов и катаракты с фиброзом задней капсулы хрусталика. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может быть выбрано из NASH, фиброза печени и цирроза печени. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может представлять собой NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может быть выбрано из диабетического заболевания почек, хронического заболевания почек и фиброза почек. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может быть выбрано из метаболической сердечной недостаточности и фиброза сердца. Согласно некоторым вариантам осуществления связанное с фиброзом заболевание может представлять собой фиброз легких.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения фиброза печени или цирроза печени у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в данном документе композиции.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ уменьшения жировой фракции в печени у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции, причем, необязательно, указанный пациент подвержен риску развития NASH или ему был поставлен диагноз NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен

способ снижения эластичности печени, уменьшения процентного содержания жира в организме, уменьшения массы тела, уменьшения соотношения массы печени и массы тела, снижения содержания липидов в печени, уменьшения площади фиброза печени, снижения содержания глюкозы в крови натощак, содержания триглицерида натощак, снижения холестерина ЛПНП, снижения АроВ, снижения АроС и/или увеличения холестерина ЛПВП у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции, причем, необязательно, указанный пациент подвержен риску развития NASH или ему был поставлен диагноз NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ увеличения содержания адипонектина у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции, причем, необязательно, указанный пациент подвержен риску развития NASH или ему был поставлен диагноз NASH. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения одного или нескольких связанных с NASH симптомов у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 202. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 202. В настоящем документе предусмотрены способы лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего SEQ ID NO: 202, причем его остаток pAF связан с фрагментом полиэтиленгликоля. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный полиэтиленгликоль характеризуется

молекулярной массой от приблизительно 0,1 кДа до 100 кДа или от приблизительно 20 кДа до приблизительно 40 кДа, или приблизительно 30 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный полиэтиленгликоль характеризуется молекулярной массой приблизительно 30 кДа.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 102. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 102. В настоящем документе также предусмотрены способы лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего (a) SEQ ID NO: 102 без N-концевого Met или (b) SEQ ID NO: 102.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 475. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 475. В настоящем документе предусмотрены способы лечения или профилактики NASH у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего SEQ ID NO: 475.

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент может проявлять стадию 1-3 фиброза NASH CRN, которая необязательно определяется биопсией печени. Согласно некоторым вариантам осуществления перед лечением у пациента может быть индекс жировой инфильтрации печени по меньшей мере приблизительно 60. Согласно некоторым вариантам осуществления перед лечением пациент может обладать

процентом доли жировой фракции печени по меньшей мере 10%, который необязательно определяется магнитно-резонансным исследованием.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения сердечной недостаточности или фиброза сердца у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения почечного или ренального фиброза у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения фиброза легких у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или описанной в настоящем документе композиции.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрены способы лечения связанного с фиброзом заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение пациенту эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего одну или несколько неканонических аминокислот, причем указанный модифицированный полипептид FGF-21 обладает идентичностью, составляющей по меньшей мере 90% или 95%, по отношению к полипептиду FGF-21 человека, характеризующемуся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7 и 201, причем указанное связанное с фиброзом заболевание выбрано из NASH, фиброза печени, диабетического заболевания почек, хронического заболевания почек, фиброза почек, фиброза легких, фиброза сердца, сердечной недостаточности и метаболической сердечной недостаточности.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 обладает идентичностью, составляющей по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к полипептиду FGF-21 человека, характеризующемуся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-7 и 201.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения связанного с фиброзом заболевания, предусматривающий

введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21 из SEQ ID NO: 201, необязательно связанного с полимером или водорастворимым полимером, который может содержать полиэтиленгликоль, необязательно характеризующийся молекулярной массой от 1 до 100 кДа или приблизительно 30 кДа, причем указанное связанное с фиброзом заболевание может быть выбрано из NASH, фиброза печени, диабетического заболевания почек, хронического заболевания почек и метаболической сердечной недостаточности.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 72, 77, 86, 87, 91, 108, 110, 126, 131 или 146 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 77, 91 или 131 в SEQ ID NO: 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота может содержать аналог или производное фенилаланина. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота может содержать п-ацетил-L-фенилаланин. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота может содержать п-ацетил-L-фенилаланин и может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может быть связана с фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ) или монометокси-ПЭГ (МПЭГ), характеризующимся средней молекулярной массой от приблизительно 0,1 кДа до приблизительно 100 кДа. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может быть связана с фрагментом полиэтиленгликоля или монометокси-ПЭГ (МПЭГ), характеризующимся средней молекулярной массой: i) от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 кДа; ii) от приблизительно 1 кДа до 50 кДа; iii) от приблизительно 10 кДа до 40 кДа; iv) от приблизительно 20 кДа до 30 кДа; v) от приблизительно 0,050 кДа до приблизительно 100 кДа или vi) приблизительно 100 кДа, 95 кДа, 90 кДа, 85 кДа, 80 кДа, 75 кДа, 70 кДа, 65 кДа, 60 кДа, 55 кДа, 50 кДа, 45 кДа, 40 кДа, 35 кДа, 30 кДа, 25 кДа, 20 кДа, 15 кДа, 10 кДа, 9 кДа, 8 кДа, 7 кДа, 6 кДа, 5 кДа, 4 кДа, 3 кДа, 2 кДа, 1 кДа,

900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да или 100 Да. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может быть связана с полиэтиленгликолем со средней молекулярной массой приблизительно 30 кДа.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может быть связана с линкером, полимером, биологически активной молекулой или удлиняющим период полужизни фрагментом через оксимную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления оксимная связь характеризуется структурой, которая представляет собой результат реакции карбонильной группы и аминооксигруппы.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF 21 может обладать по меньшей мере одной биологической активностью человеческого полипептида FGF 21 дикого типа, характеризующегося аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или другого полипептида FGF-21.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ может дополнительно предусматривать введение по меньшей мере одного другого активного средства указанному пациенту, причем указанное дополнительное активное средство может содержаться в той же композиции, что и указанный модифицированный полипептид FGF-21, или может вводиться отдельно. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство может быть выбрано из противофиброзных средств, антагониста N-кадгерина, антитела к N-кадгерину, низкомолекулярного антагониста N-кадгерина, антагонистического фрагмента N-кадгерина, противовоспалительных средств, гепатопротекторных средств, подавляющих ренин-ангиотензиновую систему (RAS), пробиотиков и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Согласно некоторым вариантам осуществления антифибротическое средство может быть выбрано из ниндеданиба, пирфенидона, антагонистов LPA1, антагонистов рецептора LPA1, аналога GLP1, тралокинумаба (IL-13, AstraZeneca), висмодегиба (антагониста hedgehog, Roche), PRM-151 (пентраксин-2, TGF бета-1, Promedior), SAR-156597 (биспецифическое моноклональное антитело IL-4 и IL-13, Sanofi), симтузумаба (антитело к подобному лизилоксидазе 2 белку (анти-LOXL2), Gilead), CKD-942, PTL-202 (PDE ингибитор/пентоксифиллин/NAC контролируемое пероральное высвобождение, Pacific Ther.), Omipalisib (пероральный ингибитор PI3K/mTOR, GSK), IW-001 (пероральный расворимый мод. бычьего коллагена типа V, ImmuneWorks), STX-100 (антагонист интегрина альфа V/бета-6, Stromedix/Biogen),

Actimmune (IFN гамма), PC-SOD (мидизмаза, ингалируемый, LTT Bio-Pharma/CKD Pharm), лебрикизумаба (гуманизированное моноклональное антитело к IL-13 SC, Roche), AQX-1125 (активатор SHIP1, Aquinox), CC-539 (ингибитор JNK, Celgene), FG-3019 (FibroGen) и SAR-100842 (Sanofi). Согласно некоторым вариантам осуществления гепатопротективным средством может быть урсодезоксихолевая кислота (UDCA) или оботихолевая кислота (OCA или INT-747, Intercept).

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрена композиция, содержащая модифицированный полипептид FGF-21, адаптированный для использования в способе лечения связанного с фиброзом заболевания, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция может дополнительно содержать по меньшей мере одно другое активное средство. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство может быть выбрано из противофиброзных средств, пирфенидона, антагониста N-кадгерина, антитела к N-кадгерину, низкомолекулярного антагониста N-кадгерина, антагонистического фрагмента N-кадгерина, противовоспалительных средств, гепатопротекторных средств, таких как урсодезоксихолевая кислота (UDCA), оботихолевая кислота (OCA или INT-747, Intercept), системы, подавляющей ренин-ангиотензиновую систему (RAS), пробиотиков и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК).

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения осложненной формы ожирения, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 или композиции, содержащей описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления осложненная форма ожирения может быть связана с синдромом Прадера-Вилли.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию, содержащую описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество можно вводить перорально, местно или посредством инъекции. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид или композицию FGF-21 можно

вводить путем подкожной инъекции, внутривенной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно один раз в день или реже чем приблизительно один раз в день. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно два раза в неделю или реже чем приблизительно два раза в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно один раз в неделю или реже чем приблизительно два раза в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно один раз в две недели или реже чем приблизительно два раза в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно один раз в три недели или реже чем приблизительно два раза в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно один раз в месяц или реже чем приблизительно один раз в месяц. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой один раз в четыре недели. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно один раз в день. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 или композицию с ним вводят с частотой приблизительно один раз в неделю.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 можно вводить в количестве от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 500 мг на дозу, от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 200 мг на дозу, от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 100 мг на дозу, от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 80 мг на дозу, от приблизительно 1 мг до приблизительно 60 мг на дозу, от приблизительно 5 мг до приблизительно 40 мг на дозу, от приблизительно 10 мг до приблизительно 30 мг на дозу, от приблизительно

10 мг до приблизительно 20 мг на дозу, от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 1 мг на дозу, от приблизительно 1 мг до приблизительно 2 мг на дозу, от приблизительно 2 мг до приблизительно 4 мг на дозу, от приблизительно 4 мг до приблизительно 6 мг на дозу, от приблизительно 6 мг до приблизительно 10 мг на дозу, от приблизительно 10 мг до приблизительно 20 мг на дозу, от приблизительно 20 мг до приблизительно 40 мг на дозу, от приблизительно 40 мг до приблизительно 60 мг на дозу, от приблизительно 60 мг до приблизительно 80 мг на дозу, от приблизительно 80 мг до приблизительно 100 мг на дозу, от приблизительно 100 мг до приблизительно 120 мг на дозу, от приблизительно 120 мг до приблизительно 140 мг на дозу, от приблизительно 140 мг до приблизительно 160 мг на дозу, от приблизительно 160 мг до приблизительно 180 мг на дозу, от приблизительно 180 мг до приблизительно 200 мг на дозу или от приблизительно 200 мг до приблизительно 240 мг на дозу.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 можно вводить в количестве, выбранном из приблизительно 0,2 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 4 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 180 мг и приблизительно 200 мг на дозу. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 можно вводить в количестве, выбранном из приблизительно 0,2 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 40 мг и приблизительно 60 мг на дозу.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 или композицию, содержащую описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество можно вводить совместно или вводить по отдельности (одновременно или последовательно) по меньшей мере с одним другим активным средством. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство выбирают из противодиабетических средств, средств против ожирения, контролирующих холестерин средств, противовоспалительных средств и антигипертензивных средств.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство выбирают из статина, агониста GLP-1 и инсулина. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно другое активное средство выбирают из амилина, аналога амилина, ингибитора альфа-глюкозидазы, такого как миглитол, акарбоз, воглибоз, метформин, бигуанид, глитазона, такого как росиглитазон, пиоглитазон, троглитазон, повышающего секрецию средства, такого как экзенатид, лираглутид, таспоглютид или ликсисенатид, гликозурического средства, ингибитора дипептидилпептидазы-4, инсулина, инсулина быстрого действия, короткого действия, регулярного действия, среднего действия или длительного действия, хумалога, лизпро, новолога, апидры, хумулина, аспарта, человеческого инсулина, NPH, ленте, ультраленте, лантуса, гларгина, левемира, детемира, аторвастатина, церивастатина, флувастатина, ловастатина, мевастатина, питавастатина, правастатина, розувастатина, симвастатина, виторина, аддикора, бесилата, кадуета, симкора, орлистата (Ксеникала), ингибитора липазы поджелудочной железы, налтрексона, фентермина и топирамата (Qsymia), лоркасерина (Белвик), налтрексона, бупропиона (Contravene), римонабанта (Акомплия), антагониста каннабиноидного рецептора, сибутрамина (Меридиа), лоркасерина, римонабанта, экзенатида, прамлинтида, фентермина, топирамата, нормотимика, бупропиона, глюкоманнана, гуаровой камеди, декседрина, дигоксина, аноректического лекарственного средства, противосудорожного лекарственного средства, экзенатида (Баета/Бидурион), лираглутида (Виктоза), ликсисенатида (Ликсумия), албиглутида (Танзеум), экзенатида длительного действия (LAR), таспоглютида, албиглутида и LY2189265 (Дулаглютид).

Преимущественно, описанные в настоящем документе модифицированные соединения FGF-21 могут повысить эффективность за счет обеспечения более длительного времени полужизни в кровеносном русле, требующего меньшего количества доз, увеличивая как удобство для субъекта, нуждающегося в такой терапии, так и вероятность соблюдения субъектом требований к дозировке.

Метаболический синдром, как правило, диагностируют у пациентов, проявляющих по меньшей мере три из следующих признаков: брюшной жир - у большинства мужчин талия размером 40 дюймов или больше; высокое содержание сахара в крови - по меньшей мере 110 миллиграммов на децилитр (мг/дл) после голодания; высокое содержание триглицеридов - не менее 150 мг/дл в кровотоке; низкое содержание ЛВП - менее 40 мг/дл; и артериальное давление 130/85 или выше.

Способы применения могут быть эффективными для лечения или задержки начала сахарного диабета типа II и/или ожирения у нуждающегося в этом пациента. У указанного пациента может быть диагностирован преддиабет или может проявляться один или несколько факторов риска развития сахарного диабета типа II, такие как семейный анамнез сахарного диабета типа II; один или несколько из родителей или братьев и сестер с ранее диагностированным сахарным диабетом типа II; дислипидемия; общее содержание триглицеридов в крови по меньшей мере 200 мг/дл; содержание липопротеинов высокой плотности в крови менее 35 мг/дл; ожирение; индекс массы тела более 25 кг/м2; гестационный диабет в анамнезе; рождение ребенка с весом при рождении более 9 фунтов; гипертония; систолическое артериальное давление не менее 140 мм рт.ст.; диастолическое артериальное давление не менее 90 мм рт.ст.; предыдущее измерение содержания глюкозы в крови натощак не менее 99 мг/дл; сосудистые заболевания; поликистозный овариальный синдром или акантокератодермия.

Пациент может проявлять один или несколько таких симптомов преддиабета, как содержание глюкозы в крови натощак от 100 мг/дл до 125 мг/дл; содержание сахара в крови от 140 до 199 мг/дл через два часа после приема 75 г раствора глюкозы или раствора глюкозы, равного 1,75 г глюкозы на килограмм массы тела, до максимальной дозы 75 г; и/или гликированный гемоглобин от 5,7% до 6,4%.

Пациент может проявлять один или несколько таких симптомов сахарного диабета, как содержание глюкозы в крови натощак более 125 мг/дл; содержание сахара в крови не менее 200 мг/дл через два часа после приема 75 г раствора глюкозы или раствора глюкозы, равного 1,75 г глюкозы на килограмм массы тела, до максимальной дозы 75 г; и/или гликированный гемоглобин не менее 6,5%.

Возможно, у пациента был диагноз сахарный диабета II типа.

Пациент может быть невосприимчив к лечению по меньшей мере одним соединением, выбранным из группы, состоящей из: GLP-1, эксенатида-1, эксендина, аналога эксендина, агониста эксендина, лираглутида, ликсисенатида, албиглутида, эксенатида LAR, DPP-4, агониста рецептора GLP-1 и другого агониста GLP-1 или такое соединение может быть противопоказано для введения пациенту.

Способы могут дополнительно предусматривать введение указанному пациенту противодиабетического средства или средства против ожирения в дополнение к указанному модифицированному полипептиду FGF-21. Указанное противодиабетическое средство или средство против ожирения может содержать один или несколько из следующего: амилин, агонист амилина, сульфонилмочевина,

кальцитонин, глюкагон, агонисты PPAR-гамма, агонисты рецептора GPL-1, ингибитор дипептидилпептидазы IV, аналог амилина, бигуаниды, агонисты рецептора допамина D2, меглитиниды, ингибитор альфа-глюкозидазы, антидислипидемический секвестрант желчной кислоты, эксендин, аналог эксендина, агонист эксендина, желудочный ингибиторный пептид (GIP), пептид инкретин, инсулин, ингибитор SGLT2, ингибитор реабсорбции глюкозы, фенофибрат, фибрат, антитело или фрагмент антитела к грелину, рецептор фактора роста фибробластов (FGFR)-1 (IIIb), FGFR-1 (IIIc), антитело или фрагмент антитела и/или FGFR-4 (IIIc), антитело или фрагмент антитела к CD38, антитело к MIC-1 или связывающий фрагмент MIC-1, метформин или комбинация любого из вышеперечисленных.

Согласно иллюстративному варианту осуществления указанное противодиабетическое средство может представлять собой метформин, инсулин гларгин, такой как лантус (Sanofi), ситаглиптин, такой как янувия, инсулин аспарт, такой как новолог и новорапид (Novo Nordisk), инсулин лиспро, такой как хумалог (Eli Lilly), лираглутид, такой как виктоза (Novo Nordisk), инсулин детелир, такой как левемир (Novo Nordisk), ситаглиптин в комбинации с метформином, таким как янумет (Merck), растворимый инсулин аспарт и протамин-кристаллизованный инсулин аспарт в соотношении 30/70, такой как Novo Mix 30 (Novo Nordisk), или пиоглитазон, такой как актос (Takeda).

Способ может быть эффективным для снижения массы тела.

Противодиабетические средства, используемые в комбинации с модифицированными полипептидами FGF-21 согласно настоящему изобретению, включают в себя, без ограничения, средства, усиливающие секрецию инсулина или сенсибилизаторы к инсулину, ингибиторы MGAT2 или другие противодиабетические средства. Эти средства включают в себя, без ограничения, ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DP4) (например, ситаглиптин, саксаглиптин, алоглинтин, вилдаглиптин и т.п.), бигуаниды (например, метформин, фенформин и т.п.), сульфонилмочевины (например, глибурид, глимепирид, глипизид и т.п.), ингибиторы глюкозидазы (например, акарбоза, миглитол и т.п.), агонисты PPARγ, такие как тиазолидиндионы (например, розиглитазон, пиоглитазон и т.п.), двойные агонисты α/γ PPAR (например, мураглитазар, тезаглитазар, алеглитазар и т.п.), активаторы глюкокиназы (как описано в Fyfe, M.C.T. et al., *Drugs of the Future*, 34(8):641-653 (2009), и включено в настоящий документе посредством ссылки), модуляторы рецептора GPR40, модуляторы рецепторов GPR119 (MBX-2952, PSN821, APD597 и т.п.),

ингибиторы SGLT2 (дапаглифлозин, канаглифлозин, ремаглифлозин и т.п.), аналоги амилина, такие как прамлинтид и/или инсулин. Модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему изобретению также могут быть необязательно использованы в комбинации со средствами для лечения осложнений сахарного диабета. Эти средства включают в себя ингибиторы PKC и/или ингибиторы AGE.

Модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему изобретению также могут быть необязательно использованы в комбинации с одним или несколькими гипофагическими средствами, такими как диэтилпропион, фендиметразин, фентермин, орлистат, сибутрамин, лорказерин, прамлинтид, топирамат, антагонисты рецепторов MCHR1, оксинтомодулин, налтрексон, пептид амилин, модуляторы рецептора NPY Y5, модуляторы рецептора NPY Y2, модуляторы рецептора NPY Y4, модуляторы рецептора 5HT2c, цетилистат и тому подобное. Модифицированные полипептиды FGF-21 можно также применять в комбинации с агонистом рецептора подобного глюкагону пептида-1 (GLP-1R), таким как эксенатид, лираглутид, GPR-1(1-36) амид, GLP-1(7-36) амид, GLP-1(7-37) (как описано в патенте США №5614492 на имя Habener, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки), который можно вводить путем инъекции, интраназального или трансдермального или буккального устройств.

Модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему изобретению также могут быть необязательно использованы в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, такими как ингибиторы DGAT, лекарственными средствами, снижающими LDL, такие как статины (ингибиторы HMG CoA-редуктазы) или ингибиторы абсорбции холестерина, модуляторами PCSK9, увеличивающими ЛПВП лекарственными средствами, такими как ингибиторы CETP.

Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота может быть связана с водорастворимым полимером. Согласно некоторым вариантам осуществления водорастворимый полимер содержит фрагмент полиэтиленгликоля. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота связана с водорастворимым полимером с помощью линкера или связана с водорастворимым полимером. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула полиэтиленгликоля представляет собой бифункциональный полимер. Согласно некоторым вариантам осуществления бифункциональный полимер связан со вторым полипептидом. Согласно некоторым вариантам осуществления второй полипептид представляет собой немодифицированный или модифицированным полипептид FGF-21.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере две неканонические аминокислоты, связанные с водорастворимым полимером, содержащим полиэтиленгликоль. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неканонических аминокислот включены в одно или несколько из следующих положений в модифицированном FGF-21: перед положением 1 (т.е. на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (т. е. на карбоксильном конце белка) (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неканонических аминокислот включены в одно или несколько из следующих положений в модифицированном FGF-21: 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 и 110 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неканонических аминокислот включены в одно или несколько из следующих положений в модифицированном FGF-21: 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотами в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неканонических аминокислот включены в одно или несколько из следующих положений в модифицированном FGF-21: 87, 77, 83, 72 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неканонических аминокислот включены в одно или несколько из следующих положений в модифицированном FGF-21: 69, 79, 91, 96, 108 и 110 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неканонических аминокислот включены в лидерную или сигнальную последовательность SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7 или другую немодифицированную или

модифицированную последовательность FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления лидерные последовательности могут быть выбраны из SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43 или 44. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные секреторные конструкции FGF-21 клонируют в pVK7ara (Nde/Eco) с лидерными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43 или 44.

Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота в одном или нескольких из этих положений связана с водорастворимым полимером, включая в себя, без ограничения, положения: перед положением 1 (то есть на N-конце), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 (т.е. на карбоксильном конце белка) (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления неприродная аминокислота в одном или нескольких положениях, начиная от положения перед 1 (то есть на N-конце) до C-конца в SEQ ID NO: 34-36, связана с водорастворимым полимером. Согласно некоторым вариантам осуществления неприродная аминокислота в одном или нескольких из этих положений связана с водорастворимым полимером, включая в себя, без ограничения, положения 10, 52, 117, 126, 131, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 и 110 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления неприродная аминокислота в одном или нескольких из этих положений связана с водорастворимым полимером, включая в себя, без ограничения, следующие положения: 10, 52, 77, 117, 126, 131, 162 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления неприродная аминокислота связана с водорастворимым полимером в одном или нескольких из этих положений: 87, 77, 83, 72 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления неприродная аминокислота связана с

водорастворимым полимером в одном или нескольких из этих положений: 69, 79, 91, 96, 108 и 110 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неприродных аминокислот в лидерной или сигнальной последовательности SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или других модифицированных FGF- 21 связана с водорастворимым полимером. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неприродных аминокислот в лидерной или сигнальной последовательности SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7 или другой модифицированной последовательности FGF-21 связаны с водорастворимым полимером.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая модулирует аффинность модифицированного полипептида FGF-21 к рецептору полипептида FGF-21 или партнеру по связыванию, включая в себя, без ограничения, белок, полипептид, малую молекулу или нуклеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которые повышают стабильность модифицированного полипептида FGF-21 по сравнению со стабильностью соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции, или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другим немодифицированным или модифицированным полипептидом FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая снижает иммуногенность модифицированного полипептида FGF-21 по сравнению с иммуногенностью соответствующего FGF-21 без по меньшей мере одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которые увеличивают период полужизни в сыворотке или время циркуляции модифицированного полипептида FGF-21 по сравнению с периодом полужизни в сыворотке или временем циркуляции соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID

NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая уменьшает дезамидирование модифицированного полипептида FGF-21 по сравнению с дезамидированием соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая увеличивает растворимость в воде модифицированного FGF-21 полипептида по сравнению с растворимостью в воде соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая увеличивает растворимость модифицированного полипептида FGF-21, производимого в клетке-хозяине, по сравнению с растворимостью соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая увеличивает экспрессию модифицированного полипептида FGF-21 в клетке-хозяине или увеличивает синтез in vitro по сравнению с экспрессией или синтезом соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. Модифицированный полипептид FGF-21, содержащий эту замену, может сохранять агонистическую активность и сохраняет или улучшает уровни экспрессии в клетке-хозяине. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которые повышают устойчивость к протеазе или уменьшают расщепление протеазой

(такое как расщепление С-концевых аминокислот) модифицированного полипептида FGF-21 по сравнению с устойчивостью к протеазе соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. В патенте США № 6716626 указано, что потенциальные сайты, которые могут быть замещены для изменения расщепления протеазой, включают в себя, без ограничения, одноосновный сайт в пределах 2 остатков пролина. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая модулирует активность сигнальной трансдукции модифицированного рецептора FGF-21 по сравнению с активностью рецептора при взаимодействии с соответствующим полипептидом FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которая модулирует его связывание с другой молекулой, такой как рецептор, по сравнению со связыванием соответствующего полипептида FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с веществом сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит по меньшей мере одну замену, добавление или делецию, которые повышают совместимость модифицированного полипептида FGF-21 с фармацевтическими консервантами (например, м-крезолом, фенолом, бензиловым спиртом) при сравнении с совместимостью соответствующего FGF-21 по меньшей мере без одной замены, добавления или делеции или по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, 201 или другой немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21. Эта повышенная совместимость позволит получить препарат консервированной фармацевтической композиции, которая сохраняет физико-химические свойства и биологическую активность белка во время хранения. В публикации международной заявки WO 2005/091944, которая полностью включена посредством ссылки, обсуждаются следующие примеры мутеинов FGF-21 с повышенной фармацевтической стабильностью: замена заряженной и/или полярной, но

незаряженной аминокислоты на одну из следующих: глицин 42, глутамин 54, аргинин 77, аланин 81, лейцин 86, фенилаланин 88, лизин 122, гистидин 125, аргинин 126, пролин 130, аргинин 131, лейцин 139, аланин 145, лейцин 146, изолейцин 152, аланин 154, глутамин 156, глицин 161, серин 163, глицин 170 или серин 172 в SEQ ID NO: 1 в публикации международной заявки WO 05/091944. Модифицированный полипептид FGF-21 согласно настоящему изобретению может включать в себя по меньшей мере одну из этих замен в соответствующем положении в полипептиде и/или может включать в себя одну или несколько других замен, дополнений или делеций. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неприродных аминокислот заменены в одном или нескольких из следующих положений: глицин 42, глутамин 54, аргинин 77, аланин 81, лейцин 86, фенилаланин 88, лизин 122, гистидин 125, аргинин 126, пролин 130, аргинин 131, лейцин 139, аланин 145, пролин/лейцин 146, изолейцин 152, аланин 154, глутамин 156, глицин 161, серин 163, глицин 170, серин 172 (аминокислотные положения, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7). Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько неприродных аминокислот заменены в одном или нескольких из следующих положений: глутамат 91, аргинин 131, глутамин 108, аргинин 77, аргинин 72, гистидин 87, лейцин 86, аргинин 126, глутамат 110, тирозин 83, пролин 146, аргинин 135, аргинин 96, аргинин 36 (положения аминокислот, соответствующие SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7).

В публикации международной заявки WO 05/091944 описаны дополнительные мутеины FGF-21 с улучшенной фармацевтической стабильностью. Такие мутеины включают в себя замену цистеина двумя или более из следующих в FGF-21 (смотрите SEQ ID NO: 1 в публикации международной заявки WO 05/091944): аргинин 19, тирозин 20, лейцин 21, тирозин 22, треонин 23, аспартат 24, аспартат 25, аланин 26, глутамин 27, глутамин 28, аланин 31, лейцин 33, изолейцин 35, лейцин 37, валин 41, глицин 42, глицин 43, глутамат 50, глутамин 54, лейцин 58, валин 62, лейцин 66, глицин 67, лизин 69, аргинин 72, фенилаланин 73, глутамин 76, аргинин 77, аспартат 79, глицин 80, аланин 81, лейцин 82, глицин 84, серин 85, пролин 90, аланин 92, серин 94, фенилаланин 95, лейцин 100, аспартат 102, тирозин 104, тирозин 107, серин 109, глутамат 110, пролин 115, гистидин 117, лейцин 118, пролин 119, аспарагин 121, лизин 122, серин 123, пролин 124, гистидин 125, аргинин 126, аспартат 127, аланин 129, пролин 130, глицин 132, аланин 134, аргинин 135, лейцин 137, пролин 138 или лейцин 139. Модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию могут включать в себя по

меньшей мере одну из этих замен в соответствующем положении в полипептиде и/или могут включать в себя одну или несколько других замен, дополнений или делеций.

В публикации международной заявки WO 05/091944 дополнительно описаны специфические мутеины FGF-21 со сконструированными дисульфидными связями (аминокислоты, замещенные цистеином), в дополнение к природной в Cys75-Cys93, которые представляют собой следующие: Gln76Cys-Ser109Cys, Cys75-Ser85Cys, Cys75-Ala92Cys, Phe73Cys-Cys93, Ser123Cys-His125Cys, Asp102Cys-Tyr104Cys, Aspl27Cys-Glyl32Cys, Ser94Cys-Glu110Cys, Pro115Cys-His117Cys, Asn121Cys-Asp127Cys, Leu100Cys-Asp102Cys, Phe95Cys-Tyr107Cys, Arg19CysPro138Cys, Tyr20Cys-Leu139Cys, Tyr22Cys-Leu137Cys, Arg77Cys-Asp79Cys, Pro90Cys-Ala92Cys, Glu50Cys-Lys69Cys, Thr23Cys-Asp25Cys, Ala31Cys-Gly43Cys, Gln28Cys-Gly43Cys, Thr23Cys-Gln28Cys, Val41Cys-Leu82Cys, Leu58Cys-Val62Cys, Gln54Cys-Leu66Cys, Ile35Cys-Gly67Cys, Gly67Cys-Arg72Cys, Ile35Cys-Gly84Cys, Arg72Cys-Gly84Cys или Arg77Cys-Ala81Cys, где нумерация основана на SEQ ID NO: 1 в публикации международной заявки WO 05/091944. Дополнительные мутеины со сконструированными дисульфидными связями представляют собой Tyr22Cys-Leu139Cys; Asp24Cys-Arg135Cys; Leu118Cys-Gly132Cys; His117Cys-Pro130Cys; His117Cys-Ala129Cys; Leu82Cys-Pro119Cys; Gly80Cys-Ala129Cys; Gly43Cys-Pro124Cys; Gly42Cys-Arg126Cys; Gly42Cys-Pro124Cys; Gln28Cys-Pro124Cys; Gln27Cys-Ser123Cys; Ala26Cys-Lys122Cys или Asp25Cys-Lys122Cys, где нумерация основана на SEQ ID NO: 1 в публикации международной заявки WO 05/091944. Дополнительные мутеины со сконструированными дисульфидными связями представляют собой Leu118Cys-Ala134Cys; Leu21Cys-Leu33Cys; Ala26Cys-Lys122Cys; Leu21Cys-Leu33Cys/Leu118Cys-Ala134Cys, где нумерация основана на SEQ ID NO: 1 в публикации международной заявки WO 05/091944. Модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему изобретению могут включать в себя одну или несколько из этих замен в соответствующем положении(ях) в полипептиде и/или могут включать в себя одну или несколько других замен, дополнений или делеций.

В публикации международной заявки WO 05/091944 описаны дополнительные мутеины FGF-21, которые были пегилированы. Эти мутеины содержали одну из следующих замен: D25C, D38C, L58C, K59C, P60C, K69C, D79C, H87C, E91C, E101C, D102C, L114C, L116C, K122C, R126C, P130C, P133C, P140C. В публикации международной заявки WO 05/091944 описаны замены цистеина в следующих положениях: 19, 21, 26, 28, 29, 30, 36, 39, 42, 50, 56, 61, 64, 65, 68, 70, 71, 77, 81, 85, 86, 90, 92, 94, 98, 107, 108, 112, 113, 123 и 124. В публикации международной заявки WO

05/091944 указаны замены цистеина в следующих положениях: 24, 27, 37, 40, 44, 46, 49 57, 88, 89, 106, 110, 111, 115, 120 и 139. В публикации международной заявки WO 05/091944 описаны замены цистеина в следующих положениях: 18, 45, 47, 48, 78, 83, 99, 103, 125, 128, 131, 132 и 138. В публикации международной заявки WO 05/091944 описаны замены цистеина в следующих положениях: 25, 38, 58, 59, 60, 69, 79, 87, 91, 101, 102, 114, 116, 122 , 126, 130, 133 и 140.

Модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию могут включать одну или несколько вышеуказанных замен в соответствующем положении в полипептиде и/или могут включать в себя одну или несколько других замен, дополнений или делеций. Также в настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие модифицированный полипептид FGF-21, адаптированный для использования в описанных в настоящем документе способах, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия модифицированный полипептид FGF-21 по меньшей мере с одной неприродной аминокислотой включает в себя по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию. Согласно некоторым вариантам осуществления посттрансляционную модификацию осуществляют in vitro. Согласно некоторым вариантам осуществления посттрансляционную модификацию осуществляют in vivo в эукариотической клетке или в неэукариотической клетке.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок включает в себя по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, которую осуществляют in vivo одной клеткой-хозяином, причем посттрансляционная модификация, как правило, не производится другим типом клеток-хозяев. Согласно некоторым вариантам осуществления белок включает в себя по меньшей мере одну посттрансляционную модификацию, которая производится in vivo эукариотической клеткой, причем посттрансляционная модификация, как правило, не производится неэукариотической клеткой. Примеры посттрансляционных модификаций включают в себя, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, ацилирование, липидную модификацию, пальмитоилирование, добавление пальмитата, фосфорилирование, модификацию связей гликолипидов и тому подобное. Согласно некоторым вариантам осуществления белок или полипептид согласно настоящему раскрытию может содержать последовательность секреции или локализации, эпитопную метку, метку FLAG, полигистидиновую метку, слияние GST и/или подобное.

В настоящем раскрытии также предусмотрены водорастворимые и гидролитически стабильные производные ПЭГ-производных и родственных гидрофильных полимеров, содержащих один или несколько ацетиленовых или азидных фрагментов. Полимерные производные ПЭГ, которые содержат ацетиленовые фрагменты, являются высокоселективными для связывания с азидными фрагментами, которые селективно введены в белки в ответ на селекторный кодон. Аналогично, производные ПЭГ-полимера, которые содержат азидные фрагменты, являются высокоселективными для связывания с ацетиленовыми фрагментами, которые были введены селективно в белки в ответ на селекторный кодон.

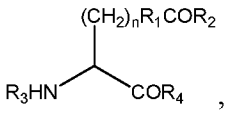
Более конкретно, азидные фрагменты содержат, без ограничения, алкилазиды, арилазиды и производные этих азидов. Производные алкилазидов и арилазидов могут включать в себя другие заместители, при условии, что сохраняется специфическая для ацетилена реакционная способность. Ацетиленовые фрагменты содержат алкилацетилены и арилацетилены и их производные. Производные алкилацетилена и арилацетилена могут включать в себя другие заместители, при условии, что сохраняется специфическая для азида реакционная способность.

В настоящем раскрытии предусмотрены конъюгаты веществ, характеризующихся большим разнообразием функциональных групп, заместителей или фрагментов, с другими веществами, включая в себя, без ограничения, метку; краситель; полимер; водорастворимый полимер; производное полиэтиленгликоля; фотосшиватель; радионуклид; цитотоксическое соединение; лекарственное средство; метку сродства; фотоаффинную метку; реакционноспособное соединение; смолу; второй белок или полипептид или аналог полипептида; антитело или фрагмент антитела; хелатор металла; кофактор; жирную кислоту; углевод; полинуклеотид; ДНК; РНК; антисмысловый полинуклеотид; сахарид; водорастворимый дендример; циклодекстрин; ингибирующую рибонуклеиновую кислоту; биоматериал; наночастицу; спиновую метку; флуорофор, металлсодержащий фрагмент; радиоактивный фрагмент; новую функциональную группу; группу, ковалентно или нековалентно взаимодействующую с другими молекулами; фотоулавливающий фрагмент; возбуждаемый актиническим излучением фрагмент; фотоизомеризуемый фрагмент; биотин; производное биотина; аналог биотина; фрагмент, содержащий тяжелый атом; химически расщепляемую группу; фоточувствительную группу; удлиненную боковую цепь; углеродсвязанный сахар; окислительно-восстановительное средство; аминотиокислоту; токсический фрагмент; изотопически меченый фрагмент; биофизический зонд; фосфоресцирующую группу;

хемилюминесцентную группу; электронно-плотную группу; магнитную группу; интеркалирующую группу; хромофор; средство переноса энергии; биологически активное средство; обнаруживаемую метку; малую молекулу; квантовую точку; нанотрансмиттер; радионуклеотид; радиопередатчик; нейтрализатор нейтронов или любую комбинацию вышеуказанного или любого другого желаемого соединения или вещества. Настоящее раскрытие также включает в себя конъюгаты веществ, содержащих азидные или ацетиленовые фрагменты с производными ПЭГ-полимера, содержащие соответствующие ацетиленовые или азидные фрагменты. Например, ПЭГ-полимер, содержащий азидный фрагмент, может быть связан с биологически активной молекулой в положении в белке, которое содержит неканоническую аминокислоту, несущую ацетиленовую функциональность. Связь, посредством которой связаны ПЭГ и биологически активная молекула, включает в себя, без ограничения, продукт циклоприсоединения Хьюсгена [3+2].

Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота содержит карбонильную группу, ацетильную группу, аминооксигруппу, гидразиновую группу, гидразидную группу, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу.

Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота содержит карбонильную группу. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота характеризуется следующей структурой:

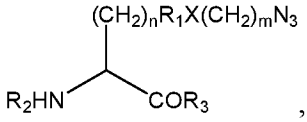


,

где n = 0-10; R1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил; R2 представляет собой H, алкил, арил, замещенный алкил и замещенный арил; и R3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации аминоконца, а R4 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации карбоксильного конца.

Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота содержит аминооксигруппу. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота содержит гидразидную группу. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота содержит гидразиновую группу. Согласно некоторым вариантам осуществления неканонический аминокислотный остаток содержит семикарбазидную группу.

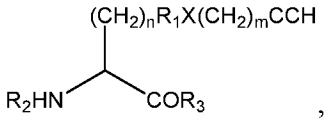
Согласно некоторым вариантам осуществления неканонический аминокислотный остаток содержит азидную группу. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота характеризуется следующей структурой:



,

где n = 0-10; R1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил, замещенный арил или отсутствует; X представляет собой O, N, S или отсутствует; m = 0-10; R2 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации амино-конца, а R3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации карбоксильного конца.

Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота содержит алкиновую группу. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота характеризуется следующей структурой:



,

где n = 0-10; R1 представляет собой алкил, арил, замещенный алкил или замещенный арил; X представляет собой O, N, S или отсутствует; m = 0-10, R2 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации аминоконца и R3 представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации карбоксильного конца.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может быть агонистом, частичным агонистом, антагонистом, частичным антагонистом или обратным агонистом. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 содержит неканоническую аминокислоту, связанную с водорастворимым полимером. Согласно некоторым вариантам осуществления водорастворимый полимер содержит фрагмент полиэтиленгликоля.

В настоящем раскрытии также предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотид, который гибридизуется в жестких условиях с SEQ ID NO: 8-14. В настоящем раскрытии также предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотид, который гибридизуется в жестких условиях с SEQ ID NO: 8-14, причем полинуклеотид содержит по меньшей мере один селекторный кодон. В настоящем раскрытии также предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие полинуклеотид, который кодирует полипептиды, показанные в

виде SEQ ID NO: 1-7, или описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления описанный в настоящем документе выделенный полинуклеотид содержит по меньшей мере один селекторный кодон, например, селекторный кодон, который кодирует неканоническую аминокислоту, содержащуюся в указанном модифицированном полипептиде FGF-21.

Согласно некоторым вариантам осуществления селекторный кодон выбирают из группы, состоящей из амбер-кодона, охра-кодона, опал-кодона, уникального кодона, редкого кодона, кодона из пяти оснований и кодона из четырех оснований.

В настоящем раскрытии также предусмотрены способы получения модифицированного полипептида FGF-21, связанного с водорастворимым полимером. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает контактирование выделенного модифицированного полипептида FGF-21, содержащего неканоническую аминокислоту с водорастворимым полимером, содержащим фрагмент, который реагирует с неканонической аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота, включенная в модифицированный полипептид FGF-21, является реакционноспособной по отношению к водорастворимому полимеру, который в противном случае не реагирует с любой из 20 общих аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления неканоническая аминокислота, включенная в модифицированный полипептид FGF-21, является реакционноспособной по отношению к линкеру, полимеру или биологически активной молекуле, которая в противном случае не реагирует с любой из 20 общих аминокислот.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21, связанный с водорастворимым полимером, получают путем взаимодействия модифицированного полипептида FGF-21, содержащего карбонилсодержащую аминокислоту, с линкером, полимером, таким как молекула полиэтиленгликоля, или биологически активной молекулой, содержащей группу аминоокси, гидразина, гидразида или семикарбазида. Согласно некоторым вариантам осуществления группа аминоокси, гидразина, гидразида или семикарбазида связана с молекулой полиэтиленгликоля через амидную связь.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21, связанный с водорастворимым полимером, получают путем взаимодействия молекулы полиэтиленгликоля, содержащей карбонильную группу, с полипептидом, содержащим неканоническую аминокислоту, которая содержит аминоокси, гидразин, гидразид или семикарбазид.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21, связанный с водорастворимым полимером, получают путем взаимодействия модифицированного полипептида FGF-21, содержащего алкинсодержащую аминокислоту, с молекулой полиэтиленгликоля, содержащей азидный фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления азидная или алкиновая группа связана с молекулой полиэтиленгликоля через амидную связь.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21, связанный с водорастворимым полимером, получают путем взаимодействия модифицированного полипептида FGF-21, содержащего азидсодержащую аминокислоту, с молекулой полиэтиленгликоля, содержащей алкиновую часть. Согласно некоторым вариантам осуществления азидная или алкиновая группа связана с молекулой полиэтиленгликоля через амидную связь.

Согласно некоторым вариантам осуществления водорастворимый полимер, связанный с модифицированным полипептидом FGF-21, содержит фрагмент полиалкиленгликоля. Согласно некоторым вариантам осуществления неканонический аминокислотный остаток, включенный в модифицированный полипептид FGF-21, содержит карбонильную группу, аминооксигруппу, гидразидную группу, гидразин, семикарбазидную группу, азидную группу или алкиновую группу. Согласно некоторым вариантам осуществления неканонический аминокислотный остаток, включенный в модифицированный полипептид FGF-21, содержит карбонильный фрагмент, и водорастворимый полимер содержит фрагмент аминоокси, гидразида, гидразина или семикарбазида. Согласно некоторым вариантам осуществления неканонический аминокислотный остаток, включенный в модифицированный полипептид FGF-21, содержит алкиновый фрагмент, а водорастворимый полимер содержит азидную часть. Согласно некоторым вариантам осуществления неканонический аминокислотный остаток, включенный в модифицированный полипептид FGF-21, содержит азидный фрагмент, а водорастворимый полимер содержит алкиновый фрагмент.

В настоящем раскрытии также предусмотрены клетки, содержащие полинуклеотид, кодирующий модифицированный полипептид FGF-21, содержащий селекторный кодон. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки содержат ортогональную РНК-синтетазу и/или ортогональную тРНК для замещения неканонической аминокислоты в модифицированном полипептиде FGF-21.

В настоящем раскрытии также предусмотрены способы получения модифицированного полипептида FGF-21, содержащего неканоническую аминокислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают культивирование клеток, содержащих полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие модифицированный полипептид FGF-21, ортогональную РНК-синтетазу и/или ортогональную тРНК в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии модифицированного полипептида FGF-21; и очистку модифицированного полипептида FGF-21 от клеток и/или культуральной среды.

В пределах объема настоящего раскрытия находится лидер или сигнальная последовательность FGF-21, присоединенная к модифицированной кодирующей области FGF-21, а также гетерологичная сигнальная последовательность, присоединенная к модифицированной кодирующей области FGF-21. Выбранным гетерологичным лидером или сигнальной последовательностью должен быть тот, который распознается и обрабатывается, т.е. с помощью системы секреции клеток-хозяев секретируется и, возможно, расщепляется сигнальной пептидазой, клеткой-хозяином. Лидерные последовательности настоящего раскрытия могут быть выбраны из следующего: три лейциновых лидера из SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 6 (аминокислотные положения 1-28), два лейциновых лидера из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 7 (аминокислотные положения 1-27), His-метка из SEQ ID NO: 2 (аминокислотные положения 1-10), SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44. Способ лечения состояния или нарушения с модифицированным FGF-21 согласно настоящему раскрытию подразумевает лечение модифицированным полипептидом FGF-21 с сигнальным или лидерным пептидом или без него.

В настоящем раскрытии также предусмотрены способы индуцирования увеличения поглощения глюкозы в клетках адипоцитов, причем указанный способ предусматривает введение модифицированного FGF-21 в указанные клетки в количестве, эффективном для индуцирования увеличения поглощения глюкозы. Указанное увеличение поглощения глюкозы может привести к увеличению расходов энергии за счет более быстрого и эффективного использования глюкозы.

II. Общие рекомбинантные нуклеиновые кислоты и способы применения с раскрытыми модифицированными полипептидами FGF-21

Согласно многочисленным вариантам осуществления настоящего раскрытия нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющий интерес модифицированный полипептид FGF-21, могут быть выделены, клонированы и часто изменены с

использованием рекомбинантных способов. Такие варианты осуществления могут применяться, включая в себя, без ограничения, для экспрессии белка или во время получения вариантов, производных, экспрессионных кассет или других последовательностей, полученных из модифицированного полипептида FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности, кодирующие модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию, функционально связаны с гетерологичным промотором. Согласно некоторым вариантам осуществления использование кодонов ДНК в полинуклеотидных последовательностях, кодирующих модифицированный полипептид FGF-21, может быть оптимизировано для экспрессии E. coli или клеткой млекопитающих (например, CHO) с использованием техник, хорошо известных в настоящей области техники

Иллюстративная кДНК, кодирующая P-форму FGF-21 без лидерной последовательности, показана как SEQ ID NO: 8. Этот полипептид показан как SEQ ID NO: 1.

Иллюстративная кДНК, кодирующая His-меченную P-форму FGF-21 без лидерной последовательности, показана как SEQ ID NO: 9. Этот полипептид показан как SEQ ID NO: 2.

Иллюстративная кДНК, кодирующая P-форму FGF-21 с лидерной последовательностью, содержащей 3 лейцина вместе, показана как SEQ ID NO: 10. Этот полипептид показан как SEQ ID NO: 3.

Иллюстративная кДНК, кодирующая P-форму FGF-21 с лидерной последовательностью, содержащей 2 лейцина, показана как SEQ ID NO: 11. Этот полипептид показан как SEQ ID NO: 4.

Иллюстративная кДНК, кодирующая L-форму FGF-21 без лидерной последовательности, показана как SEQ ID NO: 12. Этот полипептид показан как SEQ ID NO: 5.

Иллюстративная кДНК, кодирующая L-форму FGF-21 с лидерной последовательностью, содержащей 3 лейцина, показана как SEQ ID NO: 13. Этот полипептид показан как SEQ ID NO: 6.

Иллюстративная кДНК, кодирующая L-форму FGF-21 с лидерной последовательностью, содержащей 2 лейцина, показана как SEQ ID NO: 14. Этот полипептид показан как SEQ ID NO: 7.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21, может быть синтезирована на

основе аминокислотной последовательности исходного полипептида, включая в себя, без ограничения, наличие аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1-7, а затем изменение нуклеотидной последовательности для осуществления введения (т.е. включения или замены) или удаления (т.е. делеции или замены) соответствующего аминокислотного остатка(ов). Нуклеотидная последовательность может быть удобно модифицирована с помощью сайт-направленного мутагенеза в соответствии с общепринятыми способами. Альтернативно, нуклеотидная последовательность может быть получена химическим синтезом, включая в себя, без ограничения, с использованием синтезатора олигонуклеотидов, причем олигонуклеотиды сконструированы на основе аминокислотной последовательности желаемого полипептида, и с предпочтительным выбором тех кодонов, которые являются предпочтительными в клетке-хозяине, в которой должен быть произведен рекомбинантный полипептид. Например, несколько небольших олигонуклеотидов, кодирующих части желаемого полипептида, могут быть синтезированы и собраны с помощью ПЦР, лигирования или цепной реакции лигирования. Смотрите, например, Barany, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 189-193 (1991); патент США № 6522427, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Настоящее раскрытие также относится к эукариотическим клеткам-хозяевам, неэукариотическим клеткам-хозяевам и организмам для включения in vivo неприродной аминокислоты через ортогональные пары тРНК/RS. Клетки-хозяева представляют собой генетически модифицированные (включая в себя, без ограничения, трансформированные, трансдуцированные или трансфицированные) полинуклеотидами согласно настоящему раскрытию или конструкциями, которые включают в себя полинуклеотид по настоящему раскрытию, включая в себя, без ограничения, вектор по настоящему раскрытию, который может представлять собой, например, вектор клонирования или вектор экспрессии. Например, кодирующие области для ортогональной тРНК, ортогональной тРНК-синтетазы и дериватизируемого белка функционально связаны с контрольными элементами экспрессией генов, которые функциональны в желаемой клетке-хозяине. Вектор может быть, например, в форме плазмиды, космиды, фага, бактерии, вируса, голого полинуклеотида или конъюгированного полинуклеотида. Векторы можно вводить в клетки и/или микроорганизмы стандартными способами.

Селекторные кодоны

Селекторные кодоны согласно настоящему раскрытию расширяют каркас генетического кодона белковых биосинтетических машин. Например, селекторный кодон включает в себя, без ограничения, уникальный кодон из трех оснований, нонсенс-кодон, такой как стоп-кодон, включая в себя, без ограничения, амбер-кодон (UAG), охре-кодон или опал-кодон (UGA), неприродный кодон, кодон из четырех или более оснований, редкий кодон и т.п. Специалистам в настоящей области техники очевидно, что имеется широкий диапазон числа селекторных кодонов, которые могут быть введены в желаемый ген или полинуклеотид, включая в себя, без ограничения, один или несколько, два или более, три или более, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более в одном полинуклеотиде, кодирующем по меньшей мере часть модифицированного полипептида FGF-21.

Согласно одному варианту осуществления способы предусматривают использование селекторного кодона, который представляет собой стоп-кодон для включения одной или нескольких неприродных (т.е. неканонических) аминокислот in vivo. Например, производится О-тРНК, которая распознает стоп-кодон, включая в себя, без ограничения, UAG, и аминоацилируется посредством O-RS с желаемой неприродной аминокислотой. Эта О-тРНК не распознается природными аминоацил-тРНК синтетазами хозяина. Обычный сайт-направленный мутагенез может быть использован для введения стоп-кодона, включая в себя, без ограничения, TAG, в преставляющий интерес сайт в представляющем интерес полипептиде. Смотрите, например, Sayers, J.R., et al. (1988), *5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis.* Nucleic Acids Res, 16:791-802. Когда O-RS, О-тРНК и нуклеиновая кислота, которые кодируют представляющий интерес полипептид, объединяются in vivo, неприродная аминокислота вводится в ответ на кодон UAG, чтобы получить полипептид, содержащий неприродную аминокислоту в указанном положении.

Включение неприродных аминокислот in vivo можно осуществить без значительного возмущения эукариотической клетки-хозяина. Например, поскольку эффективность супрессии для кодона UAG зависит от конкуренции между О-тРНК, включая в себя, без ограничения, амбер-супрессорную тРНК, и эукариотического фактора высвобождения (включая в себя, без ограничения, eRF) (который связывается со стоп-кодоном и инициирует высвобождение растущего пептида из рибосомы), эффективность супрессии может модулироваться, включая в себя, без ограничения, увеличением уровня экспрессии О-тРНК и/или супрессорной тРНК.

Неприродные аминокислоты также могут быть закодированы с использованием редких кодонов. Например, когда концентрация аргинина в реакции синтеза белка in vitro снижается, редкий аргининовый кодон AGG оказался эффективным для введения Ala посредством синтетической тРНК, ацилированной аланином. Смотрите, например, Ma et al., Biochemistry, 32:7939 (1993). В этом случае синтетическая тРНК конкурирует с природным тРНКArg, который существует как незначительный вид в *Escherichia coli*. Некоторые организмы не используют все триплетные кодоны. Неназначенный кодон AGA в *Micrococcus luteus* был использован для вставки аминокислот в экстракте транскрипции/трансляции in vitro. Смотрите, например, Kowal and Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997). Компоненты настоящего описания могут быть получены для использования этих редких кодонов in vivo.

Селекторные кодоны также содержат расширенные кодоны, включая в себя, без ограничения, кодоны из четырех или более оснований, такие как, кодоны из четырех, пяти, шести или более оснований. Примеры кодонов из четырех оснований включают в себя, без ограничения, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU и тому подобное. Примеры кодонов из пяти оснований включают в себя, без ограничения, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC и т.п. Особенность настоящего раскрытия предусматривает использование расширенных кодонов на основе супрессии сдвига рамки считывания. Кодоны из четырех или более оснований могут вставлять, включая в себя, без ограничения, одну или несколько неприродных аминокислот в один и тот же белок. Например, в присутствии мутированных О-тРНК, включая в себя, без ограничения, специальную супрессирующую рамку сдвига тРНК, с антикодоновыми петлями, например, по меньшей мере с антикодоновыми петлями из 8-10 нуклеотидов, кодоны из четырех или более оснований читаются как одна аминокислота. Согласно другим вариантам осуществления антикодоновые петли могут декодировать, включая в себя, без ограничения, по меньшей мере кодон из четырех оснований, по меньшей мере кодон из пяти оснований или по меньшей мере кодон из шести оснований или более. Поскольку существует 256 возможных кодов из четырех оснований, несколько неприродных аминокислот могут быть закодированы в одной и той же клетке с использованием кодонов из четырех или более оснований.

Согласно одному варианту осуществления в настоящем раскрытии могут использоваться расширенные кодоны на основе редких кодонов или нонсенс-кодонов, что может уменьшить бессмысленное прочитывание и супрессию сдвига рамки считывания на других нежелательных сайтах.

Для данной системы селекторный кодон может также включать в себя один из природных кодонов из трех оснований, где эндогенная система не использует (или редко использует) кодон из природных оснований. Например, это включает в себя систему, в которой отсутствует тРНК, которая распознает природный кодон из трех оснований, и/или систему, в которой кодон из трех оснований представляют собой редкий кодон.

Селекторные кодоны необязательно включают в себя неприродные пары оснований. Эти неприродные пары оснований дополнительно расширяют существующий генетический алфавит. Одна дополнительная пара оснований увеличивает количество триплетных кодонов с 64 до 125. Свойства третьих пар оснований включают в себя стабильное и селективное спаривание оснований, эффективное ферментативное включение в ДНК с высокой точностью полимеразой и эффективное удлинение праймера после синтеза вновь образованной неприродной пары оснований. Описания неприродных пар оснований, которые могут быть адаптированы для способов и композиций, включают в себя, например, Hirao, *et* al., (2002), Nature Biotechnology, 20:177-182. Смотрите также Wu, Y., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630.

Гены, кодирующие представляющие интерес белки или полипептиды, такие как модифицированный полипептид FGF-21, могут быть мутированы с использованием способов, известных специалисту в настоящей области техники и описанных в настоящем документе, и включают в себя, например, один или несколько селекторных кодонов для включения неприродной аминокислоты. Например, нуклеиновая кислота для представляющего интерес белка мутирует, чтобы включить один или несколько селекторных кодонов, обеспечивающих включение одной или нескольких неприродных аминокислот. Настоящее раскрытие предусматривает любой такой вариант, включая в себя, без ограничения, мутантные варианты любого белка, например, включающие в себя по меньшей мере одну неприродную аминокислоту.

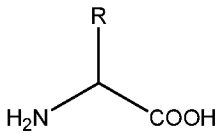
Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие представляющий интерес белок, такой как модифицированный полипептид FGF-21, могут быть легко мутированы для введения цистеина в любое желаемое положение полипептида. Цистеин широко используется для введения реакционноспособных молекул, водорастворимых полимеров, белков или широкого спектра других молекул, в представляющий интерес белок.

III. Неканонические аминокислоты

Очень широкое разнообразие неканонических аминокислот пригодно для использования в настоящем раскрытии. В модифицированный полипептид FGF-21 может быть введено любое количество неканонических аминокислот. В общем, введенные неканонические аминокислоты по существу химически инертны по отношению к 20 общим генетически кодируемым аминокислотам (то есть аланину, аргинину, аспарагину, аспарагиновой кислоте, цистеину, глутамину, глутаминовой кислоте, глицину, гистидину, изолейцину, лейцину, лизину, метионину, фенилаланину, пролину, серину, треонину, триптофану, тирозину и валину). Согласно некоторым вариантам осуществления неканонические аминокислоты включают в себя функциональные группы боковой цепи, которые эффективно и селективно реагируют с функциональными группами, не обнаруженными в 20 общих аминокислотах (включая в себя, без ограничения, азидо, кетоновые, альдегидные и аминооксигруппы) с образованием стабильных конъюгатов. Например, модифицированный полипептид FGF-21, который включает в себя неканоническую аминокислоту, содержащую азидо-функциональную группу, может подвергнуться взаимодействию с полимером (включая в себя, без ограничения, полиэтиленгликоль) или, альтернативно, вторым полипептидом, содержащим алкиновый фрагмент, для образования стабильного конъюгата, приводящего к селективной реакции азида и алкиновых функциональных групп с образованием продукта циклоприсоединения Хьюсгена [3+2].

Общая структура альфа-аминокислоты проиллюстрирована следующим образом (формула I):

I



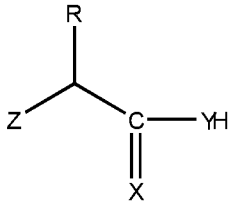
Неканоническая аминокислота, как правило, представляет собой любую структуру, характеризующуюся приведенной выше формулой, где R-группа представляет собой любой заместитель, отличный от используемого в двадцати природных аминокислотах, и может быть подходящим для использования в модифицированных полипептидах FGF-21 согласно настоящему раскрытию. Поскольку неканонические аминокислоты согласно настоящему изобретению, как правило, отличаются от природных аминокислот только структурой боковой цепи, неканонические аминокислоты образуют амидные связи с другими аминокислотами, включающими в себя, без ограничения, природные или неканонические, таким же

образом, как они образуются во встречающихся в природе полипептидах. Однако неканонические аминокислоты содержат группы боковой цепи, которые отличают их от природных аминокислот. Например, R необязательно содержит алкил-, арил-, ацил-, кето-, азидо-, гидрокси-, гидразиновую, циано-, гало-, гидразидную, алкенильную, алкильную, эфирную, тиоловую, селено-, сульфонил-, боратную, боронатную, фосфо-, фосфоно-, фосфиновую, гетероциклическую, еноновую, иминовую, альдегидную, сложноэфирную, тиокислотную, гидроксиламиновую группу, аминогруппу и т.п. или любую их комбинацию.

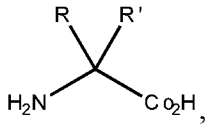
Иллюстративные неканонические аминокислоты, которые могут быть пригодны для использования в настоящем раскрытии и которые применимы для реакций с водорастворимыми полимерами, включают в себя, без ограничения, карбонильные, аминоокси, гидразиновые, гидразидные, семикарбазидные, азидные и алкиновые реакционноспособные группы. Согласно некоторым вариантам осуществления неканонические аминокислоты содержат сахаридный фрагмент. Примеры таких аминокислот включают в себя *N*-ацетил-L-глюкозаминил-L-серин, *N*-ацетил-L-галактозаминил-L-серин, *N*-ацетил-L-глюкозаминил-L-треонин, *N*-ацетил-L-глюкозаминил-L-аспарагин и *O*-маннозаминил-L-серин.

Многие из неканонических аминокислот, предусмотренные в настоящем документе, являются коммерчески доступными, например, от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США), Novabiochem (подразделение EMD Biosciences, Дармштадт, Германия) или Peptech (Берлингтон, Массачусетс, США). Те, которые не представляют собой коммерчески доступные, необязательно синтезируются, как предусмотрено в настоящем документе, или с использованием стандартных способов, известных специалистам в настоящей области техники. Для способов органического синтеза смотрите, например, Organic Chemistry by Fessendon and Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York) и Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). Смотрите также патенты США № 7045337 и 7083970, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В дополнение к неприродным аминокислотам, которые содержат новые боковые цепи, неприродные аминокислоты, которые могут быть пригодны для использования в настоящем раскрытии, также необязательно содержат модифицированные структуры остова, включая в себя, без ограничения, как показано структурами формул II и III:

II



III



где Z, как правило, содержит OH, NH_2, SH, NH-R′ или S-R′; X и Y, которые могут быть одинаковыми или различными, как правило, содержат S или O, и R и R', которые необязательно являются одинаковыми или различными, как правило, выбираются из одного и того же списка компонентов для группы R, описанной выше для неприродных аминокислот, характеризующихся формулой I, а также водород. Например, неприродные аминокислоты согласно настоящему раскрытию необязательно содержат замены в аминогруппе или карбоксильной группе, как показано формулами II и III. Неприродные аминокислоты этого типа включают в себя, без ограничения, α-гидроксикислоты, α-тиокислоты, α-аминотиокарбоксилаты, включая в себя, без ограничения, с боковыми цепями, соответствующими общим двадцати природным аминокислотам или неприродным боковым цепям. Кроме того, замещения у α-углерода необязательно включают в себя, без ограничения, L, D или α-α-дизамещенные аминокислоты, такие как D-глутамат, D-аланин, D-метил-O-тирозин, аминомасляную кислоту и тому подобное. Другие структурные альтернативы включают в себя циклические аминокислоты, такие как аналоги пролина, а также 3, 4, 6, 7, 8 и 9-членные кольцевые аналоги пролина, β и γ аминокислоты, такие как замещенные β-аланин и γ-аминомасляная кислота.

Многие неприродные аминокислоты основаны на природных аминокислотах, таких как тирозин, глутамин, фенилаланин и т.п., и пригодны для использования в настоящем раскрытии. Аналоги тирозина включают в себя, без ограничения, паразамещенные тирозины, ортозамещенные тирозины и метазамещенные тирозины, где замещенный тирозин содержит, без ограничения, кетогруппу (включая в себя, без ограничения, ацетильную группу), бензоильную группу, аминогруппу, гидразин, гидроксиламин, тиольную группу, карбоксигруппу, изопропильную группу, метильную

группу, линейную или разветвленную C_6-C_{20} углеводородную группу, насыщенный или ненасыщенный углеводород, О-метильную группу, полиэфирную группу, нитрогруппу, алкинильную группу или тому подобное. Кроме того, предусматриваются также многозамещенные арильные кольца. Аналоги глутамина, которые могут быть пригодны для использования в настоящем раскрытии, включают в себя, без ограничения, α-гидроксипроизводные, γ-замещенные производные, циклические производные и замещенные амидами производные глутамина. Примеры аналогов фенилаланина, которые могут быть подходящими для применения в настоящем описании, включают в себя, без ограничения, паразамещенные фенилаланины, ортозамещенные фенилаланины и метазамещенные фенилаланины, где заместитель содержит, включая в себя, без ограничения, гидроксигруппу, метоксигруппу, метильную группу, аллильную группу, альдегид, азидо-, иодо-, бромо-, кетогруппу (включая в себя, без ограничения, ацетильную группу), бензоил, алкинильную группу или подобную. Конкретные примеры неприродных аминокислот, которые могут быть пригодны для применения в настоящем документе, включают в себя, без ограничения, п-ацетил-L-фенилаланин, О-метил-L-тирозин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метилфенилаланин, О-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-О-ацетил-GlcNAc-серин, L-Dopa, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-азидо-L-фенилаланин, п-ацил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, L-фосфосерин, фосфоносерин, фосфонотирозин, иодфенилаланин, п-бромфенилаланин, п-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин и п-пропаргилоксифенилаланин и тому подобное.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрены композиции модифицированного полипептида FGF-21, содержащего неприродную аминокислоту (такую как п-(пропаргилокси)фенилаланин). Также предусмотрены различные композиции, содержащие п-(пропаргилокси)фенилаланин и, включая в себя, без ограничения, белки и/или клетки. Согласно одному аспекту композиция, которая включает в себя неприродную аминокислоту п-(пропаргилокси)фенилаланин, дополнительно включает в себя ортогональную тРНК. Неприродная аминокислота может быть связана (включая в себя, без ограничения, ковалентно) с ортогональной тРНК, включая в себя, без ограничения, ковалентно связанную с ортогональной тРНК, хотя и аминоацильная связь, ковалентно связанная с 3'ОН или 2'ОН терминального рибозного сахара ортогональной тРНК и т. д.

Описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может содержать неканоническую аминокислоту, описанную в патенте США № 8012931, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Структура и синтез неприродных аминокислот: карбонильных, подобных карбонильным, маскированных карбонильных, защищенных карбонильных групп и гидроксиламинных групп

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретение предусмотрен модифицированный FGF-21, связанный с водорастворимым полимером, например, ПЭГ, с помощью оксимной связи. Для образования оксимных связей пригодны многие типы неканонических аминокислот. Они включают в себя, без ограничения, неканонические аминокислоты, содержащие карбонильную, дикарбонильную, подобную карбонильной, маскированную карбонильную, защищенную карбонильную и гидроксиламинную группу. Такие аминокислоты, их структура и синтез описаны в патенте США № 8012931, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

IV. Структура и синтез неприродных аминокислот: содержащие гидроксиламин аминокислоты

Предварительная заявка на патент США №60/638418 полностью включена посредством ссылки. Таким образом, раскрытия, представленные в разделе V (озаглавленном как «Неприродные аминокислоты»), части B (озаглавленной как «Структура и синтез неприродных аминокислот: содержащие гидроксиламин аминокислоты»), в предварительной заявке на патент США № 60/638418, полностью применимы к способам, композициям, техникам и стратегиям получения, очистки, характеризации и использования неприродных аминокислот, полипептидов из неприродных аминокислот и модифицированных полипептидов из неприродных аминокислот, описанных в настоящем документе, в той же степени, как если бы такие раскрытия были полностью представлены в настоящем документе. Опубликованные патентные публикации США № 2006/0194256, 2006/0217532 и 2006/0217289 и публикация международной заявки WO 2006/069246, озаглавленная «Композиции, содержащие неприродные аминокислоты и полипептиды, способы их предусматривающие и их использование», также полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Химический синтез неприродных аминокислот

Многие из неприродных аминокислот, подходящих для использования в настоящем раскрытии, являются коммерчески доступными, например, от Sigma (США) или Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Те, которые не представляют собой коммерчески доступные, необязательно синтезируются, как предусмотрено в настоящем документе или в различных публикациях, или с использованием стандартных способов, известных специалистам в настоящей области техники. Для способов органического синтеза смотрите, например, Organic Chemistry by Fessendon and Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York) и Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). Дополнительные публикации, описывающие синтез неприродных аминокислот, включают в себя, например, публикацию международной заявки WO 2002/085923, озаглавленную как «In vivo включение неприродных аминокислот», Matsoukas et al., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) *A New Synthesis of Glutamine and of γ-Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates.* J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterrji, R. (1959) *Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents.* J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. et al. (1988) *Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine).* J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) *Glutamine analogues as Potential Antimalarials*, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) *Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues.* J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) *Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization.* J. Org. Chem. 50:1239-1246; Barton et al., (1987) *Synthesis of Novel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D-alpha-Amino-Adipic Acids, L-alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives.* Tetrahedron 43:4297-4308; и Subasinghe et al., (1992) *Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site.* J. Med. Chem. 35:4602-7. Смотрите также патентную публикацию США № 2004/0198637, озаглавленную как «Белковые матрицы», которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

A. Карбонильные реакционноспособные группы

Аминокислоты с карбонильной реакционноспособной группой допускают разнообразные реакции на связывание молекул (включая в себя, без ограничения, ПЭГ или другие водорастворимые молекулы) посредством реакций нуклеофильного присоединения или альдольной конденсации.

Синтез п-ацетил-(+/-)-фенилаланина и мета-ацетил-(+/-)-фенилаланина описан в публикации Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Другие содержащие карбонил аминокислоты могут быть получены аналогичным способом специалистом в настоящей области техники.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21, содержащий неканоническую аминокислоту, может быть химически модифицирован для создания реакционноспособной карбонильной функциональной группы. Например, альдегидная функциональность, пригодная для реакций конъюгации, может быть получена из функциональности, характеризующейся соседними аминогруппами и гидроксильными группами. Когда биологически активная молекула представляет собой полипептид, например, может быть использован *N*-концевой серин или треонин (который может присутствовать в норме или может быть подвергнут химическому или ферментативному расщеплению) для получения альдегидной функциональности в условиях мягкого окислительного расщепления с использованием периодата. Смотрите, например, Gaertner, *et al., Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner *et al., J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994). Однако способы, известные в настоящей области техники, ограничены аминокислотой на N-конце пептида или белка.

В настоящем раскрытии в полипептид в качестве «маскированной» альдегидной функциональности может быть включена неканоническая аминокислота, несущая соседние гидроксильные и аминогруппы. Например, 5-гидроксилизин содержит гидроксильную группу, смежную с эпсилон-амином. Условия реакции для получения альдегида, как правило, предусматривают добавление молярного избытка метапериодата натрия в мягких условиях, чтобы избежать окисления в других сайтах полипептида. Величина pH реакции окисления, как правило, составляет приблизительно 7,0. Типичная реакция предусматривает добавление приблизительно 1,5 молярного избытка метапериодата натрия к буферному раствору полипептида с последующей инкубацией в течение 10 минут в темноте. Смотрите, например, патент США № 6423685, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Карбонильная функциональность может быть подвергнута селективному взаимодействию с содержащим гидразин, гидразид, гидроксиламин или семикарбазид реагентом в мягких условиях в водном растворе с образованием соответственно соответствующих гидразоновых, оксимовых или семикарбазоновых связей, которые стабильны при физиологических условиях. Смотрите, например, Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Кроме того, уникальная реакционная способность карбонильной группы позволяет селективную модификацию в присутствии других боковых цепей аминокислот. Смотрите, например, Cornish, V. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., *et al.*, *Science* 276:1125-1128 (1997).

B. Реакционноспособные группы гидразина, гидразида или семикарбазида

Неканонические аминокислоты, содержащие нуклеофильную группу, такую как гидразин, гидразид или семикарбазид, позволяют реакцию с множеством электрофильных групп с образованием конъюгатов (включая в себя, без ограничения, с ПЭГ или другими водорастворимыми полимерами).

Содержащие гидразид, гидразин и семикарбазид аминокислоты доступны из коммерческих источников. Например, L-глутамат-γ-гидразид доступен от Sigma Chemical (Сент-Луис, Миссури). Другие аминокислоты, не доступные коммерчески, могут быть получены специалистом в настоящей области техники. Смотрите, например, патент США № 6281211, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные полипептиды FGF-21, содержащие неканонические аминокислоты, которые несут функциональные группы гидразида, гидразина или семикарбазида, могут эффективно и селективно реагировать с целым рядом молекул, которые содержат альдегиды или другие функциональные группы с аналогичной химической реакционной способностью. Смотрите, например, Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Уникальная реакционная способность функциональных групп гидразида, гидразина и семикарбазида делает их значительно более реакционноспособными по отношению к альдегидам, кетонам и другим электрофильным группам по сравнению с нуклеофильными группами, присутствующими на 20 обычных аминокислотах (включая в себя, без ограничения, гидроксильную группу серина или треонина или аминогруппы лизина и N-конца).

C. Аминооксисодержащие аминокислоты

Неканонические аминокислоты, содержащие аминооксигруппу (также называемую гидроксиламиновой), допускают реакцию с множеством электрофильных групп с образованием конъюгатов (включая в себя, без ограничения, с ПЭГ или другими водорастворимыми полимерами). Подобно гидразинам, гидразидам и семикарбазидам, повышенная нуклеофильность аминооксигруппы позволяет ей эффективно и селективно реагировать с целым рядом молекул, которые содержат альдегиды или другие функциональные группы с аналогичной химической реакционной способностью. Смотрите, например, Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001). В то время как результат реакции с гидразиновой группой представляет собой соответствующий гидразон, оксим, однако, как правило, возникает в результате реакции аминооксигруппы с карбонилсодержащей группой, такой как кетон.

Аминоксисодержащие аминокислоты могут быть получены из легко доступных предшественников аминокислот (гомосерин, серин и треонин). Смотрите, например, M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003). Некоторые из аминооксисодержащих аминокислот, таких как L-2-амино-4-(аминоокси)масляная кислота, были выделены из природных источников (Rosenthal G., Life Sci., 60: 1635-1641 (1997). Другие аминооксисодержащие аминокислоты могут быть получены специалистом в настоящей области техники.

D. Азидные и алкиновые реакционноспособные группы

Уникальная реакционная способность азидных и алкиновых функциональных групп делает их чрезвычайно полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул. Органические азиды, в частности, альфа-азиды, и алкины, как правило, устойчивы к общим реактивным химическим условиям. В частности, обе функциональные группы азида и алкина инертны по отношению к боковым цепям (т.е. группам R) 20 общих аминокислот, обнаруженных во встречающихся в природе полипептидах. Однако, при приведении к непосредственной близости обнаруживается «пружинящая» природа азидных и алкиновых групп, и они селективно и эффективно реагируют посредством реакции циклоприсоединения Хьюсгена [3+2] с образованием соответствующего триазола. Смотрите, например, Chin J., *et al.*, *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).

Поскольку реакция циклоприсоединения Хьюсгена предусматривает реакцию селективного циклоприсоединения (смотрите, например, Padwa, A., in Comprehensive

Organic Synthesis, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176), а не нуклеофильное замещение, включение неканонических аминокислот, несущих содержащие азид и алкин боковые цепи, позволяет полученным в результате полипептидам избирательно модифицироваться в положении неканонической аминокислоты. Реакция циклоприсоединения, предусматривающая содержащий азид или алкин модифицированный полипептид FGF-21, может быть проведена при комнатной температуре в водных условиях путем добавления Cu(II) (включая в себя, без ограничения, в виде каталитического количества $CuSO_4$) в присутствии восстановителя для восстановления Cu(II) до Cu(I), in situ, в каталитическом количестве. Смотрите, например, Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., *et al.*, *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Иллюстративные восстанавливающие средства включают в себя, без ограничения, аскорбат, металлическую медь, хинин, гидрохинон, витамин К, глутатион, цистеин, Fe^{2+}, Co^{2+} и приложенный электрический потенциал.

В некоторых случаях, когда желательна реакция циклоприсоединения Хьюсгена [3+2] между азидом и алкином, модифицированный полипептид FGF-21 может содержать неканоническую аминокислоту, содержащую алкиновый фрагмент, а водорастворимый полимер для присоединения к аминокислоте может содержать азидный фрагмент. Альтернативно, также может быть проведена обратная реакция (то есть с азидным фрагментом на аминокислоте и алкиновым фрагментом, присутствующим в водорастворимом полимере).

Функциональная группа азида также может быть подвергнута селективному взаимодействию с водорастворимым полимером, содержащим ариловый эфир и соответствующим образом функционализированным арилфосфиновым фрагментом с образованием амидной связи. Арилфосфиновая группа восстанавливает азид *in situ*, и полученный амин затем эффективно реагирует с проксимальной сложноэфирной связью с образованием соответствующего амида. Смотрите, например, E. Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). Азидсодержащая аминокислота может быть либо алкилазидом (включая в себя, без ограничения, 2-амино-6-азидо-1-гексановую кислоту), либо арилазидом (п-азидофенилаланин).

Функциональная группа азида также может быть подвергнута селективному взаимодействию с водорастворимым полимером, содержащим сложный тиоэфир и соответствующим образом функционализированный фрагмент арилфосфина с

образованием амидной связи. Арилфосфиновая группа восстанавливает азид *in situ*, и полученный амин затем эффективно реагирует с соединением сложного тиоэфира с образованием соответствующего амида.

Содержащие алкин аминокислоты являются коммерчески доступными. Например, пропаргилглицин является коммерчески доступным от Peptech (Burlington, MA). Альтернативно, содержащие алкин аминокислоты могут быть получены стандартными способами. Например, п-пропаргилоксифенилаланин может быть синтезирован, например, как описано в Deiters, A., *et al., J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003), а 4-алкинил-L-фенилаланин может быть синтезирован, как описано в Kayser, B., *et al., Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997). Другие алкинсодержащие аминокислоты могут быть получены специалистом в настоящей области техники.

Азидсодержащие аминокислоты доступны из коммерческих источников. Например, 4-азидофенилаланин может быть получен от Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). Для тех азидсодержащих аминокислот, которые не являются коммерчески доступными, азидную группу можно получить относительно легко, используя стандартные способы, известные специалистам в настоящей области техники, включая в себя, без ограничения, замещение подходящей уходящей группы (включая в себя, без ограничения, галогенид, мезилат, тозилат) или через открытие подходяще защищенного лактона. Смотрите, например, Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

Молекула, которая может быть добавлена к белку согласно настоящему раскрытию посредством циклоприсоединения [3+2], предусматривает практически любую молекулу с азидным или алкинильным производным. Молекулы включают в себя, без ограничения, красители, флуорофоры, сшивающие средства, производные сахарида, полимеры (включая в себя, без ограничения, полимеры, содержащие полиэтиленгликоль), фотосшивающие средства, цитотоксические соединения, метки сродства, производные биотина, смолы, гранулы, второй белок или полипептид (или более), полинуклеотид(ы) (включая в себя, без ограничения, ДНК, РНК и т. д.), хелаторы металлов, кофакторы, жирные кислоты, углеводы и тому подобное. Эти молекулы могут быть добавлены к неприродной аминокислоте с алкинильной группой, включая в себя, без ограничения, п-пропаргилоксифенилаланин или азидогруппу, включая в себя, без ограничения, п-азидофенилаланин, соответственно.

E. Аминотиольные реакционноспособные группы

Уникальная реакционная способность бета-замещенных аминотиольных функциональных групп делает их чрезвычайно полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул, которые содержат альдегидные группы, путем образования тиазолидина. Смотрите, например, J. Shao and J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899. Согласно некоторым вариантам осуществления бета-замещенные аминотиольные аминокислоты могут быть включены в модифицированные полипептиды FGF-21 и затем подвергнуты взаимодействию с водорастворимыми полимерами, содержащими альдегидную функциональность. Согласно некоторым вариантам осуществления водорастворимый полимер, конъюгат лекарственного средства или другое полезное вещество могут быть связаны с модифицированным полипептидом FGF-21, содержащим бета-замещенную аминотиольную аминокислоту, путем образования тиазолидина.

F. Дополнительные реакционноспособные группы

Дополнительные реакционноспособные группы и неканонические аминокислоты, которые могут быть включены в модифицированные полипептиды FGF-21, описаны в следующих патентных заявках, которые все полностью включены посредством ссылки в настоящий документ: патентная публикация США № 2006/0194256, патентная публикация США № 2006/0217532, патентная публикация США № 2006/0217289, предварительный патент США №60/755338; предварительный патент США № 60/755711; предварительный патент США № 60/755018; международная патентная заявка № PCT/US06/49397; публикация международной заявки WO 2006/069246; предварительный патент США № 60/743041; предварительный патент США № 60/743040; международная патентная заявка № PCT/US06/47822; предварительный патент США 60/882819; предварительный патент США № 60/882500 и предварительный патент США № 60/870594.

Клеточный захват неприродных аминокислот

Захват неприродных аминокислот клеткой представляет собой одну из проблем, которая обычно рассматривается при разработке и отборе неприродных аминокислот, включая в себя, без ограничения, для включения в белок. Например, высокая плотность заряда α-аминокислот свидетельствует о том, что эти соединения вряд ли будут проникающими в клетки. Природные аминокислоты поступают в эукариотическую клетку с помощью набора основанных на белке транспортных систем. Может быть выполнен быстрый скрининг, в котором оценивается, какие неприродные аминокислоты, если таковые имеются, поглощаются клетками. Смотрите, например,

анализы токсичности, например, в патентной публикации США № 2004/0198637, озаглавленной как «Белковые матрицы», которая включена в настоящий документ посредством ссылки, и Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) *Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code*. PNAS United States 96:4780-4785. Хотя поглощение легко анализируется с помощью различных анализов, альтернативой разработке неприродных аминокислот, поддающихся воздействию клеточных путей поглощения, представляет собой обеспечение путей биосинтеза для создания аминокислот *in vivo*.

Биосинтез неприродных аминокислот

Многие пути биосинтеза уже существуют в клетках для производства аминокислот и других соединений. Хотя способ биосинтеза для конкретной неприродной аминокислоты может не существовать в природе, включая в себя, без ограничения, в клетке, настоящее раскрытие предусматривает такие способы. Например, пути биосинтеза для неприродных аминокислот необязательно производятся в клетке-хозяине путем добавления новых ферментов или модификации существующих путей клеток-хозяев. Дополнительные новые ферменты представляют собой необязательно природные ферменты или искусственно полученные ферменты. Например, биосинтез п-аминофенилаланина (как представлено в примере в публикации международной заявки WO 2002/085923, озаглавленной «In vivo включение неприродных аминокислот») основан на добавлении комбинации известных ферментов из других организмов. Гены этих ферментов могут быть введены в эукариотическую клетку путем трансформации клетки плазмидой, содержащей гены. Гены, экспрессируемые в клетке, обеспечивают ферментативный путь синтеза желаемого соединения. Примеры типов ферментов, которые необязательно добавляют, приведены в примерах ниже. Дополнительные последовательности ферментов находятся, например, в GenBank. Полученные искусственно ферменты также необязательно добавляют в клетку таким же образом. Таким образом, клеточным инструментом и ресурсами клетки манипулируют с образованием неприродных аминокислот.

Существует множество способов для получения новых ферментов для использования в биосинтетических путях или для эволюции существующих путей. Например, рекурсивная рекомбинация, включая в себя, без ограничения, разработанную Maxygen, Inc. (доступна в сети интернет на maxygen.com), необязательно используется для разработки новых ферментов и путей. Смотрите, например, Stemmer (1994), *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, Nature 370(4):389-391 и Stemmer, (1994),

DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751. Аналогичным образом, DesignPath™, разработанный Genencor (доступен в сети интернет на genencor.com), по выбору используется для разработки метаболических путей, включая в себя, без ограничения, для разработки пути создания O-метил-L-тирозина в клетке. Эта технология реконструирует существующие пути в организмах-хозяевах, используя комбинацию новых генов, включая в себя, без ограничения, те, которые идентифицированы посредством функциональной геномики, а также молекулярная эволюция и дизайн. Корпорация Diversa (доступна в сети интернет на diversa.com) также предоставляет технологию для быстрого скрининга библиотек генов и путей генов, включая в себя, без ограничения, для создания новых путей.

Как правило, неприродную аминокислоту, полученную с помощью разработанного биосинтетического пути согласно настоящему раскрытию, получают в концентрации, достаточной для эффективного биосинтеза белка, включая в себя, без ограничения, природное клеточное количество, но не в такой степени, чтобы влиять на концентрацию других аминокислот или выделение клеточных ресурсов. Типичные концентрации, полученные *in vivo* таким образом, составляют от приблизительно 10 мМ до приблизительно 0,05 мМ. Как только клетка трансформируется плазмидой, содержащей гены, используемые для получения ферментов, желательных для конкретного пути, и производится неприродная аминокислота, необязательно применяются селекции *in vivo* для дальнейшей оптимизации производства неприродной аминокислоты для синтеза рибосомального белка и клеточного роста.

V. Получение in vivo модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих неканонические аминокислоты

Модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию могут быть получены *in vivo* с использованием модифицированных тРНК и тРНК-синтетаз для добавления или замены аминокислот, которые не кодируются в природных системах. Такие способы описаны в патенте США № 8012931, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Способы получения тРНК и тРНК-синтетаз, в которых используются неканонические аминокислоты, описаны, например, в патентах США № 7045337 и 7083970, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Эти способы предусматривают создание трансляционной машины, которая функционирует независимо от синтетаз и тРНК, эндогенных по отношению к трансляционной системе

(и поэтому их иногда называют «ортогональными»). Как правило, трансляционная система содержит ортогональную тРНК (О-тРНК) и ортогональную аминоацил-тРНК-синтетазу (O-RS). Как правило, O-RS предпочтительно аминоацилирует О-тРНК по меньшей мере с одной не встречающейся в природе аминокислотой в трансляционной системе, и О-тРНК распознает по меньшей мере один селекторный кодон, который не распознается другими тРНК в системе. Таким образом, трансляционная система вставляет неканоническую аминокислоту в белок, производимый в системе, в ответ на кодирующий селекторный кодон, тем самым «замещая» аминокислоту в положении в кодируемом полипептиде.

Применение О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетаз предусматривает селекцию специфического кодона, который кодирует неканоническую аминокислоту. Хотя может быть использован любой кодон, как правило, желательно выбрать кодон, который редко или никогда не используется в клетке, в которой экспрессируется О-тРНК/аминоацил-тРНК синтетаза. Например, иллюстративные кодоны включают в себя нонсенс-кодон, такой как стоп-кодоны (амбер-, охра- и опал-), кодоны из четырех или более оснований и другие природные кодоны из трех оснований, которые редко используются или не используются.

Конкретный селекторный кодон(ы) может быть введен в соответствующие положения в кодирующей последовательности модифицированного полинуклеотида FGF-21 с использованием способов мутагенеза, известных в настоящей области техники (включая в себя, без ограничения, сайт-специфический мутагенез, кассетный мутагенез, мутагенез селекции с ограничением, и т.д.).

VI. Расположение неканонических аминокислот в модифицированных полипептидах FGF-21

В настоящем раскрытии предполагается включение одной или нескольких неканонических аминокислот в модифицированные полипептиды FGF-21. Одна или несколько неканонических аминокислот могут быть включены в конкретное положение, которое не нарушает активности полипептида. Это может быть достигнуто путем осуществления «консервативных» замен, включающих в себя, без ограничения, замещение гидрофобных аминокислот гидрофобными аминокислотами, объемных аминокислот на объемные аминокислоты, гидрофильных аминокислот на гидрофильные аминокислоты и/или вставку неканонических аминокислот в положение, которое не требуется для активности.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию содержат одну или несколько не встречающихся в природе аминокислот, расположенных в области белка, которая не нарушает структуру полипептида.

Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотная последовательность в описанном в настоящем документе модифицированном полипептиде FGF-21 может содержать по меньшей мере одну неканоническую аминокислоту. По меньшей мере одна неканоническая аминокислота может быть введена в любое положение в аминокислотной последовательности, включая в себя положения, соответствующие аминокислотам 1-181 из SEQ ID NO: 1 или перед положением 1 (т.е. на N-конце) или в положение 182 (т.е. на карбоксильном конце белка) или соответствующие аминокислоты в SEQ ID NO: 2-7 или другой модифицированный полипептид FGF-21 согласно настоящему раскрытию. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 10, 36, 52, 117, 126, 131, 135, 146, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 или 110 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 72, 77, 86, 87, 91, 108, 110, 126, 131 или 146 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неприродная аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может представлять собой производное фенилаланина. Согласно некоторым вариантам осуществления положение, соответствующее аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1, может представлять собой производное фенилаланина. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна неканоническая аминокислота может представлять собой п-ацетил-L-фенилаланин. Согласно некоторым вариантам осуществления положение, соответствующее аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1, может представлять собой п-ацетил-L-фенилаланин. Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 91 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 131 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 108 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих

аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 77 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 72 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 87 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 86 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 126 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 110 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 83 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 146 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 135 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 96 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7). Согласно одному варианту осуществления неприродная аминокислота находится в положении 36 в FGF-21 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислот в SEQ ID NO: 2-7).

Согласно другому варианту осуществления аминокислотная последовательность в описанном в настоящем документе модифицированном полипептиде FGF-21 может содержать неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере одну неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем любой другой из аминокислот 1-181 из SEQ ID NO: 1 или перед положением 1 (то есть на N-конце) или в положении 182 (то есть на карбоксильном конце белка), или соответствующем аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7 или другом раскрытом в настоящем документе модифицированном полипептиде FGF-21. Согласно другому варианту осуществления по меньшей мере одна другая неканоническая аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 10, 36, 52, 117, 126, 131, 135, 146, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 или

110 в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту осуществления по меньшей мере одна другая неканоническая аминокислота может находиться в положении, соответствующем аминокислоте 91 или 131 в SEQ ID NO: 1.

Согласно другому варианту осуществления существует неприродная аминокислота в положении 91 и одна или несколько других неприродных аминокислот в одном или нескольких следующих положений: положение, соответствующее любой другой аминокислоте 1-181 из SEQ ID NO: 1 или перед положением 1 (то есть на N-конце) или в положении 182 (т.е. на карбоксильном конце белка) или соответствующих аминокислотах в SEQ ID NO: 2-7 или другом модифицированном полипептиде FGF-21 согласно настоящему раскрытию. Согласно другому варианту осуществления существует неприродная аминокислота в положении 91 и одна или несколько других неприродных аминокислот в одном или нескольких из следующих положений: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 и 36 (положение аминокислот, соответствующее SEQ ID NO: 1 или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7).

Согласно другому варианту осуществления существует неприродная аминокислота 131 и одна другая неприродная аминокислота в одном или нескольких из следующих положений: положение, соответствующее любой другой аминокислоте 1-181 из SEQ ID NO: 1 или перед положением 1 (т.е. на N-конце), или в положении 182 (т.е. на карбоксильном конце белка), или соответствующее аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7 или другом модифицированном полипептиде FGF-21. Согласно другому варианту осуществления существует неприродная аминокислота в положении 131 и одна другая неприродная аминокислота в одном или нескольких из следующих положений: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 и 36 (положение аминокислот, соответствующее SEQ ID NO: 1, или соответствующим аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7).

Согласно другому варианту осуществления аминокислотная последовательность в описанном в настоящем документе модифицированном полипептиде FGF-21 может содержать неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем остатку 108 в SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере две другие неканонические аминокислоты в положениях, соответствующих по меньшей мере двум из следующих аминокислот SEQ ID NO: 1: положении, соответствующем любой другой из аминокислот 1-181 из SEQ ID NO: 1 или перед положением 1 (то есть на N-конце), или в положении 182 (т.е. на карбоксильном конце белка), или соответствующее аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7 или другому модифицированному полипептиду FGF-21 согласно настоящему раскрытию. Согласно другому варианту осуществления аминокислотная

последовательность в описанном в настоящем документе модифицированном полипептиде FGF-21 может содержать неканоническую аминокислоту в положении, соответствующем аминокислоте 108 в SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере две другие не встречающиеся в природе аминокислоты в положениях, соответствующих по меньшей мере двум из следующих аминокислот в SEQ ID NO: 1: 10, 36, 52, 117, 126, 131, 135, 146, 162, 87, 77, 83, 72, 69, 79, 91, 96, 108 или 110 в SEQ ID NO: 1.

Согласно другому варианту осуществления существует неприродная аминокислота в положении 77 и одна другая неприродная аминокислота в одном или нескольких из следующих положений: положение, соответствующее любой другой аминокислоте 1-181 из SEQ ID NO: 1 или перед положением 1 (т.е. на N-конце) или в положении 182 (т.е. на карбоксильном конце белка), или соответствующее аминокислотам в SEQ ID NO: 2-7 или другом модифицированном полипептиде FGF- 21. Согласно другому варианту осуществления существует неприродная аминокислота в положении 77 и одна другая неприродная аминокислота в одном или нескольких из следующих положений: 131, 108, 77, 72, 87, 86, 126, 110, 83, 146, 135, 96 и 36 (SEQ ID NO: 1 или соответствующих аминокислотах SEQ ID NO: 2-7).

VII. Экспрессия у неэукариот и эукариот

Системы экспрессии, культивирование и выделение

Немодифицированные или модифицированные полипептиды FGF-21 могут экспрессироваться в любом количестве подходящих систем экспрессии, включая в себя, например, дрожжи, клетки насекомых, клетки млекопитающих и бактерии. Ниже приведено описание иллюстративных систем экспрессии.

Дрожжи: Используемый в настоящем документе термин «дрожжи» включает в себя любые из различных дрожжей, способных экспрессировать ген, кодирующий модифицированный полипептид FGF-21.

Особый интерес для применения в настоящем раскрытии представляют виды в пределах родов *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* и *Candida*, включая в себя, без ограничения, *P. pastoris*, *P. guillerimondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa* и *H. polymorpha*. В публикации международной заявки WO 2005/091944, включенной в настоящий документ посредством ссылки, описывается экспрессия FGF-21 у дрожжей.

Инфицированные бакуловирусом клетки насекомых. Термин «насекомое-хозяин» или «клетка насекомого-хозяин» относится к насекомому, которое может быть или было

использовано в качестве реципиента для рекомбинантных векторов или другой переносимой ДНК. Термин включает в себя потомство исходной клетки насекомого-хозяина, которое было трансфицировано. Понятно, что потомство отдельной родительской клетки может не обязательно быть полностью идентичным по морфологии или по геномной или общей ДНК, комплементарной исходному родителю из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомство родительской клетки, которое в достаточной степени сходно с родителем, которое характеризуется соответствующим свойством, таким как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей модифицированный полипептид FGF-21, включено в потомство, предназначенное для этого определения.

Виды *E. Coli, Pseudomonas* и другие прокариоты:

Термин «бактериальный хозяин» или «бактериальная клетка-хозяин» относится к бактерии, которая может быть или была использована в качестве реципиента для рекомбинантных векторов или другой переносящей ДНК. Термин включает в себя потомство исходной бактериальной клетки-хозяина, которая была трансфицирована. Понятно, что потомство отдельной родительской клетки может не обязательно быть полностью идентичным по морфологии или по геномной или общей ДНК, комплементарной исходному родителю из-за случайной или преднамеренной мутации. Потомство родительской клетки, которое в достаточной степени сходно с родителем, которое характеризуется соответствующим свойством, таким как присутствие нуклеотидной последовательности, кодирующей немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21, включено в потомство, предназначенное для этого определения.

При отборе бактериальных хозяев для экспрессии, подходящие хозяева могут включать те, которые, как было показано, обладают, среди прочего, хорошей способностью образования телец включения, низкой протеолитической активностью и общей устойчивостью. В промышленном/фармацевтическом брожении, как правило, применяют бактерии, полученные из штаммов K (например, W3110) или бактерий, полученных из штаммов B (например, BL21). Другие примеры подходящих хозяев *E.coli* включают в себя, без ограничения, штаммы BL21, DH10B или их производные. Согласно другому варианту осуществления способов настоящего изобретения хозяин *E.coli* представляет собой штамм протеаза-минус, включая в себя, без ограничения, OMP- и LON-. Штамм клеток-хозяев может представлять собой вид *Pseudomonas*, включая в себя, без ограничения, *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa и Pseudomonas*

putida. Известно, что *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, обозначенный штаммом MB101, применим для рекомбинантного производства и доступен для терапевтических процессов получения белка.

После того как был создан штамм рекомбинантных клеток-хозяев (т.е. экспрессирующая конструкция была введена в клетку-хозяина, и выделены клетки-хозяева с надлежащей экспрессирующей конструкцией), рекомбинантный штамм клеток-хозяев культивируют в условиях, подходящих для получения модифицированных полипептидов FGF-21.

Рекомбинантные клетки-хозяева могут быть культивированы в периодическом или непрерывном форматах с использованием либо сбора клеток (в случае, когда модифицированный полипептид FGF-21 накапливается внутри клетки), либо сбора культурального супернатанта в периодическом или непрерывном форматах.

Модифицированные полипептиды FGF-21, производимые в бактериальных клетках-хозяевах, могут быть плохо растворимыми или нерастворимыми (в форме телец включения). Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения аминокислотные замены могут быть легко получены в модифицированном полипептиде FGF-21, который выбран с целью повышения растворимости рекомбинантно производимого белка. Модифицированный полипептид FGF-21 может быть солюбилизирован, например, с помощью мочевины или гидрохлорида гуанидина.

В случае растворимого модифицированного белка FGF-21, FGF-21 может секретироваться в периплазматическое пространство или в культуральную среду. Например, модифицированный FGF-21 секретируется в периплазматическое пространство клеток W3110-B2, используя плазмиды, кодирующие конструкции, включая в себя восемь различных лидерных последовательностей, включая последовательности, перечисленные в SEQ ID NO: 39-44, и трансформируя их в клетки W3110-B2, клетки затем выращивали при 37°C до тех пор, пока OD не достигало приблизительно 0,8, и в этот момент экспрессия индуцировалась 0,01% арабинозой. Через пять часов высвобожденные образцы периплазмы могут быть приготовлены из культур. Кроме того, растворимый модифицированный FGF-21 может присутствовать в цитоплазме клеток-хозяев. Может быть желательным сконцентрировать растворимый модифицированный FGF-21 до выполнения стадий очистки.

Когда модифицированный полипептид FGF-21 производится в виде слитого белка, последовательность слияния может быть удалена. Удаление последовательности слияния может быть осуществлено посредством ферментативного или химического

расщепления. Ферментативное удаление последовательностей слияния может быть осуществлено с использованием способов, известных специалистам в настоящей области техники. Выбор фермента для удаления последовательности слияния может быть определен идентичностью слияния, и условия реакции могут быть определены выбором фермента, как будет очевидно для специалиста в настоящей области техники. Химическое расщепление может быть осуществлено с использованием реагентов, известных специалистам в настоящей области техники, включая в себя, без ограничения, цианогенбромид, TEV-протеазу и другие реагенты. Расщепленный модифицированный полипептид FGF-21 может быть очищен от расщепленной последовательности слияния способами, известными специалистам в настоящей области техники.

В общем случае иногда желательно денатурировать и уменьшать экспрессированные полипептиды, а затем вызывать рефолдинг полипептидов в предпочтительную конформацию. Например, гуанидин, мочевина, DTT, DTE и/или шаперонин могут быть добавлены к представляющему интерес продукту трансляции. Белки могут быть подвергнуты рефолдингу в редокс-буфере, содержащем, без ограничения, окисленный глутатион и L-аргинин. Реагенты рефолдинга могут протекать или иным образом вступать в контакт с одним или несколькими полипептидами или другим продуктом экспрессии или наоборот.

В случае прокариотического производства модифицированного полипептида FGF-21, полученный таким образом модифицированный полипептид FGF-21 может быть неправильно уложен и, таким образом, характеризоваться пониженной биологической активностью или лишиться ее. Биоактивность белка может быть восстановлена путем «рефолдинга». В общем, неправильно уложенный немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21 подвергается рефолдингу путем солюбилизации (когда модифицированный полипептид FGF-21 также нерастворим), разворачивания и восстановления полипептидной цепи с использованием, например, одного или нескольких хаотропных средств (например, мочевины и/или гуанидина) и восстанавливающего средства, способного восстанавливать дисульфидные связи (например, дитиотреитол, DTT или 2-меркаптоэтанол, 2-ME). Затем при умеренной концентрации хаотропа добавляют окисляющее средство (например, кислород, цистин или цистамин), которое позволяет реформировать дисульфидные связи. Модифицированный полипептид FGF-21 может быть подвергнут рефолдингу с использованием стандартных способов, известных в настоящей области техники, таких как описанные в патентах США № 4511502, 4511503 и 4512922, которые включены в

настоящий документ посредством ссылки. Модифицированный полипептид FGF-21 также может быть уложен вместе с другими белками для образования гетеродимеров или гетеромультимеров.

После рефолдинга модифицированный FGF-21 может быть дополнительно очищен. Очистка модифицированного FGF-21 может быть осуществлена с использованием ряда техник, известных специалистам в настоящей области техники, включая в себя хроматографию с гидрофобным взаимодействием, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию с обращенной фазой, аффинную хроматографию и или любую их комбинацию. Дополнительная очистка может также включать в себя стадию сушки или осаждения очищенного белка.

После очистки модифицированный FGF-21 может быть обменен на различные буферы и/или сконцентрирован любым из множества способов, известных в настоящей области техники, включая в себя, без ограничения, диафильтрацию и диализ. Модифицированный FGF-21, который предусмотрен в виде одного очищенного белка, может подвергаться агрегации и осаждению.

Очищенный модифицированный FGF-21 может быть чистым по меньшей мере на 90% (как измерено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой, ОФ-ВЭЖХ или электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, SDS-PAGE) или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% или более. Независимо от точного численного значения чистоты модифицированного FGF-21, модифицированный FGF-21 является достаточно чистым для использования в качестве фармацевтического продукта или для дополнительного процессинга, такого как конъюгация с водорастворимым полимером, таким как PEG.

Некоторые модифицированные молекулы FGF-21 могут быть использованы в качестве терапевтических средств в отсутствие других активных ингредиентов или белков (за исключением вспомогательных веществ, носителей и стабилизаторов, сывороточного альбумина и т.п.), или они могут образовывать комплексы с другим белком или полимером.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения выход модифицированного FGF-21 после каждой стадии очистки может составлять по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере

приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 99,9% или по меньшей мере приблизительно 99,99% немодифицированного или модифицированного FGF-21 в исходном материале для каждой стадии очистки.

VIII. Экспрессия в альтернативных системах

Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению могут быть экспрессированы с использованием бесклеточной (например, in vitro) трансляционной системы. Трансляционные системы могут быть клеточными или бесклеточными и могут быть прокариотическими или эукариотическими. Клеточные трансляционные системы включают в себя, без ограничения, цельноклеточные препараты, такие как пермеабилизированные клетки или культуры клеток, причем желаемая последовательность нуклеиновой кислоты может быть транскрибирована в мРНК, и мРНК транслирована. Бесклеточные трансляционные системы являются коммерчески доступными, и многие различные типы и системы хорошо известны. Примеры бесклеточных систем включают в себя, без ограничения, прокариотические лизаты, такие как лизаты *Escherichia coli*, и лизаты эукариот, такие как экстракты зародышей пшеницы, лизаты клеток насекомых, лизаты ретикулоцитов кролика, лизаты ооцитов кролика и клеточные лизаты человека. Также доступны мембранные экстракты, такие как экстракты собачьей поджелудочной железы, содержащие микросомальные мембраны, которые могут быть использованы для трансляции секреторных белков.

IX. Высокомолекулярные полимеры, связанные с модифицированными полипептидами FGF-21

Различные модификации описанных в настоящем документе полипептидов из неприродных аминокислот могут быть осуществлены с использованием композиций, способов, техник и стратегий, описанных в настоящем документе. Эти модификации предусматривают включение дополнительной функциональности в неприродный

аминокислотный компонент полипептида, включая в себя, без ограничения, метку; краситель; полимер; водорастворимый полимер; производное полиэтиленгликоля; фотосшиватель; радионуклид; цитотоксическое соединение; лекарственное средство; метку сродства; фотоаффинную метку; реакционноспособное соединение; смолу; второй белок или полипептид или аналог полипептида; антитело или фрагмент антитела; хелатор металла; кофактор; жирную кислоту; углевод; полинуклеотид; ДНК; РНК; антисмысловый полинуклеотид; сахарид; водорастворимый дендример; циклодекстрин; ингибирующую рибонуклеиновую кислоту; биоматериал; наночастицу; спиновую метку; флуорофор, металлсодержащий фрагмент; радиоактивный фрагмент; новую функциональную группу; группу, ковалентно или нековалентно взаимодействующую с другими молекулами; фотозаключенный фрагмент; возбуждаемый актиничным излучением фрагмент; фотоизомеризуемую часть; биотин; производное биотина; аналог биотина; фрагмент, содержащий тяжелый атом; химически расщепляемую группу; фоточувствительную группу; удлиненную боковую цепь; углеродсвязанный сахар; окислительно-восстановительное средство; аминотиокислоту; токсический фрагмент; изотопически меченый фрагмент; биофизический зонд; фосфоресцирующую группу; хемилюминесцентную группу; электронно-плотную группу; магнитную группу; интеркалирующую группу; хромофор; средство переноса энергии; биологически активное средство; детектируемую метку; малую молекулу; квантовую точку; нанотрансмиттер; радионуклеотид; радиопередатчик; нейтрализатор нейтронов или любую комбинацию вышеуказанного или любого другого желаемого соединения или вещества. В качестве иллюстративного неограничивающего примера композиций, способов, техник и стратегий, описанных в настоящем документе, нижеследующее описание будет сфокусировано на добавлении высокомолекулярных полимеров в полипептид с неприродными аминокислотами с пониманием того, что описанные композиции, способы, техники и стратегии к ним также применимы (с соответствующими модификациями, если это необходимо, и для которых специалист в настоящей области техники мог бы сделать с раскрытиями в настоящем документе) для добавления других функциональных возможностей, включая в себя, без ограничения, перечисленные выше.

Широкое разнообразие макромолекулярных полимеров и других молекул можно связать с модифицированными полипептидами FGF-21 по настоящему изобретению для модуляции биологических свойств модифицированного полипептида FGF-21 и/или обеспечения новых биологических свойств модифицированной молекуле FGF-21. Эти

высокомолекулярные полимеры могут быть связаны с модифицированным полипептидом FGF-21 через каноническую аминокислоту, через неканоническую аминокислоту или любой функциональный заместитель природной или неприродной аминокислоты или любой заместитель или функциональную группу, добавленные к природной или неприродной аминокислоте. Молекулярная масса полимера может характеризоваться широким диапазоном, включая в себя, без ограничения, от приблизительно 100 Да до приблизительно 100000 Да или более. Молекулярная масса полимера может составлять от приблизительно 100 Да до приблизительно 100000 Да, включая в себя, без ограничения, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да, 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да, 1000 Да, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да и 100 Да. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 100 Да до приблизительно 50000 Да. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 100 Да до приблизительно 40000 Да. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 1000 Да до приблизительно 40000 Да. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 5000 Да до приблизительно 40000 Да. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярная масса полимера составляет от приблизительно 10000 Да до приблизительно 40000 Да.

Выбранный полимер может быть водорастворимым, так что белок, к которому он присоединен, не осаждается в водной среде, такой как физиологическая среда. Полимер может быть разветвленным или неразветвленным. Для терапевтического применения препарата конечного продукта полимер может представлять собой фармацевтически приемлемый.

Примеры полимеров включают в себя, без ограничения, полиалкиловые эфиры и их алкокси-кэппированные аналоги (например, полиоксиэтиленгликоль, полиоксиэтилен/пропиленгликоль и его метокси- или этокси-кэппированные аналоги, особенно полиоксиэтиленгликоль, последний также известен как полиэтиленгликоль или ПЭГ); дискретный ПЭГ (dPEG); поливинилпирролидоны; поливинилалкиловые эфиры; полиоксазолины, полиалкилоксазолины и полигидроксиалкилоксазолины; полиакриламиды, полиалкилакриламиды и полигидроксиалкилакриламиды (например, полигидроксипропилметакриламид и его производные); полигидроксиалкилакрилаты;

полисиаловые кислоты и их аналоги; гидрофильные пептидные последовательности; полисахариды и их производные, включая в себя декстран и производные декстрана, например, карбоксиметилдекстран, декстрансульфаты, аминодекстран; целлюлозу и ее производные, например, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксиалкилцеллюлозу; хитин и его производные, например, хитозан, сукцинилхитозан, карбоксиметилхитин, карбоксиметилхитозан; гиалуроновую кислоту и ее производные; крахмалы; альгинаты; сульфат хондроитина; альбумин; пуллулан и карбоксиметилпуллулан; полиаминокислоты и их производные, например, полиглутаминовые кислоты, полилизины, полиаспарагиновые кислоты, полиаспартамиды; сополимеры малеинового ангидрида, такие как сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер дивинилэтилового эфира и малеинового ангидрида; поливиниловые спирты; их сополимеры; тройные сополимеры; их смеси и производные вышеуказанного.

При использовании в настоящем документе и при рассмотрении конъюгатов ПЭГ и модифицированного полипептида FGF-21 термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое дает желаемый благоприятный эффект пациенту. Количество может варьировать от одного индивидуума к другому и может зависеть от ряда факторов, включая в себя общее физическое состояние пациента и основную причину состояния, подлежащего лечению. Количество модифицированного полипептида FGF-21, используемого для терапии, дает приемлемую скорость изменения и поддерживает желаемый ответ на благоприятном уровне.

Водорастворимый полимер может быть любой структурной формы, включая в себя, без ограничения, линейную, раздвоенную или разветвленную. Как правило, водорастворимый полимер представляет собой полиалкиленгликоль, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), но могут также использоваться другие водорастворимые полимеры. В качестве примера, ПЭГ используется для описания некоторых вариантов осуществления настоящего раскрытия.

Термин «ПЭГ» широко используется для охвата любой молекулы полиэтиленгликоля без учета размера или модификации на конце ПЭГ и может быть представлен как связанный с модифицированным полипептидом FGF-21 по формуле:

$XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$,

где n равно от 2 до 10000 и X представляет собой H или концевую модификацию, включающую в себя, без ограничения, C_{1-4}-алкил, защитную группу или концевую функциональную группу.

В некоторых случаях ПЭГ, используемый в полипептидах согласно настоящему раскрытию, оканчивается на одном конце гидрокси или метокси, то есть X представляет собой H или CH_3 («метокси ПЭГ»). Альтернативно, ПЭГ может заканчиваться реакционноспособной группой, образуя, таким образом, бифункциональный полимер. Типичные реакционноспособные группы могут включать в себя такие реакционноспособные группы, которые, как правило, используются для взаимодействия с функциональными группами, содержащимися в 20 общих аминокислотах (включая в себя, без ограничения, малеимидные группы, активированные карбонаты (включая в себя, без ограничения, п-нитрофениловый эфир), активированные сложные эфиры (включая в себя, без ограничения, N-гидроксисукцинимид, п-нитрофениловый эфир) и альдегиды), а также функциональные группы, которые являются инертными по отношению к 20 общим аминокислотам, но которые специфически реагируют с комплементарными функциональными группами, присутствующими в неканонических аминокислотах (включая в себя, без ограничения, азидные группы, алкиновые группы). Следует отметить, что другой конец ПЭГ, который показан в вышеуказанной формуле посредством Y, может присоединяться либо непосредственно, либо опосредовано к модифицированному полипептиду FGF-21 через природную или неканоническую аминокислоту. Например, Y может представлять собой амидную, карбаматную или мочевинную связь с аминогруппой (включая в себя, без ограничения, эпсилон-амин лизина или *N*-конец) полипептида. Альтернативно, Y может представлять собой малеимидную связь с тиольной группой (включая в себя, без ограничения, тиольную группу цистеина). Альтернативно, Y может представлять собой связь с остатком, который, как правило, не доступен через 20 общих аминокислот. Например, азидную группу на ПЭГ можно подвергнуть взаимодействию с алкиновой группой на модифицированном полипептиде FGF-21 с образованием продукта циклоприсоединения [3+2] Хьюсгена. Альтернативно, алкиновая группа на ПЭГ может быть подвергнута взаимодействию с азидной группой, присутствующей в неканонической аминокислоте с образованием аналогичного продукта. Согласно некоторым вариантам осуществления сильный нуклеофил (включая в себя, без ограничения, гидразин, гидразид, гидроксиламин, семикарбазид) можно подвергнуть взаимодействию с альдегидной или кетоновой группой, присутствующей в неканонической аминокислоте, с образованием гидразона, оксима или семикарбазона, соответственно, который в некоторых случаях может быть дополнительно восстановлен посредством обработки соответствующим восстанавливающим средством. Альтернативно, сильный нуклеофил может быть введен

в модифицированный полипептид FGF-21 через неканоническую аминокислоту и применяться для взаимодействия предпочтительно с кетоновой или альдегидной группой, присутствующей в водорастворимом полимере.

Может быть использована любая молекулярная масса для ПЭГ, как желательно практически, включая в себя, без ограничения, от приблизительно 100 Дальтон (Да) до 100000 Да или более по желанию (включая в себя, без ограничения, иногда 0,1-50 кДа или 10-40 кДа). Молекулярная масса ПЭГ может характеризоваться широким диапазоном, включая в себя, без ограничения, от приблизительно 100 Да до приблизительно 100000 Да или более. Масса ПЭГ может составлять от приблизительно 100 Да до приблизительно 100000 Да, включая в себя, без ограничения, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да, 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да, 1000 Да, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да и 100 Да. Могут также использоваться ПЭГ с разветвленной цепью, включая в себя, без ограничения, молекулы ПЭГ с молекулярной массой каждой цепи в диапазоне от 1 до 100 кДа (включая в себя, без ограничения, 1-50 кДа или 5-20 кДа). Молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью может составлять, включая в себя, без ограничения, от приблизительно 1000 Да и приблизительно 100000 Да или более. Молекулярная масса каждой цепи ПЭГ с разветвленной цепью может составлять от приблизительно 1000 Да до приблизительно 100000 Да, включая в себя, без ограничения, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да, 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да и 1000 Да. Как правило, по меньшей мере один конец молекулы ПЭГ доступен для реакции с неканонической аминокислотой. Например, производные ПЭГ, содержащие алкиновые и азидные фрагменты для реакции с боковыми цепями аминокислот, могут быть использованы для присоединения ПЭГ к неканоническим аминокислотам, как описано в настоящем документе. Если неканоническая аминокислота содержит азид, тогда ПЭГ может, как правило, содержать либо алкиновый фрагмент, чтобы осуществить образование продукта циклоприсоединения [3+2], либо активированные ПЭГ-частицы (т.е. сложный эфир, карбонат), содержащие фосфиновую группу для осуществления образования амидной связи. Альтернативно, если неканоническая аминокислота содержит алкин, тогда ПЭГ может, как правило, содержать азидный фрагмент для

осуществления образования продукта циклоприсоединения [3+2] Хьюсгена. Если неканоническая аминокислота содержит карбонильную группу, ПЭГ, как правило, может содержать мощный нуклеофил (включая в себя, без ограничения, функциональность гидразида, гидразина, гидроксиламина или семикарбазида) для того, чтобы осуществить образование соответствующих гидразоновых, оксимных и семикарбазоновых связей, соответственно. В других альтернативах можно использовать обратную ориентацию реакционноспособных групп, описанных выше, то есть азидный фрагмент в неканонической аминокислоте можно подвергнуть взаимодействию с производным ПЭГ, содержащим алкин.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 с производным ПЭГ содержит химическую функциональность, которая является реакционноспособной с химической функциональностью, присутствующей на боковой цепи неканонической аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии предусмотрены азидные и ацетиленсодержащие полимерные производные, содержащие водорастворимую основную цепь полимера, характеризующуюся средней молекулярном массой от приблизительно 800 Да до приблизительно 100000 Да. Полимерная основная цепь водорастворимого полимера может представлять собой полиэтиленгликоль. Однако следует понимать, что широкое применение водорастворимых полимеров, включая в себя, без ограничения, полиэтиленгликоль и другие родственные полимеры, включая в себя полидекстран и полипропиленгликоль, также пригодно для использования в раскрытых в настоящем документе полипептидах и что использование термина ПЭГ или полиэтиленгликоль предназначено для охвата и включения всех таких молекул.

Основная цепь полимера может быть линейной или разветвленной. Разветвленные полимерные основные цепи, как правило, известны в настоящей области техники. Как правило, разветвленный полимер содержит центральный фрагмент разветвленного ядра и множество линейных полимерных цепей, связанных с центральным разветвленным ядром. Разветвленный ПЭГ может также быть в форме разветвленного ПЭГ, представленного ПЭГ(--$YCHZ_2)_n$, где Y представляет собой связывающую группу, а Z представляет собой активированную концевую группу, связанную с CH посредством цепочки атомов определенной длины. Еще одна разветвленная форма, боковая ПЭГ, содержит реакционноспособные группы, такие как карбоксил, вдоль основной цепи ПЭГ, а не в конце цепей ПЭГ.

Многие другие полимеры также пригодны для использования в полипептидах согласно настоящему изобретению. Примеры подходящих полимеров включают в себя, без ограничения, другие полиалкиленгликоли, такие как полипропиленгликоль («PPG»), их сополимеры (включая в себя, без ограничения, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля), их терполимеры, их смеси и тому подобного. Хотя молекулярная масса каждой цепи полимерного остова может варьировать, она, как правило, находится в диапазоне от приблизительно 800 Да до приблизительно 100000 Да, часто от приблизительно 6000 Да до приблизительно 80000 Да. Молекулярная масса каждой цепи полимерного остова может составлять от приблизительно 100 Да до приблизительно 100000 Да, включая в себя, без ограничения, 100000 Да, 95000 Да, 90000 Да, 85000 Да, 80000 Да, 75000 Да, 70000 Да, 65000 Да , 60000 Да, 55000 Да, 50000 Да, 45000 Да, 40000 Да, 35000 Да, 30000 Да, 25000 Да, 20000 Да, 15000 Да, 10000 Да, 9000 Да, 8000 Да, 7000 Да, 6000 Да, 5000 Да, 4000 Да, 3000 Да, 2000 Да, 1000 Да, 900 Да, 800 Да, 700 Да, 600 Да, 500 Да, 400 Да, 300 Да, 200 Да и 100 Да.

Водорастворимые полимеры могут быть связаны с описанными в настоящем раскрытии модифицированными полипептидами FGF-21. Водорастворимые полимеры могут быть связаны через неканоническую аминокислоту, включенную в модифицированный полипептид FGF-21, или любую функциональную группу или заместитель неканонической или канонической аминокислоты, или любую функциональную группу или заместитель, добавленный к неканонической или канонической аминокислоте. Альтернативно, водорастворимые полимеры связаны с модифицированным полипептидом FGF-21, содержащим неканоническую аминокислоту, через природную аминокислоту (включая в себя, без ограничения, цистеин, лизин или аминогруппу N-концевого остатка). В некоторых случаях описанные в настоящем раскрытии модифицированные полипептиды FGF-21 содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 неприродных аминокислот, причем одна или несколько неканонических аминокислот связаны с водорастворимым полимером(ами) (включая в себя, без ограничения, ПЭГ и/или олигосахариды). В некоторых случаях модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию дополнительно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более канонических аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами. В некоторых случаях модифицированные полипептиды FGF-21 согласно настоящему раскрытию содержат одну или несколько канонических аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами, и одну или несколько встречающихся в природе аминокислот, связанных с водорастворимыми полимерами. Согласно

некоторым вариантам осуществления водорастворимые полимеры, используемые в настоящем раскрытии, увеличивают период полужизни в сыворотке модифицированного полипептида FGF-21 по сравнению с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 201, тот же самый полипептид FGF-21 без указанного водорастворимого полимера или другое описанное в настоящем документе соединение сравнения.

Число водорастворимых полимеров, связанных с модифицированным полипептидом FGF-21 (то есть степень пегилирования или гликозилирования) согласно настоящему раскрытию, может быть скорректировано с целью обеспечения измененных (включая в себя, без ограничения, увеличенных или уменьшенных) фармакологических, фармакокинетических или фармакодинамических характеристик, таких как период полужизни *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления период полужизни модифицированного FGF-21 увеличивается по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 процентов, в 2 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 11 раз, в 12 раз, в 13 раз, в 14 раз, в 15 раз, в 16 раз, в 17 раз, в 18 раз, в 19 раз, в 20 раз, в 25 раз, в 30 раз, в 35 раз, в 40 раз, в 50 раз или по меньшей мере приблизительно в 100 раз по сравнению с немодифицированным полипептидом.

Производные ПЭГ, содержащие сильную нуклеофильную группу (то есть гидразид, гидразин, гидроксиламин или семикарбазид)

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения модифицированный полипептид FGF-21, содержащий карбонилсодержащую неканоническую аминокислоту, может быть модифицирован производным ПЭГ, которое содержит концевой фрагмент гидразина, гидроксиламина, гидразида или семикарбазида, который связан непосредственно с основной цепью ПЭГ.

Степень и сайты, на которых водорастворимые полимеры связаны с модифицированным полипептидом FGF-21, могут модулировать связывание модифицированного полипептида FGF-21 с рецептором полипептида FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления связи могут быть расположены таким образом, что модифицированный полипептид FGF-21 связывает рецептор полипептида FGF-21 с K_d приблизительно 400 нМ или менее, с K_d 150 нМ или менее, а в некоторых случаях с K_d 100 нМ или менее, как измерено с помощью анализа равновесного связывания, такого как описанный в Spencer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:7862-7867 (1988), для модифицированного FGF-21.

Способы и химия для активации полимеров, а также для конъюгирования пептидов описаны в литературе и известны в настоящей области техники. Обычно используемые способы активации полимеров включают в себя, без ограничения, активацию функциональных групп цианогенбромидом, периодатом, глутаральдегидом, бипоксидами, эпихлоргидрином, дивинилсульфоном, карбодиимидом, сульфонилгалогенидами, трихлортриазином и т.д. Пегилирование (т.е. добавление любого водорастворимого полимера) модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих неканоническую аминокислоту, такую как п-азидо-L-фенилаланин, можно осуществлять любым подходящим способом, таким как описанный в патенте США № 8012931, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Водорастворимый полимер, связанный с аминокислотой модифицированного полипептида FGF-21 согласно настоящему раскрытию, может быть дополнительно дериватизирован или замещен без ограничений.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения модифицированный полипептид FGF-21 может быть модифицирован производным ПЭГ, которое содержит азидный фрагмент, который может вступать в реакцию с алкиновым фрагментом, присутствующим на боковой цепи неканонической аминокислоты. В общем случае производные ПЭГ могут характеризоваться средней молекулярной массой в диапазоне от 1 до 100 кДа, а согласно некоторым вариантам осуществления - от 10 до 40 кДа.

Согласно некоторым вариантам осуществления производное ПЭГ на азидном конце может характеризоваться структурой:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$,

где R представляет собой простой алкил (метил, этил, пропил и т. д.), m равно 2-10 и n равно 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса составляет от 5 до 40 кДа).

Согласно другому варианту осуществления производное ПЭГ на азидном конце может характеризоваться структурой:

$RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$,

где R представляет собой простой алкил (метил, этил, пропил и т. д.), m равно 2-10, p равно 2-10 и n равно 100-1000 (т.е. средняя молекулярная масса составляет от 5 до 40 кДа).

Согласно другому варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированный полипептид FGF-21, содержащий алкинсодержащую аминокислоту, может быть дополнительно модифицирован с помощью разветвленного ПЭГ-

производного, которое содержит концевой азидный фрагмент, причем каждая цепь разветвленного ПЭГ характеризуется распределением молекулярных масс от 10 до 40 кДа и может составлять от 5 до 20 кДа. Например, согласно некоторым вариантам осуществления производное ПЭГ на азидном конце может характеризоваться следующей структурой:

$[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pN_3$,

где R представляет собой простой алкил (метил, этил, пропил и т. д.), m равно 2-10, p равно 2-10 и n равно 100-1000, а X необязательно представляет собой O, N, S или карбонильную группу (C=O), в каждом случае, который может присутствовать или отсутствовать.

Согласно другому варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированный полипептид FGF-21 может быть модифицирован производным ПЭГ, которое содержит алкиновый фрагмент, который может вступать в реакцию с азидным фрагментом, присутствующим на боковой цепи неканонической аминокислоты.

Согласно другому варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированный полипептид FGF-21 может быть модифицирован производным ПЭГ, которое содержит активированную функциональную группу (включая в себя, без ограничения, сложный эфир, карбонат), кроме того, содержащую арилфосфиновую группу, которая может вступать в реакцию с азидным фрагментом, присутствующим на боковой цепи неканонической аминокислоты.

Модифицированный полипептид FGF-21 может быть конъюгирован с гидразид-содержащим ПЭГ с помощью следующих иллюстративных способов. Модифицированный полипептид FGF-21, включающий карбонилсодержащую аминокислоту (такую как pAcF), может быть получен в соответствии с описанной выше процедурой. После модификации гидразид-содержащий ПЭГ, характеризующийся следующей структурой, может конъюгировать с модифицированным полипептидом FGF-21:

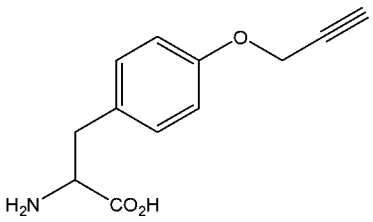
$R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-X-NH-NH_2$,

где, например, R представляет собой метил, n=2 и N = 10000 MM, и X представляет собой карбонильную (C=O) группу. Очищенный модифицированный FGF-21, содержащий п-ацетилфенилаланин, растворяют в концентрации 0,1-10 мг/мл в 25 мМ MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 6,0, 25 мМ Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) PH 7,0 или в 10 мМ ацетата натрия (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4,5,

подвергают взаимодействию с избытком в 1-100 раз содержащего гидразид ПЭГ, и соответствующий гидразон восстанавливают *in situ* путем добавления исходного 1M $NaCNBH_3$ (Sigma Chemical, St. Louis, MO), растворенного в H_2O до конечной концентрации 10-50 мМ. Реакции проводят в темноте при температуре от 4°C до комнатной температуры в течение 18-24 часов. Реакции останавливают добавлением 1 М Трис (Sigma Chemical, St. Louis, MO) при pH приблизительно 7,6 до конечной концентрации Триса 50 мМ или разбавляют в подходящем буфере для немедленной очистки.

Введение алкиносодержащей аминокислоты в модифицированный полипептид FGF-21 Ofan и дериватизация с МПЭГ-азидом

Модифицированные полипептиды FGF-21, содержащие алкинсодержащую аминокислоту, могут быть получены и могут быть дериватизированы МПЭГ-азидом посредством следующих иллюстративных способов. Выбранное положение можно заменить следующей неканонической аминокислотой:



Последовательности, используемые для сайт-специфического введения п-пропаргилтирозина в модифицированный FGF-21, могут представлять собой описанные выше SEQ ID NO: 1 (FGF-21), SEQ ID NO: 16 или 17 (muttRNA, *M. Jannaschii* mtRNA $^{Tyr}_{CUA}$), 22, 23 или 24. Модифицированный полипептид FGF-21, содержащий пропаргилтирозин, может быть экспрессирован в *E. coli* и очищен с использованием описанных выше условий для очистки модифицированного полипептида FGF-21, содержащего карбонилсодержащую аминокислоту.

Очищенный модифицированный FGF-21, содержащий пропаргил-тирозин, растворенный в концентрации 0,1-10 мг/мл в PB-буфере (100 мМ фосфат натрия, 0,15 М NaCl, pH 8), и избыток в 10-1000 раз азид-содержащего ПЭГ добавляют к реакционной смеси. Затем к реакционной смеси добавляют каталитическое количество $CuSO_4$ и Cu-проволоки. После инкубации смеси (включая в себя, без ограничения, приблизительно 4 часа при комнатной температуре или 37°C или в течение ночи при 4°C) добавляют H_2O и смесь фильтруют через диализную мембрану. Образец можно проанализировать, чтобы подтвердить выход.

X. Слитые белки, содержащие модифицированные полипептиды FGF-21

В настоящем раскрытии также предусмотрены модифицированные полипептиды FGF-21 или их фрагменты, содержащие модифицированную последовательность полипептида FGF-21 и партнера по слиянию. Партнер по слиянию может придавать функциональное свойство, включая в себя, без ограничения, удлинение периода полужизни, облегчение очистки и/или производства белка, улучшенные биофизические свойства, такие как повышение растворимости или стабильности и снижение иммуногенности или токсичности, или любую другую цель. Например, слитый белок может проявлять удлиненный период полужизни in vivo, тем самым облегчая менее частое дозирование (такое как дозирование два раза в неделю, один раз в неделю или один раз в две недели и т.д.) в терапевтической схеме лечения. Иллюстративные слитые белки содержат модифицированный FGF-21, слитый с партнером по слиянию, таким как альбумин (например, сывороточный альбумин человека), удлиняющий PK (PKE) аднектин, XTEN, Fc-домен или фрагмент любого из вышеперечисленных или комбинация любого из вышеперечисленных. Слитый белок может быть получен путем экспрессии нуклеиновой кислоты, которая кодирует модифицированную последовательность полипептида FGF-21 и последовательность партнера по слиянию в одной и той же рамке считывания, необязательно разделенную последовательностью, кодирующей связывающий пептид. Слитый белок может содержать модифицированный полипептид FGF-21 и партнера по слиянию в любом порядке, например, один или несколько партнеров по слиянию, связанные с N-концом и/или C-концом последовательности модифицированного полипептида FGF-21, или один или несколько партнеров по слиянию, связанных как с N-концом, так и с C-концом.

Слияние может быть образовано присоединением партнером по слиянию к любому концу (т. е. к N- или C-концу) модифицированного полипептида FGF-21, то есть группировки партнер по слиянию-модифицированный FGF-21 или модифицированный FGF-21-партнер по слиянию. Кроме того, модифицированный полипептид FGF-21 может быть слит с одним или несколькими партнерами по слиянию на обоих концах, необязательно с соединительным пептидом на одном конце или с обоих концов. Согласно некоторым вариантам осуществления партнер по слиянию и модифицированный FGF-21 сливают через связывающий пептид. Иллюстративные связывающие пептиды могут содержать или состоять из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 74-100, 301 и 350-383 или комбинации вышеприведенных (например, двух, трех или более из вышеприведенных последовательностей). Иллюстративные

связывающие пептиды могут составлять в длину от 0 (то есть, связывающий пептид отсутствует) до 100 или более аминокислот, например, по меньшей мере от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и до 60, 50, 40, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислот. Иллюстративные неограничивающие длины связывающего пептида включают в себя от 1 до 100 аминокислот, от 1 до 40 аминокислот, от 1 до 20 аминокислот, от 1 до 10 аминокислот или от 3 до 5 аминокислот.

Модифицированный полипептид FGF-21 или его фрагмент может быть получен в виде слитого белка, содержащего сывороточный альбумин человека (HSA) или его часть. Такие конструкции слияния могут быть подходящими для усиления экспрессии модифицированного FGF-21 или его фрагмента в эукариотической клетке-хозяине, такой как CHO, или в бактерии, такой как E. coli. Иллюстративные части HSA включают в себя N-концевой полипептид (аминокислоты 1-369, 1-419 и промежуточные длины, начинающиеся с аминокислоты 1), как описано в патенте США № 5766883 и публикации PCT WO 97/24445, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок может содержать белок HSA с модифицированным FGF-21 или его фрагментами, присоединенными к каждому из C- и N-концов HSA. Иллюстративные конструкции HSA раскрыты в патенте США № 5876969, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Иллюстративные способы экспрессии FGF-21 у млекопитающих описаны в публикации международной заявки WO 2005/091944, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированный полипептид FGF-21 может быть слит с молекулой XTEN. Молекулы XTEN также упоминаются как неструктурированные рекомбинантные полимеры, неструктурированные рекомбинантные полипептиды (URP) и, как правило, описаны в Schellenberger et al., Nat Biotechnol., 2009 Dec;27(12):1186-90, патентной публикации США № 2012/0220011, патенте США № 7846445 и публикации международной заявки WO/2012/162542, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Период полужизни модифицированного полипептида FGF-21 можно варьировать, варьируя конституцию молекулы XTEN, например, варьируя ее размер. Например, молекула XTEN может быть выбрана для достижения желаемого периода полужизни, например, в диапазоне от 1 до 50 часов, например, по меньшей мере 1, 2, 5, 10, 12, 15, 20 или 25 часов или дольше.

Иллюстративные молекулы XTEN включают в себя URP, содержащий по меньшей мере 40 смежных аминокислот, причем: (a) URP содержит по меньшей мере

три различных типа аминокислот, выбранных из группы, состоящей из остатков глицина (G), аспартата (D), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), причем сумма указанной группы аминокислот, содержащихся в URP, составляет более чем приблизительно 80% от общего количества аминокислот URP и причем указанный URP содержит более одного остатка пролина, и причем указанный URP обладает пониженной чувствительностью к протеолитической деструкции по отношению к соответствующему URP, у которого отсутствует указанный более чем один остаток пролина; (b) по меньшей мере 50% аминокислот указанного URP лишены вторичной структуры, как определено алгоритмом Chou-Fasman; и (c) показатель, рассчитанный с помощью программы Tepitope, указанного URP составляет менее -5. Дополнительные иллюстративные молекулы XTEN содержат неструктурированный рекомбинантный полимер (URP), содержащий по меньшей мере приблизительно 40 смежных аминокислот, и причем (a) сумма остатков глицина (G), аспартата (D), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), содержащихся в URP, составляет по меньшей мере 80% от общего количества аминокислот URP, а остальная часть, если присутствует, состоит из аргинина или лизина, и остальная часть не содержит метионин, цистеин, аспарагин и глутамин, причем указанный URP содержит по меньшей мере три различных типа аминокислот, выбранных из глицина (G), аспартата (D), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P); (b) по меньшей мере 50% по меньшей мере из 40 смежных аминокислот в указанном URP лишены вторичной структуры, как определено алгоритмом Chou-Fasman; и (c) причем URP характеризуется показателем, рассчитанным с помощью программы Tepitope, менее -4.

Дополнительные иллюстративные молекулы XTEN включают в себя молекулы rPEG. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула rPEG может не включать в себя гидрофобный остаток (например, F, I, L, M, V, W или Y), остаток, содержащий амид боковой цепи (например, N или Q), или остаток с положительно заряженной боковой цепью (например, H, K или R). Согласно некоторым вариантам осуществления rPEG может включать в себя A, E, G, P, S или T. Согласно некоторым вариантам осуществления rPEG может включать в себя 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-99% глицина или даже 100% глицина.

Указанная молекула XTEN может быть дополнительно присоединена к полиэтиленгликолю.

Термин «PAS» и/или «ПАСилирование» относится к генетическому слиянию представляющего интерес биофармацевтического белка, такого как модифицированный

полипептид FGF-21, с конформационно-неупорядоченной полипептидной последовательностью, состоящей из аминокислот Pro, Ala и Ser (отсюда термин «полипептид PAS» и «ПАСилирование»). ПАСилирование может увеличить период полужизни в сыворотке, повысить растворимость, стабильность и/или резистентность к протеазе и/или понизить иммуногенность представляющего интерес белка, т.е. слитого белка (для справки смотрите публикацию международной заявки WO2008155134 A1 и патент США US20140073563, которые включены в настоящий документ посредством ссылки). Последовательности PAS могут быть присоединены посредством слияния генов с N-концом, C-концом или обоими концами аминокислотной последовательности модифицированного полипептида FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид PAS может содержать по меньшей мере два домена, содержащие аминокислотную последовательность, состоящую по меньшей мере из 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более аминокислотных остатков, образуя неупорядоченную конформацию и причем указанный второй домен содержит остатки аланина, серина и пролина, причем указанная неупорядоченная конформация опосредует повышенную стабильность in vivo и/или in vitro биофармацевтического белка, с которым слит полипептид PAS. Согласно некоторым вариантам осуществления второй домен, содержащий остатки аланина, серина и пролина, может быть выбран из ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 310); AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 311); APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 312), SAPSSPSPSAPPSPSPASPS (SEQ ID NO: 313), SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO: 314), AASPAAPSAPPASASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 315) и ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 316). Полипептид PAS может содержать один или несколько сайтов для ковалентной модификации.

Согласно иллюстративным вариантам осуществления модифицированный FGF-21 слит с аднектином, например, с альбуминсвязывающим или PKE аднектином. Иллюстративные аднектины раскрыты в патентной публикации США № 2011/0305663, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Указанный аднектин может быть основан на десятом домене фибронектина типа III и может связываться с сывороточным альбумином. Указанный аднектин может содержать одну или несколько петель BC, содержащих аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, петлю DE, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, и петлю FG, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, или содержит

полипептид, выбранный из SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 и 52-72, или содержит полипептид, который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 или 52-72, которые соответственно соответствуют последовательностям SEQ ID NOS 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20 и 24-44 патента США № 2011/0305663.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированный полипептид FGF-21 может быть слит с доменом Fc иммуноглобулина («домен Fc») или его фрагментом или вариантом, таким как функциональная область Fc. Функциональная область Fc связывается с FcRn, но не обладает эффекторной функцией. Способность области Fc или ее фрагмента связываться с FcRn может быть определена с помощью стандартных анализов связывания, известных в настоящей области техники. Иллюстративные «эффекторные функции» включают в себя связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; (например, рецептор B-клеток, BCR) и т.д. Такие эффекторные функции могут быть оценены с использованием различных анализов, известных в настоящей области техники для оценки таких эффекторных функций антител.

Согласно приблизительному варианту осуществления домен Fc получают из подкласса IgG1, однако могут также использоваться другие подклассы (например, IgG2, IgG3 и IgG4). Ниже показана иллюстративная последовательность домена Fc иммуноглобулина IgG1 человека:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 302)

Согласно некоторым вариантам осуществления область Fc, используемая в слитом белке, может содержать шарнирную область молекулы Fc. Иллюстративная шарнирная область содержит остатки шарнира ядра, охватывающие положения 1-16 (то есть DKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 303)) приведенной выше иллюстративной последовательности домена Fc иммуноглобулина IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления слитый белок может принимать мультимерную структуру (например, димер), частично благодаря остаткам цистеина в положениях 6 и 9 в области

шарнира приведенной выше иллюстративной последовательности домена Fc иммуноглобулина IgG1 человека. Согласно другим вариантам осуществления используемая в настоящем документе шарнирная область может дополнительно включать в себя остатки, полученные из областей CH1 и CH2, которые фланкируют шарнирную последовательность ядра иллюстративной последовательности домена Fc иммуноглобулина IgG1 человека. Согласно еще другим вариантам осуществления шарнирная последовательность может содержать или состоять из GSTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 304).

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность петли может включать в себя одну или несколько замен, которые придают желаемые фармакокинетические, биофизические и/или биологические свойства. Некоторые иллюстративные последовательности петли включают в себя EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 305), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 306), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 307), DKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 308) и DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 309). Согласно одному варианту осуществления остаток P в положении 18 иллюстративной последовательности домена Fc иммуноглобулина IgG1 человека, представленной выше, может быть заменен на S для удаления эффекторной функции Fc; это замещение проиллюстрировано примерами шарниров, характеризующихся последовательностями EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 306), EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 307) и DKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 309). Согласно другому варианту осуществления остатки DK в положениях 1-2 приведенной выше иллюстративной последовательности домена Fc иммуноглобулина IgG1 человека могут быть заменены на GS для удаления потенциального участка клиппирования; эта замена проиллюстрирована в последовательности EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 307). Согласно другому варианту осуществления C в положении 103 константной области тяжелой цепи IgG1 человека (то есть доменов CH_1--CH_3) можно заменить на S, чтобы предотвратить образование несобственной цистеиновой связи в отсутствие легкой цепи; это замещение проиллюстрировано примерами последовательностей EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS (SEQ ID NO: 305), EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 306) и EPKSSGSTHTCPPCPAPELLGGSS (SEQ ID NO: 307).

Дополнительные иллюстративные последовательности Fc включают в себя следующие:

hIgG1a_191 [Подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

(SEQ ID NO: 323)

hIgG1a_189 [hIgG1a_191 без «GK» на C-конце; подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

(SEQ ID NO:324)

hIgG1a_191b [Подтип A/F]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO:325)

hIgG1f_1.1_191 [Содержит 5 точечных мутаций для изменения функции ADCC, подтип F]

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

(SEQ ID NO:326)

hIgG1f_1.1_186 [Содержит 5 точечных мутаций для изменения функции ADCC и C225S (нумерация Edlemen); подтип F]

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:327)

hIgG1a_(N297G)_191 [Подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:328)

hIgG1a_190 [hIgG1a_190 без «K» на C-конце; подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G (SEQ ID NO:329)

hIgG1a_(N297Q)_191 [Подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:330)

hIgG1a_(N297S)_191 [Подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:331)

hIgG1a_(N297A)_191 [Подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:332)

hIgG1a_(N297H)_191 [Подтип A]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYHSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:333)

hIgG4

DKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO:334)

hIgG4_(S241P)

DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO:335)

Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 302 и 323-335. Следует понимать, что С-концевой лизин домена Fc представляет собой необязательный компонент слитого белка, содержащего домен Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 302 и 323-335, за исключением того, что С-концевой лизин пропущен. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302. Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302, за исключением того, что ее С-концевой лизин пропущен.

Согласно некоторым вариантам осуществления получают модифицированный полипептид FGF-21, содержащий связывающую альбумин последовательность. Иллюстративные связывающие альбумин последовательности включают в себя, без ограничения, связывающий альбумин домен из стрептококкового белка G (смотрите, например, Makrides *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996) и Sjolander *et al.*, *J, Immunol. Methods* 201:115-123 (1997)) или связывающие альбумин пептиды, такие как описанные, например, в Dennis, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002).

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению ацилируются жирными кислотами. В некоторых случаях жирные кислоты способствуют связыванию с сывороточным альбумином. Смотрите, например, Kurtzhals, *et al.*, *Biochem. J.* 312:725-731 (1995).

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению непосредственно сливают с сывороточным альбумином (включая в себя, без ограничения, человеческий сывороточный альбумин). Специалисты в настоящей области техники поймут, что большое разнообразие других молекул также может быть связано с модифицированным FGF-21 в настоящем раскрытии для модуляции связывания с сывороточным альбумином или другими сывороточными компонентами.

XI. Гликозилирование модифицированных и немодифицированных полипептидов FGF-21

Настоящее раскрытие включает в себя модифицированные полипептиды FGF-21, содержащие одну или несколько неканонических аминокислот, несущих сахаридные остатки. Сахаридные остатки могут быть либо природными (включая в себя, без ограничения, N-ацетилглюкозамин), либо неприродными (включая в себя, без ограничения, 3-фторгалактозу). Сахариды могут быть связаны с неканоническими аминокислотами либо с помощью N- или O-связанной гликозидной связи (включая в себя, без ограничения, N-ацетилгалактозу-L-серин), либо с неприродной связью (включая в себя, без ограничения, оксим или соответствующий C- или S-связанный гликозид).

Сахаридные (включая в себя, без ограничения, гликозильные) фрагменты могут быть добавлены к модифицированным полипептидам FGF-21 либо *in vivo*, либо *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения модифицированный полипептид FGF-21, содержащий карбонилсодержащую неканоническую аминокислоту, может быть модифицирован сахаридом, дериватизированным аминооксигруппой, для получения соответствующего гликозилированного полипептида, связанного посредством оксимной связи. После присоединения к неканонической аминокислоте сахарид может быть дополнительно разработан посредством обработкой гликозилтрансфераз и другими ферментами для получения олигосахарида, связанного с модифицированным полипептидом FGF-21. Смотрите, например, H. Liu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения модифицированный полипептид FGF-21, содержащий карбонилсодержащую неканоническую аминокислоту, может быть непосредственно модифицирован гликаном с определенной структурой, полученной в виде аминооксипроизводного. Другие функциональные группы, включающие в себя азид, алкин, гидразид, гидразин и семикарбазид, могут быть использованы для связывания сахарида с неканонической аминокислотой.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения модифицированный полипептид FGF-21, содержащий неканоническую аминокислоту, содержащую азид или алкинил, затем может быть модифицирован, включая в себя, без ограничения, посредством реакции циклодобавления [3+2] Хьюсгена, включая в себя, без ограничения, алкинильные или азидные производные, соответственно.

XII. Димеры и мультимеры FGF-21

В настоящем раскрытии также предусмотрены комбинации FGF-21 и модифицированных FGF-21, такие как гомодимеры, гетеродимеры, гомомультимеры или гетеромультимеры (то есть тримеры, тетрамеры и т. д.), где модифицированный FGF-21, содержащий один или несколько неканонических аминокислот, связывается с другим FGF-21 или модифицированным FGF-21 или его вариантом или любым другим полипептидом, который не представляет собой FGF-21 или модифицированный FGF-21 или его вариант либо непосредственно с полипептидным остовом, либо через линкер. Из-за его повышенной молекулярной массы по сравнению с мономерами димер FGF-21 или мультимерные конъюгаты могут проявлять новые или желательные свойства, включая в себя, без ограничения, различные фармакологические, фармакокинетические, фармакодинамические свойства, модулированный терапевтический период полужизни или модулированный период полужизни в плазме, по отношению к мономерному FGF-21. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные димеры FGF-21 по настоящему изобретению могут модулировать сигнальную трансдукцию рецептора FGF-21. Согласно другим вариантам осуществления модифицированные димеры FGF-21 или мультимеры согласно настоящему раскрытию могут действовать как антагонист, агонист или модулятор рецептора FGF-21.

XIII. Измерение активности полипептида FGF-21 и аффинности полипептида FGF-21 для рецептора полипептида FGF-21

Было показано, что FGF-21 стимулирует поглощение глюкозы и повышает чувствительность к инсулину в адипоцитах 3T3-L1, модели in vitro, используемой для

изучения метаболизма жировой ткани, как показано в примере 3 патентной публикации США № 20040259780, которая полностью включена посредством ссылки. Характерным признаком сахарного диабета типа 2 является дефицит поглощения глюкозы в различных типах тканей, включая в себя жировую ткань. Таким образом, модифицированный FGF-21 может быть применим для лечения сахарного диабета типа 2 путем снижения содержания глюкозы в крови. Более того, модифицированный FGF-21 может быть применим для лечения ожирения путем увеличения расхода энергии за счет более быстрого и эффективного использования глюкозы. Кроме того, было показано, что FGF-21 стимулирует поглощение глюкозы в адипоцитах 3T3-L1 независимым от инсулина образом, указывая на то, что он также применим для лечения сахарного диабета типа 1. Смотрите патентную публикацию США № 20040259780. Показано, что FGF-21 стимулирует поглощение глюкозы в адипоцитах 3T3-L1 зависимым от концентрации образом при субоптимальной концентрации инсулина (5 нМ) и в отсутствие инсулина в патентной публикации США № 20040259780. Кроме того, FGF-21 индуцирует поглощение глюкозы в модели ткани ex vivo, описанной в патентной публикации США № 20040259780.

Модифицированные полипептиды FGF-21 могут подвергаться анализу на биологическую активность. В целом, тест на биологическую активность должен обеспечивать анализ желаемого результата, такого как увеличение или уменьшение биологической активности, различная биологическая активность, анализ аффинности к рецептору или партнеру по связыванию, конформационные или структурные изменения самого модифицированного FGF-21 или его рецептора или анализ времени полужизни в сыворотке, по сравнению с немодифицированным FGF-21 или другим соединением сравнения, как описано в настоящем документе.

Иллюстративные способы дифференцирования 3T3-L1 на адипоциты и анализ поглощения глюкозы описаны в патенте США № 8012931, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

XIV. Измерение активности, функционального периода полужизни in vivo и фармакокинетических параметров

Один аспект настоящего описания представляет собой длительный биологический период полувыведения, который может быть получен путем конструирования модифицированного полипептида FGF-21, который может быть конъюгирован с водорастворимым полимерным фрагментом или слит с партнером по слиянию. Быстрое снижение концентраций полипептида FGF-21 в сыворотке после

введения делает его терапевтически значимым для оценки биологических реакций на лечение модифицированным полипептидом FGF-21. Модифицированный полипептид FGF-21 по настоящему описанию может характеризоваться пролонгированными периодами полужизни в сыворотке также после введения, например, подкожного или внутривенного введения, делая возможным измерение, например, посредством ELISA или способом первичного скрининга. Измерение биологического времени полужизни in vivo осуществляют, как описано в настоящем документе.

Эффективность и функциональный период полужизни in vivo модифицированного полипептида FGF-21, содержащего внутреннюю делецию и/или неканоническую аминокислоту, можно определить согласно протоколам, известным специалистам в настоящей области техники и описанным в настоящем документе.

В иллюстративном анализе фармакокинетические параметры для описанного в настоящем документе немодифицированного или модифицированного полипептида FGF-21 могут быть оценены у нормальных самцов крыс Sprague-Dawley (N=5 животных на одну обрабатываемую группу). Животные могут получать либо однократную дозу 25 мкг/крыса внутривенно, либо 50 мкг/крыса, и приблизительно 5-7 образцов крови можно отбирать в соответствии с заранее определенным временем, как правило, в течение 6 ч для модифицированного полипептида FGF-21, содержащего неканоническую аминокислоту и не конъюгированного с водорастворимым полимером, и приблизительно 4 дня для модифицированного полипептида FGF-21, содержащего неканоническую аминокислоту и конъюгированного с водорастворимым полимером. Фармакокинетические данные для модифицированного FGF-21 можно сравнить с соединением сравнения, таким как полипептид FGF-21 дикого типа SEQ ID NO: 1, модифицированный полипептид FGF-21 SEQ ID NO: 201, тот же модифицированный FGF-21 с отсутствием внутренней делеции или другим описанным в настоящем документе соединением сравнения.

Фармакокинетические параметры могут также оцениваться у примата, например, у яванских макаков. Как правило, одну инъекцию вводят либо подкожно, либо внутривенно, и содержание сывороточного FGF-21 контролируют с течением времени.

Полипептиды по настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения млекопитающих, страдающих от неинсулинозависимого сахарного диабета (NIDDM: тип 2), инсулинозависимого сахарного диабета (тип 1), а также ожирения, неадекватного клиренса глюкозы, гипергликемии, гиперинсулинемии и т.п. FGF-21 эффективен на животных моделях сахарного диабета и ожирения, как показано в патентной публикации

США № 20040259780, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Поскольку метаболические профили различаются среди различных животных моделей ожирения и сахарного диабета, был проведен анализ нескольких моделей для разделения эффектов гиперинсулинемии, гипергликемии и ожирения. Мыши с сахарным диабетом (db/db) и ожирением (ob/ob) характеризуются массивным ожирением, гиперфагией, переменной гипергликемией, резистентностью к инсулину, гиперинсулинемией и нарушенным термогенезом (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340). Тем не менее, сахарный диабет гораздо более выражен в модели db/db (Coleman, Diabetes 31:1, 1982; E. Shafrir, in Diabetes Mellitus; H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340). Крысы Zucker (fa/fa) страдают серьезным ожирением, гиперинсулинемией и резистентностью к инсулину (Coleman, Diabetes 31: 1, 1982; E. Shafrir, Diabetes Mellitus, H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340), и мутация fa/fa может быть крысиным эквивалентом мышиной мутации db (Friedman et al., Cell 69: 217- 220, 1992. Truett et al., Proc., Nat., Sci., USA 88: 7806, 1991). Мыши Tubby (tub/tub) характеризуются ожирением, умеренной резистентностью к инсулину и гиперинсулинемией без значительной гипергликемии (Coleman et al., J. Heredity 81: 424, 1990).

Модель глутамата мононатрия (MSG) для химически индуцированного ожирения (Olney, Science 164: 719, 1969, Cameron et al., Cli Exp. Pharmacol. Physiol., 5:41, 1978), в которой ожирение менее серьезное, чем в генетических моделях, и развивается без гиперфагии, гиперинсулинемии и резистентности к инсулину. Наконец, стрептозотоциновая модель (STZ) для химически индуцированного сахарного диабета может быть протестирована для изучения эффектов гипергликемии при отсутствии ожирения. Получающие STZ животные характеризуются дефицитом инсулина и тяжелой гипергликемией (Coleman, Diabetes 31: 1, 1982; E. Shafrir, Diabetes Mellitus, H. Rifkin and D. Porte, Jr. Eds. (Elsevier Science Publishing Co., Inc. , New York, ed. 4, 1990), pp. 299-340).

Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению могут быть оценены в in vivo модели септического шока у ob/ob мышей. Смотрите патентную публикацию США № 20050176631, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Способы анализа индуцированного FGF-21 фосфорилирования ERK1/2

Фосфорилирование ERK1/2, индуцируемое FGF-21 (дикого типа или модифицированными полипептидами FGF-21, включая в себя полипептиды, связанные с ПЭГ или другим линкером, полимером или биологически активной молекулой), можно осуществлять посредством следующих иллюстративных способов.

Клетки Seed 293, стабильно трансфицированные человеческим Klotho-бета, помещают в количестве 100000 клеток/лунку (DMEM + 10% FBS) в планшет, покрытый поли-Lys. На следующий день клетки представляют собой на 100% конфлюентные, среду отбирают и заменяют свежей средой, и инкубируют в течение ночи. Через 24 часа клетки стимулируют выбранным немодифицированным или модифицированным FGF-21 или аналогом FGF-21 с использованием в качестве стандарта FGF21WT. Каждое отдельное соединение получают разбавлением их в PBS/1% BSA. Клетки обрабатывают три раза в течение 10 мин при 37°C в инкубаторе. Через 10 мин инкубационные среды тщательно отбирают из каждой лунки, и в каждую лунку добавляют 40 мкл холодного однократного буфера для лизиса клеток, содержащего ингибиторы протеазы/фосфатазы (коктейль PI, Na3VN4 и PMSF) для получения клеточных лизатов. 96-луночный планшет помещают на лед на 20 минут, а затем вращают при 4000 об/мин в течение 10 мин. Клеточные лизаты замораживают при температуре -80°C. Позже каждый образец оттаивают, и 10 мкл клеточных лизатов добавляют к обработанному MSD планшету, покрытому антителом, захватывая как нефосфорилированные, так и фосфорилированные формы ERK1/2. Инкубация с первичным антителом происходит в течение 2 часов, затем планшет несколько раз промывают специальным буфером с последующим добавлением вторичного антитела. Через 1 час инкубационный планшет снова промывают несколько раз. В каждую лунку добавляют буфер для прочтения. Планшет переносят в считывающее MSD устройство. Кривая, которая получается, основана на антифосфорилированных единицах считывания ERK1/2, и EC50 рассчитывают с использованием Sigma Plot. Степень потери активности рассчитывают, посредством деления EC50 исследуемого соединения на EC50 WT.

Определение фармакокинетических свойств модифицированных полипептидов FGF-21 у крыс

Эти иллюстративные способы могут быть использованы для измерения фармакокинетических свойств нативных и модифицированных соединений FGF-21 у катетеризированных крыс. Фармакокинетику исследуемых изделий анализируют с помощью ELISA, специфического для человеческого FGF-21, из образцов сыворотки, полученных в определенные моменты времени после введения лекарственного средства.

Двенадцати (12) самцам крыс Sprague-Dawley (SD), масса которых составляла приблизительно 250-275 граммов в начале исследования, хирургически устанавливали катетеры в яремную вену. Животные находятся в хорошем состоянии и могли приспособиться к месту проведения исследования, по меньшей мере, в течение 3 дней до начала исследования. Крыс можно взвесить в день введения исследуемого изделия. Животные могут быть размещены в стандартных условиях без патогенов со свободным доступом к пище и воде.

Соединения вводят подкожно, например, в количестве 0,25 мг/кг.

Животных взвешивают перед введением исследуемого изделия. Соединения составляют таким образом, чтобы их вводили в дозе 1 на массу тела в мкл. Подкожное введение исследуемого изделия осуществляют в дорсальную лопаточную область. Животные могут получать одну инъекцию исследуемого изделия (время=0). В определенные моменты времени у животных может быть взята цельная кровь, собрана в пробирки для сбора образцов микропланшета SST. Сыворотке можно дать образовать сгусток в течение 30 минут до центрифугирования. Сыворотку можно перенести в полипропиленовые пробирки для титрования, запечатать микрополосками и хранить при -80°C до анализа с помощью ELISA для определения концентраций в сыворотке немодифицированных или модифицированных FGF-21.

Каждое животное может быть использовано для полного курса времени РК. Из яремных венозных катетеров можно извлечь приблизительно 0,25 мл цельной крови. Сразу после сбора крови катетеры можно промыть 0,1 мл физиологического раствора. Следующие моменты времени сбора для животных, получающих материал исследуемых изделий, должны быть выбраны, но могут быть изменены на основе ожидаемого фармакокинетического профиля исследуемых изделий:

До забора крови, через 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72 и 96 часов после введения дозы для каждого исследуемого соединения определяют фармакокинетические параметры, которые могут включать в себя Lambda_z, Lambda_z_lower, Lambda_z_upper, HL_Lambda_z, Tmax, Cmax, C0, AUCINF_obs, Vz_obs, Cl_obs, MRTINF_obs и/или Vss_obs.

Исследования in vivo модифицированного FGF-21 у крыс ZDF

Модифицированный FGF-21, немодифицированный FGF-21 и буферный раствор вводят мышам или крысам. Результаты показывают активность и период полужизни модифицированных полипептидов FGF-21 по настоящему изобретению в сравнении с немодифицированным FGF-21.

В публикации международной заявки WO 2005/091944 описаны фармакокинетические исследования, которые могут быть выполнены с соединениями FGF-21, такими как соединения по настоящему изобретению. Модифицированный полипептид FGF-21 по настоящему изобретению вводят мышам внутривенно или подкожно. У животных берут кровь до введения дозы и в определенные моменты времени после. Плазму собирают из каждого образца и анализируют с помощью радиоиммунологического анализа. Период полуэлиминации можно вычислить и сравнить между модифицированными полипептидами FGF-21, содержащими внутреннюю делецию и/или неканоническую аминокислоту или партнера по слиянию, и FGF-21 дикого типа или различными формами полипептидов FGF-21 по настоящему раскрытию. Аналогично, модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению можно вводить яванским макакам. У животных берут кровь до введения дозы и в определенные моменты времени после. Плазму собирают из каждого образца и анализируют с помощью радиоиммунологического анализа.

Полипептиды согласно настоящему раскрытию можно вводить крысам-самцам ZDF (диабетические жирные крысы, возраст 8 недель в начале исследования, Charles River-GMI). Крыс кормят кормом Purina 5008 не ограниченно. Создаются следующие группы исследования: физиологический раствор; инсулин 4 Ед/день; немодифицированный или модифицированный FGF-21, 500 мкг/день однократно (в группе однократного дозированная введение осуществляет один раз и забор крови проводят в моменты времени T = 0, 2, 4, 8 и 24 часа после введения дозы); немодифицированный или модифицированный FGF-21, 100 мкг/день; немодифицированный или модифицированный FGF-21, 250 мкг/день; немодифицированный или модифицированный FGF-21, 500 мкг/день; немодифицированный или модифицированный FGF-21 (один раз/день) 500 мкг/мл; безжировая группа с солевым раствором; безжировая группа с инсулином 4 Ед/день; безжировая группа с немодифицированным или модифицированным FGF-21 500 мкг/день. Безжировые группы представляют собой недиабетических, худощавых крыс ZDF.

Соединения вводят подкожно (два раза в сутки), за исключением второй группы 500 мкг/день, которая получает одну инъекцию в день на протяжении всего исследования (7 дней). Контрольным крысам вводят носитель (PBS, 0,1 мл). Через 7 дней введения животных подвергают пероральному тесту на толерантность к глюкозе. Кровь для определения глюкозы и триглицеридов собирается посредством кровотечения из

хвостового зажима без анестезии. Модифицированные полипептиды FGF-21 могут снижать содержание глюкозы в плазме зависимым от дозы образом. Кроме того, худощавые крысы ZDF могут не стать гипогликемическими после воздействия модифицированными полипептидами FGF-21 по настоящему изобретению по сравнению с крысами, которым вводили инсулин.

Исследования in vivo модифицированного FGF-21 на *модели ожирения ob/ob*

Мышиная модель ob/ob представляет собой животную модель гипергликемии, резистентности к инсулину и ожирения. Содержание глюкозы в плазме после воздействия немодифицированным или модифицированным полипептидом FGF-21 по сравнению с контрольными группами несущей среды и инсулина, могут быть измерены у мышей ob/ob. В этой модели ожирения исследуемым группам самцов мышей ob/ob (возрастом 7 недель) вводят только одну несущую среду (PBS), инсулин (4 Ед/день) или немодифицированный или модифицированный полипептид FGF-21 (5 мкг/день и 25 мкг/день) подкожно (0,1 мл, два раза в день) в течение семи дней. Кровь собирают посредством кровотечения из хвостового зажима в дни 1, 3 и 7 через 1 час после первого введения соединения, а содержание глюкозы в плазме измеряют с использованием стандартного протокола. Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению стимулируют поглощение глюкозы, если они снижают содержание глюкозы в плазме по сравнению с контрольной группой носителя. Содержание триглицеридов можно сравнить после воздействия модифицированными полипептидами FGF-21 по настоящему изобретению в сравнении с другими молекулами. Полипептид можно вводить мышам посредством множественных доз, непрерывной инфузии или разовой дозы и т. д.

Фармакокинетическая оценка модифицированных полипептидов FGF21:

Фармакокинетические свойства модифицированного FGF-21 с различными сайтами конъюгации ПЭГ оценивают на крысах. Другими изученными параметрами являются MW ПЭГ, а также доза вводимого соединения. Определяется процентная биодоступность.

Все эксперименты на животных проводят в соответствии с протоколами, утвержденными Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных. Самцов (175-300 г) крыс Sprague-Dawley получают из лабораторий Charles River. Крыс размещают отдельно в клетках в комнатах с 12-часовым циклом свет/темнота и акклиматизируют к виварию не менее чем за 3 дня до эксперимента. Животным

предоставляется свободный доступ к сертифицированной пище для грызунов Purina 5001 и воде.

Катетеры хирургическим путем устанавливаются в яремную вену для сбора крови. После успешной проходимости катетера животных разделяют на группы лечения до введения дозы. Одну дозу соединения вводят внутривенно или подкожно в объеме дозы 1 мл/кг. Концентрацию доз соединений получают путем разбавления в PBS с использованием концентрации исходного раствора, как указано в сертификате о пригодности. Образцы крови собирают в различные моменты времени через постоянный катетер и помещают в микроцентрифужные пробирки SST. Сыворотку собирают после центрифугирования и хранят при -80°C до анализа.

Анализ количественного определения модифицированного FGF-21 в сыворотке крыс Sprague-Dawley осуществляют следующим образом. Лунки микропланшета покрывают козлиным поликлональным антителом IgG к человеческому FGF-21 (PAb; RnD Systems, клон AF2539), которое используют в качестве реагента для захвата. Образцы стандарта (STD) и контроля качества (QC), полученные путем добавок немодифицированного или модифицированного FGF-21 в 100% сыворотку крыс Sprague Dawley, и исследуемые образцы загружают в лунки после предварительной обработки 1:100 буфером I-Block . Немодифицированный или модифицированный FGF-21 в STD, QC и исследуемые образцы захватываются иммобилизованным поликлональным антителом. Несвязанные материалы удаляются промыванием лунок. В лунки добавляют козье поликлональное антитело IgG с биотином к человеческому FGF-21 (системы RnD, клон BAF2539) с последующей стадией промывания и добавлением стрептавидин-пероксидазы хрена (SA-HRP; RnD Systems, номер в каталоге DY998) для обнаружения захваченных немодифицированных или модифицированных FGF-21. После еще одной стадии промывки в лунки добавляют раствор субстрата тетраметилбензидина (TMB, Kirkegaard Perry Laboratories). TMB реагирует с пероксидом в присутствии HRP и дает колориметрический сигнал, пропорциональный количеству FGF-21 (дикого типа или модифицированного FGF-21), связанного с реагентом захвата на начальной стадии. Развитие окраски останавливают добавлением 2 н. серной кислоты, и интенсивность цвета (оптическая плотность, OD) измеряют при 450 нм. Преобразование единиц OD для исследуемых образцов и QC до концентрации достигается посредством компьютерного программного обеспечения, опосредованного сравнением со стандартной кривой на том же планшете, который регрессирует по 5-параметрической регрессионной

логистической модели с использованием пакета SOFTmax Pro v5 для уменьшения объема данных. Результаты представлены в единицах концентрации нг/мл.

Концентрации можно также измерить с помощью сэндвич-анализа с двойными антителами или другими способами, известными специалистам в настоящей области техники. Концентрации рассчитывают с использованием стандартной кривой, полученной из соответствующего дозированного соединения. Фармакокинетические параметры оценивают с использованием программы моделирования WinNonlin (Pharsight, версия 4.1). Используется некомпартментный анализ для данных отдельных животных с линейно-логарифмическим способом трапеций, и данные о концентрации представляют собой равномерно взвешенные.

XV. Введение и фармацевтические композиции

Также в настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие терапевтически эффективное количество описанного в настоящем документе модифицированного полипептида FGF-21 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Такой носитель или вспомогательное вещество включает в себя, без ограничения, физиологический раствор, забуференный солевой раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и/или их комбинации. Состав получают в соответствии с режимом введения. В общем, способы введения белков известны специалистам в настоящей области техники и могут быть применены для введения полипептидов по настоящему изобретению.

Например, описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может вводиться пациенту в концентрации от приблизительно 0,1 до 100 мг/кг массы тела пациента-реципиента. Согласно одному варианту осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может вводиться пациенту в концентрации приблизительно 0,5-5 мг/кг массы тела пациента-реципиента. Согласно другому варианту осуществления описанный в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может вводиться пациенту-реципиенту с частотой от одного раза в день до одного раза в две недели, например, приблизительно один или два раза в неделю, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз каждые четыре дня, один раз каждые пять дней или один раз каждые шесть дней.

Следует понимать, что концентрация модифицированного полипептида FGF-21, вводимого данному пациенту, может быть больше или меньше, чем приведенные выше иллюстративные концентрации для введения.

Основываясь на информации, представленной в настоящем раскрытии, специалист в настоящей области техники сможет определить эффективную дозировку и частоту введения путем рутинного экспериментирования, например, руководствуясь раскрытыми в настоящем документе описанием и идеями в Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; и Golan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., (etc.): Lippincott Williams & Wilkins.

Средние количества модифицированного FGF-21 могут варьировать и, в частности, должны основываться на рекомендациях и назначении квалифицированного врача. Точное количество модифицированного FGF-21 является предпочтительным с учетом таких факторов, как точный тип подвергаемого лечению состояния, состояние подвергаемого лечению пациента, а также другие ингредиенты в композиции. В настоящем раскрытии также предусмотрено введение терапевтически эффективного количества другого активного средства. Количество, которое следует давать, может быть легко определено специалистом в настоящей области техники.

«Фармацевтическая композиция» относится к химической или биологической композиции, подходящей для введения млекопитающему. Такие композиции могут быть специально составлены для введения одним или несколькими из некоторого числа путей, включая в себя, без ограничения, буккальный, накожный, эпидуральный, ингаляционный, внутриартериальный, внутрисердечный, интрацеребровентрикулярный, внутрикожный, внутримышечный, интраназальный, внутриглазной, внутрибрюшинный, интраспинальный, интратекальный, внутривенный, пероральный, парентеральный, ректальный посредством клизмы или суппозитория, подкожный, субдермальный, подъязычный, трансдермальный и трансмукозальный. Кроме того, введение может происходить посредством инъекции, порошка, жидкости, геля, капель или других средств введения.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «вспомогательное вещество» включает в себя любые растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие абсорбцию средства, которые являются физиологически совместимыми. Согласно одному варианту осуществления носитель

подходит для парентерального введения. Альтернативно, носитель может быть подходящим для внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного или подъязычного введения. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция может присутствовать в лиофилизированной форме. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрено включение стабилизатора в фармацевтическую композицию. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с помощью поверхностно-активных веществ.

Во многих случаях может быть предпочтительным включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия, в композиции. Посредством включения такого средства, как соли-моностеараты и желатин, можно продлить абсорбцию инъецируемых композиций. Более того, полипептид может быть составлен в виде состава с высвобождением с течением времени, например, в композиции, которая включает в себя полимер с медленным высвобождением. Активные соединения могут быть получены с носителями, которые могут защищать соединение от быстрого высвобождения, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая в себя имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биодеградируемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры, полимолочная кислота и полимолочные, полигликолевые сополимеры (PLG). Специалистам в настоящей области техники известно множество способов приготовления таких составов.

Модифицированные полипептиды FGF-21 и композиции согласно настоящему изобретению можно вводить любым обычным способом, подходящим для белков или пептидов, включая в себя, без ограничения, парентерально, т.е. посредством инъекций,

включая в себя, без ограничения, подкожно или внутривенно или в любой другой форме инъекций или инфузий. Полипептидные композиции можно вводить несколькими путями, включая в себя, без ограничения, пероральный, внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, трансдермальный, подкожный, местный, подъязычный или ректальный пути. Композиции, содержащие модифицированный FGF-21, также можно вводить через липосомы. Модифицированный полипептид FGF-21 может использоваться отдельно или в комбинации с другими подходящими компонентами, такими как фармацевтический носитель. Модифицированный полипептид FGF-21 может использоваться в комбинации с другими средствами, включая в себя, без ограничения, пероральное противодиабетическое средство.

Термин «противодиабетическое средство» означает любое лекарственное средство, которое применимо при лечении, предупреждении или ином уменьшении тяжести любого нарушения метаболизма глюкозы или любых его осложнений, включая в себя любые состояния, заболевания или осложнения, описанные в настоящем документе. Противодиабетические средства включают в себя инсулин, тиазолидиндионы, сульфонилмочевины, производные бензойной кислоты, ингибиторы альфа-глюкозидазы или тому подобное.

Современные лекарственные средства или противодиабетические средства, используемые для лечения сахарного диабета и его синдромов-предшественников, таких как резистентность к инсулину, которые хорошо известны в настоящей области техники, включают в себя пять классов соединений: бигуаниды, например, метформин; тиазолидиндионы, например, троглитазон; сульфонилмочевины, например, толбутамид и глибурид; производные бензойной кислоты, например, репаглинид; и ингибиторы глюкозидазы. В дополнение к этим средствам ряд других способов лечения можно использовать в комбинации с полипептидами FGF-21 по настоящему изобретению для улучшения контроля глюкозы, включая в себя, без ограничения, ингибиторы DPP-4. Соединения свинца DPP-4, исследованные в клинических испытаниях, включают в себя вилдаглиптин (галвус) (LAF237), ситаглиптин (янувия), саксаглиптин и алоглиптин, соединение Novartis 1-[[[2-[(5-цианопиридин-2-ил)амино]этил]амино]ацетил]-2-циано-(S)-пирролидин (NVP DPP728).

Другая категория противодиабетических средств, которая представляет собой ингибиторы карнитин-пальмитоил-трансферазы I (CPT-I), такие как этомоксир.

Другие известные противодиабетические средства включают в себя препараты инсулина (например, препараты животного инсулина, экстрагированные из

поджелудочной железы быка и свиньи, препараты человеческого инсулина, генетически синтезированные с использованием Escherichia coli, дрожжей, цинк-инсулин, протаминовый цинк-инсулин, фрагмент или производное инсулина (например, INS-1), препарат перорального инсулина), инсулин-сенсибилизаторы (например, пиоглитазон или его соль (предпочтительно гидрохлорид), розиглитазон или его соль (предпочтительно малеат), нетоглитазон, ривоглитазон (CS-011), FK-614, соединение, описанное в публикации международной заявки WO 01/38325, тезаглитазар (AZ-242), рагаглитазар (N,N-622), мураглитазар (BMS-298585), эдаглитазон (BM-13-1258), метаглидазен (MBX-102), навеглитазар (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921), ингибиторы α-глюкозидазы (например, воглибоза, акарбоза, миглитол, эмигликат и т.д.), бигуаниды (например, фенформин, метформин, буформин или его соль (например, гидрохлорид, фумарат, сукцинат)), средства для секреции инсулина [сульфонилмочевина (например, толбутамид, глибенкламид, гликлазид, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, гликлопирамид, глимепирид, глипизид, глибузол), репаглинид, натеглинид, митиглинид или их гидрат соли кальция], ингибиторы дипептидилпептидазы IV (например, видаглиптин (LAF237), P32/98, ситаглиптин (MK-431), P93/01, PT-100, саксаглиптин (BMS-477118), T-6666, TS-021), β3-агонисты (например, AJ-9677), агонисты GPR40, глюкагоноподобные полипептиды (I) (glp I), (glp2) или другие диабетогенные пептидные гормоны, агонисты рецептора GLP-1 [например, GLP-1, средство GLP-1MR, N,N-2211, AC-2993 (экзендин-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH_2, CJC-[131], агонисты амилина (например, прамлинтид), ингибиторы фосфотирозинфосфатазы (например, ванадат натрия), ингибиторы глюконеогенеза (напримар, ингибиторы гликогенфосфорилазы, ингибиторы глюкозо-6-фосфатазы, антагонисты глюкагона), ингибиторы SGLUT (натрий-глюкоза-котранспортер) (например, T-1095), ингибиторы 11β-гидроксистероиддегидрогеназы (например, BVT-3498), адипонектин или его агонисты, ингибиторы IKK (например, AS-2868), улучшающие устойчивость к лептину лекарственные средства, агонисты рецепторов соматостатина (соединения, описанные в публикациях международных заявок WO 01/225228, WO 03/4204, WO 98/44921, WO 98/45285, WO 99/273,5 и т.д.), активаторы глюкокиназы (например, Ro-28-1675), GIP (глюкозозависимый инсулинотропный пептид) и т.п.

Модифицированный FGF-21 можно также превращать в аэрозольные композиции (то есть он может быть «распылен») для введения посредством ингаляции. Аэрозольные

препараты могут быть помещены в герметичные приемлемые пропелленты, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобное.

Составы, подходящие для парентерального введения, такого как, например, внутрисуставной (в суставах), внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный и подкожный пути, включают в себя водные и неводные изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать в себя суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Составы модифицированного FGF-21 могут быть представлены в виде однодозовых или многодозовых герметичных контейнеров, таких как ампулы и флаконы.

Доза, вводимая пациенту в контексте настоящего раскрытия, представляет собой достаточную для того, чтобы характеризоваться благоприятным терапевтическим ответом у пациента с течением времени или другой соответствующей активностью в зависимости от применения. Доза определяется эффективностью состава и активностью, стабильностью или периодом полужизни в сыворотке модифицированного полипептида FGF-21 и состоянием пациента, а также массой тела или площадью поверхности подлежащего лечению пациента.

Доза, вводимая, например, пациенту массой 70 килограммов, как правило, находится в диапазоне, эквивалентном дозам, используемых в настоящее время терапевтических белков, с поправкой на измененную активность или период полужизни в сыворотке соответствующей композиции.

Для введения, составы согласно настоящему изобретению вводят со скоростью, определяемой LD-50 или ED-50 соответствующего состава и/или наблюдением любых побочных эффектов модифицированных полипептидов FGF-21 в различных концентрациях, включая в себя, без ограничения, применительно к массе и состоянию здоровья пациента. Введение может быть достигнуто с помощью одной или нескольких доз.

Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему раскрытию могут быть введены непосредственно субъекту-млекопитающему. Введение осуществляют любым из путей, как правило, используемых для введения полипептида FGF-21 субъекту. Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему раскрытию могут быть получены в смеси в однодозовой инъецируемой форме (включая в себя, без ограничения,

раствор, суспензию или эмульсию) с фармацевтически приемлемым носителем. Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему раскрытию также можно вводить путем непрерывной инфузии (с использованием, включая в себя, без ограничения, мини-насосов, таких как осмотические насосы), одноболюсных составов или депо с медленным высвобождением.

Составы, подходящие для введения, включают в себя водные и неводные растворы, изотонические стерильные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать в себя суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Растворы и суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного выше типа.

Фармацевтические композиции и составы по настоящему описанию могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или стабилизатор.

Подходящие носители включают в себя, без ограничения, буферы, содержащие сукцинат, фосфат, борат, HEPES, цитрат, гистидин, имидазол, ацетат, бикарбонат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая в себя, без ограничения, аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные полипептиды, включая в себя, без ограничения, менее чем приблизительно 10 остатков; белки, включая в себя, без ограничения, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, включая в себя, без ограничения, поливинилпирролидон; аминокислоты, включая в себя, без ограничения, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, гистидин или производные гистидина, метионин, глутамат или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая в себя, без ограничения, трегалозу, сахарозу, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, включая в себя, без ограничения, EDTA и динатрия эдентат; ионы двухвалентных металлов, включая в себя, без ограничения, цинк, кобальт или медь; сахароспирты, включая в себя, без ограничения, маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, включая в себя, без ограничения, натрий и хлорид натрия; и/или неионные поверхностно-активные вещества, включая в себя, без ограничения, Tween™ (включая в себя, без ограничения, Tween 80 (полисорбат 80) и Tween 20 (полисорбат 20), Pluronics™ и другие плуроновые кислоты, включая в себя, без ограничения, плуроновую кислоту F68 (полоксамер 188) или ПЭГ. Подходящие поверхностно-активные вещества включают в себя, например, без ограничения, простые

полиэфиры на основе поли(этиленоксида)-поли(пропиленоксида)-поли(этиленоксида), т.е., (ПЭО-ППО-ПЭО) или поли(пропиленоксида)-поли(этиленоксида)-поли(пропиленоксида), то есть (ППО-ПЭО-ППО) или их комбинацию. ПЭО-ППО-ПЭО и ППО-ПЭО-ППО коммерчески доступны под торговыми названиями Pluronics™, R-Pluronics™, Tetronics™ и R-Tetronics™ (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) и дополнительно описаны в патенте США № 4820352, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Другие блок-сополимеры этилена/полипропилена могут быть подходящими поверхностно-активными веществами. Поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ могут использоваться для стабилизации пегилированного модифицированного FGF-21 против одного или нескольких стрессов, включая в себя, без ограничения, стресс, который возникает в результате перемешивания. Некоторые из вышеперечисленных могут упоминаться как «наполнители». Некоторые из них также могут называться «модификаторами тоничности». Противомикробные консерванты могут также применяться для стабильности продукта и противомикробной эффективности; подходящие консерванты включают в себя, без ограничения, бензиловый спирт, хлорид бензалкония, метакрезол, метилпропилпарабен, крезол и фенол или их комбинацию.

Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему описанию, включая в себя те, которые связаны с водорастворимыми полимерами, такими как ПЭГ, также могут вводиться или быть частью систем с замедленным высвобождением. Композиции с замедленным высвобождением включают в себя, без ограничения, полупроницаемые полимерные матрицы в форме формованных изделий, включая в себя, без ограничения, пленки или микрокапсулы. Матрицы с замедленным высвобождением включают в себя биосовместимые материалы, такие как поли(2-гидроксиэтилметакрилат), этиленвинилацетат (или поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту, полилактиды (полимолочную кислоту), полигликолид (полимер гликолевой кислоты), полиангидриды полилактид-со-гликолид (сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, поли(орто) сложные эфиры, полипептиды, гиалуроновую кислоту, коллаген, хондроитинсульфат, карбоновые кислоты, жирные кислоты, фосфолипиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, полиаминокислоты, аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин, изолейцин, полинуклеотиды, поливинилпропилен, поливинилпирролидон и силикон. Композиции с замедленным высвобождением также включают в себя липосомально

задерживаемое соединение. Содержащие соединение липосомы получают известными способами.

Доза, вводимая пациенту в контексте настоящего раскрытия, должна быть достаточной, чтобы вызвать благоприятный ответ у субъекта с течением времени. Как правило, общее фармацевтически эффективное количество модифицированного полипептида FGF-21 по настоящему раскрытию, вводимого парентерально на дозу, находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мкг/кг/день до приблизительно 100 мкг/кг или от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг массы тела пациента, хотя это подлежит терапевтическому усмотрению.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению модулируют действие противодиабетического средства. Согласно другому варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированные полипептиды FGF-21 можно вводить совместно с противодиабетическим средством. Согласно другому варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированные полипептиды FGF-21 можно вводить перед лечением противодиабетическим средством. Согласно другому варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированные полипептиды FGF-21 можно вводить после лечения противодиабетическим средством. Согласно другому варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированные полипептиды FGF-21 вводят совместно с метформином. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению вводят совместно с Klotho-бета. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению вводят совместно с Klotho-бета, который включает в себя одну или несколько неканонических аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению вводят совместно с Klotho-бета и проитводиабетическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению вводят совместно с проитводиабетическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению используются в комбинации с одним или несколькими из следующих: таурин, альфа-липоевая кислота, экстракт тутового дерева, хром, глутамин, Enicostemma littorale Blume, scoparia dulcis, экстракт эстрагона и андрографзиса метельчатого. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению

используют в комбинации с одним или несколькими из следующих: препараты инсулина (например, препараты животного инсулина, экстрагированные из поджелудочной железы быка и свиньи, препараты человеческого инсулина, генетически синтезированные с использованием Escherichia coli, дрожжей, цинк-инсулин, протаминовый цинк-инсулин, фрагмент или производное инсулина (например, INS-1), препарат перорального инсулина), инсулин-сенсибилизаторы (например, пиоглитазон или его соль (предпочтительно гидрохлорид), розиглитазон или его соль (предпочтительно малеат), нетоглитазон, ривоглитазон (CS-011), FK-614, соединение, описанное в публикации международной заявки WO 01/38325, тезаглитазар (AZ-242), рагаглитазар (N,N-622), мураглитазар (BMS-298585), эдаглитазон (BM-13-1258), метаглидазен (MBX-102), навеглитазар (LY-519818), MX-6054, LY-510929, AMG-131(T-131), THR-0921), ингибиторы α-глюкозидазы (например, воглибоза, акарбоза, миглитол, эмигликат и т.д.), бигуаниды (например, фенформин, метформин, буформин или его соль (например, гидрохлорид, фумарат, сукцинат)), средства для секреции инсулина [сульфонилмочевина (например, толбутамид, глибенкламид, гликлазид, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, гликлопирамид, глимепирид, глипизид, глибузол), репаглинид, натеглинид, митиглинид или их гидрат соли кальция], ингибиторы дипептидилпептидазы IV (например, видаглиптин (LAF237), P32/98, ситаглиптин (MK-431), P93/01, PT-100, саксаглиптин (BMS-477118), T-6666, TS-021), β3-агонисты (например, AJ-9677), агонисты GPR40, глюкагоноподобные полипептиды (I) (glp I), (glp2) или другие диабетогенные пептидные гормоны, агонисты рецептора GLP-1 [например, GLP-1, средство GLP-1MR, N,N-2211, AC-2993 (экзендин-4), BIM-51077, Aib(8,35)hGLP-1 (7,37)NH_2, CJC-[131], агонисты амилина (например, прамлинтид), ингибиторы фосфотирозинфосфатазы (например, ванадат натрия), ингибиторы глюконеогенеза (напримар, ингибиторы гликогенфосфорилазы, ингибиторы глюкозо-6-фосфатазы, антагонисты глюкагона), ингибиторы SGLUT (натрий-глюкоза-котранспортер) (например, T-1095), ингибиторы 11β-гидроксистероиддегидрогеназы (например, BVT-3498), адипонектин или его агонисты, ингибиторы IKK (например, AS-2868), улучшающие устойчивость к лептину лекарственные средства, агонисты рецепторов соматостатина (соединения, описанные в публикациях международных заявок WO 01/225228, WO 03/4204, WO 98/44921, WO 98/45285, WO 99/273,5 и т.д.), активаторы глюкокиназы (например, Ro-28-1675), GIP (глюкозозависимый инсулинотропный пептид).

Один из способов, с помощью которого можно определить терапевтическую эффективность полипептидов и комбинированной терапии, включающей в себя полипептиды согласно настоящему изобретению, заключается в снижении содержания HbA1c у пациента. Согласно одному варианту осуществления полипептиды по настоящему изобретению характеризуются более низким содержание HbA1c по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или по меньшей мере на 50% в отличие от содержания HbA1c за два месяца до начала терапии с модифицированными полипептидами FGF-21, за три месяца до начала терапии с модифицированными полипептидами FGF-21 или процентными изменениями от исходного значения. Согласно другому варианту осуществления полипептиды по настоящему изобретению, вводимые пациенту, который также подвергается лечению противодиабетическим средством, модулируют способность противодиабетического средства понижать содержание глюкозы в крови.

Согласно другому варианту осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению модулируют способность троглитазона снижать потребности в инсулине. Троглитазон, используемый в комбинации с полипептидом по настоящему описанию, может быть использован для задержки или предотвращения сахарного диабета типа 2 согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления настоящего раскрытия модифицированные полипептиды FGF-21 вводят совместно или вводят до или после лечения с помощью сульфонилмочевины. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения лечение терапевтической дозой модифицированных полипептидов FGF-21 модулирует содержание глюкозы в сыворотке. Согласно другому варианту осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению вводят с Klotho-бета, который модулирует действие полипептидов на глюкозу крови. Согласно другому варианту осуществления модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему изобретению вводят с Klotho-бета, который снижает содержание глюкозы в крови больше, чем использование только модифицированных полипептидов FGF-21.

XVI. Терапевтическое применение модифицированных полипептидов FGF-21 по настоящему раскрытию

Модифицированные полипептиды FGF-21 по настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения млекопитающих, страдающих от инсулиннезависимого сахарного диабета (NIDDM: тип 2), инсулинозависимого сахарного диабета (тип 1), а также от ожирения, недостаточного клиренса глюкозы, гипергликемии, гиперинсулинемии и любого другого заболевания или состояния, которое может быть опосредовано FGF-21.

Синдром Прадера-Вилли (P.W.S. или PWS) представляет собой редкое генетическое заболевание, в котором семь генов (или некоторое их подмножество) на хромосоме 15 (q 11-13) удаляются или не экспрессируются (частичная делеция хромосомы 15q) на отцовской хромосоме. Характеристика PWS заключается в низком мышечном тонусе, низком росте, неполном сексуальном развитии, когнитивных нарушениях, проблемном поведении и хроническом чувстве голода, которое может привести к чрезмерному поеданию и опасному для жизни ожирению.

В настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения млекопитающего, проявляющего одно или несколько из следующего: сахарный диабет типа 1, сахарный диабет типа 2, ожирение, резистентность к инсулину, гиперинсулинемия, непереносимость глюкозы или гипергликемия, предусматривающий введение указанному нуждающемуся в таком лечении млекопитающему терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21 по настоящему изобретению.

Способ лечения может быть достаточным для достижения у указанного млекопитающего по меньшей мере одной из следующих модификаций: уменьшение запасов жира в организме, снижение резистентности к инсулину, снижение гиперинсулинемии, увеличение толерантности к глюкозе и уменьшение гипергликемии.

Настоящее раскрытие также охватывает способ снижения смертности и осложнений у критически больных пациентов, страдающих от синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), связанного с инфекционными инсультами, такими как сепсис, панкреатит, ишемия, множественная травма и повреждение тканей, геморрагический шок, иммунно-опосредованное повреждение органов, респираторный дистресс, шок, почечная недостаточность и синдром множественной органной дисфункции (MODS), а также неинфекционных патологических причин, которые включают в себя введение терапевтически эффективного количества модифицированного FGF-21 критически больным пациентам.

Согласно одному варианту осуществления в настоящем раскрытии предусмотрены композиции и способы с раскрытыми в настоящем документе модифицированными полипептидами FGF-21 в сочетании с другим средством для лечения нарушенного метаболизма глюкозы, такого как инсулинорезистентность, нарушение секреции инсулина или гипергликемия. Такие другие средства включают в себя, например, одно или несколько из следующего: сульфонилмочевины, агонисты PPAR-гамма, агонисты GPL-1, ингибитор дипептидилпептидазы IV, аналоги амилина, бигуаниды, агонисты рецептора допамина D2, меглитиниды, ингибитор альфа-глюкозидазы, антидислипидемическая секвестрант желчных кислот, инсулин, терапия цитокинами, генная терапия и терапия антителами. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может вводиться пациенту, который не достигает нормогликемии, с введением другого лечения, например, лечения метформином, пиоглитазоном, сульфонилмочевиной, глинидом, пероральным тиазолидиндионом (TZD), таким как пиоглитазон, агонистом рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1), таким как экзенатид, ингибитором DPP4, таким как ситаглиптин, вилдаглиптин, саксаглиптин, алоглинтин, линаглиптин или тенлиглиптин, или комбинированной терапией, такой как метформин и пиоглитазон, метформин и сульфонилмочевина, метформин и глинид, метформин и TZD, метформин и пиоглитазон, метформин и агонист рецептора GLP-1, метформин и экзенатид, ситаглиптин и метформин, ситаглиптин и симвастатин, вилдаглиптин и метформин, саксаглиптин и метформин, алоглинтин и пиоглитазон или линаглиптин и метформин, или ингибиторами SGLT2, такими как дапаглифлозин, канаглифлозин, эмпаглифлозин, ипраглифлозин или тофоглифлозин.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может быть введен для профилактики или лечения ожирения (например, индекс массы тела по меньшей мере 25). Указанный модифицированный полипептид FGF-21 может быть введен в комбинации со средством против ожирения, таким как орлистат, римонабант, сибутрамин, пептид YY (PYY, пептид с 36 аминокислотами, который снижает аппетит), аналог PYY, антагонист CB-1, римонабант, лептин, аналог лептина или фентермин.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе модифицированный полипептид FGF-21 может быть введен для профилактики или лечения синдрома Прадера-Вилли.

Понятно, что описанные в настоящем документе примеры и варианты осуществления приведены только для иллюстративных целей и что в свете этого специалистам в настоящей области техники будут предложены различные модификации или изменения, и они должны быть включены в духе и смысле настоящей заявки и объема прилагаемой формулы изобретения. Следует также понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания иллюстративных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего раскрытия, которое ограничиваются только прилагаемой формулой изобретения. Все публикации, патенты, патентные заявки и/или другие документы, цитируемые в настоящей заявке, полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка и/или другой документ были указаны индивидуально для включения посредством ссылки для всех целей.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предложены для иллюстрации, а не для ограничения заявленного изобретения.

Пример 1

Экспрессия и очистка FGF-21 в E. Coli

Плазмиды, содержащие немодифицированные или модифицированные экспрессионные конструкты FGF-21 под контролем промотора T7, трансформируют в таком штамме E. coli, как штамм W3110 B2 E. coli, в котором экспрессия полимеразы T7 находится под контролем индуцируемого арабинозой промотора. Ночные бактериальные культуры можно развести 1:100 во встряхиваемых колбах, содержащих 2X среду культивирования YT и выращивать при 37°C до OD_{600}, составляющей ~ 0,8. Экспрессию белка можно индуцировать путем добавления арабинозы (конечная концентрация 0,2%), и *пара*-ацетил-фенилаланина (pAcF) до конечной концентрации, составляющей 4 мМ. Культуры можно инкубировать в течение подходящей продолжительности и при подходящей температуре, например, при 37°C в течение 4 часов. Клетки можно осадить и ресуспендировать в лизисном буфере B-PER (Pierce) 100 мкл/OD/мл + 10 мкг/мл ДНКазы и инкубировать при 37°C в течение 30 мин. Клеточный материал можно удалить путем центрифугирования и супернатант можно удалить.

Осадок можно ресуспендировать в равном количестве буфера для внесения белка для SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия). Образцы можно загрузить на 4-12% гель PAGE с MES (морфолинэтансульфоновая кислота) и DTT (дитиотреитол). Способы очистки FGF-21 известны специалистам в настоящей области техники и очистку можно подтвердить с помощью SDS-PAGE, анализов вестерн-блоттинг, масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением с использованием ионной ловушки и подобного.

Клеточную пасту ресуспендируют путем смешивания до конечной концентрации, составляющей 10% твердого вещества в 4°C буфере I для образования тел включения (IB) (50 мМ Трис, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1% Triton X-100; 4°C). Клетки лизируют путем пропускания ресуспендированного материала через микрофлюидизатор в общем два раза, затем его центрифугируют (10000 g; 15 мин; 4°C) и супернатант сливают. Осадок IB отмывают путем ресуспендирования в дополнительном объеме буфера IB I (50 мМ Трис, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1% Triton X-100; 4°C) и ресуспендированный материал пропускают через микрофлюидизатор в общем два раза, затем его центрифугируют (10000 g; 15 мин; 4°C) и супернатант сливают. Осадок IB ресуспендируют в одном объеме буфера II (50 мМ Трис, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 4°C), затем его центрифугируют (10000 g; 15 мин; 4°C) и супернатант сливают. Осадок IB затем ресуспендируют в ½ объема буфера II (50 мМ Трис, pH 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 4°C). Отбирают аликвоты IB в соответствующие контейнеры, затем их центрифугируют (10000 g; 15 мин; 4°C) и супернатант сливают. Тельца включения солюбилизируют (это точка, в которой в других случаях их можно хранить при -80°C до последующего использования.)

Тельца включения солюбилизируют до конечной концентрации, составляющей 10-15 мг/мл буфера для солюбилизации (20 мМ Трис, pH 8,0; 8М мочевины; 10 мМ ß-ME) и инкубируют солюбилизированные IB при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 1 часа. Нерастворимый материал удаляют путем фильтрации (0,45 мкм фильтр PES) и концентрацию белка доводят (не всегда является необходимым) путем разведения с помощью дополнительного буфера для солюбилизации (если концентрация белка является высокой).

Рефолдинг можно осуществить путем разведения до конечной концентрации белка, составляющей 0,5 мг/мл в 20 мМ Трис, pH 8,0; 4°C. Рефолдинг осуществляют в течение 18 - 24 часов при 4°C.

Для очистки отфильтрованную реакцию рефолдинга можно пропустить через 0,45 мкм фильтр PES. Загруженный материал через колонку Q HP (GE Healthcare), уравновешенную в буфере A (20 мМ Трис, pH 7,5). Элюирование немодифицированного или модифицированного FGF-21 с линейным градиентом через 20CV до 100% буфера B (20 мМ Трис, pH 7,5; 250 мМ NaCl). Мономерный FGF-21, таким образом, можно получить из объединенных элюированных фракцийи. Брали пул Q HP и буфер заменяли на 20 мМ Трис, pH 8,0; 2М мочевины; 1 мМ EDTA. pH снижали до 4,0 с помощью 50% ледяной уксусной кислоты. Образцы концентрировали до 4,0±1,0мг/мл. К образцу добавляли 12:1 молярного избытка ПЭГ и конечную концентрацию 1% уксусного гидразида, pH 4,0. Образец инкубируют при 28°C в течение 48-72 часов. К реакции ПЭГ затем добавляют конечную концентрацию 50 мМ основания Трис и разводят в 10 раз очищенной с помощью обратного осмоса (RO) водой. Подтверждают, чтобы проводимость составляла <1мСм/см, и pH составлял 8,0-9,0. Материал загружают на колонку Source 30Q (GE Healthcare), уравновешенную в буфере A (20 мМ Трис, pH 8,0). ПЭГ-FGF-21 элюируют с линейным градиентом через 20CV до 100%B (20 мМ Трис, pH 8,0; 100 мМ NaCl). ПЭГ-FGF-21 объединяют и буфер заменяют на 20 мМ Трис, pH 7,4; 150 мМ NaCl. ПЭГ-материал концентрируют до 1-2мг/мл и стерилизуют посредством фильтрации с использованием 0,22 мкм фильтра PES. Материал хранят при 4°C. Для продолжительного хранения мгновенно замораживают и хранят при -80°C.

Пример 2

Способы получения модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих неканоническую аминокислоту

Введенную трансляционную систему, которая содержит ортогональную тРНК (O-тРНК) и ортогональную аминоацил-тРНК-синтетазу (O-RS), можно использовать для экспрессии модифицированных FGF-21, содержащих неканоническую аминокислоту. O-RS предпочтительно аминоацилирует O-тРНК с неканонической аминокислотой. В свою очередь трансляционная система вставляет неканоническую аминокислоту в FGF-21, в ответ на кодированный селекторный кодон. Подходящие последовательности O-RS и O-тРНК описаны в международной патентной публикации WO 2006/068802 с названием “Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof” (E9; SEQ ID NO: 15) и в международной патентной публикации WO 2007/021297 с названием “Compositions of tRNA and Uses Thereof” (F13; SEQ ID NO: 16), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Иллюстративные последовательности O-RS и O-тРНК включены в таблицу 2 ниже.

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей иллюстративных полипептидных и полинуклеотидных последовательностей ортогональной тРНК (О-тРНК) и ортогональной аминоацил-тРНК-синтетазы (О-RS)

SEQ ID NO:17	*M. jannaschii* mtRNA $^{Tyr}_{CUA}$	тРНК
SEQ ID NO:18	*HLAD03; оптимизированная амбер-супрессорная тРНК*	тРНК
SEQ ID NO:19	*HL325A; оптимизированная тРНК-супрессор сдвига рамки считывания AGGA*	тРНК
SEQ ID NO:20	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-азидо-L-фенилаланина* *пара-Az-PheRS(6)*	RS
SEQ ID NO:21	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-бензоил-L-фенилаланина* *пара-BpaRS(1)*	RS
SEQ ID NO:22	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пропаргил-фенилаланина* *Пропаргил-PheRS*	RS
SEQ ID NO:23	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пропаргил-фенилаланина* *Пропаргил-PheRS*	RS
SEQ ID NO:24	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пропаргил-фенилаланина* *Пропаргил-PheRS*	RS
SEQ ID NO:25	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-азидо-фенилаланина* *пара-Az-PheRS(1)*	RS
SEQ ID NO:26	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-азидо-фенилаланина* *пара-Az-PheRS(3)*	RS
SEQ ID NO:27	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-азидо-фенилаланина*	RS

	пара-Az-PheRS(4)	
SEQ ID NO:28	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-азидо-фенилаланина* *пара-Az-PheRS(2)*	RS
SEQ ID NO:29	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-ацетил-фенилаланина (LW1)*	RS
SEQ ID NO:30	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-ацетил - фенилаланина (LW5)*	RS
SEQ ID NO:31	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-ацетил-фенилаланина (LW6)*	RS
SEQ ID NO:32	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-азидо-фенилаланина (AzPheRS-5)*	RS
SEQ ID NO:33	*Аминоацил-тРНК-синтетаза для введения пара-азидо-фенилаланина (AzPheRS-6)*	RS

Таблица 3: Иллюстративные полипептидные и полинуклеотидные последовательности FGF-21, ортогональной тРНК (O-тРНК) и ортогональной аминоацил-тРНК-синтетазы (O-RS)

SEQ ID NO	**Название последовательности**
1	Аминокислота последовательность FGF-21 без лидера (P-форма) HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPE SLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE DGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGI LAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
2	Аминокислота последовательность FGF-21 без лидера (P-форма) — меченная His MHHHHHHSGGHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFD PEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
3	Аминокислота последовательность FGF-21 с лидером (P-форма) — лидер с 3 лейцинами (“209 аминокислотная P-форма” или “P-форма”)

	MDSDETGFEHSGLWVSVLAGLLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYL YTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS RFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV YQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPP DVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
4	Аминокислота последовательность FGF-21 с лидером (P-форма) — лидер с двумя лейцинами MDSDETGFEHSGLWVSVLAGLLGACQAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLY TDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR FLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNK SPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQG RSPSYAS
5	Аминокислота последовательность FGF-21 без лидера (L-форма) His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
6	Аминокислота последовательность FGF-21 с лидером (L-форма) — лидер с 3 лейцинами (209 аминокислотная L-форма) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

7	Аминокислота последовательность FGF-21 с лидером (L-форма) — лидер с 2 лейцинами (208 аминокислотная L-форма) Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
8	Нуклеотидная последовательность для FGF-21 без лидера (P-форма) CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTC CGGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCA CCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGA GCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTC AAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCCTGTGCCAGCGGCCAGATG GGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCC GGGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCC ACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGAC CCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCC CCCGCACCCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCCAGCCCCCCGAT GTGGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGA AGCCCCAGCTACGCTTCCTGA
9	Нуклеотидная последовательность для FGF-21 без лидера (P-форма) — меченная His ATGCATCATCATCATCATCATAGCGGCGGCCACCCCATCCCTGACTCC AGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTAC ACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGAGGA TGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCCTGC AGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAG ACATCCAGGTTCCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCG CTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAG GACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGCAC CTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGAGGACC AGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCCGCACCCCCGGAGCC ACCCGGAATCCTGGCCCCCCAGCCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCC

	TCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCTTC CTGA
10	Нуклеотидная последовательность для FGF-21 с лидером (P-форма)— лидер с 3 лейцинами ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT GTGCTGGCTGGTCTTCTGCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCT GACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTAC CTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAG GGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTC TCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAG TCAAGACATCCAGGTTCCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATG GATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTC TTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGC TGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGA GGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCCGCACCCCCG GAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCCAGCCCCCCGATGTGGGCTCCTCG GACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTAC GCTTCCTGA
11	Нуклеотидная последовательность для FGF-21 с лидером (P-форма)— лидер с 2 лейцинами ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGACTGTGGGTTTCT GTGCTGGCTGGTCTTCTGGGAGCCTGCCAGGCACACCCCATCCCTGAC TCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTC TACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGA GGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGTCTCC TGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCA AGACATCCAGGTTCCTGTGCCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGAT CGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTG AGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCACGGCCTCCCGCTGC ACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCCTGCACCCCGAGGA CCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCCGCACCCCCGGAG CCACCCGGAATCCTGGCCCCCCAGCCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGAC CCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACGCT TCCTGA
12	Нуклеотидная последовательность для FGF-21 без лидера (L-форма) CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGCCAAGTCC GGCAGCGGTACCTCTACACAGATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCCAC CTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAG CCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCA

	AATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCCTGTGCCAGCGGCCAGATGG GGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCTGAGGCCTGCAGCTTCCG GGAGCTGCTTCTTGAGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCCA CGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGGGACCC TGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCC CGCACTCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGCCCCCCAGCCCCCCGATGT GGGCTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAG CCCAGCTACGCTTCCTGA
13	Нуклеотидная последовательность для FGF-21 с лидером (L-форма) - лидер с 3 лейцинами ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
14	Нуклеотидная последовательность для FGF-21 с лидером (L-форма) - лидер с 2 лейцинами ATG GAC TCG GAC GAG ACC GGG TTC GAG CAC TCA GGA CTG TGG GTT TCT GTG CTG GCT GGT CTT CTG GGA GCC TGC CAG GCA CAC CCC ATC CCT GAC TCC AGT CCT CTC CTG CAA TTC GGG GGC CAA GTC CGG CAG CGG TAC CTC TAC ACA GAT GAT GCC CAG CAG ACA GAA GCC CAC CTG GAG ATC AGG GAG GAT GGG ACG GTG GGG GGC GCT GCT GAC CAG AGC CCC GAA AGT CTC CTG CAG CTG AAA GCC TTG AAG CCG GGA GTT ATT CAA ATC TTG GGA GTC AAG ACA TCC AGG TTC CTG TGC CAG CGG CCA GAT GGG GCC CTG TAT GGA TCG CTC CAC TTT GAC CCT GAG GCC TGC AGC TTC CGG GAG CTG CTT CTT GAG GAC GGA TAC AAT GTT TAC CAG TCC GAA GCC CAC GGC CTC CCG CTG CAC CTG CCA GGG AAC AAG TCC CCA CAC CGG GAC CCT GCA CCC CGA GGA CCA GCT CGC TTC CTG CCA CTA CCA GGC CTG CCC CCC GCA CTC CCG GAG CCA CCC GGA ATC CTG GCC CCC CAG

	CCC CCC GAT GTG GGC TCC TCG GAC CCT CTG AGC ATG GTG GGA CCT TCC CAG GGC CGA AGC CCC AGC TAC GCT TCC TGA
34	Аминокислота последовательность FGF-21 (Rattus norvegicus - ref|NP_570108.1|[18543365]) Met Asp Trp Met Lys Ser Arg Val Gly Ala Pro Gly Leu Trp Val Cys Leu Leu Leu Pro Val Phe Leu Leu Gly Val Cys Glu Ala Tyr Pro Ile Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Thr Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Thr Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Gln Asp Pro Ala Thr Arg Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Pro His Glu Pro Gln Glu Gln Pro Gly Val Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
35	Аминокислота последовательность FGF-21 (Mus musculus - ref|NP_064397.1|[9910218]) Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
36	Аминокислота последовательность FGF-21 (Danio rerio - ref|NP_001038789.1|[113671792]) Met Leu Phe Ala Cys Phe Phe Ile Phe Phe Ala Leu Phe Pro His Leu Arg Trp Cys Met Tyr Val Pro Ala Gln Asn Val Leu Leu Gln Phe Gly Thr Gln Val Arg Glu Arg Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Leu Phe Leu Glu Met Asn Pro Asp Gly Ser Val Lys Gly Ser Pro Glu Lys Asn Leu Asn Cys Val Leu Glu Leu Arg Ser Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Ile Gln Ser Ala Ala Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Val Asp Asp Gln Asp Lys Leu Lys Gly Gln His His Tyr Ser Ala Leu Asp Cys Thr Phe Gln Glu Leu Leu Leu Asp Gly Tyr Ser Phe Phe Leu Ser Pro His Thr Asn Leu Pro Val Ser Leu Leu Ser Lys Arg Gln Lys His Gly Asn Pro Leu Ser Arg Phe Leu Pro Val Ser Arg Ala Glu Asp Ser Arg Thr Gln Glu Val Lys Gln Tyr Ile Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ser Asp

	Asp Pro Leu Gly Met Gly His Arg Ser His Leu Gln Thr Val Phe Ser Pro Ser Leu His Thr Lys Lys
37	Аминокислота последовательность Klotho beta (Homo sapiens - ref|NP_783864.1|[28376633]) MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVT GFSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWK KDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSI SWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEIVTLYHWDLPLALQE KYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTG MHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLG SHWIEPNRSENTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFS VLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREAL NWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLD EIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYY KQIIRENGFSLKESTPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHL YVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYR FALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHA HLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRL SDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHAD WAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKH RRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSD RDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQ ALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSKPRFGFF TSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPL IFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS
38	Аминокислота последовательность Klotho beta (Mus musculus - refNP_112457.1 GI:13626032) MKTGCAAGSPGNEWIFFSSDERNTRSRKTMSNRALQRSAVLSAFVLLRA VTGFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEG SWKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSF YQFSISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDL PLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAW HGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKG WLSITLGSHWIEPNRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEF MKTGAMIPEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLN LRQVLNWIKLEYDDPQILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQ AIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSS AHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKGRFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFT DPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKV THYQFALDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYYRCVVSEGLKLGVFPMVTLYH PTHSHLGLPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAELCFRELGDLVKLWITINE

	PNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLS LHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKTGDYPSVMKEYI ASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVIHKQLNTNR SVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRKLLAWIRRNYRDRDIYITAN GIDDLALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEEKSKP RFGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLV EKKPLIFFGCCFISTLAVLLSITVFHHQKRRKFQKARNLQ NIPLKKGHSRVFS
39	Нуклеотидная лидерная последовательность OmpA atgaaaaaaactgctatcgcgatcgctgtagctctggctggtttcgcgaccgtagctaacgct
40	Аминокислотная лидерная последовательность OmpA M K K T A I A I A V A L A G F A T V A N A
41	Нуклеотидная лидерная последовательность MalE atgaaaataaaaacaggtgcacgcatcctcgcattatccgcattaacgacgatgatgttttccgcctcggctctcgcc
42	Аминокислотная лидерная последовательность MalE M K I K T G A R I L A L S A L T T M M F S A S A L A
43	Нуклеотидная лидерная последовательность StII atgaaaaagaatatcgcatttcttcttgcatctatgttcgtttttttctattgctacaaatgcctatgca
44	Аминокислотная лидерная последовательность StII M K K N I A F L L A S M F V F S I A T N A Y A

Трансформация *E. coli* с помощью плазмид, содержащих модифицированный ген FGF-21 и пару ортогональной аминоацил-тРНК-синтетазы/тРНК (специфической для требуемой неканонической аминокислоты), обеспечивает возможность сайт-специфического введения неканонической аминокислоты в модифицированный полипептид FGF-21.

Зрелый FGF-21 дикого типа можно амплифицировать с помощью ПЦР из реакции синтеза кДНК, например, полученной из полиА+ иРНК печени здорового человека (Biochain) с использованием стандартных протоколов и клонировать в такой вектор, как pET30 (например, используя сайты расщепления NcoI-BamHI). После необязательного подтверждения последовательности FGF-21 (который может включать в себя такую метку для очистки, как N-концевую последовательность HHHHHHSGG) можно субклонировать. Например, FGF-21 можно субклонировать в супрессорный вектор, содержащий амбер-супрессоропную тирозил-тРНК$^{Tyr/CUA}$ из *Methanococcus jannaschii* (*Mj* тРНК$^{Tyr/CUA}$), и связывать с подходящим промотором, например, пи конститутивном контроле синтетического промотора, полученного из промоторной последовательности липопротеина *E. coli* (Miller, J.H., Gene, 1986), а также ортогональную тирозил-тРНК-синтетазу (*Mj*TyrRS) под контролем промотора GlnRS *E. coli*. Экспрессия немодифицированного или модифицированного FGF-21 может находиться под контролем промотора T7. Амбер-мутации можно вводить с использованием стандартных протоколов мутации Quick Change (Stratagene; La Jolla, California). Последовательность конструктов можно подвергать верификации.

Две отдельных неканонических аминокислоты можно ввести в модифицированные полипептиды FGF-21 путем введения селекторного кодона на два отдельных сайта в пределах нуклеиновой кислоты.

Супрессия с помощью пара-ацетил-фенилаланина (pAcF)

Плазмиды, содержащие модифицированные экспрессионные конструкты FGF-21 и экспрессионные конструкты O-тРНК и O-RS (которые могут находиться в той же или в различных плазмидах или могут быть стабильно трансфицированы в штамм), можно трансформировать в штамм W3110 B2 E. coli, в котором экспрессия полимеразы T7 находится под контролем индуцируемым арабинозой промотором. Ночные бактериальные культуры можно развести 1:100 во встряхиваемых колбах, содержащих 2X среду культивирования YT, и выращивать при 37°C до OD_{600}, составляющей ~ 0,8. Экспрессию белка можно индуцировать путем добавления арабинозы (0,2% конечной концентрации), и *пара*-ацетил-фенилаланина (pAcF) до конечной концентрации, составляющей 4 мМ. Культуры можно инкубировать в течение подходящей продолжительности и при подходящей температуре, например, при 37°C в течение 4 часов. Клетки можно осадить и ресуспендировать в лизисном буфере B-PER (Pierce) 100 мкл/OD/мл + 10 мкг/мл ДНКазы и инкубировать при 37°C в течение 30 мин. Клеточный материал можно удалить путем центрифугирования и супернатант можно удалить.

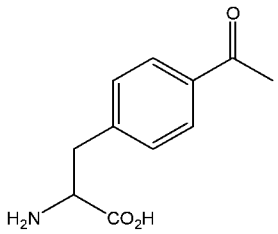
Осадок можно ресуспендировать в равном количестве буфера для внесения белка для SDS-PAGE. Образцы можно загрузить на 4-12% гель PAGE с MES и DTT. Способы очистки FGF-21 известны специалистам в настоящей области техники и очистку можно подтвердить с помощью SDS-PAGE, анализов вестерн-блоттинг, масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением с использованием ионной ловушки и подобного.

Меченные His или не меченные His мутантные белки FGF-21 можно очистить с использованием способов, известных специалистам в настоящей области техники. Например, никельсодержащую хелатную смолу ProBond (Invitrogen, Carlsbad, CA) можно использовать посредством стандартных процедур очистки меченных His белков, предоставленных производителем.

Пример 3

Введение карбонилсодержащей аминокислоты в модифицированный полипептид FGF-21 и последующая реакция с аминооксисодержащим ПЭГ

Следующий иллюстративный способ можно использовать для создания модифицированного полипептида FGF-21, связанного с увеличивающим период полужизни фрагментом. Способ предусматривает кетонсодержащую неканоническую аминокислоту, которая затем реагирует с таким увеличивающим период полужизни фрагментом, как аминооксисодержащий ПЭГ, характеризующийся молекулярной массой, составляющей приблизительно 30000 Да. Выбранный остаток FGF-21 замещают неканонической аминокислотой, характеризующейся следующей структурой:



Последовательности, использованные для сайт-специфического введения пара-ацетил-фенилаланина в FGF-21, могут представлять собой SEQ ID NO: 1 (FGF-21), SEQ ID NO: 16 или 17 (muttRNA, *M. jannaschii* mtRNA $^{Tyr}_{CUA}$), 15, 29, 30 или 31 (TyrRS LW1, 5 или 6), или любой модифицированный полипептид FGF-21, описанный в настоящем документе.

Будучи модифицированным, полипептид FGF-21, содержащий карбонилсодержащую аминокислоту, приводят в реакцию с аминооксисодержащим производным ПЭГ (PEG) формы:

R-PEG(N)-O-$(CH_2)_n$-O-NH_2

где R представляет собой метил, n представляет собой 3, и N представляет собой выбранную молекулярную массу, например, приблизительно 30000 Да.

Альтернативно, кетонсодержащую неканоническую аминокислоту можно соединить с реагентом ПЭГ, характеризующимся следующей структурой:

R-PEG(N)-O-$(CH_2)_2$-NH-C(O)$(CH_2)_n$-O-NH_2

где R = метил, n=4 и N представляет собой выбранную молекулярную массу, например, приблизительно 30000 Да.

Очищенный модифицированный FGF-21, содержащий *пара*-ацетилфенилаланин, растворенный в концентрации, составляющей 10 мг/мл, в 25 мМ MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 6,0, 25 мМ Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 7,0, или в 10 мМ ацетата натрия (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4,5, приводят в реакцию с 10 - 100-кратным избытком аминооксисодержащего ПЭГ и затем перемешивают в течение 10 – 16 часов при комнатной температуре (Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475). ПЭГ-FGF-21 затем разводят в соответствующем буфере для немедленной очистки и анализа.

Пример 4

Получение модифицированных полипептидов FGF-21

Получали полинуклеотиды, кодирующие каждый из модифицированных полипептидов FGF-21, показанных на фиг. 1A-B. Частоту использования кодонов ДНК в полинуклеотидных последовательностях оптимизировали для экспрессии в E. coli с использованием стандартных способов, известных в настоящей области техники (SEQ ID NO: 317 и 318 представляют собой иллюстративные полинуклеотидные последовательности, которые кодируют соединение 2 и пегилированное соединение 2, соответственно). Если присутствовал пептид-соединитель, его кодирующую последовательность выбирали на основании стандартного генетического кода, например, GGU, GGC, GGA или GGG для глицина, UCU, UCC, UCA, UCG, AGU или AGC для серина, CAU или CAC для гистидина и т.д. Модифицированные полипептиды FGF-21 экспрессировали в E. coli и очищали (иллюстративные способы описаны в настоящем документе). Получали модифицированные полипептиды FGF-21, содержащие пара-ацетил-фенилаланин неканонической аминокислоты (сокращенно pACF или pAF) (иллюстративные способы представлены в примере 2). Кратко, кодирующий полинуклеотид дополнительно модифицировали для включения в него селекторного кодона в соответствующем положении в полинуклеотидной

последовательности для кодирования pACF и экспрессировали в клетке, сконструированной для экспрессии ортогональной тРНК (О-тРНК) и ортогональной аминоацил-тРНК-синтетазы (O-RS), например, направляемой селекторным кодоном включения pACF в выбранном положении. pACF затем соединяли с поли(этиленгликолем) (ПЭГ), характеризующимся средней молекулярной массой, составляющей приблизительно 30 кДа (иллюстративные способы представлены в примере 3).

Кодирующая соединение 2 последовательность (SEQ ID NO:317)

M H P I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R

1 ATG CAT CCT ATT CCT GAT TCT TCT CCT CTG CTG CAA TTT GGG GGT CAG GTG CGC CAA CGT

Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G

61 TAC CTG TAC ACC GAC GAT GCG CAA CAG ACT GAG GCT CAC CTG GAG ATC CGT GAG GAC GGG

T V G G A A D Q S P E S L L Q L K A L K

121 ACT GTC GGA GGG GCT GCC GAT CAA TCC CCA GAG TCA CTG CTG CAA CTG AAA GCC CTG AAG

P G V I Q I L G V K T S R F L C Q R P D

181 CCT GGG GTC ATT CAG ATC CTG GGC GTA AAG ACG AGT CGT TTC CTG TGC CAA CGT CCT GAC

G A L Y G S L H F D P E A C S F R E L L

241 GGG GCA CTG TAT GGC TCG CTG CAT TTT GAT CCT GAG GCT TGT AGT TTT CGC GAA CTG CTG

L E D G Y N V Y Q S E A H G L P L H L G

301 CTG GAA GAT GGT TAC AAT GTG TAT CAG AGT GAA GCA CAC GGT CTG CCT CTG CAC CTG GGT

S G R G P A R F L P L P G L P P A P P E

361 TCT GGT CGT GGT CCG GCG CGT TTT CTG CCA CTG CCT GGC CTG CCT CCA GCA CCA CCT GAA

P P G I L A P Q P P D V G S S D P L S M

421 CCA CCG GGT ATT CTG GCT CCG CAA CCT CCA GAC GTC GGG AGT TCA GAT CCT CTG TCG ATG

V E P S Q G R S P S Y A S

481 GTA GAA CCG TCA CAA GGT CGC TCT CCT AGT TAC GCG TCA

Кодирующая пегилированное соединение 2 последовательность (SEQ ID NO:318)

M H P I P D S S P L L Q F G G Q V R Q R

1 ATG CAT CCT ATT CCT GAT TCT TCT CCT CTG CTG CAA TTT GGG GGT CAG GTG CGC CAA CGT

Y L Y T D D A Q Q T E A H L E I R E D G

61 TAC CTG TAC ACC GAC GAT GCG CAA CAG ACT GAG GCT CAC CTG GAG ATC CGT GAG GAC GGG

T V G G A A D Q S P E S L L Q L K A L K

121 ACT GTC GGA GGG GCT GCC GAT CAA TCC CCA GAG TCA CTG CTG CAA CTG AAA GCC CTG AAG

P G V I Q I L G V K T S R F L C Q R P D

181 CCT GGG GTC ATT CAG ATC CTG GGC GTA AAG ACG AGT CGT TTC CTG TGC CAA CGT CCT GAC

G A L Y G S L H F D P E A C S F R E L L

241 GGG GCA CTG TAT GGC TCG CTG CAT TTT GAT CCT GAG GCT TGT AGT TTT CGC GAA CTG CTG

L E D G Y N V Y pAF S E A H G L P L H L G

301 CTG GAA GAT GGT TAC AAT GTG TAT TAG AGT GAA GCA CAC GGT CTG CCT CTG CAT CTG GGC

S G R G P A R F L P L P G L P P A P P E

361 TCC GGC CGC GGT CCG GCC CGT TTT CTG CCA CTG CCT GGC CTG CCT CCA GCA CCA CCT GAA

P P G I L A P Q P P D V G S S D P L S M

421 CCA CCG GGT ATT CTG GCT CCG CAA CCT CCA GAC GTC GGG AGT TCA GAT CCT CTG TCG ATG

V E P S Q G R S P S Y A S

481 GTA GAA CCG TCA CAA GGT CGC TCT CCT AGT TAC GCG TCA

Как подробно описано в следующих примерах, получали дополнительные характеристики модифицированных полипептидов FGF-21, включая в себя исследование в отношении *in vitro* биологической активности, стабильности, способности к дезамидированию и образованию агрегатов, устойчивости к протеолизу

in vivo, иммуногенности, фармакокинетики и биологической активности *in vivo* в модели сахарного диабета.

Полные полипептидные последовательности полученных модифицированных FGF-21 полипептидов (чьи частичные последовательности показаны на фиг. 1A-B) являются следующими:

Соединение 1
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:101)

Соединение 2
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRS
PSYAS (SEQ ID NO:102)

Соединение 3
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:103)

Соединение 4
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGKKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:104)

Соединение 5
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGDKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:105)

Соединение 6
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:106)

Соединение 7
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE

AHGLPLHLPGDKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:107)

Соединение 8
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:108)

Соединение 9
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:109)

Соединение 10
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSP
SYAS (SEQ ID NO:110)

Соединение 11
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVE
PSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:111)

Соединение 12
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPHHSGRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:112)

Соединение 13
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGKDSQDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:113)

Соединение 14
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
GPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:114)

Соединение 15
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGREPSYAS (SEQ ID NO:115)

Соединение 16
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
PSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:116)

Соединение 17
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
GSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:117)

Соединение 18
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEP (SEQ ID NO:118)

Соединение 19
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:119)

Соединение 20
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGGHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP
SQGRSPSYAS (SEQ ID NO:120)

Соединение 21
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP
SQGRSPSYAS (SEQ ID NO:121)

Соединение 22
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLSGGPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQ
GRSPSYAS (SEQ ID NO:122)

Соединение 23
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS
YAS (SEQ ID NO:123)

Соединение 24
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ

LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYA
S (SEQ ID NO:124)

Соединение 25
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPSGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:125)

Соединение 26
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHSGGPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQG
RSPSYAS (SEQ ID NO:126)

Соединение 27
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHGSGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS
YAS (SEQ ID NO:127)

Соединение 28
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPHGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO:128)

Соединение 29
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPHSGGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO:129)

Соединение 30
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPHGSGRFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO:130)

Соединение 31
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLGSGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVTPSQGRSP
SYAS (SEQ ID NO:131)

Соединение 32
MHHHHHHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS
PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGY

NVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVG
SSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:132)

Пегилированное соединение 1
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDP
LSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:201)

Пегилированное соединение 2
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQG
RSPSYAS (SEQ ID NO:202)

Пегилированное соединение 5
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLPGDKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:205)

Пегилированное соединение 6
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLPGHKSRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:206)

Пегилированное соединение 10
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLGSGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGR
SPSYAS (SEQ ID NO:210)

Пегилированное соединение 11
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLGSGHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSM
VEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:211)

Пегилированное соединение 12
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLPHHSGRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:212)

Пегилированное соединение 19
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLGSGPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:219)

Пегилированное соединение 20
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLGGHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSM
VEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:220)

Пегилированное соединение 21
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLGSGRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:221)

Пегилированное соединение 22
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLSGGPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEP
SQGRSPSYAS (SEQ ID NO:222)

Пегилированное соединение 23
MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ
LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF
)SEAHGLPLHLGGGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRS
PSYAS (SEQ ID NO:223)

Дополнительные модифицированные полипептиды FGF-21 получали в виде слитых белков. Некоторые из модифицированных полипептидов FGF-21 содержали последовательность соединения 2 (SEQ ID NO:102), с N-концевым метионином или без него, слитую с одним или несколькими партнерами по слиянию, такими как домен Fc или его фрагмент, PKE аднектин (“PKE”), или модифицированная или немодифицированная последовательность сывороточного альбумина человека (“HSA”) и необязательно соединяющий пептид. Другие модифицированные полипептиды FGF-21 основаны на последовательности дикого типа соединения 1 (с N-концевым метионином или без него). Включали различные формы последовательности PKE аднектина. Они носят названия “PKE(1)” или “PKEI” и “PKE(2)” или PKEII. Аминокислотная последовательность PKE(1) представляла собой GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQTTA TISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQ (SEQ ID NO:319). Аминокислотная последовательность PKE(2) представляла собой GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEFTV PGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTP (SEQ ID NO:320). Когда PKE(1) или PKE(2) вводили на N-конце слитого белка, последовательность,

экспрессированная в E. coli, включала в себя N-концевой метионин, который, как предполагали, отщепляется с помощью met-экзопептидазы при экспрессии в E. coli, давая в результате зрелую последовательность без N-концевого метионина; предполагаемая зрелая форма белков слияния PKE без N-концевого метионина показана в перечне ниже.

Последовательность сывороточного альбумина человека, содержащаяся в некоторых белках слияния, представляла собой HuSA(C34A). Его аминокислотная последовательность представляет собой: DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC QAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRH PDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKET CFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:321).

Другая последовательность сывороточного альбумина человека, содержащаяся в некоторых белках слияния, представляла собой HSA (C34A, des Leu-585). Его аминокислотная последовательность представляет собой: DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC QAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRH PDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFH ADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKET CFAEEGKKLVAASQAALG (SEQ ID NO:322).

G4Sx3 относится к последовательности GGGGS, повторяющейся 3 раза, т.е. GGGGSGGGGSGGGGS.

Иллюстративные белки слияния содержали больше одного модифицированного полипептида FGF-21, например, соединения 141-146.

Последовательности соединений белков слияния показаны ниже, и признаки указанных белков слияния обобщенно представлены на фиг. 40A-C.

Соединение 101: PKE(2)-L1-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGSHPIPDSSPLL
QFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL
GVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGR
GPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:401)

Соединение 102: PKE(2)-L2-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSHPIPDSS
PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI
QILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLG
SGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:402)

Соединение 103: PKE(2)-L3-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPEEEEDEEEEDHP
IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKAL
KPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLP
LHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO:403)

Соединение 104: PKE(2)-L4-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPHPI
PDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL

HLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:404)

Соединение 105: PKE(2)-L5-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGSHHHHHHHH GSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQ LKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEA HGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS YAS (SEQ ID NO:405)

Соединение 106: PKE(2)-L6-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGGSG GGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQS EAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRS PSYAS (SEQ ID NO:406)

Соединение 107: PKE(2)-L7-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGGSG GGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQS EAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRS PSYAS (SEQ ID NO:407)

Соединение 108: PKE(2)-L8-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGSGSGSGSGSGS GSGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQS EAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRS PSYAS (SEQ ID NO:408)

Соединение 109: PKE(2)-L9-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSTPPTPSPSTPP

TPSPSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL
LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQS
EAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRS
PSYAS (SEQ ID NO:409)

Соединение 110: PKE(2)-L10-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPRGGEEKKKEKE
KEEQEERETKTPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE
DGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:410)

Соединение 111: PKE(2)-L11-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVG
GAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL
LEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDP
LSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:411)

Соединение 112: PKE(2)-L12-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSP
EPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSD
PLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:412)

Соединение 113: PKE(2)-L13-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSTPPTPSPSTPP
TPSPSPSTPPTPSPSTPPTPSPSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE
DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEAC
SFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:413)

Соединение 114: PKE(2)-L14-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPHPIPDSSP LLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI QILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLG SGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:414)

Соединение 115: PKE(2)-L15-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSP EPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPE SLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY QSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQG RSPSYAS (SEQ ID NO:415)

Соединение 116: PKE(2)-L16-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPPSP EPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAH LEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFD PEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ PPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:416)

Соединение 117: PKE(2)-L17-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPTPEPPSPEPPTP EPPSPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPE SLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY QSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQG RSPSYAS (SEQ ID NO:417)

Соединение 118: PKE(2)-L18-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPGGGSPTP EPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEA

HGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS
YAS (SEQ ID NO:418)

Соединение 119: PKE(2)-L19-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPEEEDPTP
EPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEA
HGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS
YAS (SEQ ID NO:419)

Соединение 120: PKE(2)-L20-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPPTPEPEEE
DPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAAD
QSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDG
YNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMV
EPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:420)

Соединение 121: PKE(2)-L21-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPTPEPPSPEPPTP
EPEEEDPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRED
GTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSF
RELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVG
SSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:421)

Соединение 122: PKE(2)-L22-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPTPEPPSPEPPTP
EPGGGGSPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR
EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEA
CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPD
VGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:422)

Соединение 123: PKE(2)-L23-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGREVQKYSDLGPLYIYQEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTPPSPEPTPEPSPEP

PTPEPSPEPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA
ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE
DGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:423)

Соединение 124: HuSA(C34A)-L201-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLY
TDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRP
DGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:424)

Соединение 125: HuSA(C34A)-L202-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQ
RYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFL

CQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPL
PGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:425)

Соединение 126: HuSA(C34A)-L203-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGETGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQR
YLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLC
QRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLP
GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:426)

Соединение 127: HuSA(C34A)-L204-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFG
GQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVK
TSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPA
RFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:427)

Соединение 128: HuSA(C34A)-L205-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTHPIPDSSPLLQFGG
QVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKT
SRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPAR
FLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:428)

Соединение 129: HuSA(C34A)-L206-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSP
LLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI
QILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLG
SGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:429)

Соединение 130: HuSA(C34A)-L207-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA

DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTGSTGSHPIPDSSPL
LQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSG
RGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID
NO:430)

Соединение 131: HuSA(C34A)-L208-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHP
IPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKAL
KPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLP
LHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS
(SEQ ID NO:431)

Соединение 132: HuSA(C34A)-L209-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP

NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGETGSSGEGTGSTGSGAGESHPIP
DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ
ID NO:432)

Соединение 133: HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPL
LQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSG
RGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID
NO:434)

Соединение 134: HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21 (соединение 2)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT

ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGETGSSGEGTGSTGSHPIPDSSPLL
QFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL
GVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGR
GPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID
NO:435)

Соединение 135: HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21 (соединение 1)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPL
LQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQI
LGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGN
KSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:436)

Соединение 136: HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21 (соединение 1)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS

QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQN
LIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETY
VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGETGSSGEGTGSTGSHPIPDSSPLL
QFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL
GVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNK
SPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
S (SEQ ID NO:437)

Соединение 137: FGF21 (соединение 2)-L205-HuSA(C34A)-
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSY
ASGETGSSGEGTDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLV
NEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER
NECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL
LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI
CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA
EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLG
KVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRP
CFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ
LKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO:440)

Соединение 138: FGF21 (соединение 2)-L209-HuSA(C34A)-
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSY
ASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQA
PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD
CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAR

RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA
DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVE
SKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC
CTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELV
KHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
(SEQ ID NO:441)

Соединение 139: FGF21 (соединение 2)-L210-HuSA(C34A)-
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSY
ASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVL
IAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVAT
LRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF
LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEG
KASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTE
CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYET
TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRY
TKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK
TPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI
KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGL (SEQ ID NO:442)

Соединение 140: FGF21 (соединение 1)-L209-HuSA(C34A)-
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG
PSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL
KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGK

ASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTEC
CHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD
LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETT
LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYT
KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAA
SQAALGL (SEQ ID NO:443)

Соединение 141: FGF21 (соединение 2)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (соединение 2)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSY
ASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQA
PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD
CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA
DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVE
SKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC
CTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELV
KHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLG
GGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVG
GAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL
LEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDP
LSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:446)

Соединение 142: FGF21 (соединение 1)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (соединение 1)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG

PSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL
KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGK
ASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTEC
CHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD
LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETT
LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYT
KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAA
SQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHL
EIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDP
EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPP
EPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:447)

Соединение 143: FGF21 (соединение 2)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-FGF21 (соединение 2)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSY
ASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQA
PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD
CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECA
DDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVE
SKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC
CTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELV
KHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGGG
GGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG
AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLL

EDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:448)

Соединение 144: FGF21 (соединение 1)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-FGF21 (соединение 1)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG
PSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL
KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGK
ASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTEC
CHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPAD
LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETT
LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYT
KKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT
PVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAA
SQAALGGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPE
ACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPE
PPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:449)

Соединение 145: FGF21 (соединение 2)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (соединение 2)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSY
ASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVL
IAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVAT
LRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF
LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEG
KASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTE
CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA

DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYET
TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRY
TKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK
TPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI
KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAH
LEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFD
PEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQ
PPDVGSSDPLSMVEPSQERSPSYAS (SEQ ID NO:450)

Соединение 146: FGF21 (соединение 1)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21 (соединение 1)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG
PSQGRSPSYASGETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGSDAHKSEVAHRFKDLG
EENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFG
DKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCT
AFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPK
LDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT
DLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE
VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLL
LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVL
NQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFA
EEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTD
DAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDG
ALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARF
LPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:451)

Соединение 147: PKE(1)-L1-FGF21 (соединение 2)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQGSHPIPDSSPLLQFGGQ
VRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTS

RFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARF LPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:452)

Соединение 148: PKE(1)-L2-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQGGGGSHPIPDSSPLLQF GGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV KTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:453)

Соединение 149: PKE(1)-L3-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQEEEEDEEEEDHPIPDSS PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI QILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLG SGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:454)

Соединение 150: PKE(1)-L4-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPPTPEPHPIPDSSP LLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI QILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLG SGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:455)

Соединение 151: PKE(1)-L5-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQGSHHHHHHHHGSHPIP DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH LGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:456)

Соединение 152: PKE(1)-L6-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQGGGGSGGGGSGGGGS

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:457)

Соединение 153: PKE(1)-L7-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQGGGGGSGGGSGGGGS
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:458)

Соединение 154: PKE(1)-L8-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQGSGSGSGSGSGSGSGS
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:459)

Соединение 155: PKE(1)-L9-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSTPPTPSPSTPPTPSPS
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK
ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH
GLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSY
AS (SEQ ID NO:460)

Соединение 156: PKE(1)-L10-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQRGGEEKKKEKEKEEQ
EERETKTPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS
PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYN
VYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPS
QGRSPSYAS (SEQ ID NO:461)

Соединение 157: PKE(1)-L11-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAA DQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLED GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSM VEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:462)

Соединение 158: PKE(1)-L12-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPPTPEPPSPEPPTP EPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAA DQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLED GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSM VEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:463)

Соединение 159: PKE(1)-L13-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSTPPTPSPSTPPTPSPS PSTPPTPSPSTPPTPSPSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREL LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSD PLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:464)

Соединение 160: PKE(1)-L14-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPHPIPDSSPLLQF GGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV KTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:465)

Соединение 161: PKE(1)-L15-FGF21 (соединение 2) GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPPTPEPPSPEPPTP EPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEA

HGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS
YAS (SEQ ID NO:466)

Соединение 162: PKE(1)-L16-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPPTPEPPSPEPPTP
EPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE
DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEAC
SFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV
GSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:467)

Соединение 163: PKE(1)-L17-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPPTPEPPSP
EPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEA
HGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPS
YAS (SEQ ID NO:468)

Соединение 164: PKE(1)-L18-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPGGGSPTPEPHPI
PDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPL
HLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS
(SEQ ID NO:469)

Соединение 165: PKE(1)-L19-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPEEEDPTPEPHPIP
DSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ
ID NO:470)

Соединение 166: PKE(1)-L20-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPPTPEPEEEDPSPE

PPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPES
LLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY
QSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQG
RSPSYAS (SEQ ID NO:471)

Соединение 167: PKE(1)-L21-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPPTPEPEEE
DPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVG
GAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL
LEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDP
LSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:472)

Соединение 168: PKE(1)-L22-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPTPEPPSPEPPTPEPGG
GGSPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRE
LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSS
DPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:473)

Соединение 169: PKE(1)-L23-FGF21 (соединение 2)
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHSYYEQNSYYRITYGETGGNSPVQEFTVPYSQT
TATISGLKPGVDYTITVYAVYGSKYYYPISINYRTEIEKPSQPSPEPTPEPSPEPPTPEP
SPEPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP
ESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV
YQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQ
GRSPSYAS (SEQ ID NO:474)

Соединение 170 [Fc(hIgG1a_191)-L7-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
SMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:475)

Соединение 171 [Fc(hIgG1a_191)- L250-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGGSGGGSGGGGGSGGGSGGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYG
SLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGI
LAPQPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:476)

Соединение 172 [Fc(hIgG1a_191)-L12-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT
EAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLH
FDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAP
QPPDVGSSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:477)

Соединение 173 [Fc(hIgG1a_191)-L251-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKPSPEPPTPEPPSPEPHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVG
GAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLE
DGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSM
VEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:478)

Соединение 174 [Fc(hIgG1a_191)-L5-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGSHHHHHHHHGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG
AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLED

GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVE
PSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:479)

Соединение 175 [Fc(hIgG1a_191)-L252-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKELQLEESAAEAQEGELEHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRE
LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDP
LSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:480)

Соединение 176 [Fc(hIgG1a_190)-L253-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GSSGGGGSGGGSGGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG
TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRE
LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDP
LSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:481)

Соединение 177 [Fc(hIgG1a_191)-L6-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGGSGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
SMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:482)

Соединение 178 [Fc(hIgG1a_189)-L6-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

GGGGSGGGGSGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG
AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLED
GYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVE
PSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:483)

Соединение 179 [Fc(hIgG1a_191)-L7-FGF21-1aa (соединение 2 с удаленной С-концевой аминокислотой)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
SMVEPSQGRSPSYA (SEQ ID NO:484)

Соединение 180 [Fc(hIgG1a_191)-L7-FGF21-3aa (соединение 2 с тремя удаленными С-концевыми аминокислотами)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGT
VGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFREL
LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPL
SMVEPSQGRSPS (SEQ ID NO:485)

Соединение 181 [Fc(hIgG1f_1,1_186)-L7-FGF21 (соединение 2)]

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEAC
SFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVG
SSDPLSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:486)

Соединение 182 [Fc(hIgG1a_191b)-L7-FGF21 (соединение 2)]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGGGGGSGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRE LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLGSGRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDP LSMVEPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:487)

Пример 5

***In vitro* активность молекул FGF-21 с делецией**

В настоящем примере активность некоторых модифицированных полипептидов FGF-21 исследуют и сравнивают с активностью пегилированного соединения 1 в клеточном *in vitro* анализе активации рецептора. Показано, что некоторые модифицированные полипептиды FGF-21, включая в себя пегилированное соединение 2, характеризуются активностью, сопоставимой с пегилированным соединением 1.

Способы

Клональную клеточную линию эмбриональной почки человека (HEK) 293, стабильно экспрессирующую β-klotho человека, создавали, чтобы охарактеризовать варианты FGF21 в первичном *in vitro* анализе. Клетки HEK-293 трансфектировали по следующему протоколу производителя для реагента для трансфекции липофектамина 2000 (Invitrogen) и с использованием линеаризованной плазмиды, кодирующей β-klotho человека с С-концевой меткой FLAG (N-DYKDDDDK-C в однобуквенном аминокислотном коде) под контролем цитомегаловирусного промотора. Положительные клоны выделяли через 14 дней роста в селективной среде [600 мкг/мл генетицина (Invitrogen) в среде Игла, модифицированной по способу Дюльбекко (DMEM) с 4,5 г/л D-глюкозы, содержащей L-глутамин, Hepes (Invitrogen) и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS)].

В первичном анализе измеряли зависимое от варианта FGF21 фосфорилирование регулируемой внеклеточным сигналом киназы 1/2 (pERK1/2) в клональной клеточной линии HEK-293, стабильно экспрессирующей β-klotho человека. Для анализов клетки высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур (Falcon) с плотностью, составляющей 40000 клеток на лунку в 200 мкл селекционной среды и содержали при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO_2. Через 48 часов всю селекционную среду

заменяли бессывороточной среде (DMEM с 4,5 г/л D-глюкозы и 0,1% не содержащего жирные кислоты бычьего сывороточного альбумина), и клетки содержали в течение 6 часов при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO_2. Подлежащие исследованию соединения серийно разводили в бессывороточной среде. Анализ начинали путем замещения бессывороточной среды на клетках разведенными соединениями, инкубацию проводили в течение 7 минут при комнатной температуре, и реакцию останавливали путем удаления соединений и добавления 100 мкл лизисного буфера (набор Perkin Elmer AlphaScreen) к каждой лунке. Планшеты встряхивали при ~ 80 об/мин в течение приблизительно 10 минут при комнатной температуре и хранили замороженными при -80˚C. Аликвоту (4 мкл) из каждой лунки оттаянного клеточного лизата анализировали в отношении pERK1/2 согласно протоколу производителя для набора Surefire AlphaScreen pERK1/2 и набора для определения IgG AlphaScreen IgG Detection, белка A, (Perkin Elmer) с использованием 384-луночных белых планшетов Proxiplate (Perkin Elmer). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение двух часов в темноте и затем считывали на устройстве для считывания нескольких планшетов Envision 2103 (Perkin Elmer) с использованием протокола AlphaScreen. Данные сопоставляли с 4-парметрическим уравнением зависимости ответа от log(агониста) с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5.

Результаты

In vitro активность определяли путем измерения FGF21-зависимого фосфорилирования регулируемой внеклеточными сигналами киназы (ERK) 1/2 в клеточной линии эмбриональной почки человека (HEK) 293, в которую β-Klotho человека стабильно вводили для функционирования в качестве корецептора с эндогенно экспрессированными сплайс-вариантами FGFR. Активность оценивали путем определения значения средней EC_{50} или pEC_{50} (отрицательное основание10 log концентрации EC_{50}, выраженное в моль на литр) для каждого исследованного соединения. Иллюстративная кривая зависимости ответа от дозы показана на фиг. 2 для пегилированного соединения 1 и пегилированного соединения 2. Результаты для дополнительных исследованных соединений показаны в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Значения EC50 для *in vitro* активности модифицированных FGF-21 в анализе pERK.

Название соединения	pERK EC50 (нМ) n=3
Пегилированное соединение 1	6,7

Соединение 2	4,6
Соединение 3	28
Соединение 5	69,2
Соединение 6	39,1
Соединение 7	28,4
Соединение 10	21,9
Соединение 11	28,2
Соединение 12	31,9
Соединение 19	5,1
Соединение 20	3,9
Соединение 22	4,1
Соединение 23	30

Таблица 5. Значения EC50 для *in vitro* активности модифицированных FGF-21 в анализе pERK.

Название соединения	**EC50 (нМ)**
Пегилированное соединение 1	14
Пегилированное соединение 2	28
Пегилированное соединение 5	24
Пегилированное соединение 6	20
Пегилированное соединение 10	28
Пегилированное соединение 11	30
Пегилированное соединение 12	39
Пегилированное соединение 19	30
Пегилированное соединение 20	42
Пегилированное соединение 21	30
Пегилированное соединение 22	36
Соединение 32 (непегилированный контроль)	8

Пример 6

Исследование термической стабильности модифицированных полипептидов FGF-21

В настоящем примере термическую стабильность модифицированных полипептидов FGF-21 измеряли с использованием термической сканирующей флуоресценции (TSF) и дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Термическая стабильность признана в литературе как прогностическое значение для определения склонности к образованию агрегатов (см., например, Webster, “Predicting Long-Term Storage Stability of Therapeutic Proteins,” Pharmaceutical Technology, Volume 37, Issue 11, pp. 42-48, Nov 2, 2013).

Способы

Термические срединные точки денатурации измеряли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрия в MicroCal (Malvern Instruments) автоматическом VP-DSC. Для анализа DSC образцы белка составляли в 250 мМ сахарозы, 20 мМ гистидина, pH 7,0 в концентрации, составляющей приблизительно 2 мг/мл с частотой сканирования 90°C в час. Эталонную ячейку заполняли идентичным буфером без белка. Точки перехода (Tm) фазового перехода между свернутыми и термически развернутыми белковыми доменами при условиях растворения и прилагаемую частоту сканирования определяли из максимумов пиков, наблюдаемых на кривой термограммы (стрелки).

Для термической сканирующей флуоресценции (TSF) белок разводят до 0,2 мг/мл в представляющем интерес буфере и добавляют небольшое количество флуоресцентного флуорофора анилинонафталенсульфоновой кислоты (ANS). Образцы помещают в 96-луночный тонкостенный планшет для ПЦР и температуру образца белка в присутствии внешнего флуорофора увеличивают, при этом флуоресценцию образца подвергают мониторингу на приборе для проведения ПЦР Bio-Rad CT1000-RT PCR. Срединную точку термического разворачивания белка определяют путем мониторинга увеличения флуоресцентного сигнала зонда, так как он взаимодействует с вновь открытым для взаимодействия гидрофобной сердцевиной подвергаемого термической денатурации белка. Температуру точки разворачивания (Tm) при исследуемых буферных условиях и условиях частоты сканирования определяли как точку перегиба кривой подъема флуоресцентного сигнала.

Результаты

Репрезентативные результаты сканирования DSC показаны на фиг. 3. Наблюдали, что пегилированное соединение 2 характеризуется температурой точки перехода (“Tm”) приблизительно на 8°C выше чем пегилированное соединение 1. Термическая обратимость составляла >95% (данные не показаны).

На фиг. 4 показаны репрезентативные результаты для TSF. Соединение 10 проявляло приблизительно 8°C увеличение в Tm относительно соединения 1 (характеризующегося последовательностью FGF-21 дикого типа, за исключением того, что N-концевой метионин был включен для экспрессии в *E. coli*). Результаты в отношении дополнительных соединений показаны в таблице 6 ниже.

Вместе эти результаты указывают на то, что иллюстративные соединения с достаточной вероятностью будут характеризоваться пониженной склонностью к

образованию агрегатов, например, соединения 2, 10, и 16. Пониженная склонность к образованию агрегатов, как предполагают, обеспечивает более длительный срок годности и/или способность к введению в состав с большей концентрацией.

Таблица 6. Результаты термической стабильности, определенные с помощью термической сканирующей флуоресценции для модифицированных полипептидов FGF-21 по сравнению с соединением 1. Повышенную термическую стабильность наблюдали вплоть до приблизительно 7-8°C для некоторых соединений.

Соединение	Tm (°C)	Отличие от соединения 1
Соединение 1	46,63	0
Соединение 2	53,2	6,57
Соединение 3	46,92	0,29
Соединение 5	47,46	0,83
Соединение 6	43,2	-3,43
Соединение 7	42,78	-3,85
Соединение 10	54,5	7,87
Соединение 11	43,9	-2,73
Соединение 12	45,4	-1,23
Соединение 14	42,97	-3,66
Соединение 16	50,8	4,17
Соединение 18	47,96	1,33

Пример 7

Дезамидирование и образование агрегатов

В настоящем примере описана оценка дезамидирования и образования агрегатов для модифицированных полипептидов FGF-21.

Способы

Исследования термического стрессового воздействия:

Образцы представляющего интерес белка получают в буфере для исследования (250 мМ сахарозы, 20 мМ гистидин, pH 6,5 и pH 7 или 20 мМ Трис, pH 7,5) в концентрации, составляющей 7,5 мг белка/мл. Образцы исследовали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (aSEC) и анализа вариантов, отличающихся зарядом, с помощью динамического капиллярного

изоэлектрофокусирования (icIEF) со значением времени = 0. Образцы затем исследовали в стрессовых условиях путем их помещения в инкубатор при 25°C в течение 1 недели и затем при 40°C в течение 5 недель. Аликвоты отбирали и исследовали с помощью icIEF и aSEC в различных временных точках в течение следующих 4 - 5 недель после отбора и дополнительно исследовали с помощью aSEC и icIEF для мониторинга стабильности.

aSEC

Эксклюзионную хроматографию (aSEC) проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA) на колонке Zenix-C 300 SEC (Sepax Technologies, Newark, DE USA) с размерами 300 x 4,6 мм. Используемая подвижная фаза представляла собой 200 мМ фосфата калия и 150 мМ хлорида натрия, доведенного до pH 6,9, с объемной скоростью потока, составляющей 0,35 мл/мин. Приблизительно 20 мкг образца вводили для каждого анализа. Разделение подвергали мониторингу при УФ 280 нм. Количественное определение мономера в зависимости от высокомолекулярных молекул проводили путем интеграции площади под кривой при значениях времени удерживания, соответствующих каждому виду.

icIEF

Дезамидирование обнаруживали с помощью анализа вариантов, отличающихся зарядами, (дезамидирование увеличивает суммарный отрицательный заряд белка и образование кислых вариантов), проведенного с помощью динамического капиллярного изоэлектрофокусирования (icIEF), который проводили на приборе iCE280 (ProteinSimple, Santa Clara, CA USA) с использованием покрытого фторуглеродом капилляра, 100 мкм x 50 мм. Образец разводили до 0,3 мг/мл с использованием раствора, который содержит 0,35% метилцеллюлозы, 4% pH3-10 фармалитов, 4 М мочевины и 2% маркера pI. Анолит и католит представляют собой 0,08 М ортофосфорной кислоты и 0,1 М гидроксида натрия, соответственно. Фокусирования достигали путем приложения 1,5 кВ в течение 2 мин и затем 3,0 кВ в течение 11 мин. Количественное определение модифицированных в отношении (-) заряда молекул относительно исходных молекул проводили путем интеграции соответствующей площади под кривыми.

Результаты

Биофизические свойства пегилированного соединения 2 продемонстрировали превосходство над пегилированным соединением 1. Никакого разложения не наблюдали в течение 5 недель при 2-8°C наряду с низкими скоростями разложения, наблюдаемыми при ускоренных условиях при 40°C относительно пегилированного соединения 1 (фиг. 5). Восьминедельные исследования при ускоренных условиях показало, что

пегилированное соединение 2 превосходит пегилированное соединение 1 в исследуемом составе (гистидин/сахароза, pH 7,0). При указанных условиях дезамидирование прекращалось и пегилированное соединение 2 характеризовалось пониженной склонностью к образованию растворимых высокомолекулярных (HMW) агрегатов. Указанные результаты указывают на то, что пегилированное соединение 2 характеризуется более широким диапазоном pH для возможностей получения состава с пониженными склонностями к агрегации по сравнению с пегилированным соединением 1.

Кроме того, оценивали образование HMW агрегатов. Пониженное образование HMW агрегатов при данной концентрации является показателем большей растворимости, что будет приводить к способности быть введенным в состав с повышенной концентрацией. На фиг. 6 проиллюстрировано образование HMW агрегатов для некоторых модифицированных полипептидов FGF-21 и соединения 1. Для большинства исследованных соединений образование агрегатов снижалось относительно пегилированного соединения 1 (например, пегилированное соединение 2 и пегилированное соединение 10). Для некоторых соединений образование HMW агрегатов являлось сходным или выше чем для пегилированного соединения 1.

Кроме того, оценивали дезамидирование. На фиг. 7 проиллюстрированы обнаруженные уровни дезамидирования (на которые указывало образование кислых вариантов с течением времени) для некоторых модифицированных полипептидов FGF-21 и пегилированного соединения 1. Для всех показанных модифицированных полипептидов FGF-21 уровни обнаруженного дезамидирования снижались по отношению к пегилированному соединению 1.

Пример 8

Оценка растворимости модифицированных полипептидов FGF-21

В указанном примере описано измерение относительной растворимости модифицированных полипептидов FGF-21. Результаты указывают на способность соединения быть составленным в относительно большей концентрации, что будет обеспечивать облегченное введение эффективной дозировки.

Способы

Оценки относительной растворимости проводили с помощью последовательных циклов концентрирования в пробковом потоке с последующим анализом с помощью эксклюзионной хроматографии. Образцы, составленные в PBS pH 7,2 при сходных, но

не идентичных начальных концентрациях, вводили с помощью пипетки в центрифужные концентраторы с ограничением 3 кДа молекулярной массы и центрифугировали со скоростью, составляющей 4750 об/мин в течение 10 минутных, 15 минутных и 30 минутных циклов при 4°C. Между циклами центрифугирования аликвоты удаляли из прибора для концентрирования и анализ аналитической эксклюзионной хроматографии (aSEC) проводили (на колонке GE Healthcare Superdex S-75 10/300 GL, уравновешенной в буфере PBS, pH 7,2) для определения концентрации HMW и видов мономеров в растворе.

Общие концентрации определяли по поглощению при 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop. Процент высокомолекулярных молекул определяли с помощью расчетов площади под кривой высокомолекулярных пиков относительно пиков мономеров на кривой хроматограммы SEC. Полученные точки данных наносят на график для визуализации рангового порядка от наименее растворимых конструктов к наиболее растворимым при исследуемых условиях, чем ниже наклон, созданных точками данных, тем более стабилен вариант белка при исследованных условиях.

Результаты

Относительную растворимость модифицированных полипептидов FGF-21 определяли путем измерения образования высокомолекулярных (HMW) агрегатов в зависимости от концентрации белка. Пониженное образование HMW агрегатов при данной концентрации является показателем большей растворимости, что будет приводить к способности быть составленным в большей концентрации.

Наклон кривой растворимости в пробковом потоке для исследованных соединений показан ниже в таблице 7 (пониженные значения указывают на пониженное образование агрегатов и, следовательно, на способность быть составленным в большей концентрации). Относительно низкие уровни образования наблюдали для некоторых соединений (например, соединения 2 и соединения 10), что указывало на пониженное образование агрегатов и большую растворимость (фиг. 8 и таблица 7). Самый высокий наклон растворимости в пробковом потоке наблюдали для соединения 1.

Таблица 7. Результаты растворимости в пробковом потоке для модифицированных полипептидов FGF-21.

Соединение	**Наклон растворимости в пробковом потоке**

Соединение 1	1,863
Соединение 2	0,3171
Соединение 3	1,2219
Соединение 5	0,8548
Соединение 6	1,1353
Соединение 7	1,4318
Соединение 10	0,3647
Соединение 11	1,1156
Соединение 12	1,0317
Соединение 19	0,9743
Соединение 20	1,1545
Соединение 22	0,1997
Соединение 23	0,771

Пример 9

Исследование иммуногенности молекул FGF-21 с делецией

Проводили исследования ответ Т-клеточной активации и показали, что последовательность белка, используемая в большинстве соединений, представляла эквивалентный ответ относительно белковой последовательности, используемой в пегилированном соединении 1.

Способы

Иммуногенность оценивали с помощью анализа пролиферации CD4+ Т-клеток. Мононуклеары периферической крови (PBMC) из разнообразного набора доноров крови человека выделяли с использованием градиента Ficoll. Доноров типировали в отношении HLA для обеспечения охвата изменчивости аллеля MHC класса II, присутствующей в человеческой популяции. После мечения PBMC с карбоксифлуоресцеинсукцинимидиловым сложным эфиром (CFSE) помещали в 96-луночный формат с плотностью 200000 клеток на лунку в стандартной среде для культивирования клеток в присутствии исследуемого соединения в течение 7 дней. Пролиферацию CD4+ Т-клеток анализировали путем мечения с помощью антитела к CD4 и проточной цитометрии. Процентную антигенность белков рассчитывают как процентное отношение доноров, которые показывают значительный ответ CD4+ Т-клеточной пролиферации по сравнению с контролем, содержащим только среду.

Результаты

В in vitro оценке риска иммуногенности с использованием анализа пролиферации Т-клеток человека 13 из 40 доноров (32,5%) показали CD4+ пролиферативный ответ через 7 дней воздействия соединения 2 по сравнению с 15 из 40 доноров, которые показали положительный сигнал от соединения 1 (содержащего последовательность FGF-21 дикого типа за исключением того, что оно включало N-концевой метионин для экспрессии в *E. coli*) (фиг. 9). Наряду с тем, что указанный клеточный эксперимент не замещает реальных наблюдений иммунологического ответа человека, этот анализ указывает на то, что отсутствует повышенный риск иммуногенности соединения 2 для человека по сравнению с FGF21 дикого типа.

Дополнительные модифицированные полипептиды FGF-21 исследовали в анализе CD4+ пролиферации относительно соединения 1 (фиг. 9). Иммуногенность, как правило, являлась аналогичной наблюдаемой для контрольной последовательности FGF21 (соединение 1), за исключением соединения 10, которое проявляло относительно повышенный иммунный ответ, указывая на то, что соединение может являться нежелательно иммуногенным при введении пациентам-людям.

Пример 10

***In vivo* стабильность интактных на С-конце (активных) модифицированных полипептидов FGF-21**

В настоящем исследовании оценивали содержание интактных на С-конце (т.е. активных) модифицированных полипептидов FGF-21 *in vivo*. Пегилированное соединение 2 проявляло сильно повышенную пропорцию интактного на С-конце, активного полипептида по сравнению с пегилированным соединением 1, включая в себя повышенную продолжительность *in vivo* активности.

Способы

Фармакокинетику пегилированного соединения 2 и пегилированного соединения 1 оценивали у яванских макак после подкожной (SC) дозы, составляющей 0,25 мг/кг и 0,225 мг/кг, соответственно. Образцы крови (0,2 мл) собирали через 0, 0,25, 0,5, 1, 3, 7, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 часов после введения лекарственного средства и хранили при - 80° С до биоанализа.

Параметры PK общего и интактного на С-конце пегилированного соединения 1 и пегилированного соединения 2 получали с помощью некомпартментного анализа концентрации в сыворотке или плазме в зависимости от времени (Phoenix™ WinNonlin®,

6,3, Pharsight Corporation, St. Louis, MO). Площадь под кривой от нуля до бесконечности [AUC(tot)] рассчитывали с использованием комбинации линейных и логарифмических трапецеидальных суммирований. Оценки AUC и периода полужизни (t 1/2) проводили с использованием минимум 3 временных точек с определяемыми количественно концентрациями.

Концентрации общего пегилированного соединения 1 в исследованиях PK сигнала от дозы измеряли с использованием невалидизированного, основанного на Meso Scale Discovery (MSD) электрохемилюминесцентного иммуносорбентного анализа (ECLIA). ПЭГ-специфическое моноклональное антитело (mAb) использовали для захвата пегилированного соединения 1 с последующим использованием кроличьего поликлонального антитела к FGF21 (pAb) для обнаружения общего пегилированного соединения 1.

Подкожную (SC) фармакокинетику (PK) пегилированного соединения 2 и пегилированного соединения 1 также оценивали у самцов мышей линии Ob/Ob. Пегилированное соединение 2 вводили мышам (n=3/временная точка/путь введения) в виде отдельной SC инъекции 0,1 мг/кг. Пегилированное соединение 1 вводили в виде отдельной SC дозы 0,05 мг/кг. Образцы крови собирали в различные временные точки после введения лекарственного средства и обрабатывали по существу так, как описано для яванских макак.

Регистрацию проводили с помощью электрохемилюминесценции, выраженной в относительных световых единицах (RLU), которая являлась пропорциональной количеству общего пегилированного соединения 1, связанного с помощью реагентов захвата и обнаружения. Стандартные кривые находились в диапазоне от 0,2 до 154 нг/мл. Исследуемые образцы количественно определяли с использованием 4-параметрической логистической регрессионной модели с весовым коэффициентом, составляющим 1/Y. Такой же анализ использовали для измерения концентраций интактного на С-конце пегилированного соединения 1 в сыворотке крыс ZDF и яванских макак за исключением того, что кроличье поликлональное антитело к FGF21, специфическое к С-концу пегилированного соединения 1, использовали для обнаружения. Стандартные кривые находились в диапазоне от 0,2 до 154 нг/мл. Исследуемые образцы количественно определяли с использованием 4-параметрической логистической регрессионной модели с весовым коэффициентом, составляющим 1/Y.

Результаты

Пегилированное соединение 1 подвергается протеолизу *in vivo*, так что с течением времени основная часть соединения превращается в усеченную, неактивную форму. *In vivo* протеолитическую стабильность пегилированных соединений 1 и 2 сравнивали друг с другом у мышей *ob/ob* (фиг. 10) и яванских макак (фиг. 11). Указанные результаты показывают, что AUC активной, интактной на С-конце формы увеличивалась в 7-8 раз для модифицированного соединения FGF-21, содержащего делецию (пегилированное соединение 2) по сравнению с пегилированным соединением 1, указывая на то, что пегилированное соединение 2 характеризуется повышенной i*n vivo* протеолитической стабильностью.

Пример 11

Фармакокинетические исследования модифицированных полипептидов FGF-21

Указанный пример представляет результаты фармакокинетических исследований с использованием модифицированных полипептидов FGF-21 у мышей, крыс и яванских макак (см. таблицу 8 ниже).

Кратко, клиренс пегилированного соединения 2 являлся низким у мышей, крыс и обезьян (диапазон: 0,94 - 2,6 мл/ч/кг). Объем распределения (Vss), при ~0,04 - 0,05 л/кг являлся близким объему плазмы и показывал минимальное распределение во внесосудистом пространстве. Подкожная (SC) биодоступность являлась приемлемой у мышей (40%) и обезьян (58%), тогда как она являлась относительно низкой у крыс (16%). Эта низкая SC биодоступность могла являться специфической для крыс, так как другие пегилированные молекулы, согласно наблюдениям, характеризовались сходным явлением (низкая SC биодоступность у крыс с хорошей биодоступностью у мышей, обезьян и людей). Важнее, что SC биодоступность для пегилированного соединения 2 у этих видов (включая в себя крыс) являлась в 2 - 3,4 раза выше относительно пегилированного соединения 1.

После SC введения пегилированного соединения 2 мышам, крысам и обезьянам наблюдали устойчивое (7-8-кратное) увеличение нормированного к дозе воздействия (AUC) интактного белка относительно пегилированного соединения 1. Увеличенные воздействия интактного пегилированного соединения 2 после подкожного введения можно объяснить пониженным системным клиренсом (в 2 – 5 раз) наряду с улучшением

(в 2 - 3,4 раз) в подкожной биодоступности у всех трех видов относительно пегилированного соединения 1.

Общее пегилированное соединение 2, состоящее из смеси протеолитических фрагментов и интактного пегилированного соединения 2, также измеряли в указанных фармакокинетических исследованиях. Соотношение AUC интактного пегилированного соединения 2 к общему пегилированному соединению 2 у мышей и крыс являлось близким 1 после IV (внутривенное) введения, указывая на минимальный системный протеолиз. Тем не менее, после SC введения соотношение составляло 0,6 - 0,86 у этих видов, указывая на некоторый протеолиз в месте SC. Аналогичную тенденцию наблюдали у обезьян, где соотношение AUC интактного пегилированного соединения 2 к общему пегилированному соединению 2 являлось немного ниже после SC введения по сравнению с IV (0,7 после SC по сравнению с 0,8 после IV введения дозы).

В целом, пегилированное соединение 2 продемонстрировало благоприятные in vitro и in vivo фармакокинетические свойства, включая в себя увеличенную биодоступность, пониженный клиренс и увеличенную AUC (площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени).

Таблица 8. IV и SC фармакокинетика интактного модифицированного белка FGF-21 у мыши, крысы и обезьяны.

Виды	*Мышь*		*Крыса*		*Обезьяна*	
	Пегилированное соединение 1	Пегилированное соединение 2	Пегилированное соединение 1	Пегилированное соединение 2	Пегилированное соединение 1	Пегилированное соединение 2
CL (мл/ч/кг)	6,1	2,5	6,2 ± 0,7	2,6 ± 0,4	4,4 ± 1	0,94 ± 0,05
Vss (л/кг)	0,043	0,044	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,005	0,04 ± 0,003
Период полужизни (ч)	47	26	35 ± 1	24 ± 3,9	13 ± 2	57 ± 4,2
MRT (h)	7,1	20	8,4 ± 0,3	20 ± 1,3	16 ± 2,5	47 ± 1,5
SC BA (%)	15	40	4,8	16,3	30	58
*SC AUC (мкг/мл*ч)*	1,2	8,1	0,39 ± 0,07	3,1 ± 0,2	20 ± 2,2	154 ± 63

Сокращения: CL: Кажущийся общий клиренс лекарственного средства из плазмы; Vss: Кажущийся объем распределения в равновесном состоянии; MRT: Среднее время удержания; SC BA: подкожная биодоступность; SC AUC: подкожная площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени.

Пример 12

***In vivo* исследования повторного введения дозы модифицированных полипептидов FGF-21 в мышиной модели сахарного диабета**

Пегилированное соединение 2 и пегилированное соединение 1 оценивали по сравнению друг с другом в 21-дневном исследовании повторного введения дозы. Результаты демонстрируют, что наряду с тем, что оба соединения являлись эффективными для уменьшения интенсивности метаболических симптомов, более длительный in vivo период полужизни активного пегилированного соединения 2 приводил к большим терапевтическим эффектам, особенно по сравнению с эффектами еженедельного введения дозы.

Способы

Самцы мышей линии *ob/ob* (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) характеризовались возрастом 8 недель в начале исследования. Мышей рандомизировали на группы лечения на основании массы тела и содержаний глюкозы. Все группы получали лечение с помощью подкожного (s.c.) введения 1 мл/кг растворов для введения дозы. Группы лечения являлись следующими: 1) несущая среда (250 мМ сахарозы/20 мМ Трис, pH 8,3) дважды в неделю (BIW), 2) пегилированное соединение 1, 0,15 мг/кг BIW, 3) пегилированное соединение 2, 0,15 мг/кг BIW, 4) пегилированное соединение 1, 0,3 мг/кг один раз в неделю (QW), или 5) пегилированное соединение 2, 0,3 мг/кг QW. Мышам, которым вводили только соединение один раз в неделю, вводили несущую среду в тот день, когда BIW группам вводили их вторую в неделю инъекцию соединения. Массу тела, содержание глюкозы, триглицеридов (клинический химический анализатор Olympus, AU680) и инсулина в плазме (ELISA, Mercodia Inc.) определяли в течение 21-дневного периода введения доз после еды. Гликированный гемоглобин (HbA1c) определяли в цельной крови в начале исследования и по его окончанию, также с помощью анализатора Olympus.

Результаты

Как пегилированное соединение 1, так и пегилированное соединение 2 вводили подкожно с использованием доз, составляющих 0,15 мг/кг дважды в неделю (BIW) и 0,3 мг/кг QW. Концентрации в плазме, измеренные при минимальном значении на 21 день, показывают, что воздействие общего (интактного и протеолизированного) FGF21 являлось аналогичным для обоих вариантов, но воздействие активного, интактного на С-конце пегилированного соединения 2 являлось в 12 – 25 раз выше, чем воздействие пегилированного соединения 1 после введения QW или BIW, соответственно (таблица 9).

Таблица 9: Воздействие интактного на С-конце пегилированного соединения 1 и пегилированного соединения 2 при минимальном значении через 21 день от повторного введения дозы у мышей *ob/ob* (среднее ± s.e.m. (стандартная ошибка среднего))

Параметр	**Пегилированное соединение 2 BIW (0,15 мг/кг)**	**Пегилированное соединение 1 BIW (0,15 мг/кг)**	**Пегилированное соединение 2 QW (0,3 мг/кг)**	**Пегилированное соединение 1 QW (0,3 мг/кг)**
Минимальная концентрация перед введением следующей дозы (нг/мл)	175 ± 43	7 ± 0,7	38 ± 3	3 ± 0,1
Прогнозируемая Cmax (нг/мл)*	1064	313	2149	633
Прогнозируемая AUC (мкг/мл*ч)*	107	18	107	18

* Прогнозируемые на основе однократной дозы фармакокинетические данные у мышей ob/ob

Гликированный гемоглобин (HbA1c) получали *in vivo* из неферментативного добавления глюкозы к специфическим аминокислотам в указанном белке, и измеренный процент HbA1c соответствует среднему значению глюкозы в крови, интегрированному по продолжительности циркуляции эритроцитов. Значение HbA1c, превышающее 6,5%, представляет собой диагностический критерий сахарного диабета. Скорректированные на несущую среду изменения в HbA1c на 21 день исследования повторного введения дозы показаны на фиг. 12. Введение BIW 0,15 мг/кг любых полипептидов FGF21 приводило в норму HbA1c до значений меньше чем 5% после 21-дневного введения. Тем не менее, только пегилированное соединение 2 статистически достоверно снижало ΔHbA1c по сравнению с несущей средой с введением QW 0,3 мг/кг, согласуясь со значительным увеличением в функциональном воздействии активного интактного на С-

конце белка. Указанные результаты указывают на то, что поддержание целевой минимальной концентрации (C_{trough}) может являться достаточным для эффективности (таблица 9).

Согласуясь с результатами пониженного содержания HbA1c, содержания глюкозы в плазме также значительно снижались в течение исследования (все группы $p < 0,01$ для 2 - 21 дня по сравнению с несущей средой, за исключением доз QW на 14 дня, для которых пегилированное соединение 2 достигало статической значимости ($p < 0,05$), а пегилированное соединение 1 не являлось статистически значимым) (фиг. 16). В целом, изменение AUC глюкозы (различие в % по отношению к несущей среде) значительно снижалось для всех групп лечения в течение исследования ($p < 0,001$ по сравнению с несущей средой) (фиг. 17).

Кроме того, плазма триглицерид содержания являлись значительно пониженными в группе пегилированного соединения 2 по сравнению с несущей средой, на 2 и 4 день для группы BIW ($p < 0,01$) и на 2, 4 и 10 и 17 дни для группы QW ($p < 0,01$), а также на 2 и 17 день для группы пегилированного соединения 1 QW ($p < 0,05$) (фиг. 18).

Пегилированное соединение 2 значительно снижало прирост массы тела в % относительно несущей среды или пегилированного соединения 1 в течение продолжительности 21-дневного исследования у мышей *ob/ob* (фиг. 13 и фиг. 14). Введение QW 0,3 мг/кг пегилированного соединения 2 показывает сниженную эффективность на 7, 14 и 21 день, когда массу тела измеряли при минимальной концентрации, вновь указывая на то, что поддержание целевой минимальной концентрации (C_{trough}) может являться достаточным для эффективности.

Введение BIW 0,15 мг/кг пегилированного соединения 2 статистически значимо снижало содержания инсулина в плазме в течение 21-дневного исследования повторного введения дозы у мышей *ob/ob* (фиг. 15); введение BIW пегилированного соединения 1 не значительно снижало инсулина в плазме через 10 дней. Введение QW 0,3 мг/кг пегилированного соединения 2 приводило к кажущемуся “пилообразному” профилю с тенденцией к превышению значений в группе, получившей несущую среду, на 14 и 21 день, если содержание инсулина измеряли при минимальной концентрации соединения. Этот паттерн указывает на то, что пегилированное соединение 2 может сохранять содержание инсулина в поджелудочной железе при постоянном введении доз.

Указанные результаты показывают, что поддержание минимальной концентрации, составляющей 175 нг/мл (таблица 9) для пегилированного соединения 2

в 0,15 мг/кг BIW приводило к значительным улучшениям показателей гликемии и изменений массы тела.

Относительно пегилированного соединения 1 увеличенное воздействие активного интактного на С-конце пегилированного соединения 2 в мышиной модели *b/ob* приводило к усиленной зависимой от дозы активности *in vivo* и увеличенной продолжительности действия с введением QW, приводя к превосходным снижениям уровней HbA1c, прироста массы тела и инсулина в плазме.

Пример 13

Прогрессирование от жировой инфильтрации печени до неалкогольного стеатогепатита (NASH) может в конце концов привести к фиброзу печени. В настоящем примере описано применение полипептида FGF-21, содержащего полипептид FGF-21 человека, модифицированный так, чтобы он содержал замену пара-ацетил-L-фенилаланина на глутамин в положении 108 и соединенный с 30 кДа полиэтиленгликолем (пегилированное соединение 1 или “ПЭГ-соединение 1,” SEQ ID NO:201) в модели фиброза. Конкретно, ПЭГ-соединение 1 исследовали в 2-параметрической модели NASH Stelic, в которой мышей C57BL6 лечат с помощью стрептозотоцина кратковременно после рождения для индукции сахарного диабета и затем помещают на высокожировую диету в 4-недельном возрасте. У этих мышей развивается жировая инфильтрация печени (5 недель), NASH (7 недель), фиброз печени (9 недель), и в конце концов гепатоклеточная карцинома (16 недель) в течение воспроизводимого периода времени. ПЭГ-соединение 1 предотвращало или эффективно вызывало обратное развитие NASH в модели Stelic, когда мышей лечили в возрасте от 5 до 9 недель (профилактическая модель) или от 7 до 9 недель (терапевтическая модель). ПЭГ-соединение 1 также снижало фиброз печени в 9-недельной временной точке настоящего исследования.

Последовательность ПЭГ-соединения 1 является следующей: MHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLK ALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY(pAF)SEA HGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG PSQGRSPSYAS (SEQ ID NO: 201), где pAF соединен в 30 кДа ПЭГ.

Материалы и способы

Мышей C 57BL/6 (беременных 15 дней самок) получали от Charles River Laboratories Japan, Inc. (Канагава, Япония). Всех используемых в исследовании животных содержали и ухаживали за ними согласно Руководствам по использованию животных Японского фармакологического общества.

Животных содержали в помещении с SPF в контролируемых условиях температуры (23 ± 2°C), влажности (45 ± 10%), освещения (12-часовые искусственные циклы света и темноты; свет с 8:00 до 20:00) и воздухообмена. Высокое давление (20 ± 4 Па) поддерживали в экспериментальной комнате для предотвращения загрязнения помещения. Животных помещали в поликарбонатных клетках KN-600 (Natsume Seisakusho, Япония) максимум по 4 мыши на клетку. Стерилизованный PULMASμ (Material Research Center, Япония) использовали для подстилки и заменяли каждую неделю.

Стерилизованную твердую высокожировую диету (HFD) предоставляли ad libitum, помещая на металлическую крышку вверху клетки. Чистую воду предоставляли ad libitum из бутылки для воды, оснащенной резиновой пробкой и поилкой. Бутылки для воды заменяли один раз в неделю, очищали и стерилизовали в автоклаве и повторно использовали.

NASH индуцировали у 40 самцов мышей с помощью однократной подкожной инъекции раствора 200 мкг стрептозотоцина (STZ, Sigma-Aldrich Co. LLC., США) через 2 дня после рождения и кормления высокожировой диетой (HFD, 57 ккал% жира, № по кат: HFD32, CLEA Japan, Inc., Япония) через 4 недели от рождения (“мыши STAM”). Потребление пищи измеряли один раз в неделю в течение периода лечения.

ПЭГ-соединение 1 и несущую среду (20 мМ Трис/250 мМ сахарозы, pH 8,3) вводили подкожным путем в объеме, составляющем 1 мл/кг. ПЭГ-соединение 1 вводили в дозах, составляющих 1 и 3 мг/кг дважды в неделю.

Содержание глюкозы в крови после еды измеряли в цельной крови с использованием LIFE CHECK (EIDIA Co. Ltd., Япония). Для биохимии плазмы кровь собирали в полипропиленовые пробирки с антикоагулянтом (Novo-Heparin, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Япония) и центрифугировали при 1000 x g в течение 15 минут при 4°C. Супернатант собирали и хранили при -80°C до использования. Содержания аланинаминотрансферазы (ALT), триглицеридов и общего холестерина в плазме измеряли с помощью FUJI DRI-CHEM 7000 (Fujifilm Corporation, Япония).

Экстракты общих липидов печени получали с помощью способа Фольша (Folch J. et al., J. Biol. Chem. 1957;226: 497). Образцы печени гомогенизировали в хлороформе-метаноле (2:1, объем/объем) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. После отмывки с помощью смеси хлороформ-метанол-вода (8:4:3, объем/объем/объем), экстракты испаряли до сухого состояния и растворяли в изопропаноле. Содержания триглицеридов и холестерина в печени измеряли с помощью Е-теста триглицеридов и Е-теста холестерина, соответственно (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Япония).

Для окрашивания гематоксилином и эозином (HE) срезы отрезали от парафиновых блоков ткани печени, предварительно зафиксированной в растворе Буэна и окрашивали с помощью раствора гематоксилина Lillie-Mayer (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Япония) и эозина (Wako Pure Chemical Industries). Оценку активности неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) (NAS) рассчитывали согласно критериям Kleiner (Kleiner DE. et al., Hepatology, 2005;41:1313). Для визуализации макро- и микровезикулярного жира криосрезы отрезали от замороженных тканей печени, предварительно фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, погружали в соединение Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek Japan Co. Ltd., Япония) и окрашивали с помощью красителя масляного красного O (Sigma-Aldrich). Для иммуногистохимии срезы отрезали от замороженных тканей печени, погруженных в соединение Tissue-Tek O.C.T. и фиксировали в ацетоне. Активность эндогенной пероксидазы блокировали с использованием 0,03% H_2O_2 в течение 5 минут с последующей инкубацией с Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., Япония) в течение 10 минут. Срезы инкубировали с 200-кратным разведением антитела к F4/80 (BMA Biomedicals, Швейцария) в течение ночи при комнатной температуре. После инкубации с вторичным антителом (конъюгированное с HRP козье антимышиное антитело, Invitrogen, США), реакции фермента с субстратом проводили с использованием раствора 3,3'-диаминобензидина/H_2O_2 (Nichirei Bioscience Inc., Япония).

Для количественного анализа фиброза, отложения жира и областей воспаления светлопольные изображения окрашенных сириусом красным, окрашенных масляным красным и иммуноокрашенных F4/80 срезов фотографировали вокруг центральной вены с помощью цифровой камеры (DFC280; Leica, Германия) при 200-кратном увеличении и положительные области в 5 полях/срезе измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institute of Health, США).

Для количественной ПЦР общую РНК экстрагировали из образцов печени с использованием RNAiso (Takara Bio Inc., Япония) согласно инструкциям производителя. 1 мкг РНК обратно транскрибировали с использованием реакционной смеси, содержащей 4,4 мМ MgCl2 (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария), 40 Ед ингибитора РНКазы (Toyobo Co., Ltd., Япония), 0,5 мМ dNTP (Promega Corporation, США), 6,28 мкМ случайного гексамера (Promega Corporation), 5 х буфер для синтеза первой цепи (Promega), 10 мМ дитиотреитола (Invitrogen) и 200 Ед MMLV-RT (Invitrogen) в конечном объеме, составляющем 20 мкл. Реакцию проводили в течение 1 часа при 37°C с последующей реакцией в течение 5 минут при 99°C. ПЦР в реальном времени проводили с использованием готовой смеси DICE и SYBR Taq для ПЦР в реальном времени (Takara Bio). Для расчета относительного уровня экспрессии иРНК экспрессию каждого гена нормировали к экспрессии эталонного гена 36B4 (символ гена: Rplp0). Последовательности ПЦР-праймеров являлись следующими: 36B4: прямой 5'-TTCCAGGCTTTGGGCATCA-3'; обратный 5'-ATGTTCAGCATGTTCAGCAGTGTG-3'; альфа-SMA: прямой 5'-AAGAGCATCCGACACTGCTGAC-3'; обратный 5'-AGCACAGCCTGAATAGCCACATAC-3'; TIMP-1: прямой 5'-TGAGCCCTGCTCAGCAAAGA-3'; обратный 5'-GAGGACCTGATCCGTCCACAA-3'; коллаген 1 типа: прямой 5'-CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG-3'; обратный 5'-GCAATGCTGTTCTTGCAGTGGTA-3'; TGF-бета: MA030397 прямой 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACTCTA-3'; обратный 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'. Идентичности генов являлись следующими: 36B4: рибосомальный белок, большой, P0, альфа-SMA: мышечный актин, альфа 2, гладкие мышцы, аорта (Acta2), Timp-1: ингибитор металлопротеиназы 1 мышечной ткани (Timp1), вариант транскрипта 1, коллаген 1 типа: мышечный коллаген, I тип, альфа 2 (Col1a2), TGF-бета: трансформирующий фактор роста бета.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель, статистические анализы проводили с использованием тест множественного сравнения Бонферрони с использованием GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., США). Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель, t-статистические анализы проводили с использованием t-критерий Стьюдента с использованием GraphPad Prism 4. Значения P <0,05 рассматривали как статистически значимые. Тренд или тенденцию в сторону статистической значимости идентифицировали, если односторонний t-тест возвращался к значениям P <0,10. Результаты выражали как среднее ± стандартное отклонение (SD).

Каждая группа исследования содержала 8 мышей STAM, получивших подкожно либо несущую среду, либо ПЭГ-соединение 1 в объеме, составляющем 1 мл/кг дважды в неделю. Животных умерщвляли на 9 неделе. Группы исследования являлись следующими:

Группа 1: Несущая среда. 8 мышам NASH подкожно вводили несущую среду в объеме, составляющем 1 мл/кг дважды в неделю в возрасте от 5 до 9 недель.

Группа 2: Низкая доза ПЭГ-соединения 1. 8 мышам NASH подкожно вводили несущую среду, дополненный ПЭГ-соединением 1 в дозе, составляющей 1 мг/кг дважды в неделю в возрасте от 5 до 9 недель.

Группа 3: Высокая доза ПЭГ-соединения 1. 8 мышам NASH подкожно вводили несущую среду, дополненный ПЭГ-соединением 1 в дозе, составляющей 3 мг/кг дважды в неделю в возрасте от 5 до 9 недель.

Группа 4: Несущая среда. 8 мышам NASH подкожно вводили несущую среду в объеме, составляющем 1 мл/кг дважды в неделю в возрасте от 7 до 9 недель.

Группа 5: Высокая доза ПЭГ-соединения 1. 8 мышам NASH подкожно вводили несущую среду, дополненный ПЭГ-соединением 1 в дозе, составляющей 3 мг/кг дважды в неделю в возрасте от 7 до 9 недель.

Жизнеспособность, клинические признаки и поведение подвергали мониторингу ежедневно. Массу тела регистрировали до лечения. Проводили наблюдения мышей в отношении значительных клинических признаков токсичности, состояния агонии и смертности приблизительно через 60 минут после каждого введения. В конце исследования животных умерщвляли путем кровопускания через прямую пункцию сердца под анестезией эфиром (Wako Pure Chemical Industries).

Результаты

Изменения массы тела показаны на фиг. 19.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), масса тела постепенно увеличивалась в течение периода лечения. Средняя масса тела в группе, получившей низкую дозу ПЭГ-соединения 1, являлась значительно ниже, чем этот показатель в группе, получившей несущую среду, на 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20 день и с 22 по 28 день. Средняя масса тела в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1

являлась значительно ниже, чем этот показатель в группе, получившей несущую среду, с 10 по 28 день. Ни одно животное не проявляло ухудшения общего состояния.

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), масса тела постепенно увеличивалась в течение периода лечения. Средняя масса тела в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1 являлась значительно ниже, чем этот показатель в группе, получившей несущую среду, на 5, 6, 9 день и с 11 по 14 день. Ни одно животное не проявляло ухудшения общего состояния.

Общее потребление пищи показано на фиг. 20.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), не наблюдали значительных различий в общем потреблении пищи от группы, получившей несущую среду, и группы лечения ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 130 ± 4 г/мышь, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 130 ± 3 г/мышь, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 131 ± 3 г/мышь).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), общее потребление пищи характеризовалось тенденцией к увеличению в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 62 ± 3 г/мышь, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 68 ± 2 г/мышь).

Масса тела во время умерщвления показана на фиг. 21 и в таблице 10.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), во время умерщвления группы лечения ПЭГ-соединением 1 показали значительное уменьшение средней массы тела по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 21,7 ± 1,4 г, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 19,5 ± 1,4 г, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 18,9 ± 1,6 г).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), во время умерщвления группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала значительное уменьшение средней массы тела по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 21,5 ± 1,4 г, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 19,8 ± 1,0 г).

Масса печени и соотношение массы печени к массе тела показаны на фиг. 22 и фиг. 23 и в таблице 10).

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), группы лечения ПЭГ-соединением 1 показали значительное уменьшение средней массы печени по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 1511 ± 66 мг, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 1163 ± 117 мг, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 970 ± 237 мг). Группы лечения ПЭГ-соединением 1 показали значительное уменьшение среднего соотношения массы печени к массе тела по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 7,0 ± 0,4%, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 6,0 ± 0,5%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 5,1 ± 0,9%).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала значительное уменьшение средней массы печени по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 1364 ± 126 мг, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 1008 ± 135 мг). Группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала значительное уменьшение среднего соотношения массы печени к массе тела по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 6,4 ± 0,5%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 5,1 ± 0,8%).

Таблица 10. Масса тела и масса печени.

Параметр (среднее ± SD)	Несущая среда (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Низкая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Несущая среда (7 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (7 - 9 недель лечения) (n=8)
Масса тела (г)	21,7 ± 1,4	19,5 ± 1,4	18,9 ± 1,6	21,5 ± 1,4	19,8 ± 1,0
Масса печени (мг)	1511 ± 66	1163 ± 117	970 ± 237	1364 ± 126	1008 ± 135
Соотношение массы печени к массе тела (%)	7,0 ± 0,4	6,0 ± 0,5	5,1 ± 0,9	6,4 ± 0,5	5,1 ± 0,8

Содержание глюкозы в цельной крови показано на фиг. 24 и в таблице 11.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала значительное уменьшение среднего содержания глюкозы в цельной крови по сравнению с группой, получившей несущую среду. Содержания глюкозы в крови характеризовались тенденцией к

снижению в группе, получившей низкую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 691 ± 114 мг/дл, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 566 ± 119 мг/дл, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 493 ± 136 мг/дл).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала значительное уменьшение среднего содержания глюкозы в цельной крови по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 656 ± 85 мг/дл, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 454 ± 104 мг/дл).

Содержание ALT в плазме показано на фиг. 25 и в таблице 11.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), не наблюдали значительных различий в содержаниях ALT в плазме между группой, получившей несущую среду, и группами лечения с помощью ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 82 ± 66 Ед/л, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 64 ± 36 Ед/л, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 108 ± 78 Ед/л).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), содержания ALT в плазме характеризовались тенденцией к уменьшению в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 229 ± 285 Ед/л, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 36 ± 8 Ед/л).

Содержания триглицеридов в плазме показаны на фиг. 26 и в таблице 11.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), группы лечения ПЭГ-соединением 1 показали значительное уменьшение содержаний триглицеридов в плазме по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 322 ± 341 мг/дл, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 75 ± 39 мг/дл, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 64 ± 22 мг/дл).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала значительное уменьшение содержаний триглицеридов в плазме по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 139 ± 39 мг/дл, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 59 ± 51 мг/дл).

Содержания общего холестерина в плазме показаны на фиг. 27 и в таблице 11.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), содержания общего холестерина в плазме характеризовались тенденцией к уменьшению в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду. Не наблюдали значительных различий в содержаниях общего холестерина в плазме между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей низкую дозу ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 121 ± 20 мг/дл, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 114 ± 19 мг/дл, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 98 ± 31 мг/дл).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), не наблюдали значительных различий в содержаниях общего холестерина в плазме между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 121 ± 19 мг/дл, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 115 ± 29 мг/дл).

Содержание триглицеридов в печени показано на фиг. 28 и в таблице 11.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), группы лечения ПЭГ-соединением 1 показали значительное уменьшение содержаний триглицеридов в печени по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 54 ± 13 мг/г печень, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 25 ± 7 мг/г печень, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 22 ± 9 мг/г печень).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала значительное уменьшение содержаний триглицеридов в печени по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 53 ± 11 мг/г печень, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 17 ± 6 мг/г печень).

Содержание холестерина в печени показано на фиг. 29 и в таблице 11.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), не наблюдали значительных различий в содержаниях холестерина в печени между группой, получившей несущую среду, и группами лечения с помощью ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 2,9 ± 0,7 мг/г печень, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 2,9 ± 0,6 мг/г печень, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 3,1 ± 0,4 мг/г печень).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), не наблюдали значительных различий в содержаниях холестерина в печени между группой, получившей несущую среду, и группами лечения с помощью ПЭГ-соединения 1

(несущая среда: 3,1 ± 0,8 мг/г печень, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 3,6 ± 1,5 мг/г печень).

Таблица 11. Биохимические показатели крови и печени.

Параметр (среднее ± SD)	Несущая среда (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Низкая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Несущая среда (7 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (7 - 9 недель лечения) (n=8)
Содержание глюкозы в цельной крови (мг/дл)	691 ± 114	566 ± 119	493 ± 136	656 ± 85	454 ± 104
Содержание ALT в плазме (Ед/л)	82 ± 66	64 ± 36	108 ± 78	229 ± 285	36 ± 8
Содержание триглицеридов в плазме (мг/дл)	322 ± 341	75 ± 39	64 ± 22	139 ± 39	59 ± 51
Содержание общего холестерина в плазме (мг/дл)	121 ± 20	114 ± 19	98 ± 31	121 ± 19	115 ± 29
Содержание триглицеридов в печени (мг/г печень)	54 ± 13	25 ± 7	22 ± 9	53 ± 11	17 ± 6
Содержание холестерина в печени (мг/г печень)	2,9 ± 0,7	2,9 ± 0,6	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,8	3,6 ± 1,5

Гистологические анализы: окрашивание HE и оценка активности NAFLD в баллах

Репрезентативные микрофотографии окрашенных HE срезов показаны на фиг. 30A-B, и результаты оценки активности NAFLD в баллах показаны на фиг. 31, фиг. 32A-C и в таблице 12. (Оценка активности NALFD в баллах (фиг. 31) представляет собой комплекс оценок в баллах стеатоза, разбухания гепатоцитов и дольчатого воспаления). Результаты, показанные в таблице 12, основаны на критериях оценки в баллах, показанных в таблице 13.

Таблица 12. Оценка активности NAFLD в баллах.

Группа	**n**	Оценка в баллах											NAS (среднее ± SD)
		Стеатоз				**Дольчатое воспаление**				**Разбухание гепатоцитов**			
		0	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	
Несущая среда (5 - 9 недель лечения)	8	-	6	2	-	-	-	5	3	-	-	8	5,6 ± 0,7
Низкая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения)	8	3	5	-	-	-	4	4	-	-	1	7	4,0 ± 1,2
Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения)	8	4	4	-	-	-	5	3	-	2	4	2	2,9 ± 1,2
Несущая среда (7 - 9 недель лечения)	8	-	5	3	-	-	-	6	2	-	-	8	5,6 ± 0,7
Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (7 - 9 недель лечения)	8	5	3	-	-	-	6	2	-	3	4	1	2,4 ± 1,3

Таблица 13. Определение компонентов NAS

Показатель	**Балл**	**Степень**
Стеатоз	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33-66%

	3	>66%
Разбухание гепатоцитов	0	отсутствие
	1	Несколько разбухших клеток
	2	Много клеток/выраженное разбухание
Дольчатое воспаление	0	Отсутствие очагов
	1	<2 очагов/200x
	2	2-4 очага/200x
	3	>4 очагов/200x

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), срезы печени от группы, получившей несущую среду, проявляли тяжелое микро- и макровезикулярное отложение жира, разбухание гепатоцитов и инфильтрацию воспалительных клеток. Группы лечения ПЭГ-соединением 1 показали заметные улучшения (уменьшения) в отложении жира, разбухании гепатоцитов и инфильтрации воспалительных клеток, со значительным снижением в оценке активности NAFLD в баллах (NAS) по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 5,6 ± 0,7, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 4,0 ± 1,2, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 2,9 ± 1,2).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), группа, получившая высокую дозу ПЭГ-соединения 1, показала заметные улучшения (уменьшения) в отложении жира, разбухание гепатоцитов и инфильтрации воспалительных клеток, со значительным снижением NAS по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 5,6 ± 0,7, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 2,4 ± 1,3).

Гистологические анализы: окрашивание сириусом красным

Результаты окрашивания сириусом красным показаны на фиг. 33A-B, фиг. 34 (на которой показано репрезентативное окрашивание) и в таблице 14.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), срезы печени от группы, получившей несущую среду, проявляли отложение коллагена в перицентральной области дольки печени. Площадь фиброза (положительно окрашенная сириусом красным площадь) значительно уменьшалась в группах лечения ПЭГ-

соединение 1 по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 1,10 ± 0,24%, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 0,71 ± 0,17%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,71 ± 0,19%).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), площадь фиброза значительно уменьшалась в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 1,25 ± 0,29%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,75 ± 0,21%).

Гистологические анализы: иммуногистохимия F4/80

Результат иммуногистохимии F4/80 показаны на фиг. 35A-B, фиг. 36 (на которой показано репрезентативное окрашивание) и в таблице 14.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2 и 3), иммуноокрашивание F4/80 срезы печени из группы, получившей несущую среду, продемонстрировали накопление клеток F4/80+ в дольке печени. Не наблюдали значительных различий в количестве и размере клеток F4/80+ между группой, получившей несущую среду, и группами лечения с помощью ПЭГ-соединения 1, а также в процентном отношении площади воспаления (положительной в отношении F4/80 площади) (несущая среда: 6,9 ± 0,9%, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 7,6 ± 1,5%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 7,1 ± 0,7%).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), не наблюдали значительных различий в количестве и размере клеток F4/80+ между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, а также в процентном отношении площади воспаления (несущая среда: 7,1 ± 0,7%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 6,3 ± 1,1%).

Гистологический анализ: окрашивание масляным красным

Результаты окрашивания масляным красным показаны на фиг. 37A-B (на которых показано репрезентативное окрашивание), фиг. 38 и в таблице 14.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), срезы печени от группы, получившей несущую среду, проявляли микро- и макровезикулярное отложение жира в гепатоцитах. Процентное отношение площади отложения жира (положительно окрашенной масляным красным площади) значительно снижалось в группах лечения ПЭГ-соединением 1 по сравнению с группой, получившей несущую

среду (несущая среда: 30,4 ± 4,8%, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 20,5 ± 8,8%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 16,2 ± 6,1%).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), процентное отношение площади отложения жира значительно снижалось в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 30,7 ± 5,6%, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 13,9 ± 7,7%).

Таблица 14. Гистологические анализы

Параметр (среднее ± SD)	Несущая среда (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Низкая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Несущая среда (7 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (7 - 9 недель лечения) (n=8)
Положительно окрашенная сириусом красным площадь (%)	1,10 ± 0,24	0,71 ± 0,17	0,71 ± 0,19	1,25 ± 0,29	0,75 ± 0,21
Положительная окрашенная F4/80 площадь (%)	6,9 ± 0,9	7,6 ± 1,5	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,7	6,3 ± 1,1
Положительно окрашенная масляным красным площадь (%)	30,4 ± 4,8	20,5 ± 8,8	16,2 ± 6,1	30,7 ± 5,6	13,9 ± 7,7

Анализы генной экспрессии

Результаты анализа генной экспрессии показаны на фиг. 39A-D и в таблице 15 для альфа-SMA, TIMP-1, коллагена 1 типа и TGF-бета.

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), уровни экспрессии иРНК альфа-SMA характеризовались тенденцией подвергаться отрицательной регуляции в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду. Не наблюдали значительных различий в уровнях экспрессии иРНК α-SMA между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей низкую дозу ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 1,00 ±

1,14, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 0,52 ± 0,60, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,39 ± 0,30).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), не наблюдали значительных различий в уровнях экспрессии иРНК α-SMA между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 1,00 ± 0,88, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 1,14 ± 1,01).

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), уровни экспрессии иРНК TIMP-1 характеризовались тенденцией подвергаться отрицательной регуляции в группе, получившей низкую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду. Не наблюдали значительных различий в уровнях экспрессии иРНК TIMP-1 между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 1,00 ± 0,39, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 0,73 ± 0,28, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,88 ± 0,31).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), уровни экспрессии иРНК TIMP-1 характеризовались тенденцией подвергаться отрицательной регуляции в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 1,00 ± 0,57, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,65 ± 0,34).

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), не наблюдали значительных различий в уровнях экспрессии иРНК коллагена 1 типа между группой, получившей несущую среду, и группами лечения с помощью ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 1,00 ± 0,22, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 0,88 ± 0,24, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,89 ± 0,34).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), экспрессия иРНК коллагена 1 типа значительно снижалась в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 1,00 ± 0,29, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,69 ± 0,20).

Для периода лечения, составляющего 5 - 9 недель (группы 1, 2, и 3), уровни экспрессии иРНК TGF-β характеризовались тенденцией подвергаться отрицательной регуляции в группе, получившей низкую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду. Не наблюдали значительных различий в уровнях

экспрессии иРНК TGF-β между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1 (несущая среда: 1,00 ± 0,24, низкая доза ПЭГ-соединения 1: 1,07 ± 0,60, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,90 ± 0,26).

Для периода лечения, составляющего 7 - 9 недель (группы 4 и 5), уровни экспрессии иРНК TGF-β характеризовались тенденцией подвергаться отрицательной регуляции в группе, получившей высокую дозу ПЭГ-соединения 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (несущая среда: 1,00 ± 0,45, высокая доза ПЭГ-соединения 1: 0,77 ± 0,22).

Таблица 15. Анализы генной экспрессии

Параметр (среднее ± SD)	Несущая среда (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Низкая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (5 - 9 недель лечения) (n=8)	Несущая среда (7 - 9 недель лечения) (n=8)	Высокая доза ПЭГ-соединения 1 (7 - 9 недель лечения) (n=8)
Альфа-SMA	1,00 ± 1,14	0,52 ± 0,60	0,39 ± 0,30	1,00 ± 0,88	1,14 ± 1,01
TIMP-1	1,00 ± 0,39	0,73 ± 0,28	0,88 ± 0,31	1,00 ± 0,57	0,65 ± 0,34
Коллаген 1 типа	1,00 ± 0,22	0,88 ± 0,24	0,89 ± 0,34	1,00 ± 0,29	0,69 ± 0,20
TGF-β	1,00 ± 0,24	1,07 ± 0,60	0,90 ± 0,26	1,00 ± 0,45	0,77 ± 0,22

Как отмечали выше, ПЭГ-соединение 1 снижало накопление жира в печени, что оценивали с помощью биохимического анализа, измеряющего содержание триглицеридов в печени, и гистологии после окрашивания срезов печени с помощью гематоксилина и эозина или масляного красного О. В литературе сообщалось, что указанная антистеатозная активность нативного FGF21 зависит от адипонектина у мышей (см. Lin et al., Cell Metab. 17: 779-789 (2013); Holland et al., Cell Metab 17: 790-797 (2013), каждая из которых полностью включена посредством ссылки в настоящий документ). В связи с этим, концентрации общего адипонектина измеряли в конечных образцах сыворотки, полученных от получивших лечение мышей. Содержание адипонектина в сыворотке измеряли согласно протоколу производителя с использованием коммерчески доступного набора ELISA (№ по кат. Alpco 47-ADPMS-E01).

Введение дважды в неделю 3 мг/кг ПЭГ-соединения 1 статистически значимо увеличивало содержание общего адипонектина в сыворотке по сравнению с

соответствующей группой, получившей несущую среду, при всех исследуемых конечных временных точках (фиг. 61). Указанный результат согласуется с гипотезой о том, что адипонектин вносит свой вклад в эффективность ПЭГ-соединения 1 в модели Stelic NASH.

Обсуждение

В настоящем примере показаны результаты экспериментов, в которых исследовали эффективность ПЭГ-соединения 1 как в профилактической, так и терапевтической модели NASH. В профилактической модели лечение начинали в момент, когда жировая инфильтрация печени становилась очевидной в указанной модели (начиная с 5 недели, т.е. группы 5 - 9 недель). В терапевтической модели лечение начинали в то время, когда NASH становился очевидным в указанной модели (начиная с 7 недели, т.е. группы 7 - 9 недель). Таким образом, терапевтическую эффективность ПЭГ-соединения 1 продемонстрировали как в профилактической, так и терапевтической моделях.

Лечение с помощью ПЭГ-соединения 1 значительно снижало площадь фиброза (обнаруженную с помощью окрашивания сириусом красным) в обеих моделях лечения, демонстрируя противофиброзный эффект ПЭГ-соединения 1. Лечение с помощью ПЭГ-соединения 1 также снижало уровни экспрессии иРНК α-SMA, TIMP-1 и коллагена 1 типа, дополнительно подтверждая противофиброзные свойства ПЭГ-соединения 1. Лечение с помощью ПЭГ-соединения 1 также вызывало статистически значимые уменьшения массы тела и массы печени, соотношения массы печени к массе тела, содержания глюкозы в крови, содержания триглицеридов плазма и в печени, оценки активности NAFLD в баллах, площади отложения жира (обнаруженной с помощью окрашивания масляным красным).

Все группы лечения ПЭГ-соединением 1 показали значительное снижение NAS, что является одним из клинических результатов для оценки активности NASH (Sanyal AJ. et al., Hepatology, 2011;54:344).

Более того, лечение с помощью ПЭГ-соединения 1 улучшало метаболизм липидов и глюкозы, что видно по снижению содержаний глюкозы в цельной крови, содержаний триглицеридов в плазме и содержаний триглицеридов в печени.

В заключение, в настоящем исследовании ПЭГ-соединение 1 показало анти-NASH, противофиброзные эффекты, связанные с улучшенным метаболизмом липидов и глюкозы.

Пример 14

Оценка растворимости модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих партнер по слиянию

В настоящем примере описано измерение относительной растворимости модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих партнер по слиянию. Результаты являются показателем способности соединения быть составленным в относительно повышенной концентрации, что обеспечит более легкое введение эффективной дозировки.

Способы

Оценки относительной растворимости проводили с помощью последовательных циклов концентрирования в пробковом потоке с последующим анализом с помощью эксклюзионной хроматографии. Образцы, составленные в 20 мМ гистидиновом буфере, pH 7,0 при сходных, но не идентичных начальных концентрациях, вводили с помощью пипетки в центрифужные концентраторы с ограничением 3 кДа молекулярной массы и центрифугировали со скоростью, составляющей 4750 об/мин в течение 10 минутных, 15 минутных и 30 минутных циклов при 4°C. Между циклами центрифугирования аликвоты удаляли из прибора для концентрирования и проводили анализ аналитической эксклюзионной хроматографии (aSEC) (на колонке GE Healthcare Superdex S-75 10/300 GL, уравновешенной в буфере PBS, pH 7,2) для определения концентрации HMW и видов мономеров в растворе.

Общие концентрации определяли по поглощению при 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop. Процент высокомолекулярных молекул определяли с помощью расчетов площади под кривой высокомолекулярных пиков относительно пиков мономеров на кривой хроматограммы SEC. Полученные точки данных наносят на график для визуализации рангового порядка от наименее растворимых конструктов к наиболее растворимым при исследуемых условиях, чем ниже наклон, созданных точками данных, тем более стабилен вариант белка при исследованных условиях.

Результаты

Относительную растворимость модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих партнер по слиянию, определяли путем измерения образования высокомолекулярных (HMW) агрегатов в зависимости от концентрации белка. Пониженное образование HMW агрегатов при данной концентрации является показателем большей растворимости, что будет приводить к способности быть составленным в большей концентрации.

Результаты графически показаны на фиг. 41. Наклон кривой растворимости в пробковом потоке для исследованных соединений показан ниже в таблице 16 (пониженные значения указывают на пониженное образование агрегатов и, следовательно, на способность быть составленным в большей концентрации).

Таблица 16. Результаты растворимости в пробковом потоке для модифицированных полипептидов FGF-21, содержащих партнер по слиянию

Соединение слияния FGF21- PKE аднектина (2)	**Наклон растворимости в пробковом потоке**
Соединение 101	2,72
Соединение 102	0,31
Соединение 103	n.d.
Соединение 104	0,36
Соединение 105	0,88
Соединение 106	0,83
Соединение 107	0,37
Соединение 108	0,68
Соединение 109	0,76
Соединение 110	0,25
Соединение 111	0,65
Соединение 112	0,05
Соединение 113	0,47

Пример 15

Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, проведенное в параллельных группах, многодозовое исследование для оценки безопасности,

фармакокинетических и фармакодинамических эффектов ПЭГ-соединения 1 у взрослых с неалкогольным стеатогепатитом

В США NASH представляет собой одну из ведущих причин цирроза у взрослых; у вплоть до 20% взрослых с NASH развивается цирроз печени. Гистологические показатели NASH включают в себя стеатоз, воспаление и баллонирующую дистрофию с изменяющимися количествами перицеллюлярного фиброза в печени, и они возникают при отсутствии значительного потребления алкоголя. Пациенты с NASH проявляют увеличенные коэффициенты смертности, связанной с сердечно-сосудистыми заболеваниями, заболеваниями печени и злокачественными опухолями. Отсутствуют какие-либо возможности специфического медицинского лечения.

В настоящем примере описано рандомизированное, двойное слепое и плацебо-контролируемое клиническое испытание у людей для оценки безопасности, фармакокинетических и фармакодинамических эффектов ПЭГ-соединения 1 (полипептид согласно SEQ ID NO: 201, в котором pAF соединен с 30 кДа PEG) у взрослых с NASH, включая в себя оценку безопасности, переносимости и изменение в жировой фракции печени (%) с помощью MRI.

Исследуемая выборка: В исследование включали приблизительно 90 мужчин и женщин в возрасте от 21 до 75 лет, соответствующих всем следующим критериям: биопсия печени, проведенная не позднее 1 года до отбора в исследование с подтвержденными документами результатами NASH со стадией фиброза NASH CRN 1-3 или эквивалентной стадией с использованием другой системы оценки; BMI $\geq$ 30 (масса (кг)/[рост (м)]^2); индекс жировой инфильтрации печени $\geq$ 60; жировая фракция печени (%) $\geq$ 10% с помощью MRI, проведенного в течение периода отбора в исследование. Субъектов подвергали оценкам для отбора в исследование для определения соответствия установленным критериям в пределах 42 дней до рандомизации.

Субъектов исключали из исследования, если наблюдали одновременное заболевание, включая в себя хроническое заболевание печени (отличное от NASH), цирроз печени, декомпенсированное заболевание печени, неконтролируемый сахарный диабет и определенные другие медицинские состояния или история.

Оценки исходного состояния проводили приблизительно за 14 - 35 дней до 1 дня введения дозы активного лекарственного средства или плацебо, включая в себя содержание жира в печени с помощью магнитно-резонасного исследования (MRI), эластичность печени с помощью магнитно-резонансной эластографии (MRE) и анализ композиционного состава тела с помощью двухэнергетической рентгеновской

абсорбциометрии (DXA). Дополнительная оценка исходного состояния пациента включает в себя определение массы, BMI и окружности талии.

Режим лечения: ПЭГ-соединение 1 вводят раз в день или раз в неделю в течение 16 недель взрослым, страдающим NASH. Лечение вводят самостоятельно подкожно после 7-дневной тренировки пациентом правильного использования шприца с плацебо. Приблизительно 90 соответствующих критериям субъектов рандомизируют на 1 день в одну из трех групп лечения (30 на группу), которые затем получают лечение (начиная с 1 дня) следующим образом: лечение A: 10 мг ПЭГ-соединения 1 ежедневно; лечение B: 20 мг ПЭГ-соединения 1 каждую неделю; лечение C: плацебо ежедневно. Субъектов разделяют на группы с использованием диагноза сахарного диабета 2 типа (да или нет) на основании современных критериев Американской ассоциации сахарного диабета.

Все субъекты вводят самостоятельно ПЭГ-соединение 1 или плацебо один раз в день. ПЭГ-соединение 1 предусмотрено в растворе 10 мг/мл. Для группы лечения B (20 мг/неделя) 2 инъекции по 1 мл каждая вводят одновременно в 1 день (D 1) и на 2-7 день, инъекция представляет собой плацебо. Для поддержания слепого исследования другие две группы также вводят две инъекции в 1 день, одна или обе из которых содержат плацебо. На 2-7 день инъекция составляет 1 мл ПЭГ-соединения 1 (группа лечения A) или 1 мл плацебо (группа лечения C). Лечение продолжают до 112 дня (D 112) (т.е. 16 недель).

Оценка пациентов: Оценку пациентов проводят на D 7 (начало введения только плацебо), D 1, D 15, D 29, D 43, D 57, D 86 и D 112. Проводили физикальное обследование, измерения основных показателей состояния организма, электрокардиограммы с 12 выводами (ЭКГ), клинические лабораторные оценки и сканирования MRI, MRE и DXA. Сканирования MRI, MRE и DXA в конце лечения проводили на 112 дней (+/- 1 неделя). Визиты для последующего наблюдения проводили приблизительно на D 142 и D 292, с проведение сканирования DXA для последующего наблюдения через 6 месяцев (+/- 2 недели) после последней дозы. Кровь собирают для фармакокинетического (PK) и фармакодинамического (PD) анализа. Концентрацию ПЭГ-соединения 1 (общего и интактного на C-конце) в сыворотке измеряют с помощью валидированного анализа. Все данные PK, собранные в исследовании, оценивают с помощью разработанной популяционной модели PK для оценки таких основанных на использовании модели параметров, как CL/F, Vc/F, Ka и т.д. Более того, оценки индивидуальных параметров воздействия (таких как Cavg, Cmin, Cmax и AUC в равновесном состоянии) выводили из параметров модели. Субъектов подвергали

тщательному мониторингу в отношении неблагоприятных событий в течение исследования.

Основные конечные показатели: Первичной целью является оценка эффекта ежедневных или еженедельных доз ПЭГ-соединения 1 на безопасность, переносимость и жировую фракцию печени (%) с помощью MRI у пациентов с подтвержденным биопсией NASH. Это будут оценивать по основному конечному показателю изменения в процентной жировой фракции печени (%) от исходного значения на 16 неделе, определяемому с помощью MRI протонной плотности жировой фракции печени. Исходное значение определяют как последнее измерение до введения первой дозы для всех конечных показателей. Предполагают, что ПЭГ-соединение 1, вводимое ежедневно или каждую неделю в течение 16 недель пациентам с NASH, снижает жировую фракцию печени (%) до большей степени, чем плацебо. Основные конечные показатели также включают в себя конечные показатели безопасности, включая в себя частоту встречаемости AE (неблагопритяные эффекты), серьезные AE и представляющие особый интерес события, включая в себя оценку места введения инъекции, AE, приводящие к прерыванию исследования и смерти, а также заметные нарушения в клинических лабораторных анализах, измерениях основных признаков состояния организма, ЭКГ, физикальных обследованиях и плотности костного материала (BMD), собранной с помощью сканирования DXA в заданные временные точки.

Второстепенные конечные показатели: Второстепенные конечные показатели включают в себя фармакокинетические конечные показатели и конечные показатели иммуногенности. Фармакокинетические конечные показатели будут оценивать с помощью основанных на использовании модели фармакокинетических параметров концентрации ПЭГ-соединения 1 (общего и интактного на С-конце) в сыворотке: Cavg, Cmin, Cmax и AUC(TAU), определяемых из измерений, проведенных в выбранные временные точки. Конечные показатели иммуногенности оценивают по содержанию у пациента антител к ПЭГ-соединению 1 и антител к FGF21. Определяют основанные на использовании модели фармакокинетические параметры концентрации ПЭГ-соединения 1 (общего и интактного на С-конце) в сыворотке. Основные параметры PK включают в себя: CL/F (кажущийся клиренс после вневенного введения); V/F (кажущийся объем распределения после вневенного введения); и Ka (константа скорости абсорбции из места инъекции в кровоток). Из основных параметров PK выводили второстепенные параметры PK, включая в себя Cmax (максимальная расчетная концентрация в сыворотке); T1/2 (период полуэлиминации); AUC(TAU) (площадь под кривой

зависимости концентрации от времени в одном интервале между введениями дозы); Cmin (минимальная концентрация в пределах интервала между введениями дозы); и Cavg (средняя концентрация в пределах интервала между введениями дозы).

Анализ: Анализ динамических повторных измерений используют для анализа изменения в жировой фракция печени (%) на 16 неделе от исходного измерения в получившей лечение популяции, для которых проводили как исходное измерение, так и по меньшей мере одно измерение после получения исходного измерения. Модель включает в себя группу лечения, неделю и лечение по неделям как основные эффекты и исходную жировую фракцию печени (%) и основной диабетический статус в качестве ковариат. Неструктурированную ковариационную матрицу используют для представления корреляции повторных измерений в пределах каждого субъекта. Модель обеспечивает точечные оценки, стандартные ошибки и 2-сторонние 90% доверительные интервалы для среднего изменения от исходного измерения в пределах и между группами лечения. P-значения рассчитывают для сравнения эффекта лечения в каждой из двух групп лечения ПЭГ-соединением 1 (10 мг ежедневно и 20 мг каждую неделю) с эффектом лечения в группе лечения плацебо на 16 неделе. Каждое сравнение групп лечения проводят на одностороннем 0,05 уровне значимости. Корректировки для множественности не проводят.

Отношение между воздействием ПЭГ-соединения 1 (общего и интактного на C-конце) и другими биомаркерами или конечными показателями исследовали, чтобы показать отношения между ответом и дозой. Эти измерения также анализировали, чтобы показать их отношения с изменением в жировой фракции печени и того, как указанные биомаркеры прогнозируют или относятся к этому изменению. Указанные конечные показатели и биомаркеры включают в себя следующее: изменения в эластичности печени с помощью MRE, масса тела, BMI, окружность талии, композиционный анализ тела с помощью DXA, гомеостаз глюкозы, чувствительность к инсулину, содержание липидов натощак, костный гомеостаз, ALT и AST, а также биомаркеры, связанные с риском прогрессирования заболевания и осложнений. NASH, как правило, связан со сниженными содержаниями адипонектина (гипоадипонектинемия) и сниженные содержания связаны с более обширным некровоспалением. Полагают, что адипонектин увеличивает чувствительность к инсулину путем усиления окисления жира и снижения запасания липидов в печени. Предполагают, что содержания общего адипонектина в сыворотке увеличиваются с помощью лечения ПЭГ-соединением 1. Также

предполагают, что лечение с помощью ПЭГ-соединения 1 снижает содержание триглицеридов, LDL, ApoB, ApoC3 натощак и увеличивает HDL у пациентов с NASH.

Анализ результатов исследования с использованием неструктурированной ковариационной матрицы, как описано выше, проводят, чтобы показать статистически значимое ($p < 0,05$) снижение жировой фракции печени у пациентов, получивших лечение с помощью ПЭГ-соединения 1 (как в группе исследования, получившей ежедневное введение, так и группе исследования, получившей введение каждую неделю) по сравнению с контролями плацебо.

Пример 16

В настоящем примере дополнительно исследуют эффективность ПЭГ-соединения 1 в модели STAM неалкогольного стеатогепатита (NASH). Мыши получали лечение в возрасте от 9 до 12 недель или до 15 недель.

Способы

Предусмотрены ПЭГ-соединение 1 и несущая среда (20 мМ Трис/250 мМ сахарозы, pH 8,3). Для получения раствора для введения дозы раствор ПЭГ-соединения 1 получения с помощью соответствующего разведения предусмотренной несущей среды.

Мышей C57BL/6 (беременных в течение 15 дней самок) получали из Japan SLC, Inc. (Канагава, Япония). Всех используемых в исследовании животных содержали и ухаживали за ними согласно Руководствам по использованию животных Японского фармакологического общества. NASH индуцировали у 60 самцов мышей с помощью однократной подкожной инъекции раствора 200 мкг стрептозотоцина (STZ, Sigma-Aldrich, США) через 2 дней после рождения и кормления высокожировой диетой (HFD, 57 ккал% жира, № по кат.: HFD32, CLEA Japan, Inc., Япония) через 4 недели после рождения.

ПЭГ-соединение 1 и несущую среду вводили подкожным путем в объеме, составляющем 1 мл/кг в дозе, составляющей 3 мг/кг дважды в неделю. Животных содержали в помещении с SPF в контролируемых условиях температуры (23 ± 2°C), влажности (45 ± 10%), освещения (12-часовые искусственные циклы света и темноты; свет с 8:00 до 20:00) и воздухообмена. Высокое давление (20 ± 4 Па) поддерживали в экспериментальной комнате для предотвращения загрязнения помещения. Животных помещали в поликарбонатных клетках KN-600 (Natsume Seisakusho, Япония) максимум по 4 мыши на клетку. Стерилизованный Paper-Clean (Japan SLC) использовали для

подстилки и заменяли каждую. Стерилизованную твердую высокожировую диету (HFD) предоставляли ad libitum, помещая на металлическую крышку вверху клетки. Чистую воду предоставляли ad libitum из бутылки для воды, оснащенной резиновой пробкой и поилкой. Бутылки для воды заменяли один раз в неделю, очищали и стерилизовали в автоклаве и повторно использовали. Мышей идентифицировали по номерам, выгравированным на ушных бирках. Каждую клетку метили специфическим идентификационным кодом.

Содержание глюкозы в крови после еды измеряли в цельной крови с использованием LIFE CHECK (EIDIA Co. Ltd., Япония). Для биохимии плазмы кровь собирали в полипропиленовые пробирки с антикоагулянтом (Novo-Heparin, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Япония) и центрифугировали при 1000 x g в течение 15 минут при 4°C. Супернатант собирали и хранили при -80°C до использования. Содержания ALT, триглицеридов и общего холестерина в плазме измеряли с помощью FUJI DRI-CHEM 7000 (Fujifilm Corporation, Япония).

Экстракты общих липидов печени получали с помощью способа Фольша (Folch J. et al., J. Biol. Chem. 1957;226: 497). Образцы печени гомогенизировали в хлороформе-метаноле (2:1, объем/объем) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. После отмывки с помощью смеси хлороформ-метанол-вода (8:4:3, объем/объем/объем) экстракты испаряли до сухого состояния и растворяли в изопропаноле. Содержания триглицеридов и холестерина печени измеряли с помощью E-теста триглицеридов и E-теста холестерина, соответственно (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Япония).

Для окрашивания HE срезы отрезали от парафиновых блоков ткани печени, предварительно зафиксированной в растворе Буэна и окрашивали с помощью раствора гематоксилина Lillie-Mayer (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Япония) и эозина (Wako Pure Chemical Industries). Оценку активности неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) (NAS) рассчитывали согласно критериям Kleiner (Kleiner DE. et al., Hepatology, 2005;41:1313 Для визуализации отложений коллагена зафиксированные в растворе Буэна срезы печени окрашивали с использованием раствора пикро-сириуса красного (Waldeck, Германия). Для визуализации макро- и микровезикулярного жира криосрезы отрезали от замороженных тканей печени, предварительно фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, погружали в соединение Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek Japan Co. Ltd., Япония) и окрашивали с помощью красителя масляного красного O (Sigma-Aldrich). Для иммуногистохимии срезы отрезали от замороженных тканей печени, погруженных в соединение Tissue-Tek O.C.T. и фиксировали в ацетоне.

Активность эндогенной пероксидазы блокировали с использованием 0,03% H2O2 в течение 5 минут с последующей инкубацией с Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., Япония) в течение 10 минут. Срезы инкубировали с 200-кратным разведением антитела к F4/80 (BMA Biomedicals, Швейцария) в течение ночи при 4°C. После инкубации с вторичным антителом (конъюгированное с HRP козье антимышиное антитело, Invitrogen, США), реакции фермента с субстратом проводили с использованием раствора 3,3'-диаминобензидина/H2O2 (Nichirei Bioscience Inc., Япония).

Почку фиксировали в растворе Буэна. Строение клубочка наблюдали с использованием окрашивания PAS со срезами, окисленными с помощью 0,5% перйодной кислоты и окрашенными реагентом Шиффа (оба от Wako Pure Chemical Industries). Для визуализации отложения коллагена срезы почки окрашивали раствором пикро-сириуса красного (Waldeck).

Для количественного анализа фиброза, отложения жира и областей воспаления светлопольные изображения окрашенных сириусом красным, окрашенных масляным красным и иммуноокрашенных F4/80 срезов фотографировали вокруг центральной вены для печени или интерстициальной области для почек с помощью цифровой камеры (DFC280; Leica, Германия) при 200-кратном увеличении и положительные области в 5 полях/срезе измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institute of Health, США).

Статистические анализы проводили с использованием теста множественного сравнения Бонферрони на программном обеспечении GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., США). P-значения <0,05 рассматривали как статистически значимые. Тренд или тенденцию допускали, если односторонний t-тест возвращался к значениям P <0,05. Результаты выражали как среднее ± стандартное отклонение (SD).

Результаты

Группы исследования являлись следующими (обобщенно представлены в таблице 17 ниже).

Группа 1: Несущая среда. 20 мышам с NASH подкожно вводили несущую среду в объеме, составляющем 1 мл/кг, дважды в неделю в возрасте от 9 до 12 недель или в возрасте до 15 недель.

Группа 2: ПЭГ-соединение 1. 20 мышам с NASH подкожно вводили несущую среду, дополненный ПЭГ-соединением 1 в дозе, составляющей 3 мг/кг, дважды в неделю в возрасте от 9 до 12 недель или в возрасте до 15 недель.

Таблица 17. Обобщенные данные в отношении лечения.

Группа	Количество мышей	Мыши	Исследуемое вещество	Доза (мг/кг)	Объем (мл/кг)	Режимы	Умерщвление (недели)
1	20	STAM	Несущая среда	-	1	SC, дважды в неделю, 9 недель -12 недель или 15 недель	12, 15
2	20	STAM	ПЭГ-соединение 1	3	1	SC, дважды в неделю, 9 недель -12 недель или 15 недель	12, 15

Жизнеспособность, клинические признаки и поведение подвергали мониторингу ежедневно. Массу тела регистрировали до лечения. Проводили наблюдения за мышами в отношении значительных клинических признаков токсичности, состояния агонии и смертности приблизительно через 60 минут после каждого введения. Животных умерщвляли путем кровопускания через прямую пункцию сердца под действием анестезии с помощью эфира (Wako Pure Chemical Industries). Шесть животных во всех группах умерщвляли в возрасте 12 недель для последующих анализов, и оставшихся животных содержали до дня умерщвления в возрасте 15 недель.

Масса тела во всех группах не подвергалась явным изменениям в течение периода лечения. Не наблюдали значительных различий в средней массе тела между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1.

В течение периода лечения мыши умирали до достижения 40 дня, а именно: 8 из 20 мышей умерли в группе, получившей несущую среду. Ни одно из животных не было найдено мертвым в группе ПЭГ-соединения 1. Причина смерти оставалась неясной и в группе, получившей несущую среду, могла быть связана с прогрессированием заболевания. Дни смерти отдельных мышей представляли собой дни 7, 17 (две мыши),

20 (две мыши), 34, 38 и 40. После того, как 5 мышей умерли в группе, получившей несущую среду, было принято решение модифицировать исходный протокол исследования и снизить количество мышей, умерщвляемых на 12 неделе с 8 на 6 на группу в попытке обеспечить то, что по меньшей мере 6 мышей в каждой группе будут выживать к 15 неделе.

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, не наблюдали значительных различий в средней массе тела в день умерщвления между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 42A). Аналогично, у животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, не наблюдали значительных различий в средней массе тела в день умерщвления между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 42B).

Масса органов и соотношение массы печени к массе тела показаны на фигурах 43-46 и обобщенно представлены в таблице 18.

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, группа ПЭГ-соединения 1 показала тенденции к снижению средней массы печени по сравнению с группой, получившей несущую среду (фиг. 43A). Среднее соотношение массы печени к массе тела значительно уменьшалось в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду ($p < 0,01$) (фиг. 44A). Не наблюдали значительных различий в средней массе правой почки между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 45A). Средняя масса левой почки характеризовалась тенденцией к уменьшению в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, по сравнению с группой, получившей несущую среду (фиг. 46A).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, значительно уменьшалась среднее масса печени ($p < 0,001$) (фиг. 43B) и среднее соотношение массы печени к массе тела ($p < 0,001$) (фиг. 44B) по сравнению с группой, получившей несущую среду. Не наблюдали значительных различий в средней массе правой почки (фиг. 45B) и средней массе левой почки (фиг. 46B) между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1.

Таблица 18. Результаты массы тела и массы органов.

Параметр (среднее ± SD)	**Несущая среда 12 недель (n=6)**	**ПЭГ-соединение 1 12 недель (n=6)**
Масса тела (г)	18,0 ± 4,7	16,0 ± 3,9
Масса печени (мг)	1389 ± 374	973 ± 226

Соотношение массы печени к массе тела (%)	7,7 ± 1,1	6,1 ± 0,7
Масса правой почки (мг)	143 ± 40	110 ± 25
Масса левой почки (мг)	148 ± 37	98 ± 26
Параметр (среднее ± SD)	**Несущая среда 15 недель (n=6)**	**ПЭГ-соединение 1 15 недель (n=14)**
Масса тела (г)	16,5 ± 4,8	15,2 ± 2,5
Масса печени (мг)	1341 ± 374	746 ± 161
Соотношение массы печени к массе тела (%)	8,2 ± 1,5	5,0 ± 1,1
Масса правой почки (мг)	111 ± 26	97 ± 24
Масса левой почки (мг)	101 ± 22	90 ± 20

Результаты биохимических измерений показаны на фигурах 47-52 и обобщенно представлены в таблице 19 ниже.

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, не наблюдали значительных различий в содержаниях глюкозы в цельной крови между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 47A).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, содержания глюкозы в цельной крови в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, значительно уменьшалось по сравнению с группой, получившей несущую среду ($p < 0,05$) (фиг. 47B).

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, отсутствовало значительное различие в содержаниях ALT в плазме между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 48A).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, содержания ALT в плазме в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, значительно уменьшались по сравнению с группой, получившей несущую среду ($p < 0,01$) (фиг. 48B).

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, группа ПЭГ-соединения 1 показала тенденцию к снижению в содержаниях триглицеридов в плазме по сравнению с группой, получившей несущую среду (фиг. 49A).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, отсутствовало значительное различие в содержаниях триглицеридов в плазме между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 49B).

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, не наблюдали значительных различий в содержании общего холестерина в плазме между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 50A).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, не наблюдали значительных различий в содержании общего холестерина в плазме между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 50B).

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, содержания триглицеридов в печени в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, значительно уменьшались по сравнению с группой, получившей несущую среду ($p < 0,01$) (фиг. 51A).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, содержания триглицеридов в печени в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, значительно уменьшались по сравнению с группой, получившей несущую среду ($p < 0,001$) (фиг. 51B).

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, содержания холестерина в печени в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, значительно уменьшались по сравнению с группой, получившей несущую среду ($p < 0,01$) (фиг. 52A).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, содержания холестерина в печени в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, значительно уменьшались по сравнению с группой, получившей несущую среду ($p < 0,001$) (фиг. 52B).

Таблица 19. Результаты биохимических исследований.

Параметр (среднее ± SD)	**Несущая среда 12 недель (n=6)**	**ПЭГ-соединение 1 12 недель (n=6)**
Содержание глюкозы в цельной крови (мг/дл)	628 ± 268	505 ± 231
Содержание ALT в плазме (Ед/л)	55 ± 30	39 ± 21
Содержание триглицеридов в плазме (мг/дл)	498 ± 368	167 ± 214
Содержание общего холестерина в плазме (мг/дл)	195 ± 115	162 ± 62
Содержание триглицеридов в печени (мг/г печень)	98 ± 38	42 ± 13
Содержание холестерина в печени (мг/г печень)	36 ± 15	18 ± 4
Параметр (среднее ± SD)	**Несущая среда 15 недель (n=6)**	**ПЭГ-соединение 1 15 недель (n=14)**
Содержание глюкозы в цельной крови (мг/дл)	594 ± 182	350 ± 174
Содержание ALT в плазме (Ед/л)	48 ± 15	23 ± 15
Содержание триглицеридов в плазме (мг/дл)	117 ± 24	102 ± 57
Содержание общего холестерина в плазме (мг/дл)	176 ± 72	141 ± 45
Содержание триглицеридов в печени (мг/г печень)	98 ± 31	49 ± 19

Содержание холестерина в печени (мг/г печень)	39 ± 10	19 ± 9

Репрезентативные микрофотографии, на которых показан гистологический анализ образцов печени, показаны на фигурах 53, 55, 57 и 59. Обобщенные гистологические результаты графически показаны на фигурах 54, 56, 58 и 60 и представлены в таблице 22 ниже.

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, окрашенные HE срезы печени от группы, получившей несущую среду, проявляли тяжелое микро- и макровезикулярное отложение жира, разбухание гепатоцитов и инфильтрацию воспалительных клеток (фиг. 53A-B). Группа ПЭГ-соединения 1 показала заметные улучшения в отложении жира, разбухании гепатоцитов и инфильтрации воспалительных клеток со значительным снижением в NAS по сравнению с группой, получившей несущую среду (фиг. 53C-D).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, группа ПЭГ-соединения 1 показала заметные улучшения в отложении жира, разбухании гепатоцитов и инфильтрации воспалительных клеток (фиг. 53E-F) со значительным снижением в NAS по сравнению с группой, получившей несущую среду (фиг. 53G-H).

Результаты оценки активности NALFD в баллах показаны графически на фиг. 54A-B для животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями и 9 и 13 неделями, соответственно, и обобщенно представлены в таблице 20. Оценка активности NALFD в баллах значительно снижалась в обеих группах лечения ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ для животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями и 9 и 15 неделями, соответственно).

Таблица 20. Обобщенные результаты оценки активности NALFD в баллах. Компоненты оценки в баллах показаны в таблице 21 ниже.

Группа	N	Стеатоз				Дольчатое воспаление				Разбухание гепатоцитов			NAS (среднее± SD)
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	
12 недель несущая среда	6	1	4	-	1	-	2	4	-	-	-	6	4,8 ± 1,2
12 недель ПЭГ-соединение 1	6	6	-	-	-	1	2	2	1	2	4	-	2,2 ± 0,8
15 недель несущая среда	6	1	3	1	1	-	1	5	-	-	-	6	5,2 ± 1,2
15 недель ПЭГ-соединение 1	14	11	3	-	-	6	6	2	-	7	5	2	1,6 ± 1,2

Таблица 21. Компоненты оценки активности NALFD в баллах.

Показатель	**Балл**	**Степень**
Стеатоз	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33-66%
	3	>66%
Разбухание гепатоцитов	0	Отсутствие
	1	Несколько разбухших клеток
	2	Много клеток/выраженное разбухание
Дольчатое воспаление	0	Отсутствие очагов
	1	<2 очагов/200x
	2	2-4 очага/200x
	3	>4 очагов/200x

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, окрашенные сириусом красным срезы печени от группы, получившей несущую среду, проявляли отложение коллагена в перицентральной области дольки печени (фиг. 55A-B). Не наблюдали значительных различий в площади фиброза между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 55C-D), как обобщенно представлено на фиг. 56A.

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, площадь фиброза значительно уменьшалась в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, (фиг. 55E-F) по сравнению с группой, получившей несущую среду (фиг. 55G-H), как обобщенно представлено на фиг. 56B ($p < 0,05$).

Репрезентативные микрофотографии иммуноокрашенных F4/80 срезов показаны на фиг. 57.

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, иммуноокрашивание F4/80 срезов печени из группы, получившей несущую среду, продемонстрировали накопление F4/80+ клеток в дольке печени (фиг. 57A-B). Не наблюдали значительных различий в количестве и размере F4/80+ клеток между группой, получившей несущую среду, и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 57C-D), как обобщенно представлено на фиг. 58A.

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, не наблюдали значительных различий в количестве и размере F4/80+ клеток между группой, получившей несущую среду (фиг. 57E-F) и группой, получившей ПЭГ-соединение 1 (фиг. 57G-H), как обобщенно представлено на фиг. 58B.

Репрезентативные микрофотографии окрашенных масляным красным срезов показаны на фиг. 59A-H

У животных, получивших лечение между 9 и 12 неделями, окрашенные масляным красным срезы печени от группы, получившей несущую среду, проявляли микро- и макровезикулярное отложение жира в гепатоцитах (фиг. 59A-B). Процентное отношение площади отложения жира (положительно окрашенная масляным красным площадь) значительно уменьшалось в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, (фиг. 59C-D) по сравнению с группой, получившей несущую среду, как обобщенно представлено на фиг. 60A ($p < 0{,}001$).

У животных, получивших лечение между 9 и 15 неделями, процентное отношение площади отложения жира значительно уменьшалось в группе, получившей ПЭГ-соединение 1, (фиг. 59E-F) по сравнению с группой, получившей несущую среду (фиг. 59G-H), как обобщенно представлено на фиг. 60B ($p < 0{,}001$).

Таблица 22. Обобщенные гистологические данные

Параметр (среднее ± SD)	**Несущая среда 12 недель (n=6)**	**ПЭГ-соединение 1 12 недель (n=6)**
Площадь фиброза печени (%)	1,17 ± 0,33	0,97 ± 0,51
Площадь воспаления (%)	3,38 ± 0,70	3,47 ± 1,40
Площадь отложения жира (%)	40,1 ± 4,8	16,2 ± 7,9
Площадь фиброза почки (%)	1,70 ± 0,49	1,67 ± 0,92
Параметр (среднее ± SD)	**Несущая среда 15 недель (n=6)**	**ПЭГ-соединение 1 15 недель (n=14)**
Площадь фиброза печени (%)	2,18 ± 0,14	1,44 ± 0,53
Площадь воспаления (%)	3,983 ± 1,966	4,511 ± 1,597
Площадь отложения жира (%)	32,0 ± 9,6	12,5 ± 10,1
Площадь фиброза почки (%)	1,58 ± 0,41	1,77 ± 0,69

Как отмечали выше, ПЭГ-соединение 1 снижало накопление жира в печени, что оценивали с помощью биохимического анализа, измеряющего содержание триглицеридов в печени, и гистологии после окрашивания срезов печени с помощью гематоксилина и эозина или масляного красного О. В литературе сообщалось, что указанная антистеатозная активность нативного FGF21 зависит от адипонектина у мышей (см. Lin et al., Cell Metab. 17: 779-789 (2013); Holland et al., Cell Metab 17: 790-797 (2013), каждая из которых полностью включена посредством ссылки в настоящий документ). В связи с этим, концентрации общего адипонектина измеряли в конечных образцах сыворотки, полученных от получивших лечение мышей. Содержание адипонектина в сыворотке измеряли согласно протоколу производителя с использованием коммерчески доступного набора ELISA (№ по кат. Alpco 47-ADPMS-E01).

Введение дважды в неделю 3 мг/кг ПЭГ-соединения 1 статистически значимо увеличивало содержание общего адипонектина в сыворотке по сравнению с соответствующей группой, получившей несущую среду, при всех исследуемых конечных временных точках (фиг. 62). Указанный результат согласуется с гипотезой о том, что адипонектин вносит свой вклад в эффективность ПЭГ-соединения 1 в модели Stelic NASH.

Таким образом, лечение в течение трех недель с помощью ПЭГ-соединения 1 значительно снижало соотношение массы печени к массе тела, содержание липидов в печени (триглицерида и холестерина), площадь отложения жира и NAS. В дополнение к указанным эффектам лечение в течение 6 недель с помощью ПЭГ-соединения 1 значительно снижало содержание глюкозы в цельной крови, содержание ALT в плазме и площадь фиброза. Более того, лечение с помощью ПЭГ-соединение 1 улучшало коэффициент выживаемости по сравнению с группой, получившей несущую среду.

В заключение, в настоящем исследовании ПЭГ-соединение 1 показало анти-NASH, противофиброзные эффекты, связанные с улучшенным метаболизмом липидов и глюкозы.

Пример 17

In vitro определение характеристик пегилированного соединения 2 в клетках почки эмбриона человека, стабильно экспрессирующих бета-Klotho.

FGF21 использует β-klotho в качестве корецептора вместе с рецепторами FGF для своей тканеспецифической сигнальной активности (см., например, Kurosu et al., 2007, J. Biol. Chem. 282:26687-26695; Ogawa et al., 2007, Proc. Natl. Acad. of Sci., USA 104:7432-7437, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). FGF21 вначале связывается с β-klotho и затем комплекс может активировать рецепторы FGF для инициации внутриклеточного сигнального каскада, который быстро активирует регулируемые внеклеточными сигналами киназы 1/2 (ERK1/2) в течение минут. В течение более длительного времени активированная, фосфорилированная ERK (pERK) может транслоцироваться в клеточное ядро и фосфорилировать и активировать ряд транскрипционных регуляторов, включая в себя фактор тройного комплекса, который называется E26 (E Twenty-Six, или ETS)-подобный белок 1 (Elk1). Активированный Elk1 образует комплекс с фактором ответа сыворотки, который связывается с определенными последовательностями ДНК для регуляции экспрессии определенных генов.

Создание клеточной линии, стабильно коэкспрессирующей β-klotho человека и Elk1-люциферазный транс-репортерный конструкт

Клеточную линию транс-репортерной Elk1-люциферазы получали с помощью клеток HEK293 с использованием Elk1 транс-репортерной системы Agilent Technologies PathDetect. Указанная система содержит слитую плазмиду транс-активатора которая экспрессирует слитый белок ДНК-связывающего домена из дрожжевого белка-активатора траснкрипции, Gal4, с последующим доменом активации Elk1. Когда транскрипционный активатор, Elk1, фосфорилирован и активирован регулируемой внеклеточным сигналом киназой (ERK) при стимуляции с помощью FGF21, слитый белок-активатор связывается как димер с находящейся против хода транскрипции последовательностью активации GAL4 и активирует транскрипцию репортерного фермента люциферазы. Экспрессия люциферазы из репортерной плазмиды указывает на активацию слитого белка-трансактиватора и, следовательно, присутствие эндогенной протеинкиназы. Соответственно, люциферазная активность отражает активацию ERK в клетке и соответствующих путей передачи сигнала, в данном случае, активацию Elk1.

Клетки HEK293 котрансфектировали слитой плазмидой транс-активатора, репортерной плазмидой и плазмидой, кодирующей β-klotho человека. Трансфектированные клетки подвергали селекции в отношении G-418 (500 мкг/мл) и бластицидина (10 мкг/мл). Клоны, которые выживали после селекции в отношении двух антибиотиков, анализировали путем стимуляции с помощью конструкта FGF21 и последующей активности Elk1-люциферазы. Клон HEK Luc Clone2 выбирали в качестве клеточной линии для всех последующих анализов.

Клеточный анализ Elk1-люциферазы

Клетки HEK293 Luc Clone2 высевали в 96-луночные планшеты с плотностью, составляющей 25000 клеток на лунку. Планшеты инкубировали в инкубаторе для тканевых культур при 37°C с 5% CO_2 в течение двух дней. В день исследования 3-кратное серийное разведение белков FGF21 получали в не содержащей фенол красный среде DMEM, дополненной 1x L-глутамина, 10 мМ Hepes, pH 7,2 - 7,5 и 10% FBS. Старую ростовую среду для культивирования клеток удаляли. Для начала обработки 50 мкл не содержащую фенол красный среду DMEM с исследуемыми соединениями добавляли в каждую лунку и планшеты помещали обратно в инкубатор для клеточных культур. В конце 5-часовой инкубации равный объем смеси реагентов субстрата люциферазы добавляли в каждую лунку. Планшеты запечатывали и помещали на орбитальный

шейкер в течение 3 мин при 600 об/мин. Люминесценцию измеряли на считывающем устройстве для чтения многочисленных планшетов Perkin Elmer Envision 2103.

Анализ данных

Исходные данные от всех отдельных повторяющихся точек данных анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., CA) с использованием анализа нелинейной регрессии. Данные сопоставляли с использованием уравнения зависмости ответа от log(агониста) с 4 параметрами: низ (минимум), верх (максимум), log EC50 (величина активности) и переменный угловой коэффициент Хилла. Активность (EC50) определяли как концентрацию, которая производила полумаксимальное увеличение ответа по сравнению с исходным значением, и ее рассчитывали с помощью программы подгонки кривой.

Результаты

Репрезентативные кривые зависимости ответа от концентрации для трех вариантов FGF21 (His-меченное на N-конце соединение 1 (His-соединение 1), ПЭГ-соединение 1 и ПЭГ-соединение 2) и значения расчетной активности и эффективности в 5-часовом анализе Elk1-люциферазы показаны на фиг. 63 и в таблице 23. Активности трех вариантов являлись сходными в 5-часовом анализе Elk1-люциферазы (таблица 23).

Таблица 23. Активность и эффективность вариантов FGF21 в 5-часовом анализе Elk1-люциферазы

Соединение	Активность		Эффективность	
	pEC50[a] (log M)	**EC50[b] (нМ)**	**Emax[a] (RLU)**	**% контроля[c]**
His-соединение 1	8,99 ± 0,10	1,0 (0,8 - 1,3)	1,90E06 ± 3,9E05	100
ПЭГ-соединение 1	8,44 ± 0,05[d]	3,6 (3,2 - 4,1)[d]	1,60E06 ± 3,7E05	84,5 ± 19,8
ПЭГ-соединение 2	8,27 ± 0,16[d]	5,4 (3,7 - 8,0)[d]	1,66E06 ± 4,5E05	87,8 ± 23,9

[a] Среднее ± S.D.

[b] Геометрическое среднее (95% доверительный интервал)

[c] Контроль определяли как His-соединение 1

[d] P <0,05 по сравнению с His-соединением 1, дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки-Крамера.

Различные слитые молекулы Fc-FGF-21 сравнивали в клеточном анализе Elk1-люциферазы. Все молекулы, за исключением соединения 180 и соединения 175 проявляли активности, измеряемые одноразрядным значением нМ или ниже, и являлись сопоставимыми или ниже, чем измеренная активность ПЭГ-соединения 2 (фиг. 64 и таблица 24 ниже).

Таблица 24. Геометрические средние значения EC50 с 95% доверительными интервалами.

	Соед. 170	Соед. 171	Соед. 172	Соед. 173	Соед. 174	Соед. 175	Соед. 176	Соед. 177	Соед. 178	Соед. 179	Соед. 180	Соед. 181	ПЭГ-соед. 2
Геометрическое среднее (нМ)	3,8	1,7	1,5	1,5	3,3	14,6	1,2	1,8	1,3	2,5	164,8	0,8	5,9
Нижний предел 95% доверительного интервала среднего	2,8	1,0	0,6	1,2	1,3	6,1	1,0	1,4	1,0	1,2	92,9	0,6	4,9
Верхний предел 95% доверительного интервала среднего	5,2	2,9	3,6	1,7	8,4	34,8	1,5	2,4	1,6	5,0	291,7	1,1	7,1

Пример 18

Эффекты соединений-вариантов FGF-21 на содержания адипонектина у мышей C57BL/6J

FGF21 стимулирует секрецию адипонектина из адипоцитов и широкое распространение адипонектиновых рецепторов обеспечивает потенциальный путь, с помощью которого действие FGF21 может распространяться на другие ткани. Сообщалось, что многие метаболические эффекты нативного FGF21, включая в себя его антистеатозную активность, нуждаются в адипонектине у мышей (Lin, Z. et al., Cell Metab. 17: 779-789 (2013); Holland et al., Cell Metab 17: 790-797 (2013), каждая из которых полностью включена посредством ссылки в настоящий документ). В настоящем примере сообщают об эффектах однократных восходящих доз ПЭГ-соединения 2 на выбранные фармакодинамические маркеры активностей FGF21 у нормальных, недиабетических мышей C57BL/6J.

8-недельных самцов мышей линии C57BL/6J рандомизировали в следующие группы лечения (размер n=10/группа): 1) несущая среда, 2) ПЭГ-соединение 2, 0,03 мг/кг, 3) ПЭГ-соединение 2, 0,1 мг/кг, 4) ПЭГ-соединение 2, 0,3 мг/кг, или 5) ПЭГ-соединение 2, 1,0 мг/кг, и вводили подкожно их соответственное лечение в дозе, составляющей 5 мл/кг. После введения дозы после еды, образцы крови центрифугировали и отбирали аликвоты по 20 мкл плазмы для количественного определения общего и высокомолекулярного (HMW) адипонектина (Alpco Diagnostics, Salem, NH, № по кат. 47-ADPMS-E01). Снова собирали кровь у мышей после еды через 24, 48, 72 и 144 часов после однократной острой дозы для анализов содержания глюкозы в плазме и адипонектина и массу тела измеряли перед каждым забором крови.

Концентрации общего и высокомолекулярного (HMW) адипонектина в плазме измеряли согласно протоколу производителя для набора для проведения общего и HMW ELISA у мышей (Alpco Diagnostics, Salem, NH). Воздействия ПЭГ-соединения 2 в плазме определяли с помощью ELISA. Статистический анализ всех данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующими t-теста Даннетта с использованием группы, получившей несущую среду, в качестве контроля (JMP из SAS, Cary, NC). Статистическую значимость определяли при вероятности (P) $<0,05$.

Массу тела определяли в начальной точке (0), через 24, 48, 72 и 144 часов после лечения. При пересчете в процентное изменение от исходного значения (0 день) массы тела значимое дозозависимое уменьшение наблюдали в ответ на однократные SC дозы ПЭГ-соединения 2 (фигура 65). Эффект потери массы в % являлся максимальным через 72 часа после введения дозы и начинал возвращаться к исходным значениям к 6 дню, при этом ответ на 1,0 мг/кг дозу ПЭГ-соединения 2 оставался значительно сниженным по

сравнению с таковым в группе, получившей несущую среду. Масса тела значительно уменьшалась по сравнению с группой лечения несущей средой для группы лечения 0,3 мг/кг через 72 часа (P <0,001) и для группы лечения 1,0 мг/кг через 48 часов (P <0,05), 72 часа (P <0,0001) и 144 часов (P <0,001).

Концентрации общего адипонектина в плазме значительно увеличивались относительно несущей среды за счет лечения с помощью 0,1, 0,3 и 1,0 мг/кг доз ПЭГ-соединения 2 через 72 и 144 часов после введения дозы (фиг. 66A). Исследуемая доза ПЭГ-соединения 2, составляющая 0,03 мг/кг, незначительно увеличивала эффекты на общий адипонектин по сравнению с несущей средой в любой измеренной точке. Общий адипонектин в плазме являлся значительно увеличенным в группе лечения 0,1 мг/кг через 72 часа (P <0,001) и 144 часов (P <0,01), в группе лечения 0,3 мг/кг через 72 часа (P <0,01) и 144 часов (P <0,01), и в группе лечения 1 мг/кг через 72 часа (P <0,0001) и 144 часов (P <0,0001).

Выраженные как процентное изменение от исходного значения, концентрации общего адипонектина в плазме значительно увеличивались по сравнению с несущей средой при лечении с помощью всех доз ПЭГ-соединения 2 в некоторых временных точках (фиг. 66B). Отсутствовало значительное различие в процентном изменении от исходного значения в общем адипонектине по сравнению с несущей средой через 24 часа после лечения с помощью любой дозы ПЭГ-соединения 2, и через 72 часа после введения дозы все дозы ПЭГ-соединение 2 производили статистически значимые увеличения по сравнению с несущей средой. Максимальное наблюдаемое изменение составляло 75% увеличение в изменении от исходного содержания адипонектина через 144 часов после введения дозы 1 мг/кг ПЭГ-соединения 2. Процентное изменение общего адипонектина в плазме значительно увеличивалось в группе лечения 0,03 мг/кг через 72 часа (P <0,01), в группе лечения 0,1 мг/кг через 48 часов (P <0,01), 72 часа (P <0,0001) и 144 часов (P <0,001), в группе лечения 0,3 мг/кг через 72 часа (P <0,0001) и 144 часов (P <0,0001), и в группе лечения 1,0 мг/кг через 48 часов (P <0,01), 72 часа (P <0,0001) и 144 часов (P <0,0001).

Концентрации HMW адипонектина в плазме значительно увеличивались по сравнению с несущей средой при лечении с помощью 0,1 и 1,0 мг/кг доз ПЭГ-соединения 2, при этом 0,03 и 0,3 мг/кг доза ПЭГ-соединения 2 незначительно увеличивала HMW адипонектин по сравнению с несущей средой в любой измеренной точке (данные не показаны).

При измерении в конце исследования через 144 часов после лечения концентрации в плазме ПЭГ-соединения 2 увеличивались в зависимости от дозы как для активной, интактной на карбокси(С)-конце и общей (интактной и протеолизированной) форм молекулы (таблица 25).

Таблица 25. Концентрации в плазме общего и интактного на С-конце ПЭГ-соединения 2 после однократных SC доз

Форма ПЭГ-соединения 2	Доза (мг/кг)			
	0,03	0,1	0,3	1,0
Общая (нг/мл)	1,5 ± 0,21	12 ± 0,89	39 ± 3,2	222 ± 15
Интактная на С-конце (нг/мл)	0,40 ± 0,11	5,2 ± 0,38	19 ± 1,4	135 ± 8,6

Общее и интактное на С-конце ПЭГ-соединение 2 в плазме мышей C57BL/6J через 144 часов после SC дозы.

Все значения представляют собой среднее ± S.E.M.

Аналогичному протоколу следовали в отношении молекул ПЭГ-соединения 20, соединения 105, соединения 112, соединения 182, соединения 171, соединения 170, соединения 181 и ПЭГ-соединения 1, с использованием 9-11-недельных мышей линии C58BL/6J, за исключением того, что общий адипонектин измеряли только в начальной точке, через 3 дней (72 часов) и 6 дней (144 часов) после введения дозы. Соединения экспрессировали в E. coli за исключением соединения 181, которое экспрессировали в клетках HEK. Все соединения значительно увеличивали общий адипонектин в плазме по сравнению с несущей средой на 3 день и/или 6 день при определенных исследуемых дозах (см. фиг. 67A-E).

При дозировках, составляющих 0,3 мг/кг и 1 мг/кг, каждое из ПЭГ-соединения 2 и ПЭГ-соединения 20 приводило к значительным увеличениям общего адипонектина в плазме через 6 дней после введения дозы ($P < 0,001$ для 1 мг/кг любого соединения, $P < 0,01$ для 0,3 мг/кг ПЭГ-соединения 2, и $P < 0,05$ для 0,3 мг/кг ПЭГ-соединения 20) (фиг. 67A).

В дозировке, составляющей 54,3 нмоль/кг, процентное изменение от исходного значения общего адипонектина в плазме значительно увеличивалось с помощью ПЭГ-соединения 2, соединения 105 и соединения 112 (по сравнению с получившими лечение несущей средой контролями) на 3 и 6 день ($P < 0,001$ для всех точек данных, за исключением ПЭГ-соединения 2 на 3 день, $P < 0,05$) (фиг. 67B). Кроме того, 5,43 нмоль/кг

доза соединения 112 значительно увеличивала процентное изменение общего адипонектина в плазме по сравнению с получившими лечение несущей средой контролями, только на 3 день (P <0,05) (фиг. 67B).

Процентное изменение от исходного значения общего адипонектина в плазме значительно увеличивалось с помощью соединения 182 в дозе 18,1 нмоль/кг (P <0,01 как на 3 день, так и на 6 день) и в дозе 54,3 нмоль/кг (P <0,001 и P <0,05, соответственно, на 3 и 6 день) (фиг. 67C). Увеличение в процентном изменении общего адипонектина в плазме для дозы соединения 182, составляющей 5,43 нмоль/кг, являлось значимым только на 6 день (P <0,05). Кроме того, ПЭГ-соединение 2 (54,3 нмоль/кг доза) значительно увеличивало процентное изменение общего адипонектина в плазме как на 3 день, так и на 6 день (P <0,001 для обоих дней) (фиг. 67C).

Процентное изменение от исходного значения общего адипонектина в плазме значительно увеличивалось с помощью как соединения 171, так и соединения 181 как на 3 день, так и на 6 день зависимым от дозы образом по сравнению с получившим лечение несущей средой контролем (P <0,001 для всех точек данных за исключением P <0,01 для 5,43 нмоль/кг дозы соединения 181 на 6 день) (фиг. 67D). Кроме того, ПЭГ-соединение 2 (54,3 нмоль/кг доза) значительно увеличивало процентное изменение общего адипонектина в плазме как на 3, так и на 6 день (P <0,001 для обоих дней) (фиг. 67D).

Процентное изменение от исходного значения общего адипонектина в плазме значительно увеличивалось с помощью соединения 170 на 3 и 6 день при дозе 18,1 нмоль/кг (P <0,01, оба дня) и 54,3 нмоль/кг (P <0,05 на 3 день и P <0,001 на 6 день); увеличение процентного изменения общего адипонектина в плазме для 5,43 нмоль/кг дозы являлось значимым только на 6 день (P <0,05) (фиг. 67E). Кроме того, ПЭГ-соединение 2 (54,3 нмоль/кг доза) значительно увеличивало процентное изменение общего адипонектина в плазме как на 3, так и на 6 день (P <0,001 для обоих дней) (фиг. 67E).

Процентное изменение от исходного значения общего адипонектина в плазме значительно увеличивалось с помощью соединения 1 на 3 и 6 день в дозе, составляющей 10 мг/кг (P <0,001, оба дня). Кроме того, ПЭГ-соединение 2 (1 мг/кг) значительно увеличивало процентное изменение общего адипонектина в плазме на 6 день (P <0,001) (фиг. 67F).

Пример 19

Эффекты на диабетическое заболевание почек у мышей *db/db*

Односторонне нефрэктомизированные (unix) мыши db/db представляют собой модель диабетического заболевания почек (DKD) на грызунах, в которой хирургическое удаление одной почки отягощает и усиливает повреждение и дисфункцию почек, что приводит к сахарному диабету 2 типа (Ninichuk et al., Eur J Med Res 12:351-355 (2007), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

4-недельное исследование

В указанном исследовании мышей db/db в возрасте 8 недель подвергали левосторонней нефрэктомии под действием анестезии с помощью 5% изофурана для ускорения развития диабетической нефропатии. Через три недели после односторонней нефрэктомии группам по 14 односторонне нефрэктомизированных мышей распределяли по группам лечения или с помощью ПЭГ-соединения 2, или несущей среды, на основании рандомизации по следующим критериям: соотношение альбумина к креатинину в моче (uACR), содержание глюкозы в крови и масса тела в указанном порядке. Группу худых мышей db/m (n=12) рассматривали в качестве недиабетического нормального контроля. Лечение с помощью либо ПЭГ-соединения 2, либо несущей среды у односторонне нефрэктомизированных мышей db/db начинали через три недели после операции. 0,15 мг/кг ПЭГ-соединения 2 вводили дважды в неделю (BIW) с помощью подкожной (SC) инъекции в несущей среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 20 мМ Трис, pH 8,3. Исходные образцы крови собирали с помощью ретро-орбитального кровопускания под действием анестезии с помощью 5% изофурана. Многократные трехчасовые разовые порции мочи для измерений глюкозы, альбумина и креатинина в моче получали от каждой мыши в начальной точке и через 2, 3 и 4 недели лечения.

Мышей умерщвляли под действием анестезии с помощью изофурана через 4 недели лечения. Статистический анализ данных проводили с использованием однофакторного анализа изменчивости (ANOVA) с последующим тестом Даннетта, если не указано иное (программное обеспечение для статистического анализа JMP, SAS, Cary, NC). Статистическую значимость определяли при вероятности (P) <0,05. 4 мышей unix db/db в группе, получившей несущую среду, исключали из анализов данных (за исключением потребления пищи и воды), поскольку они проявляли тяжелый пиелонефрит.

Группы ПЭГ-соединения 2 и несущей среды проявляли сходные содержания глюкозы в плазме (765 ± 42 по сравнению с 815 ± 46, P >0,05) в начальной точке до

лечения. После 4 недель лечения в конце исследования глюкоза в плазме в группе ПЭГ-соединения 2 составляла на 23% ниже, чем этот показатель в группе, получившей несущую среду (485 ± 39 по сравнению с 629 ± 43, P <0,05) (см. таблицу 26).

Таблица 26. Лечение с помощью ПЭГ-соединения 2 снижало содержание глюкозы в крови (мг/дл)[a].

Группа	Исходное содержание глюкозы в крови	Конечное содержание глюкозы в крови
Худые мыши	194,9 ± 6,4	181,0 ± 19,5
Unix db/db, несущая среда	814,8 ± 45,6[b]	628,6 ± 39,0[b]
Unix db/db, ПЭГ-соединение 2	628,6 ± 39,0[b]	485,2 ± 42,5[c]

a. Данные выражают как среднее ± S.E.M.

b. P <0,05, заболевание (unix db/db, несущая среда, n = 9) по сравнению с нормой (db/m худые, n = 10).

c. P <0,05, ПЭГ-соединение 2 (n = 14) по сравнению с несущей средой (n = 9).

После начала лечения с помощью ПЭГ-соединения 2 содержания глюкозы в моче постепенно уменьшались. Содержания глюкозы в моче в группе ПЭГ-соединения 2 показали значительное снижение на 71%, 73% и 84% при лечении 2, 3 и 4 недели, соответственно, по сравнению с группой, получившей несущую среду (все P <0,05; таблица 5).

Таблица 27. ПЭГ-соединение 2 снижало содержание глюкозы в моче (мг/дл)[a].

Группа	**2 недели введения дозы**	**3 недели введения дозы**	**4 недели введения дозы**
Худые мыши	17 ± 3	12 ± 1	40 ± 5
Unix db/db, несущая среда	8719 ± 694[b]	8550 ± 204[b]	9796 ± 378[b]
Unix db/db, ПЭГ-соединение 2	2537 ± 818[c]	2284 ± 715[c]	1565 ± 410[c]
% снижения	71%	73%	84%

a Данные выражают как среднее ± S.E.M.

b P <0,05, заболевание (unix db/db, несущая среда, n = 9-10) по сравнению с нормой (db/m худые, n = 10-12).

c P <0,05, ПЭГ-соединение 2 (n = 13-14) по сравнению с несущей средой (n = 9-10).

В литературе сообщалось, что микроальбуминурия (соотношение альбумина к креатинину в моче (uACR) > 30 мкг/мг) представляет собой один из наиболее

чувствительных и специфических индикаторов ранней нефропатии у пациентов с сахарным диабетом (см. Chae et al., J Korean Med Sci. 2012; 27: 784–787, которая полностью включена посредством ссылки в настоящий документ). Микроальбумин измеряли из 3 часовой разовой порции мочи и значения нормировали к креатинину мочи. Недиабетические худые мыши db/m характеризовались средними значениями uACR в диапазоне от 21 до 37 мкг/мг в течение исследования (фиг. 68 и таблица 28).

В течение исследования uACR у мышей unix db/db увеличивалось значительно от 23- до 62-кратно (все P <0,05) по сравнению с недиабетическими, худыми мышами db/m (фиг. 68 и таблица 28). uACR в получившей лечение с помощью несущей среды группе увеличивалось от 838 ± 159 мкг/мг в начальной точке до 1341 ± 284 мкг/мг через 4 недели (таблица 28), согласуясь с прогрессирующим повреждением почек.

По сравнению с группой, получившей несущую среду, получившие лечение с помощью ПЭГ-соединения 2 мыши unix db/db показали значительные уменьшения значений uACR на 49%, 53% и 66% после 2, 3 и 4 недель лечения, соответственно (все P <0,05; фиг. 68). Значения uACR после лечения ПЭГ-соединением 2 являлись ниже, чем значения, измеренные в исходной точке до лечения (таблица 28).

Таблица 28. ПЭГ-соединение 2 снижало uACR (мкг/мг)[a].

Группы	**Исходная точка**	**2 недели введения дозы**	**3 недели введения дозы**	**4 недели введения дозы**
Худые мыши	36,7 ± 2,6	26,3 ± 4,3	21,4 ± 2,7	30,1 ± 2,8
Unix db/db, несущая среда	838,2 ± 159,4[b]	1060,2 ± 256,9[b]	1319,9 ± 282,3[b]	1341,3 ± 283,5[b]
Unix db/db, ПЭГ-соединение 2	865,8 ± 170,8	538,5 ± 107,5[c]	616,1 ± 145,2[c]	460,6 ± 92,7[c]

Сырая масса почки отражает статус почечной гипертрофии вследствие гиперфильтрации при сахарном диабете. Средняя масса почки являлась значительно больше у мышей unix db/db по сравнению с недиабетическими худыми мышами с 59% увеличением массы почки у мышей unix db/db, которые получали лечение с помощью несущей среды. Лечение с помощью ПЭГ-соединения 2 в течение 4 недель значительно ингибировало увеличение массы почки у диабетических мышей (286 ± 6,3 по сравнению с 253 ± 7,4, несущая среда по сравнению с ПЭГ-соединением 2, P <0,05).

8-недельное исследование

В возрасте 8 недель мышей *db/db* подвергали левосторонней нефрэктомии под действием 3% изофурана в кислороде для ускорения развития диабетической нефропатии. Через три недель после односторонней нефрэктомии группы из 14 односторонне нефрэктомизированных мышей блокировали, рандомизировали и распределяли по группам лечения или ПЭГ-соединением 2 в дозе 0,15 мг/кг или 0,015 мг/кг или несущей средой на основании показателей: соотношение альбумина к креатинину в моче (uACR), содержание глюкозы в крови и масса тела в указанном порядке. Группу худых мышей *db/m* (n=11) принимали в качестве недиабетического нормального контроля. Подкожное лечение дважды в неделю с помощью ПЭГ-соединения 2 в дозе или 0,15, или 0,015 мг/кг, или несущей среды у мышей unix *db/db* начинали через три недели после операции. Мышей умерщвляли под действием 3% изофурана в кислороде с последующим смещением шейных позвонков через 8 недель лечения. Почки извлекали, декапсулировали и взвешивали.

Группа, получившая дозу 0,015 мг/кг, не показала какого-либо значительного уменьшения содержания глюкозы в крови или улучшения почечных параметров. Доза ПЭГ-соединения 2, составляющая 0,15 мг/кг, значительно снижала содержания глюкозы в крови и моче и снижала альбуминурию на ~50% по сравнению с этими показателями у получающих лечение с помощью несущей среды мышей (все P <0,05). Кластер воспалительных и фиброзных генов подвергался значительной положительной регуляции в почках односторонне нефрэктомизированных мышей *db/db* по сравнению с худыми мышами, и лечение с помощью ПЭГ-соединения 2 в дозе, составляющей 0,15 мг/кг, значительно снижало экспрессию указанных генов в сторону содержаний, наблюдаемых у худых контрольных мышей *db/m*. Средняя влажная масса почки также являлась значительно выше у односторонне нефрэктомизированных мышей *db/db* по сравнению с этим показателем у худых мышей, и лечение с помощью ПЭГ-соединения 2 в дозе 0,15 мг/кг в течение 57 дней значительно снижало среднюю влажную массу по сравнению с несущей средой.

Срезы из середины 1/3 почки окрашивали с помощью гематоксилина и эозина для гистологического анализа. Поражениям почек присваивали степень согласно критериям, определенным в примечаниях к таблице 29. Все мыши unix db/db проявляли мезангиальную гломерулопатию, которая представляет собой предполагаемый фенотип указанной модели (таблица 29). Оказалось, что лечение с помощью ПЭГ-соединения 2 в дозе 0,15 мг/кг, но не в дозе 0,015 мг/кг, снижает тяжесть мезангиальной гломерулопатии. Несколько мышей unix db/db проявляли канальцевые-

интерстициальные поражения, вторичные по отношению к гломерулопатии, что согласуется с основным патогенезом указанной модели.

Указанные наблюдения предоставляют доказательство того, что ПЭГ-соединение 2 в дозе 0,15 мг/кг является ренопротективным в условиях хронического сахарного диабета 2 типа.

Таблица 29. ПЭГ-соединение 2: частота встречаемости и степень поражения почек.

	Лечение (мг/кг)	0 (несущая среда-контроль)	0,015	0,15
	Количество мышей	9	8	9
Локализация	**Степень**			
Клубочки[a]		**9**	**8**	**9**
	1	1	1	6
	2	5	2	3
	3	3	5	-
Канальцы / Интерстиций[b]		**3**	**3**	**4**
	1	2	2	4
	2	1	1	-
Почечная лоханка[c]		**2**	**1**	**2**
	1	2	-	1
	2	-	1	1

a Гломерулярная мезангиальная экспансия является очаговой или диффузной, и сегментарной или глобальной. Степень 2 основана на оценке >50% клубочков с мезангиальной экспансией и/или дополнительном мезенгиальном, капиллярном, эпителиальном или капсульном поражении по меньшей мере в 1 клубочке; степень 3 основана на больше чем одном из указанных дополнительных поражений клубочков.

b Канальцевые поражения включают в себя дилатацию, атрофию и/или гиперплазию; интерстициальные поражения, как правило, связаны с гломерулярными

поражениями и характеризуются минимальным воспалением или локализованным перитубулярным фиброзом. Степень 1 является очаговой; степень 2 является многоочаговой с 2 - 4 очагами.

с Гнойное воспаление; степень 1 основана на воспалении, ограниченном эпителием почечной лоханки; степень 2 основана на распространении в мозговой слой или перипельвикальный корковый слой.

Пример 20

Эффекты на гипертрофию сердца и фиброз сердца у мышей Balb/C после инфузии изопротеренола

Мышь Balb/c, которой проводят инфузию изопротеренола (Iso), представляет собой модель фиброза сердца и гипертрофии на грызунах.

Самцов мышей Balb/c в возрасте от 10 до 12 недель рандомизировали на основании массы тела перед введением лекарственного средства. Iso или несущую среду (0,02 % аскорбиновой кислоты в физиологическом растворе) вводили подкожно через осмотических мининасос в течение 3 недель. Мышам одновременно вводили дважды в неделю (BIW) дозы 0,5 мг/кг ПЭГ-соединения 2 или несущей среды в течение 3 недель. Затем животных подвергали эвтаназии и сердца удаляли на больших сосудах и слегка промокали для удаления крови в желудочках и затем взвешивали. Из оставшихся 24 мышей в каждой группе целое сердце замораживали на сухом льду и хранили при $\leq$ -70°C для анализа гидроксипролина (HP).

Анализ содержания HP в сердце (конечный показатель фиброза сердца) проводили с использованием набора для анализа общего коллагена согласно инструкциям производителя (Quickzyme Biosciences, Нидерланды).

В конце 3-недельной прижизненной фазы измеряли содержание HP целого сердца. Нормированное содержание HP увеличивалось на 114% (P <0,05) в группе Iso + несущая среда (21,35 ± 0,81 мкг/мг) по сравнению с группой плацебо + несущая среда (9,96 ± 0,38 мкг/мг). Это указывало, что фиброз сердца появлялся в ответ на инфузию Iso у мышей Balb/c. Содержание HP в сердце мышей, получивших Iso+ ПЭГ-соединение 2 (0,5 мг/кг) (15,91 ± 0,49 мкг/мг) являлось значительно меньше, чем у животных, получивших Iso + несущая среда (фиг. 69 и таблица 30). Таким образом, при введении в профилактическом формате ПЭГ-соединение 2 (0,5 мг/кг) снижало степень гипертрофии и фиброза сердца.

Таблица 30. Содержание HP в сердце на 3 неделе лечения с помощью изопротеренола и ПЭГ-соединение 2. Данные представляют содержание HP целого сердца, нормированное к белку. Все значения представляют собой среднее ± S.E.M. *: P <0,05, по сравнению с плацебо + несущая среда, **: P <0,05, по сравнению с Iso + несущая среда (однофакторный дисерсионный анализ с последующим тестом Бонферрони).

	Плацебо + несущая среда (n)	Iso + несущая среда (n)	Iso + PEG-соединение 2 (n)
Гидроксипролин/белок (мкг/мг)	9,96 ± 0,38 (20)	21,35 ± 0,81 (19)*	15,91 ± 0,49 (20)**

Интервенционное исследование проводили для определения того, может ли 0,5 мг/кг ПЭГ-соединения 2 отсрочить прогрессирование или обеспечить обратное развитие предварительно установленной гипертрофии сердца и фиброза у мышей Balb/c, которые уже получили инфузию с помощью Iso в течение 1 недели до начала 3-недельного лечения с помощью варианта ПЭГ-FGF21. Интервенция с помощью ПЭГ-соединения 2 (0,5 мг/кг) привела в результате к 24% снижению массы левого желудочка (LV) (конечный показатель гипертрофии сердца, оцениваемый с помощью эхокардиографии). Это наблюдение связано со значительной, 14% потерей массы тела и 23% повышением циркулирующих содержаний адипонектина. Не наблюдали никаких значимых различий между группами Iso + несущая среда и Iso + ПЭГ-соединение 2 в отношении фиброза сердца (содержание HP) или систолической функции сердца (измеренной с помощью эхокардиографа).

Пример 21

Рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование однократных и многократных возрастающих доз для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики ПЭГ-соединения 2 у здоровых субъектов

Исследование состоит из трех частей: часть A: однократная возрастающая доза (SAD; часть B: многократная возрастающая доза (MAD); и часть C: многократная возрастающая доза у субъектов из Японии (J-MAD). ПЭГ-соединение 2 или плацебо вводят с помощью подкожной инъекции в качестве лечения в слепом режиме. Субъекты

в части A получают однократную дозу лечения в слепом режиме, и субъекты в частях B и C получают многократные дозы лечения в слепом режиме.

В SAD выбирают начальную дозу, составляющую 0,6 мг ПЭГ-соединения 2. Верхнюю дозу, составляющую 60 мг, в SAD и дозу 60 мг каждую неделю для MAD также выбирают для исследования верхнего предела прогнозируемого диапазона эффективных доз. Субъект может получать дозу, составляющую 0,6 мг, 2 мг, 6 мг, 20 мг, 40 мг или вплоть до 60 мг ПЭГ-соединения 2 в части SAD. В частях MAD субъект может получать каждую неделю дозу, составляющую 2 мг, 6 мг, 20 мг, 40 мг или 60 мг (QW или BIW).

В исследование можно включать здоровых мужчин и женщин в возрасте 21-55 лет с BMI от 30 до 40 (части A и B) или от 20 до 35 (часть C).

Основные конечные показатели:

Цель (оценить безопасность и переносимость однократных и многократных подкожных доз ПЭГ-соединения 2 у здоровых субъектов) будут измерять по следующим конечным показателям безопасности: частота встречаемости AE, серьезные AE и представляющие особый интерес события, включая в себя оценку места введения инъекции, AE, ведующие к прерыванию исследования и смерти, а также заметные нарушения в клинических лабораторных анализах, измерениях основных показателей состояния организма, ЭКГ, физикальном обследовании, возникающие вплоть до через 30 дней после последней дозы исследуемого лекарственного средства.

Второстепенные конечные показатели:

Часть A: фармакокинетические параметры однократной дозы (Cmax, Tmax, AUC(0-T), AUC(INF), T-HALF и CLT/F) получали из концентрации в сыворотке интактного на C-конце ПЭГ-соединения 2 в зависимости от времени, в день лечения однократной дозой и в течение вплоть до 4 недель периода отмывки после однократной дозы.

Часть B и C: фармакокинетические параметры многократных доз (Cmax, Tmax, AUC(TAU) и коэффициент накопления (AI)) получали из концентрации в сыворотке интактного на C-конце ПЭГ-соединения 2 в зависимости от времени после первой дозы и последней дозы. T-HALF будут рассчитывать только для последней дозы. Минимальную концентрацию в сыворотке ПЭГ-соединения 2 (C_{Trough}) будут получать в выбранные дни в течение 22 дней лечения и в течение вплоть до 4 недель после последней дозы.

Пример 22

Оценка ПЭГ-соединения 1, ПЭГ-соединения 2 и соединения 170 в мышиной модели NASH

Три варианта FGF-21, ПЭГ-соединение 1, ПЭГ-соединение 2 и соединение 170, исследовали в модели NASH с 2 попаданиями согласно Stelic Institute, описанной выше в примере 13. NASH индуцировали у 40 самцов мышей путем однократной подкожной инъекции раствора 200 мкг стрептозотоцина через 2 дней после рождения и кормления с помощью высокожировой диеты (HFD; 57% жира по ккал), начиная с 4-недельного возраста ("мыши STAM"). Мышам вводили 3 мг/кг ПЭГ-соединения 1 (n=8), 0,5 мг/кг ПЭГ-соединения 2 (n=8), 2,5 мг/кг соединения 170 (n=8), или несущую среду (20 мМ Трис/250 мМ сахарозы, pH 8,3) (n=8), подкожным путем дважды в неделю в возрасте от 7 до 9 недель. Этих мышей умерщвляли в возрасте 9 недель для различных анализов. Другая группа из 8 мышей служила в качестве исходного контроля, и их умерщвляли в возрасте 7 недель.

Концентрации общего и высокомолекулярного (HMW) адипонектина измеряли в конечных образцах сыворотки, полученных от мышей с использованием коммерчески доступного набора для проведения ELISA (Alpco, № по кат. 47-ADPMS-E01) следуя протоколу производителя. По сравнению с группой, получившей несущую среду, все 3 варианта FGF21 значительно увеличивали содержание общего адипонектина в сыворотке (фиг. 70A) ($p < 0,0001$ для ПЭГ-соединения 1, ПЭГ-соединения 2 и соединения 170), HMW адипонектина в сыворотке (фиг. 70B) ($p < 0,005$, ПЭГ-соединение 1; и $p < 0,0001$, ПЭГ-соединение 2 и соединение 170), и соотношение HMW/общего адипонектина (фиг. 70C) ($p < 0,05$, ПЭГ-соединение 1; и $p < 0,01$, ПЭГ-соединение 2 и соединение 170).

Определяли массу тела, массу печени, содержание триглицеридов в печени, содержание холестерина в печени и содержания глюкозы, триглицеридов и ALT в плазме. Все три варианта FGF21 значительно снижали массу тела (фиг. 72A), массу печени (фиг. 72B), соотношение массы печени к массе тела (фиг. 72C), содержание триглицеридов в печени (фиг. 72D) и содержание ALT в плазме (фиг. 72E). ПЭГ-соединение 2 и соединение 170 значительно снижали содержание холестерина в печени (фиг. 72F), и ПЭГ-соединение 2 значительно снижало содержания триглицеридов в плазме (фиг. 72G). Ни одно соединение не уменьшало значительно содержание холестерина или глюкозы в плазме (данные не показаны) в настоящем исследовании.

Пример 23

Оценка ПЭГ-соединения 2 и соединения 170 в течение 3 недель введения доз BIW мышам ob/ob

Пегилированное соединение 2 и соединение 170 оценивали в 21-дневном исследовании повторного введения дозы. Результаты демонстрируют, что оба соединения вызывали снижения массы печени и зависимые от дозы снижения стеатоза гепатоцитов в левой латеральной доли печени по сравнению с несущей средой.

Самцов мышей *ob/ob* (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) в 8-недельном возрасте рандомизировали на 5 групп, как описано в примере 12. Мышам вводили несущую среду, пегилированное соединение 2 и соединение 170 подкожно дважды в неделю (BIW) следующим образом (n=12 для каждой группы): 1) несущая среда (250 мМ сахарозы/20 мМ Трис, pH 8,3); 2) пегилированное соединение 2, 8,14 нмоль/кг (0,15 мг/кг); 3) соединение 170, 8,14 нмоль/кг; 4) пегилированное соединение 2, 81,45 нмоль/кг (1,5 мг/кг); и 5) соединение 170, 81,45 нмоль/кг. Массу тела, содержание глюкозы, триглицеридов, инсулина, неэстерифицированных жирных кислот (NEFA), β-OH-бутирата, общего адипонектина и высокомолекулярного (HMW) адипонектина в плазме определяли в течение 21-дневного периода введения доз после еды. Гликированный гемоглобин (HbA1c) в цельной крови определяли в начале и в конце исследования. Массу печени и содержания триглицеридов в печени определяли в конце исследования. Гистологию печени проводили на левой латеральной доле печени для оценки стеатоза гепатоцитов. Ткань фиксировали в 10% забуференном формалине и обрабатывали для гистологии. Срезы залитых парафином тканей окрашивали гематоксилином и эозином с использованием стандартных способов. Первых 6 мышей в каждой группе лечения оценивали (в общем =30 мышей). Стеатоз гепатоцитов (микро- и макровезикулярное жировое изменение), главным образом, был ограничен зонами II/III у контрольных мышей; указанной степени стеатоза условно присваивали стадию (балл) 2. Другим образцам присвоили стадию в слепом режиме (стадию 0 присваивали наименьшей степени наблюдаемого стеатоза). Кроме того, нагруженные липидами перисинусоидальные клетки, преимущественно звездчатые клетки печени (Ito) наблюдали у мышей, получивших лечение или с помощью ПЭГ-соединения 2, или соединения 170, но не у мышей, получивших лечение с помощью несущей среды, у которых клетки Ito скрыты стеатозом гепатоцитов. Относительную численность клеток Ito оценивали в слепом режиме (без подсчета) и каждому образцу условно присваивали стадию для обеспечения полуколичественной оценки (при этом балл 3 указывает на самую высокую численность).

Обе дозы обоих соединений значительно снижали содержание глюкозы после еды до нормогликемических содержаний (данные не показаны), и значительно снижали содержание инсулина и HbA1c в плазме (данные не показаны). Значительные увеличения высокомолекулярного (HMW) адипонектина по сравнению с несущей средой наблюдали с 8 дня по 21 день, с тенденцией к зависимости от дозы, при этом содержание общего адипонектина в плазме продемонстрировало несколько меньшие, но неустойчивые увеличения по сравнению с несущей средой (данные не показаны). Содержания как NEFA, так и β-OH-бутирата в плазме увеличивались с помощью обоих соединений (особенно при высокой дозе) по сравнению с несущей средой (данные не показаны), подтверждая увеличенное окисление жирных кислот. Значительные уменьшения как в абсолютной массе печени, и так и массе печени, скорректированной на массу тела, наблюдали на 21 день во всех группах лечения (фиг. 71A и 71B). Конкретно, во всех четырех группах, получивших лечение с помощью вариантов FGF-21, абсолютная масса печени значительно уменьшалась ($p < 0,0001$) относительно контрольной группы, получившей несущую среду, и повышенная доза ПЭГ-соединения 2 значительно уменьшала абсолютную массу печени по сравнению с пониженной дозой этого соединения ($p < 0,05$) (фиг. 71A). Кроме того, во всех четырех группах, получивших лечение с помощью вариантов FGF-21, соотношение массы печени к массе тела значительно уменьшалось ($p < 0,0001$) относительно контрольной группы, получившей несущую среду (фиг. 71B). Зависимое от дозы снижение тяжести стеатоза гепатоцитов наблюдали у мышей, получивших лечение с помощью или ПЭГ-соединения 2 или соединения 170, по сравнению с несущей средой (таблица 31). Нагруженные липидами перисинусоидальные клетки (преимущественно клетки Ito или звездчатые клетки печени) наблюдали в срезах от мышей, получивших лечение с помощью ПЭГ-соединения 2 и соединения 170 (таблица 32), но их нельзя визуализировать в срезах от получивших лечение с помощью несущей среды мышей, так как этому препятствует стеатоз гепатоцитов. Зависимое от дозы снижение тяжести выраженности клеток Ito наблюдали в срезах от мышей, получивших лечение или с помощью ПЭГ-соединения 2, или соединения 170.

Таблица 31. Частота встречаемости и гистологическая оценка в баллах стеатоза гепатоцитов (жирового изменения) у мышей ob/ob

		Несущая среда	ПЭГ-соединение 2 (8,14 нмоль/кг)	Соединение 170 (8,14 нмоль/кг)	ПЭГ-соединение 2 (81,45 нмоль/кг)	Соединение 170 (81,45 нмоль/кг)
Балл	№	6	6	6	6	6
0		-	-	1	6	6
1		-	6	5	-	-
2		6	-	-	-	-

Таблица 32. Частота встречаемости и гистологическая оценка в баллах перисинусоидальных нагруженных липидами клеток у мышей ob/ob.

		Несущая среда	ПЭГ-соединение 2 (8,14 нмоль/кг)	Соединение 170 (8,14 нмоль/кг)	ПЭГ-соединение 2 (81,45 нмоль/кг)	Соединение 170 (81,45 нмоль/кг)
Балл	№	6	6	6	6	6
0		ND	-	-	1	-
1		ND	-	1	4	1
2		ND	-	-	1	5
3		ND	6	5	-	-

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение модифицированнго полипептида FGF-21 содержащего полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 201, у которого остаток пара-ацетил-L-фенилаланина связан с фрагментом полиэтиленгликоля, имеющего молекулярную массу между 10 кДа и 40 кДа, для лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у пациента.

2. Применение по п. 1, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится путем подкожной инъекции.

3. Применение модифицированнго полипептида FGF-21 содержащего полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 201, у которого остаток пара-ацетил-L-фенилаланина связан с фрагментом полиэтиленгликоля, имеющего молекулярную массу между 10 кДа и 40 кДа, для лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у пациента, где указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится путем подкожной инъекции.

4. Применение по любому из п.п. 1-3, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в день.

5. Применение по любому из п.п. 1-3, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой раз в неделю.

6. Применение по любому из п.п. 1-3, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой два раза в неделю.

7. Применение по любому из п.п. 1-3, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в две недели.

8. Применение по любому из п.п. 1-3, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в три недели.

9. Применение по любому из п.п. 1-3, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в четыре недели.

10. Применение модифицированнго полипептида FGF-21 содержащего полипептид с последовательностью SEQ ID NO: 201, у которого остаток пара-ацетил-L-фенилаланина связан с фрагментом полиэтиленгликоля, имеющего молекулярную массу

между 10 кДа и 40 кДа, для лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у пациента, где указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится путем подкожной инъекции один раз в неделю.

11. Применение по п. 1-10, при котором указанный полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу 30 кДа.

12. Применение по любому из п.п. 1-11, которое приводит к одному или более из уменьшения жировой фракции печени и увеличения уровня адипонектина у указанного пациента.

13. Применение по любому из п.п. 1-11, при котором перед лечением у пациента индекс жировой инфильтрации печени составляет по меньшей мере 60.

14. Применение по любому из п.п. 1-11, при котором перед лечением у пациента процентное содержание жировой фракции печени составляет по меньшей мере 10%, которое может быть определено посредством магнитно-резонансного изображения.

15. Применение по любому из п.п. 1-1, при котором перед лечением у пациента обнаружена 1-3 стадия фиброза NASH CRN, которая может быть определена биопсией печени.

16. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение указанному пациенту эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего полипептид с SEQ ID NO: 201, у которого остаток пара-ацетил-L-фенилаланина связан с фрагментом полиэтиленгликоля, имеющего молекулярную массу между 10 кДа и 40 кДа.

17. Способ по по п. 16, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится путем подкожной инъекции.

18. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение указанному пациенту эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего полипептид с SEQ ID NO: 201, у которого остаток пара-ацетил-L-фенилаланина связан с фрагментом полиэтиленгликоля, имеющего молекулярную массу между 10 кДа и 40 кДа, где

указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится путем подкожной инъекции.

19. Способ по любому из п.п. 16-18, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в день.

20. Способ по любому из п.п. 16-18, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой раз в неделю.

21. Способ по любому из п.п. 16-18, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой два раза в неделю.

22. Способ по любому из п.п. 16-18, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в две недели.

23. Способ по любому из п.п. 16-18, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в три недели.

24. Способ по любому из п.п. 16-18, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в четыре недели.

25. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у нуждающегося в этом пациента, предусматривающие введение указанному пациенту эффективного количества модифицированного полипептида FGF-21, содержащего полипептид с SEQ ID NO: 201, у которого остаток пара-ацетил-L-фенилаланина связан с фрагментом полиэтиленгликоля, имеющего молекулярную массу между 10 кДа и 40 кДа, где указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится путем подкожной инъекции, при котором указанный модифицированный полипептид FGF-21 вводится с частотой один раз в день.

26. Способ по любому из п.п. 16-25, при котором указанный полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу 30 кДа

27. Способ по любому из п.п. 16-26, который приводит к одному или более из уменьшения жировой фракции печени и увеличения уровня адипонектина у указанного пациента.

28. Способ по любому из п.п. 16-26, при котором перед лечением у пациента индекс жировой инфильтрации печени составляет по меньшей мере 60.

29. Способ по любому из п.п. 16-26, при котором перед лечением у пациента процентное содержание жировой фракции печени составляет по меньшей мере 10%, которое может быть определено посредством магнитно-резонансного изображения.

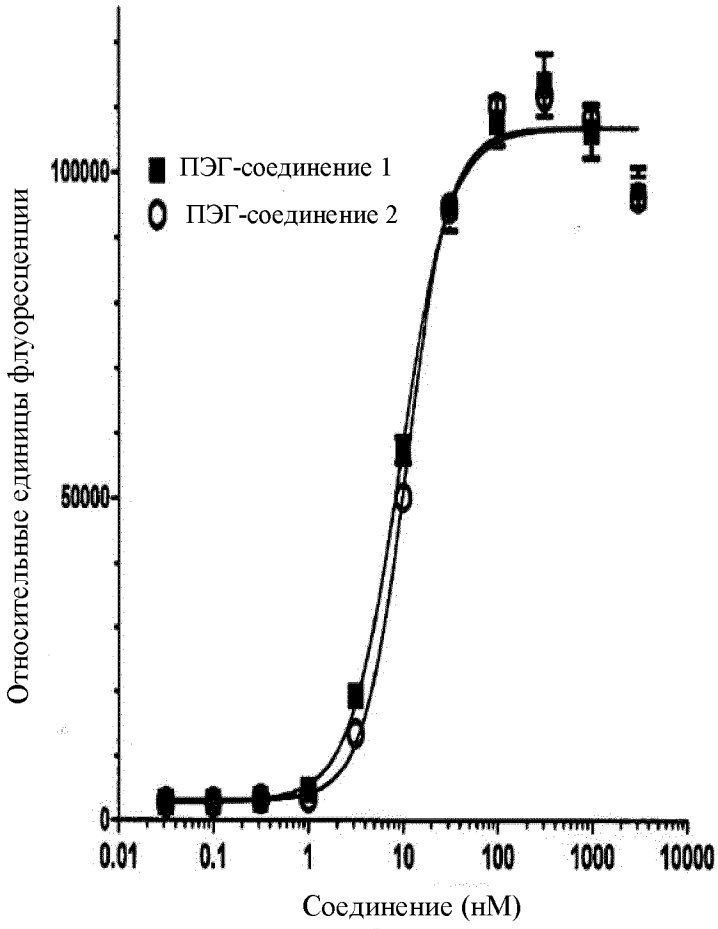
30. Способ по любому из п.п. 16-26, при котором перед лечением у пациента обнаружена 1-3 стадия фиброза NASH CRN, которая может быть определена биопсией печени.

Название соединения	SEQ ID NO:	Амино кислота 108	Мол. масса ПЭГ	Аминокислоты 109-149	Аминокислоты 169-181
Соединение 1	101	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VGPSQGRSPSYAS
Соединение 2	102	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG--------RGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 3	103	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 4	104	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGKKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 5	105	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGDKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 6	106	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 7	107	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGDKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 8	108	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG----------ARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 9	109	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 10	110	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG---------GPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 11	111	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSGH--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 12	112	Q	n/a	SEAHGLPLHLPHHSG--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 13	113	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGKDS--QDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 14	114	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VGPSQGRSPSYAS
Соединение 15	115	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGREPSYAS
Соединение 16	116	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	V-PSQGRSPSYAS
Соединение 17	117	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VG-SQGRSPSYAS
Соединение 18	118	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEP----------
Соединение 19	119	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSGP-HRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 20	120	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GGH---RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 21	121	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG---RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 22	122	Q	n/a	SEAHGLPLHLSGG------PAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 23	123	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GG----------GPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS

ФИГУРА 1А

Название соединения	SEQ ID NO:	Амино кисло-та 108	Мол. масса ПЭГ	Аминокислоты 109-149	Аминокислоты 169-181
Соединение 24	124	Q	n/a	SEAHGLPLHLPG----------G--RFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 25	125	Q	n/a	SEAHGLPLHLP-SG---------G--RFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 26	126	Q	n/a	SEAHGLPLH-SGG------PAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 27	127	Q	n/a	SEAHGLPLH--GSG---------GPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 28	128	Q	n/a	SEAHGLP-H--GG------------RFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 29	129	Q	n/a	SEAHGLP-H-SGG------------RFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 30	130	Q	n/a	SEAHGLP-H--GSG-----------RFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Соединение 31	131	Q	n/a	SEAHGLPLHL-GSG---------GPARFLPLPGLPPAPPEP	VTPSQGRSPSYAS
Соединение 32	132	Q	n/a	SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEP	VGPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 1	201	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VGPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 2	202	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHL-GSG--------RGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 5	205	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHLPGDKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 6	206	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHLPGHKS--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 10	210	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHL-GSG---------GPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 11	211	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHL-GSGH--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 12	212	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHLPHHSG--RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 19	219	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHL-GSGP-HRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 20	220	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHL-GGH---RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 21	221	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHL-GSG---RDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 22	222	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHLSGG------PAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS
Пегилир. соед. 23	223	pAF	30 кДа	SEAHGLPLHL-GG----------GPARFLPLPGLPPAPPEP	VEPSQGRSPSYAS

ФИГУРА 1B

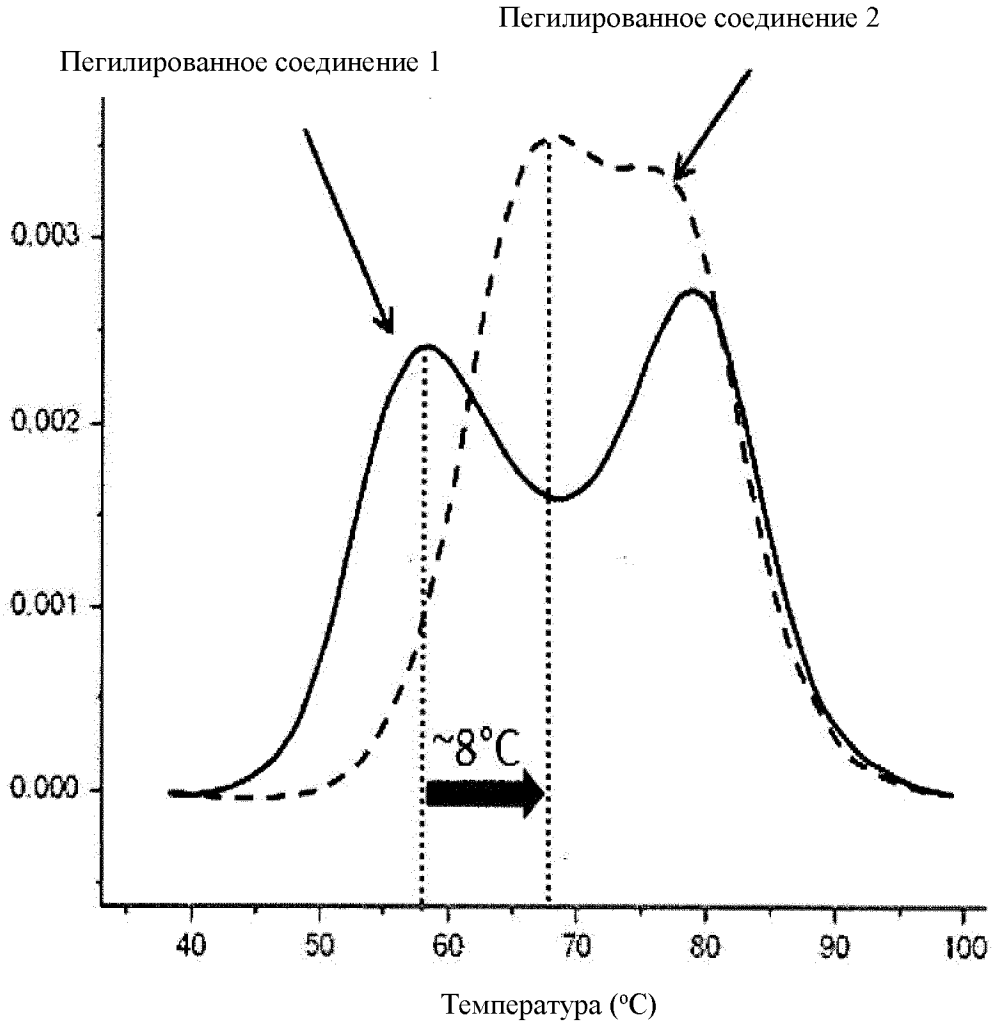


Обобщенные данные (n=4)

Параметр	ПЭГ-соединение 1	ПЭГ-соединение 2
Среднее pEC_{50} ± S.D. (M)	7.85 ± 0.26	7.74 ± 0.28
Геометр. среднее EC_{50} (95% CI) (nM)	14 (5 - 37)	18 (6 - 51)

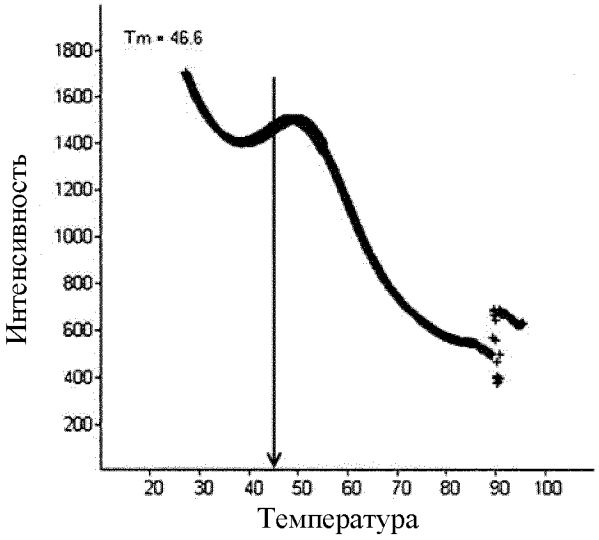
ФИГУРА 2

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC)



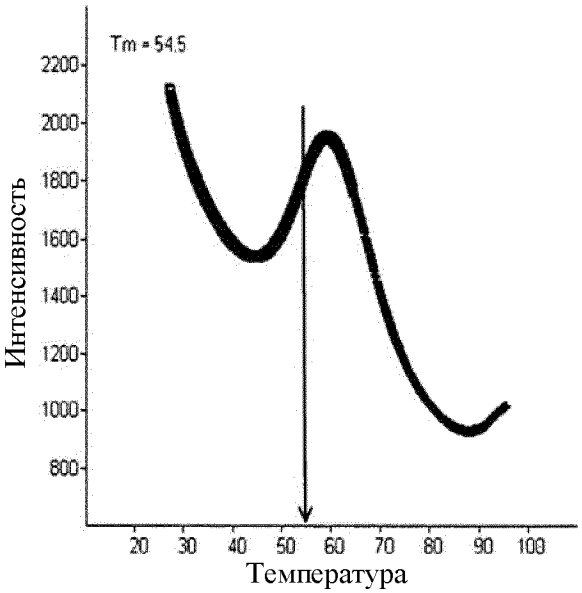
ФИГУРА 3

Термическая стабильность, определенная с помощью флуоресценции при термическом сканировании (TSF)



Соединение 1

46.63

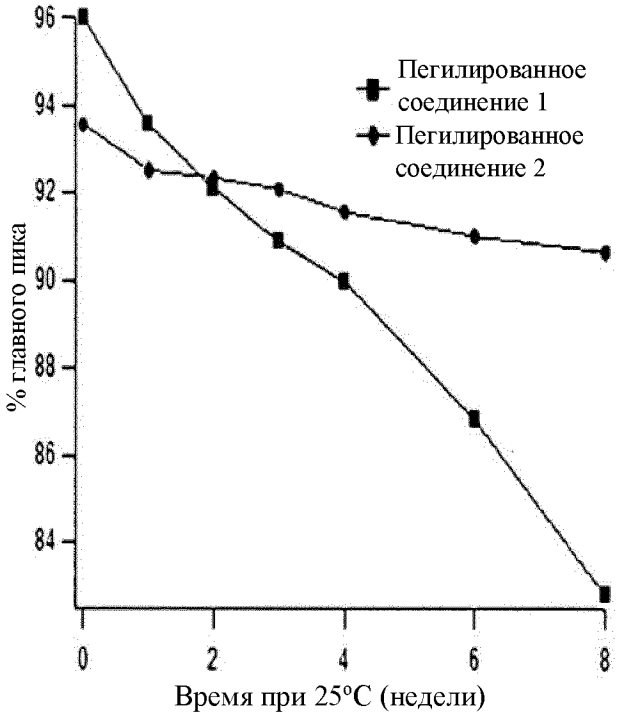


Соединение 10

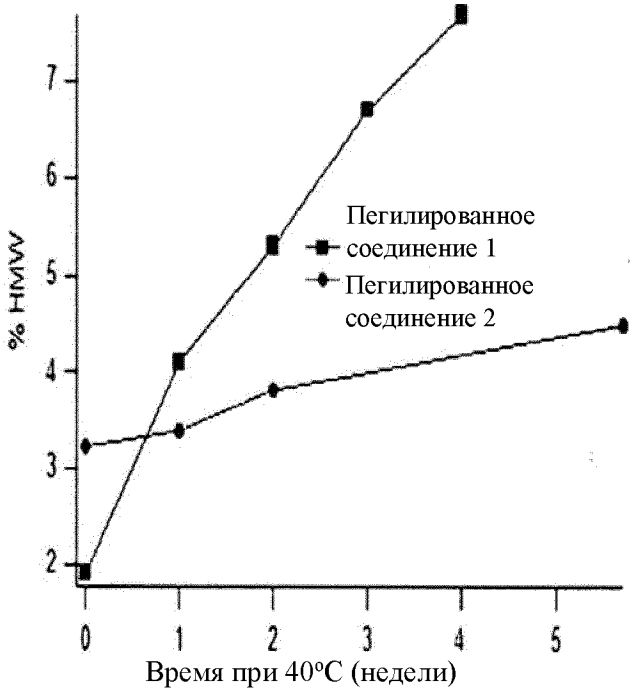
54.50 (+~8°C)

ФИГУРА 4

Формирование гетерогенности заряда при 25°C



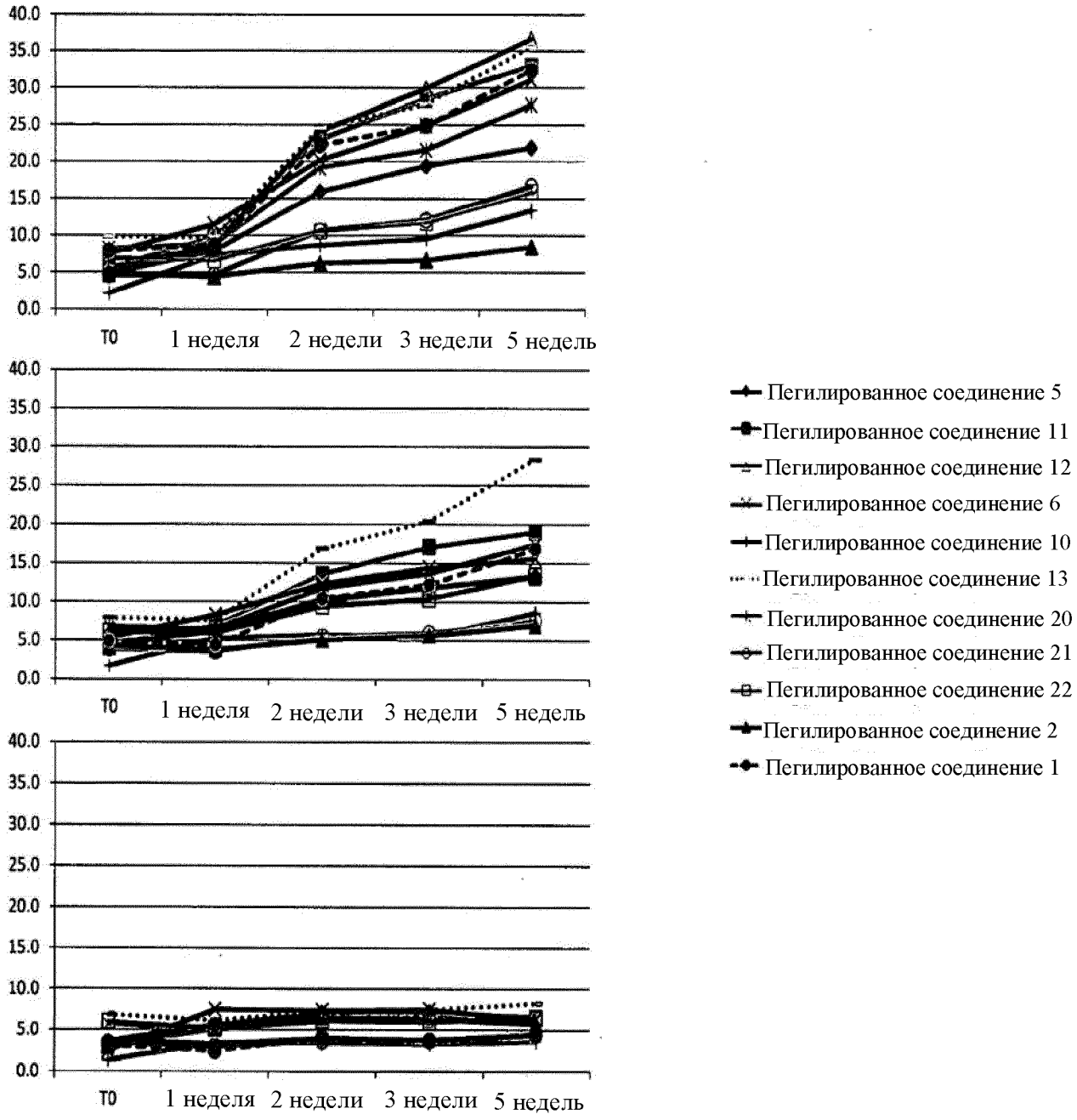
Формирование HMW при 40°C



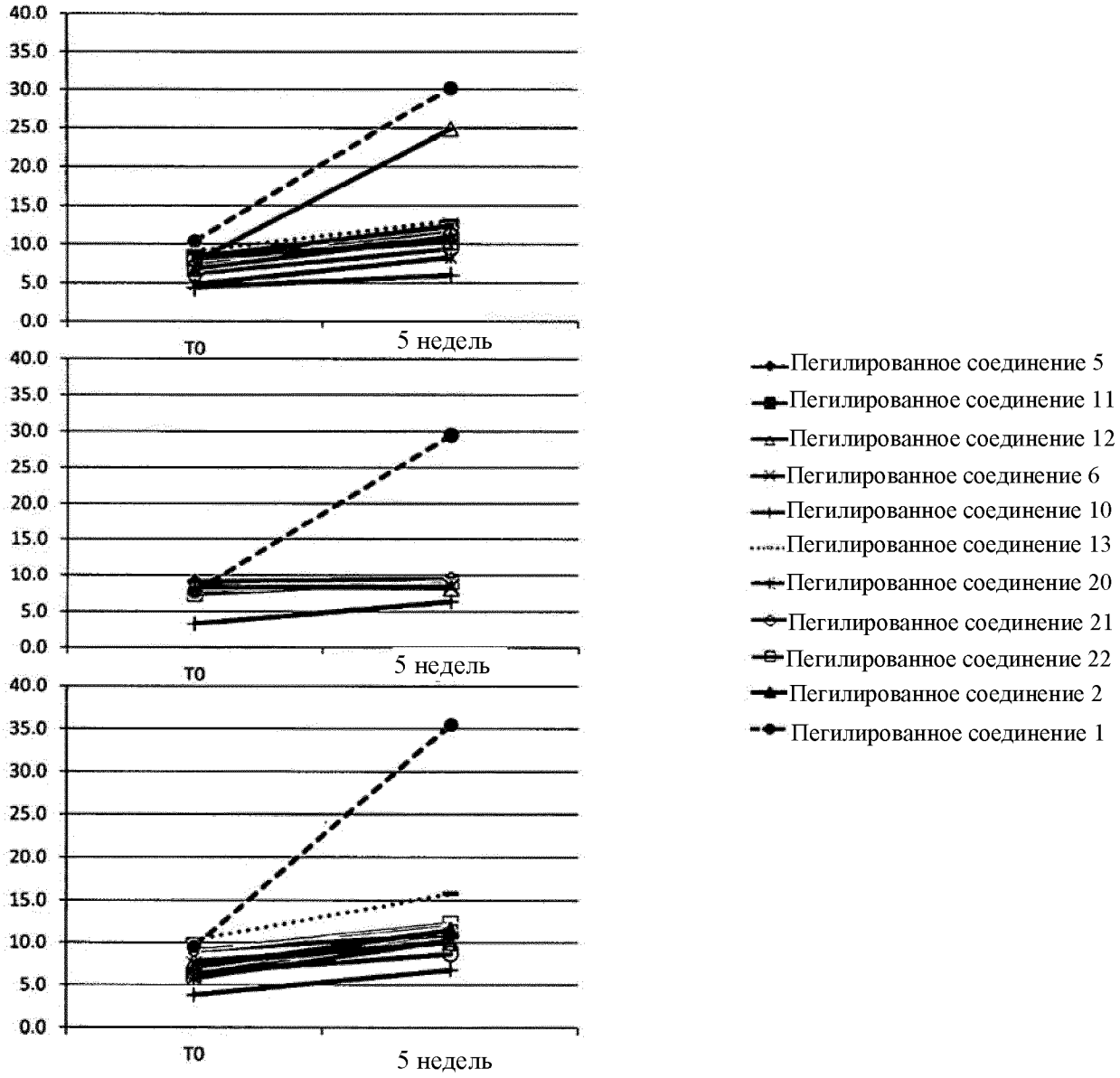
pH 7,0 буфер сахароза/гистидин

7,5 мг/мл белка

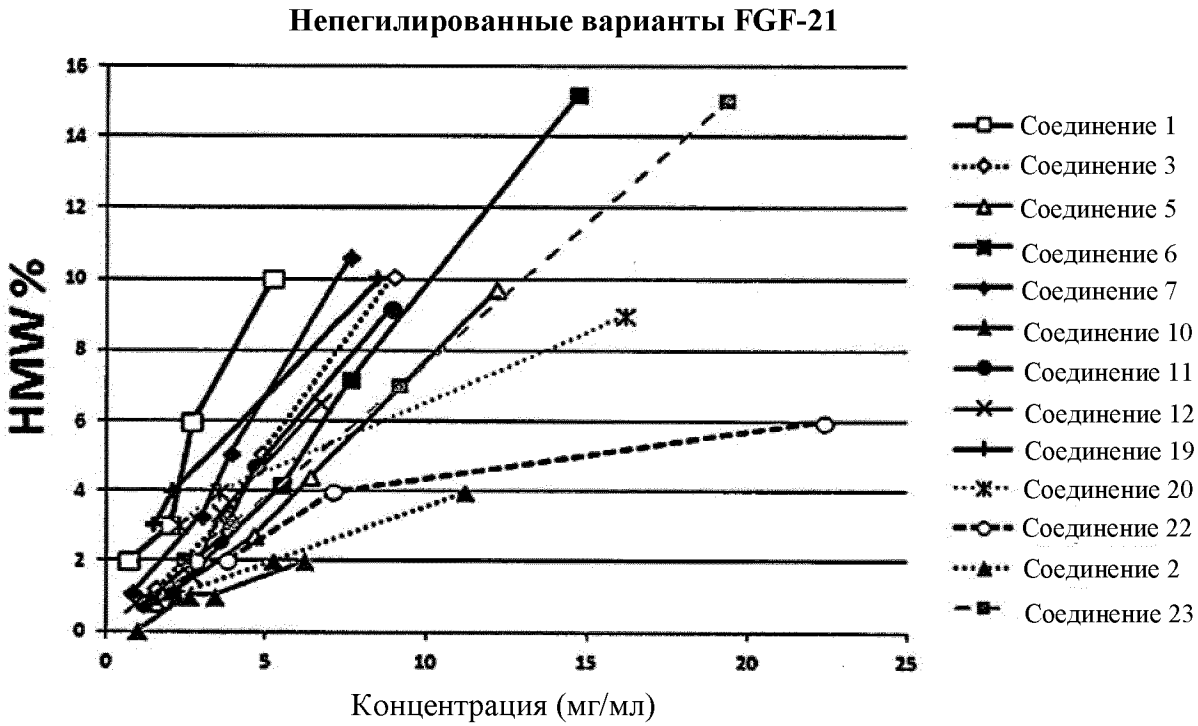
ФИГУРА 5


40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
T0
1 неделя
2 недели
3 недели
5 недель
Пегилированное соединение 5
Пегилированное соединение 11
Пегилированное соединение 12
Пегилированное соединение 6
Пегилированное соединение 10
Пегилированное соединение 13
Пегилированное соединение 20
Пегилированное соединение 21
Пегилированное соединение 22
Пегилированное соединение 2
Пегилированное соединение 1

ФИГУРА 6


40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
T0
5 недель
Пегилированное соединение 5
Пегилированное соединение 11
Пегилированное соединение 12
Пегилированное соединение 6
Пегилированное соединение 10
Пегилированное соединение 13
Пегилированное соединение 20
Пегилированное соединение 21
Пегилированное соединение 22
Пегилированное соединение 2
Пегилированное соединение 1

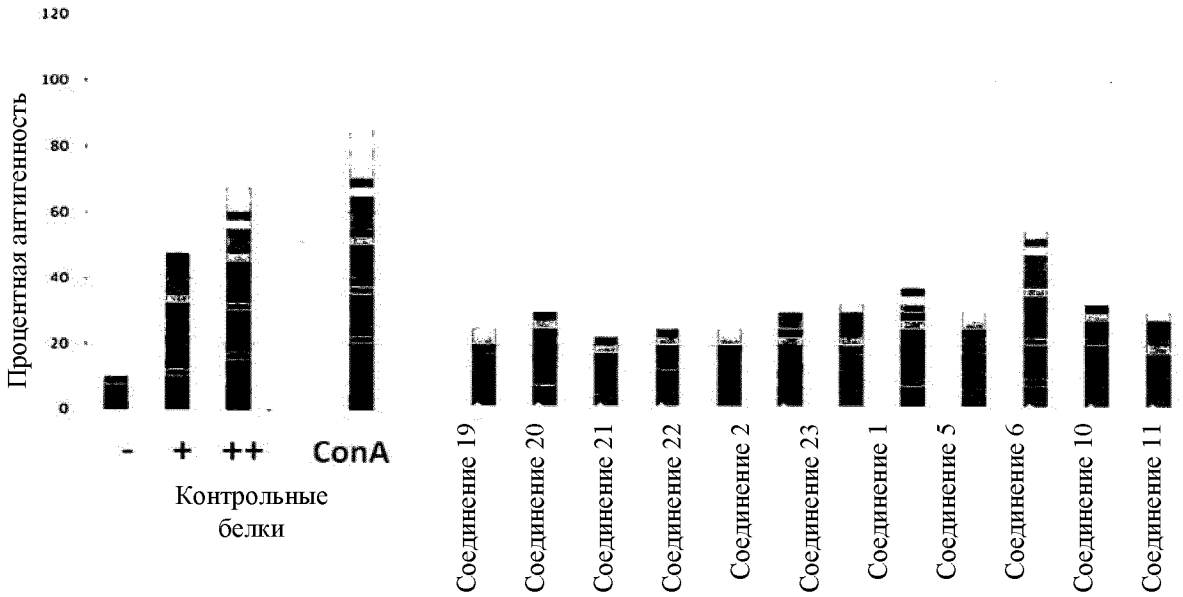
ФИГУРА 7


Непегилированные варианты FGF-21
HMW %
Концентрация (мг/мл)
Соединение 1
Соединение 3
Соединение 5
Соединение 6
Соединение 7
Соединение 10
Соединение 11
Соединение 12
Соединение 19
Соединение 20
Соединение 22
Соединение 2
Соединение 23

ФИГУРА 8

Результаты анализа пролиферации CD4+ (непегилированных) модифицированных полипептидов FGF-21

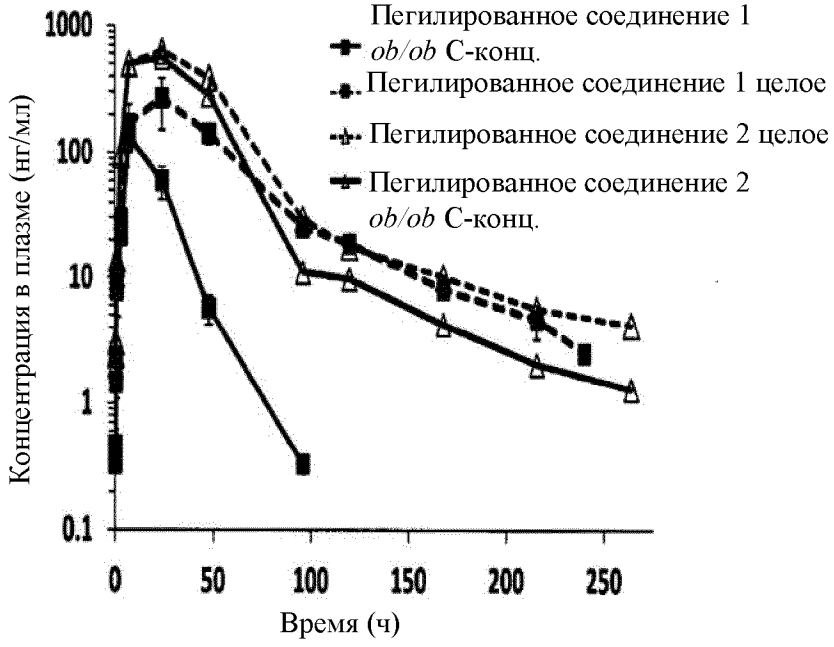
Распределение процентной антигенности по донорам



ФИГУРА 9

Усиленная in vivo (мыши *ob/ob)* эффективность отражает повышенное воздействие активного белка

SC PK у мышей *ob/ob* (0,05 mpk)



Параметры SC PK пегилированного соединения 1 у мышей *ob/ob*

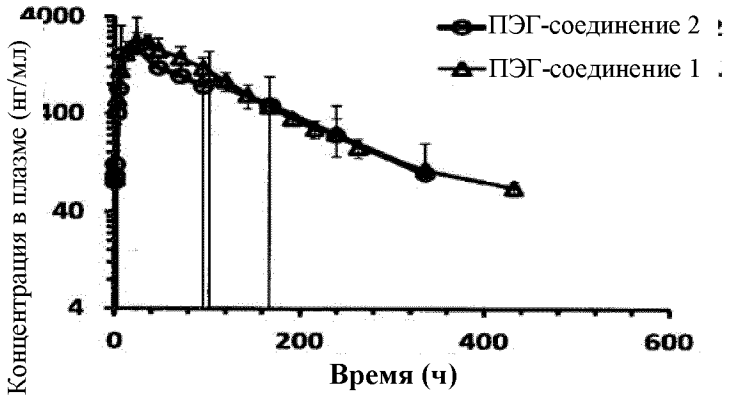
PK параметры	Единицы	С-конц. (активный)	Целый
Cmax	нг/мл	133	267.9
Tmax	ч	7	24
AUCtot	мкг/мл*ч	2.6	13.8
Отношение AUC	активный/ целый	0.18	

Параметры SC PK пегилированного соединения 2 у мышей *ob/ob*

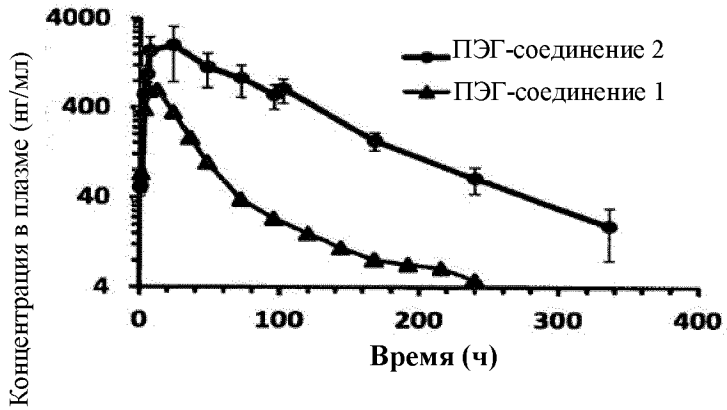
PK параметры	Единицы	С-конц. (активный)	Целый
Cmax	нг/мл	560.5	629
Tmax	ч	24	24
AUCtot	мкг/мл*ч	24.9	31.8
thalf	ч	46.1	51.7
Отношение AUC	активный/ целый	0.78	

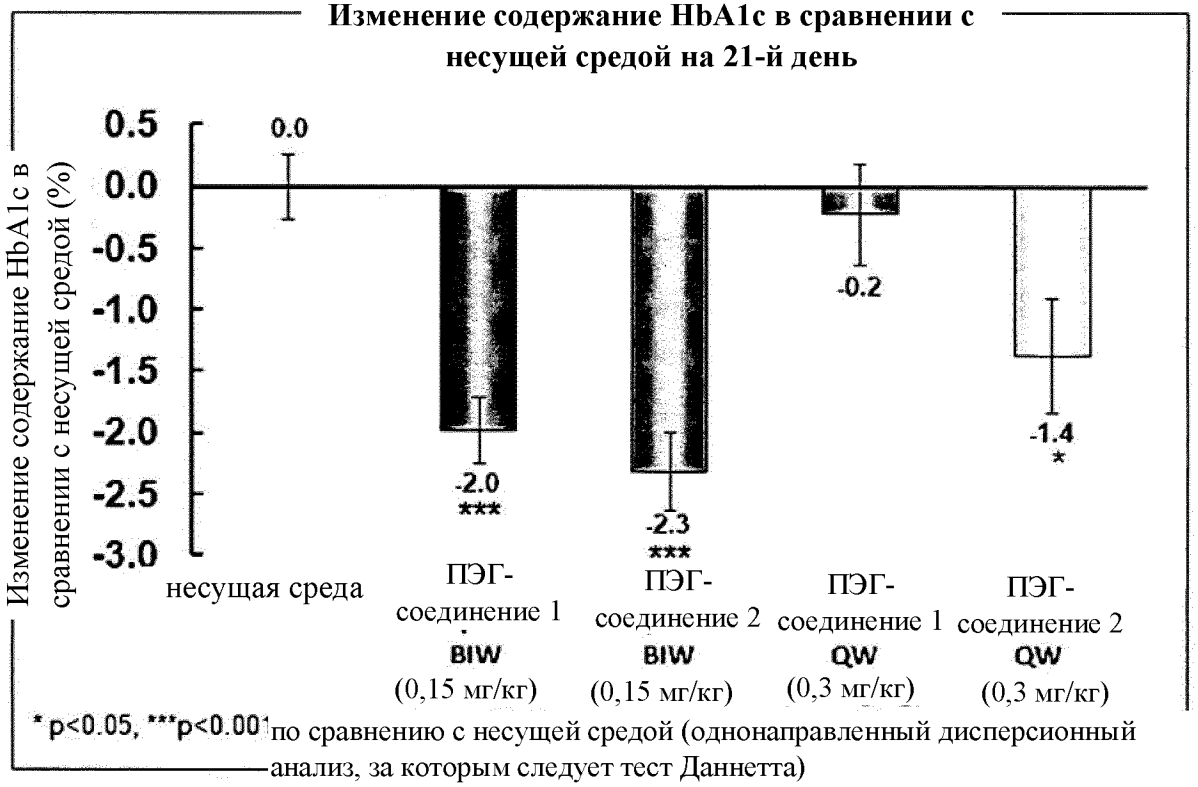
ФИГУРА 10

ФИГУРА 11А **РК целого белка**

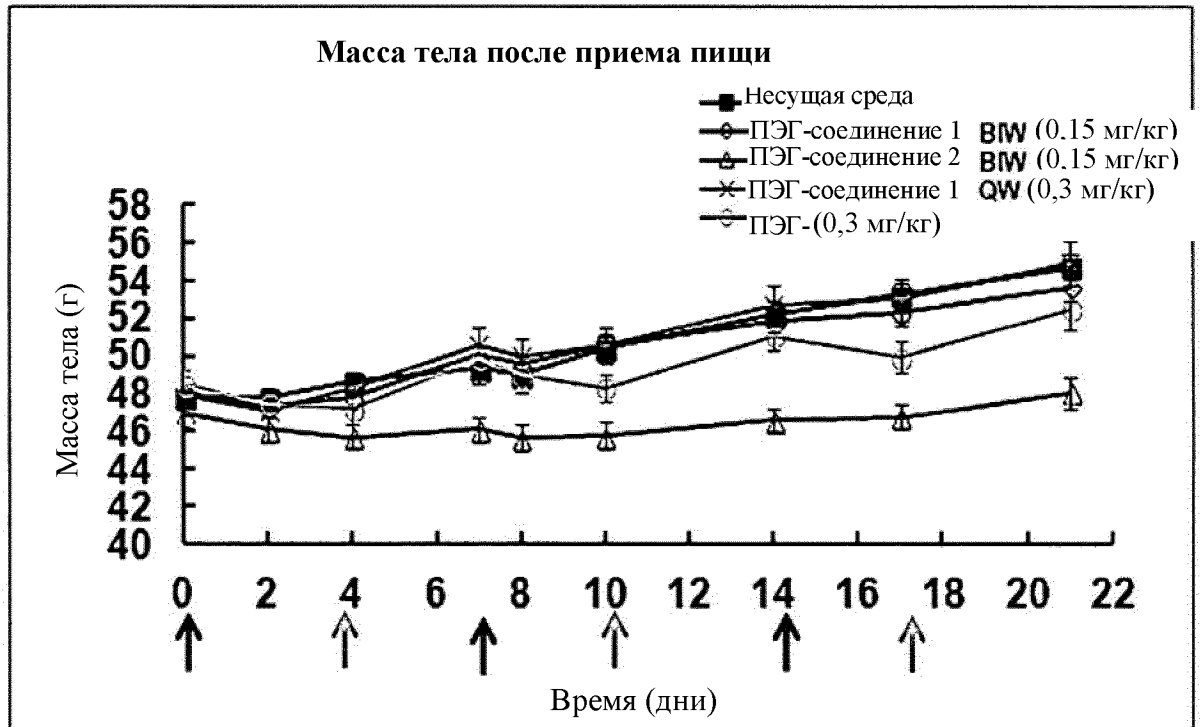


ФИГУРА 11В **РК С-интактного соединения**




Изменение содержание HbA1c в сравнении с несущей средой на 21-й день
Изменение содержание HbA1c в сравнении с несущей средой (%)
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
0.0
-2.0
***
-2.3
***
-0.2
-1.4
*
несущая среда
ПЭГ-соединение 1 BIW (0,15 мг/кг)
ПЭГ-соединение 2 BIW (0,15 мг/кг)
ПЭГ-соединение 1 QW (0,3 мг/кг)
ПЭГ-соединение 2 QW (0,3 мг/кг)
* p<0.05, ***p<0.001 по сравнению с несущей средой (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 12

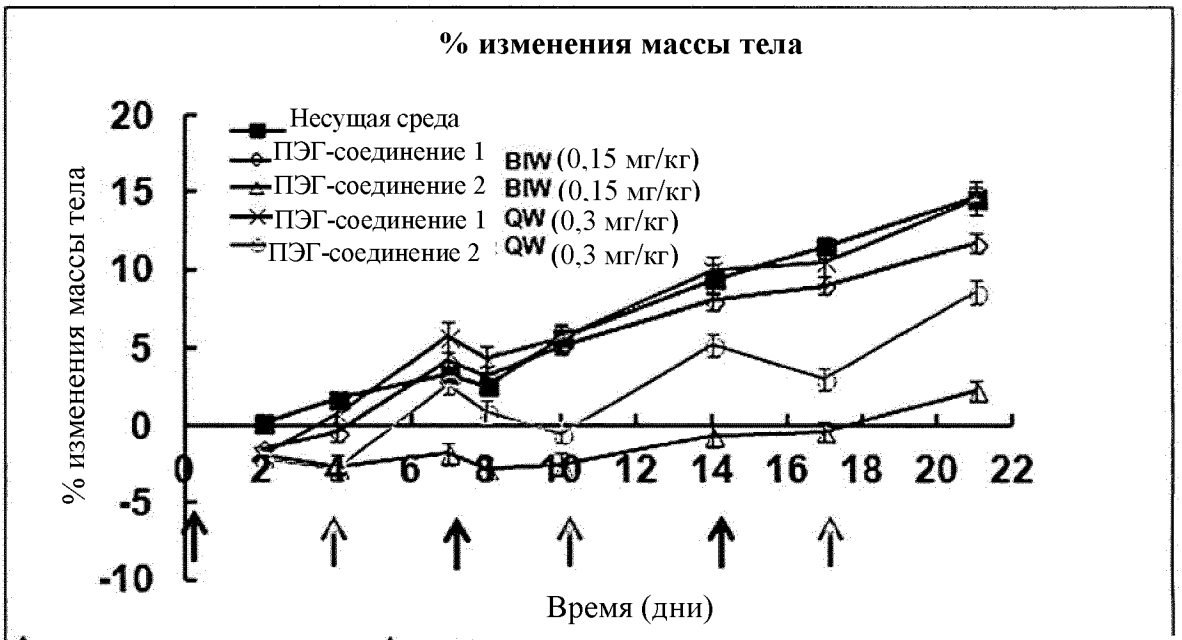


= в которые вводили соед. = BIW введение соединения во все остальные вводили несущую среду

P <0,01 Соединение 2 BIW по сравнению с несущей средой, дни 4 – 21 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

P <0,05 Соединение 2 QW по сравнению с несущей средой, день 17 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 13



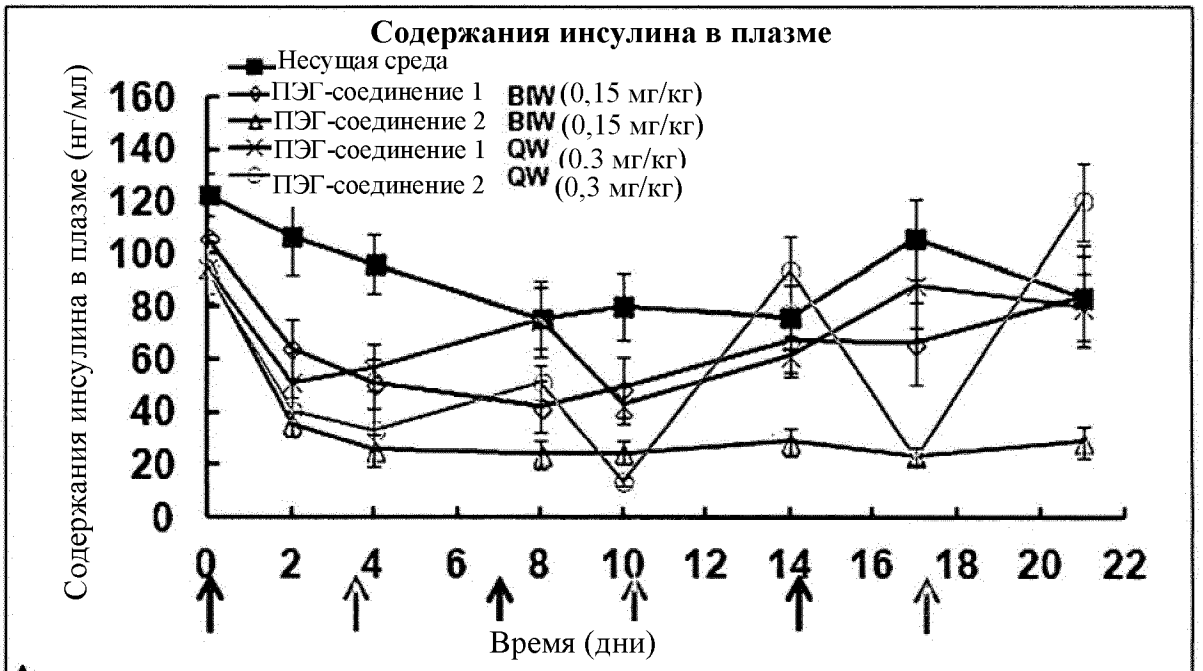
=в которые вводили соед. |; = BIW введение соединения во все остальные вводили несущую среду

P <0,01 Соединение 2 BIW по сравнению с несущей средой, дни 2 – 21 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

P <0,01 Соединение 2 QW по сравнению с несущей средой, дни 2 – 21, за исключением 7 дня (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

P <0,05 Соединение 1 BIW по сравнению с несущей средой, дни 2 – 4 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 14



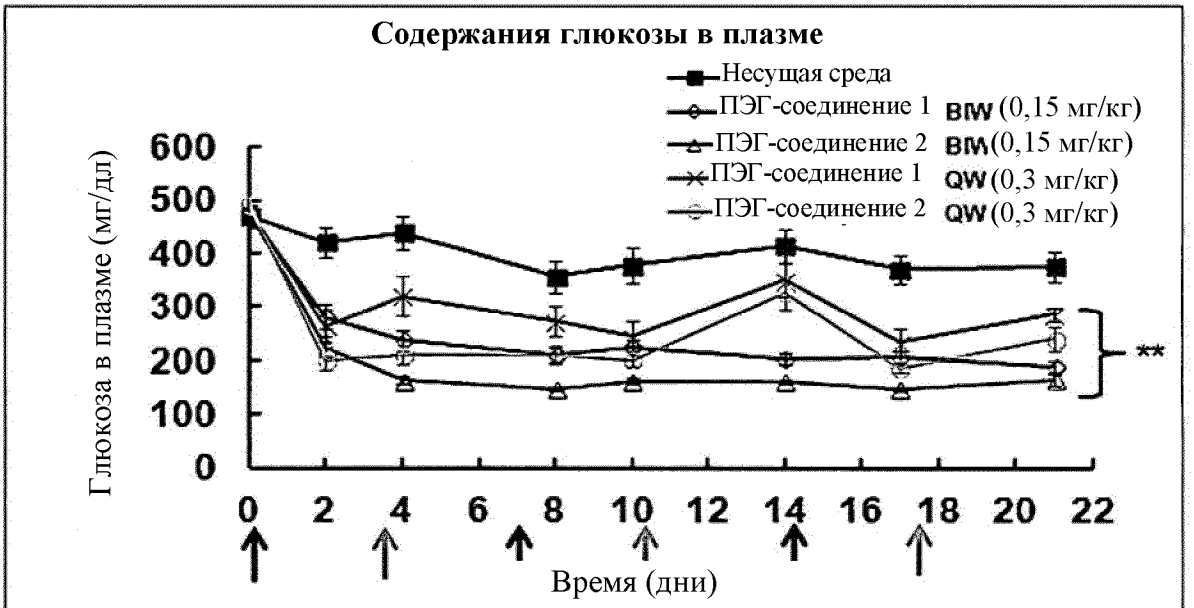
= в которые вводили соед. ; = BIW введение соединения во все остальные вводили несущую среду

P <0,01 все группы по сравнению с несущей средой, дни 2 и 4 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

P <0,01 Соединение 2 BIW по сравнению с несущей средой, дни 8, 10, 14, 17, 21 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

P <0,05 Соединение 2 QW по сравнению с несущей средой, дни 10, 17 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 15

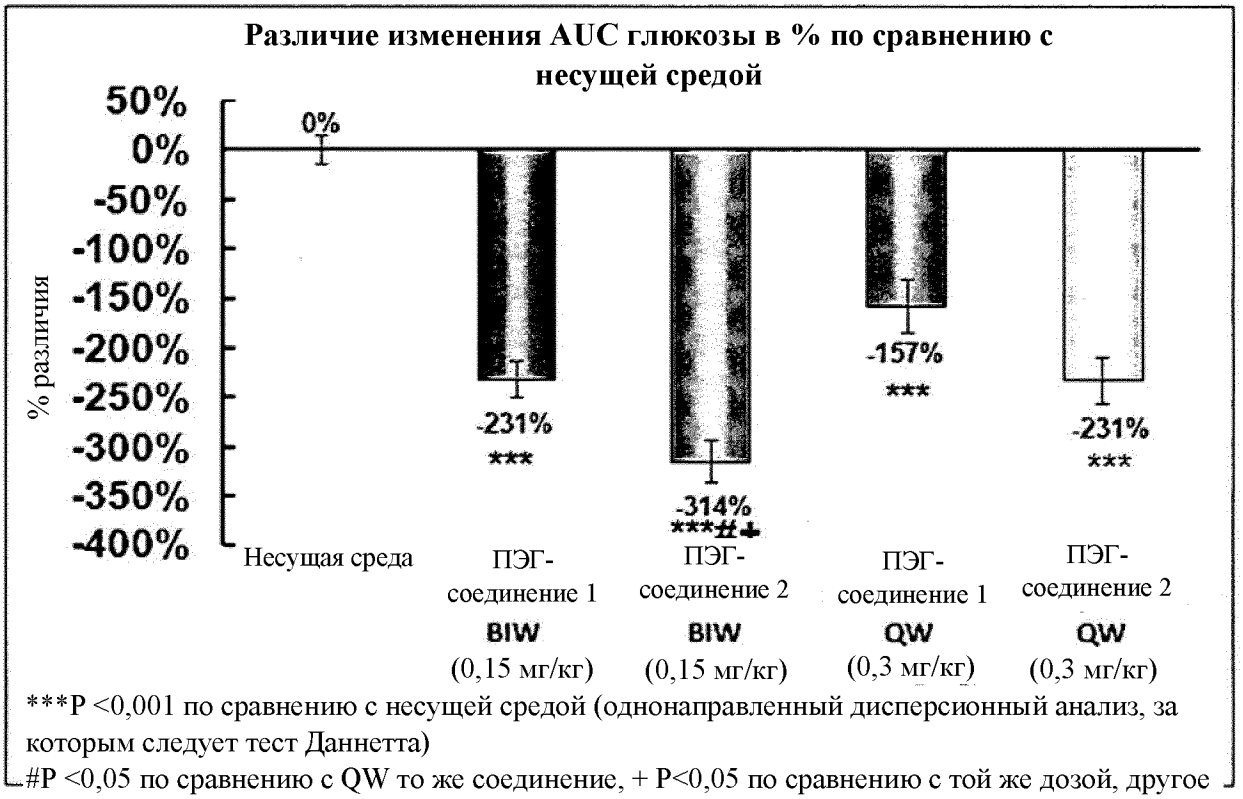


= в которые вводили соед. = BIW вводили соединение во все остальные вводили несущую среду

** Все группы P <0,01 все группы по сравнению с несущей средой, дни 2 - 21 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта), за исключением QW доз на 14 день, где 604 P <0,05 и 036 не значимый.

P <0,05 BIW по сравнению с QW дни 14 и 21, то же соединение (тест Тьюки-Крамера)

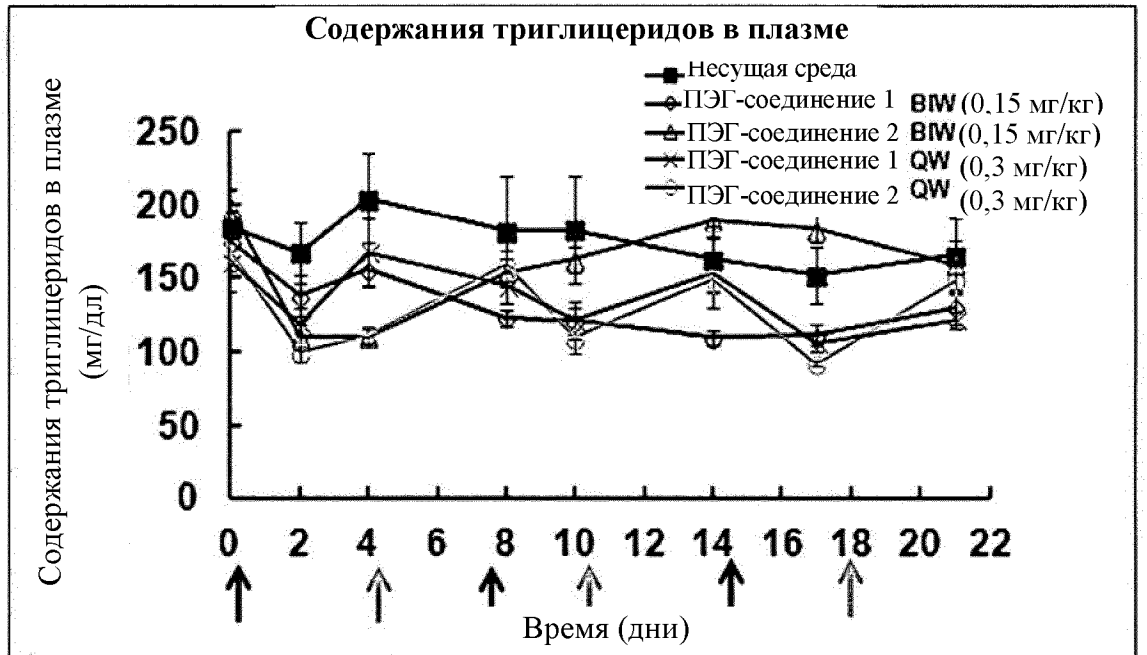
ФИГУРА 16



***P <0,001 по сравнению с несущей средой (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

#P <0,05 по сравнению с QW то же соединение, + P<0,05 по сравнению с той же дозой, другое соединение (тест Тьюки-Крамера)

ФИГУРА 17



= в которые вводили соед. ; = BIW вводили соединение 1 во все остальные вводили несущую среду

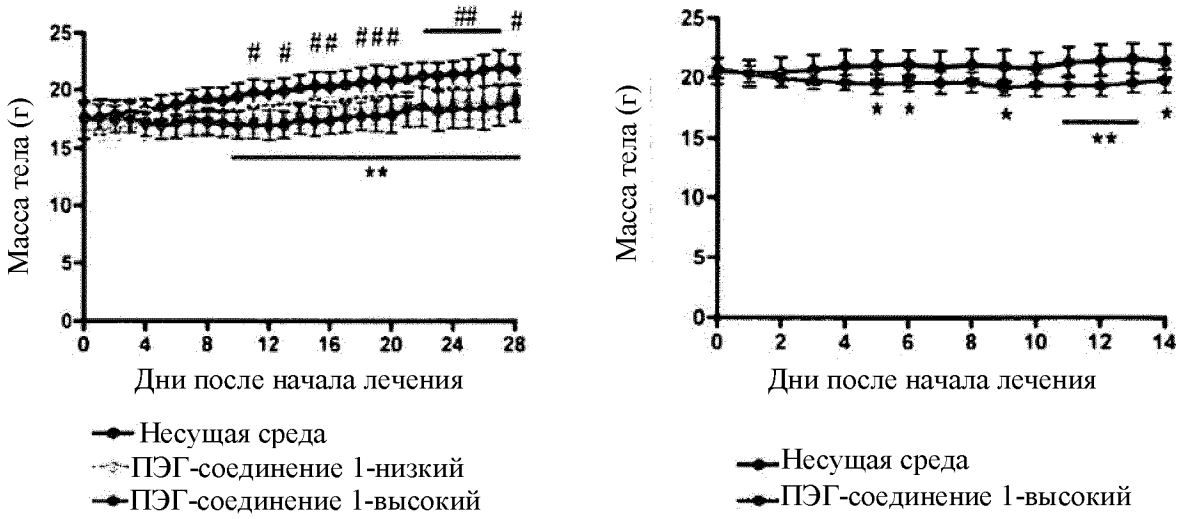
P<0,01 Соединение 2 BIW по сравнению с несущей средой, дни 2 и 4 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

P<0,01 Соединение 2 QW по сравнению с несущей средой, дни 2, 4, 10 и 17 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

P<0,05 Соединение 1 QW по сравнению с несущей средой, дни 2, 17 (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 18

ФИГУРА 19 Изменения массы тела

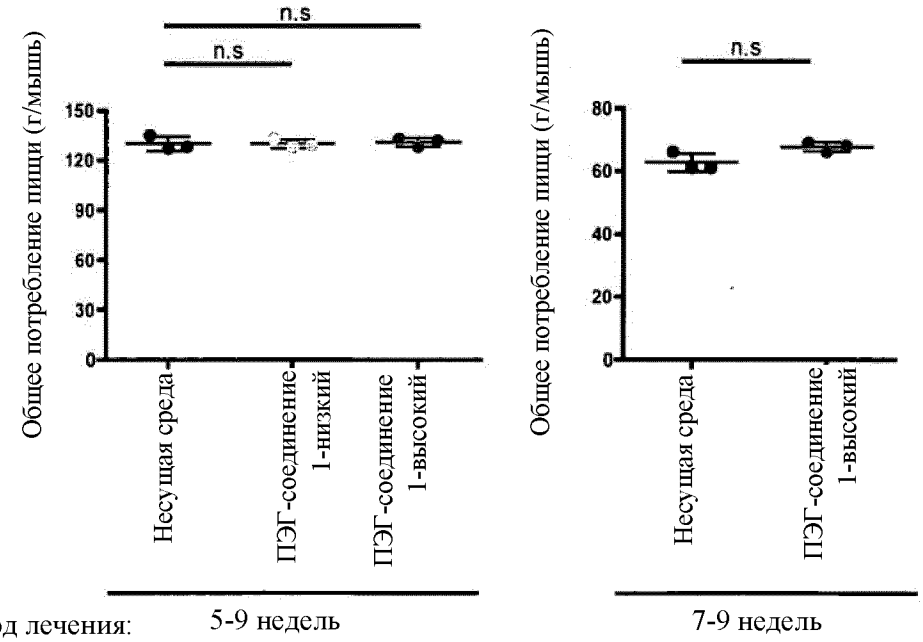


Несущая среда по сравнению с ПЭГ-соединением 1-низкий
#: P<0.05, ##: P<0.01

Несущая среда по сравнению с ПЭГ-соединением 1-высокий
*: P<0.05, **: P<0.01

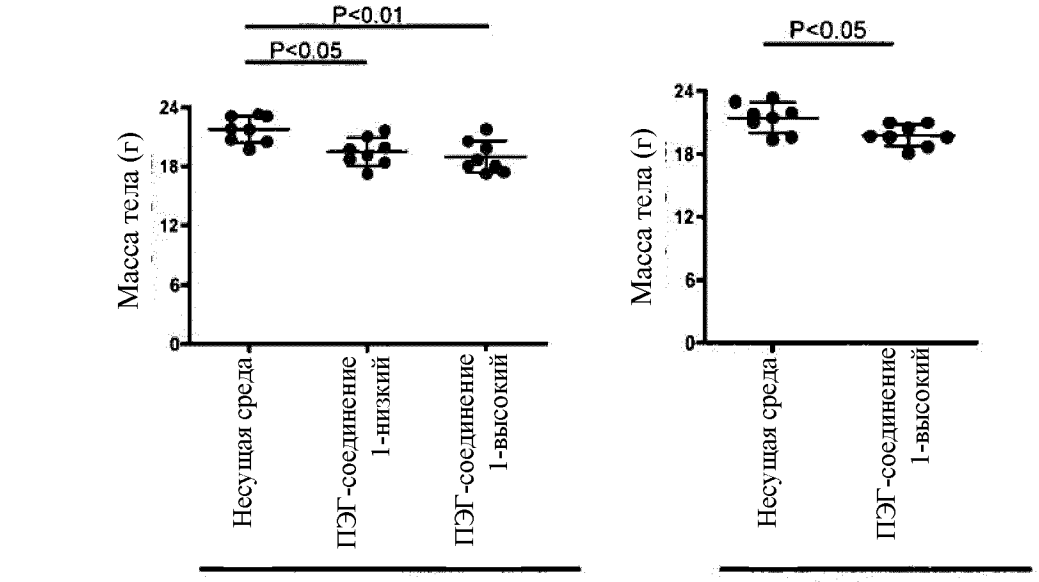
Несущая среда по сравнению с ПЭГ-соединением 1-высокий
**: P<0.01

ФИГУРА 20 Общее потребление пищи

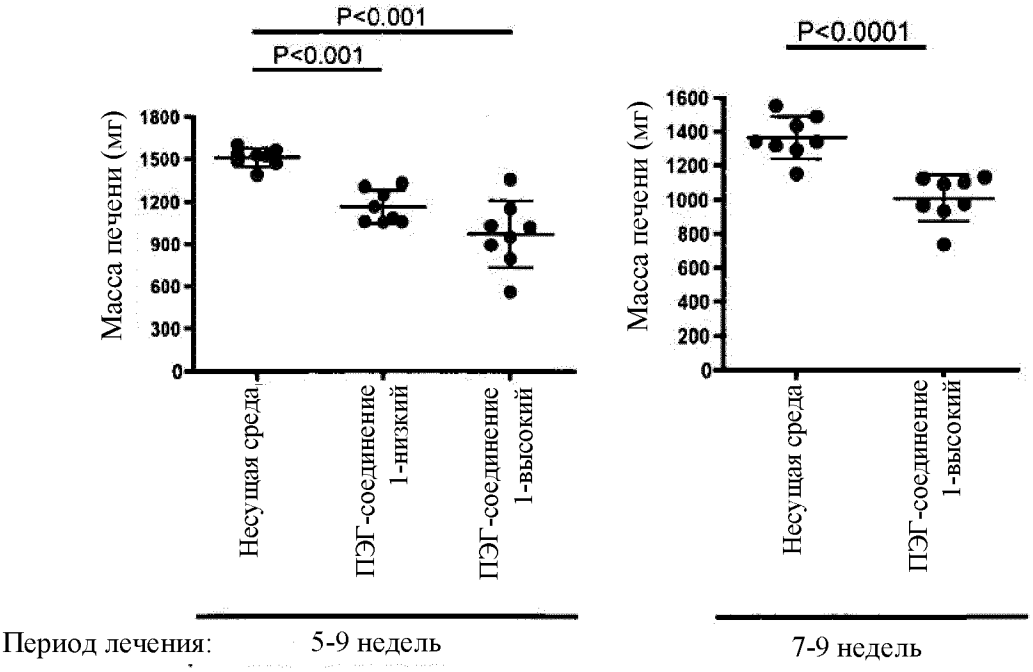


Период лечения: 5-9 недель 7-9 недель

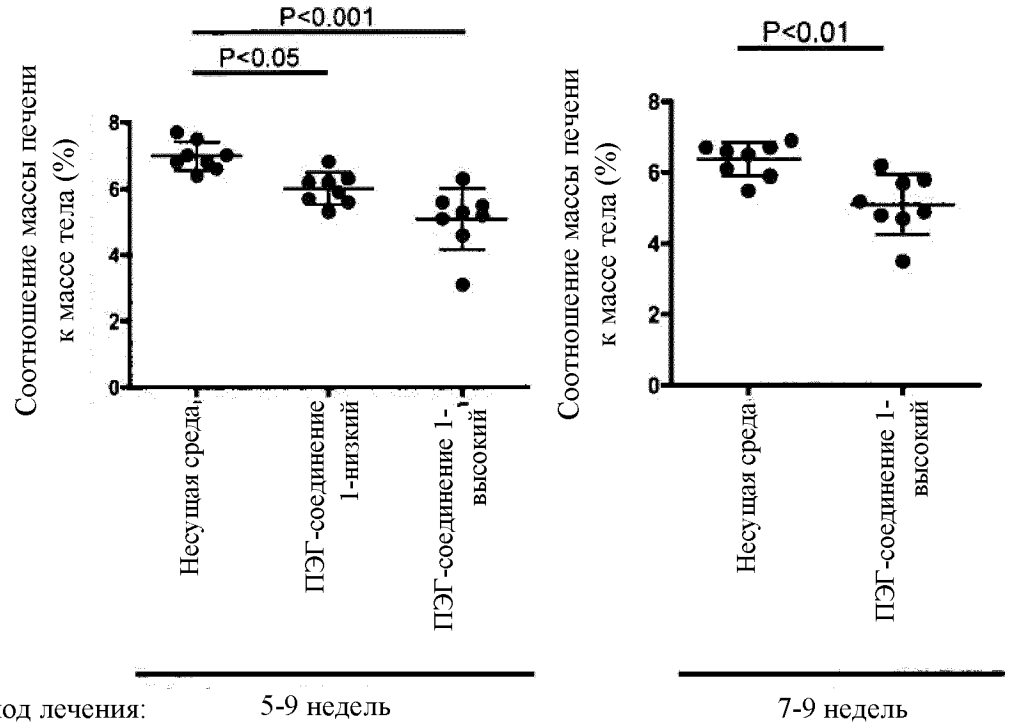
ФИГУРА 21 **Масса тела**



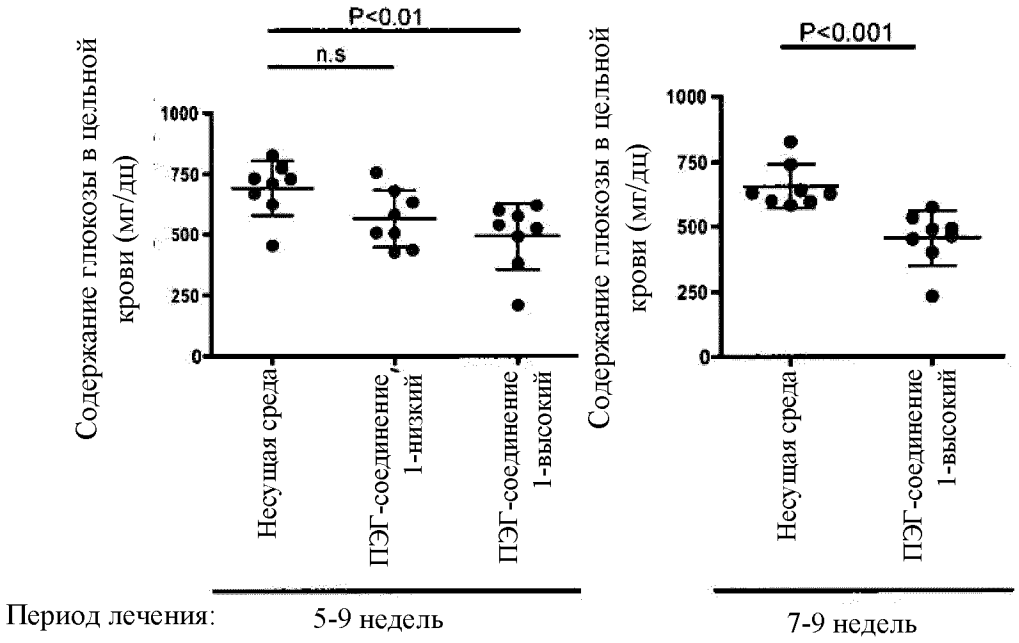
ФИГУРА 22 **Масса печени**



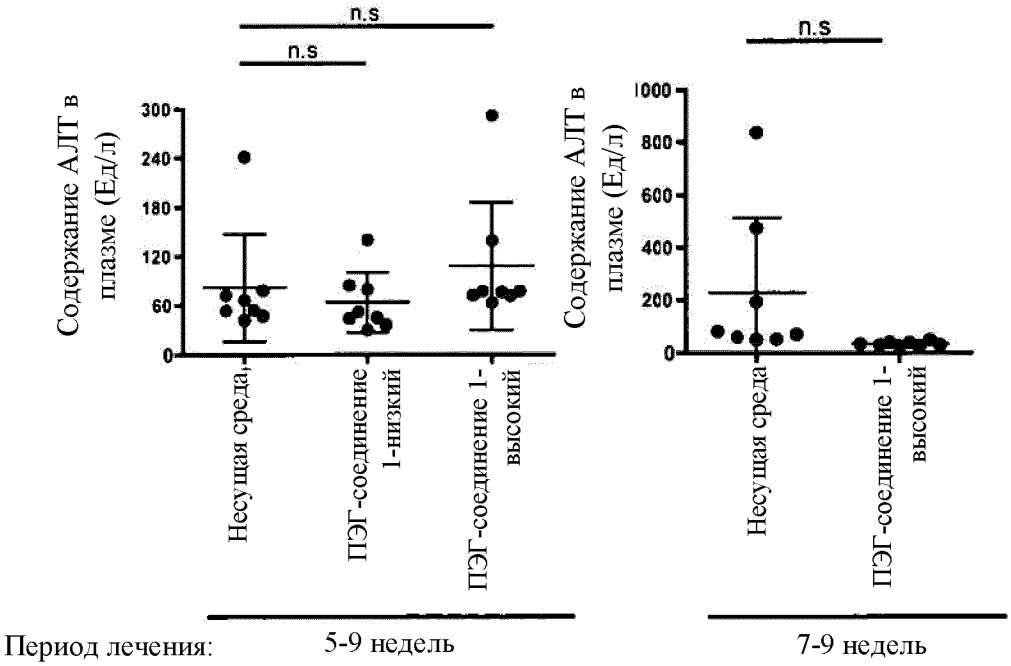
ФИГУРА 23 **Соотношение массы печени к массе тела**



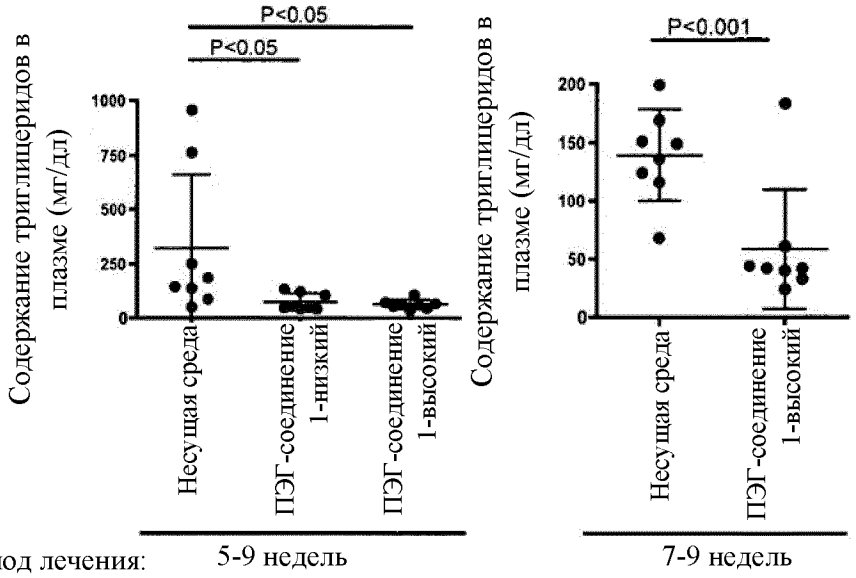
ФИГУРА 24 **Содержание глюкозы в цельной крови**



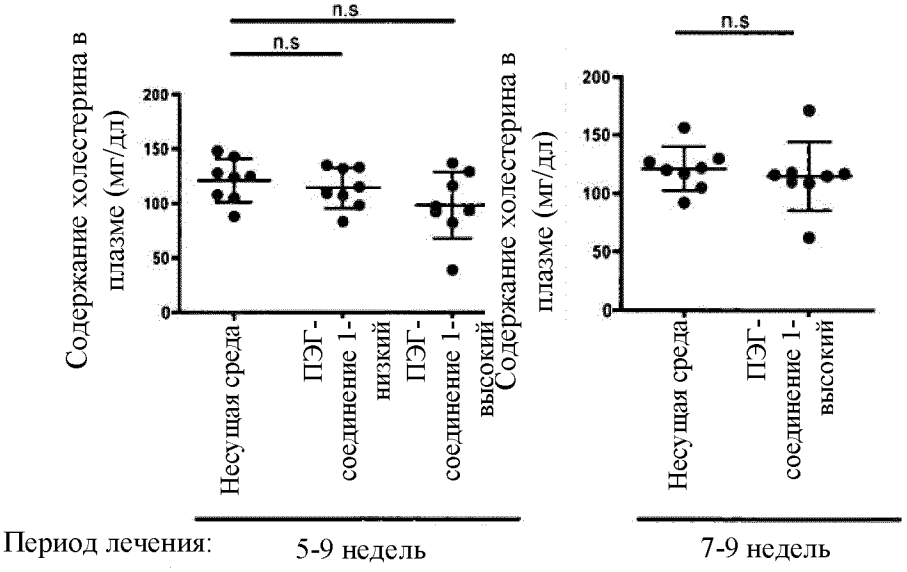
ФИГУРА 25 **Содержание АЛТ в плазме**



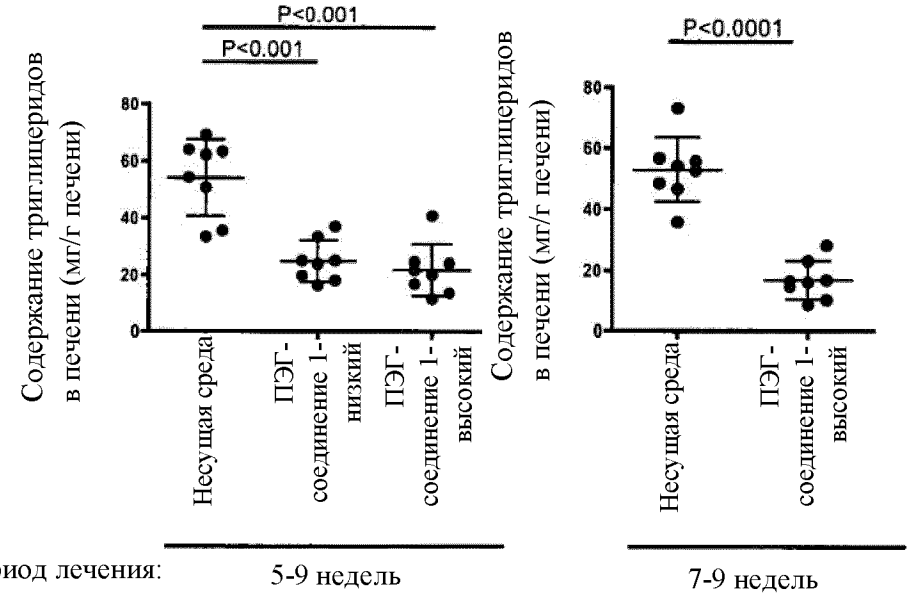
ФИГУРА 26 **Содержание триглицеридов в плазме**



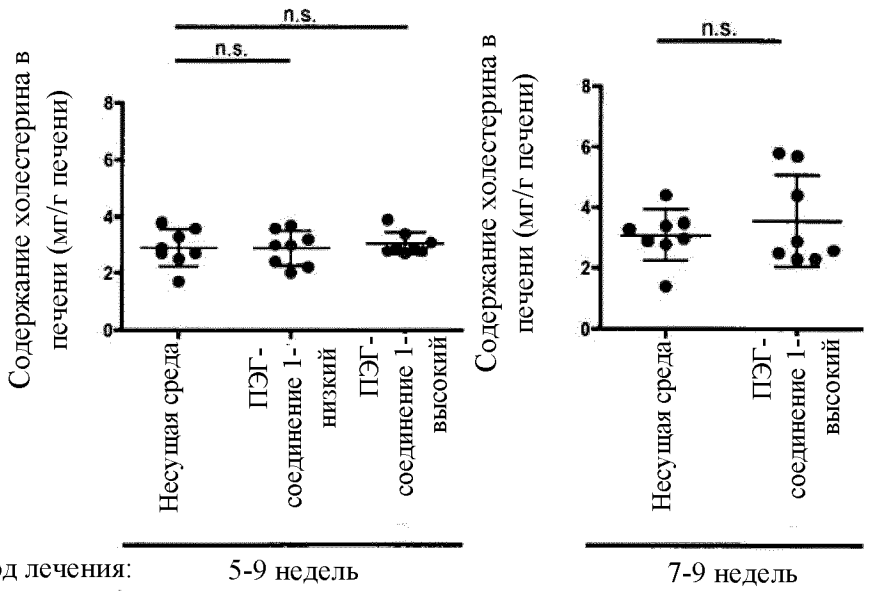
ФИГУРА 27 **Содержание холестерина в плазме**



ФИГУРА 28 **Содержание триглицеридов в печени**

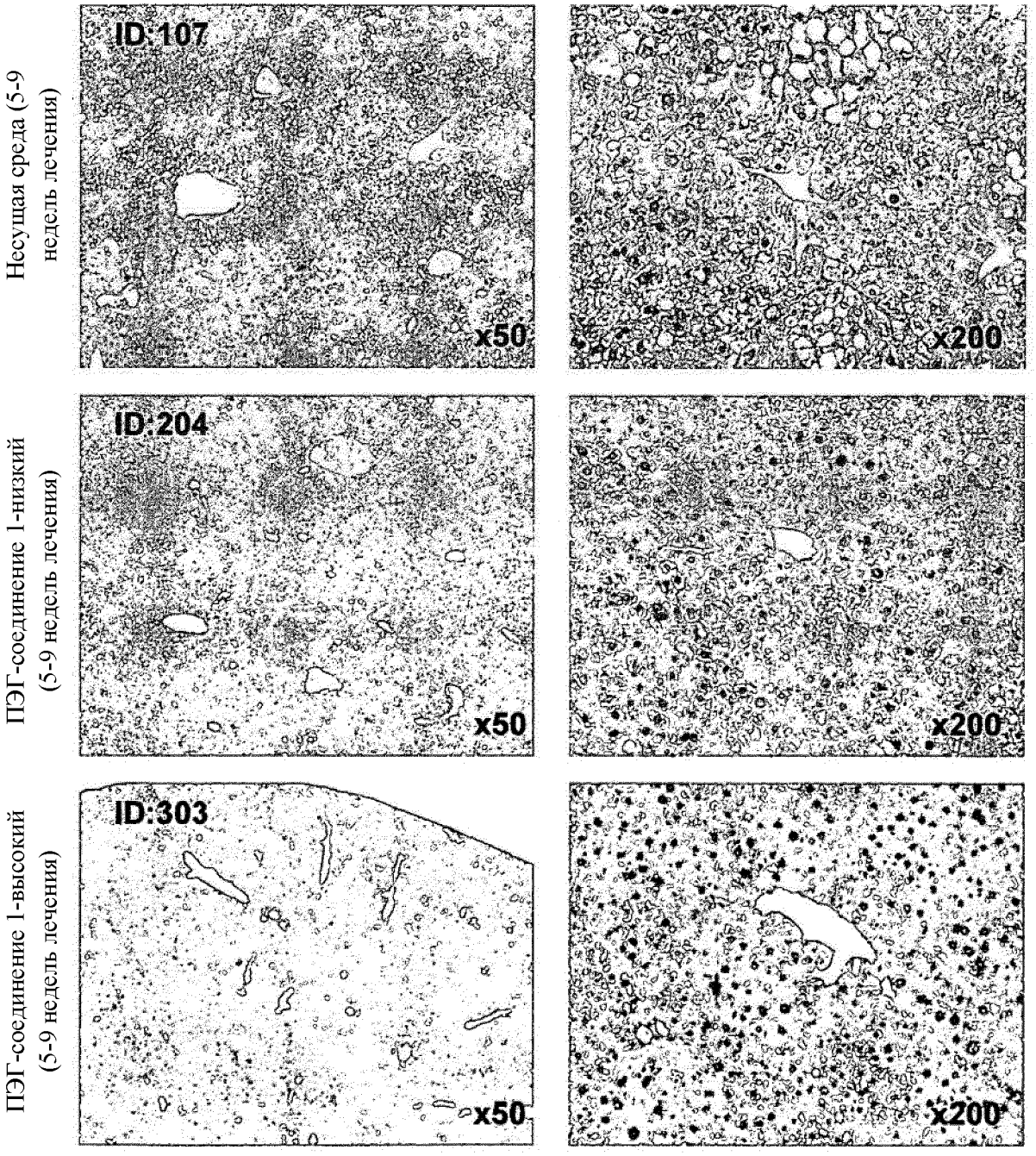


ФИГУРА 29 **Содержание холестерина в печени**



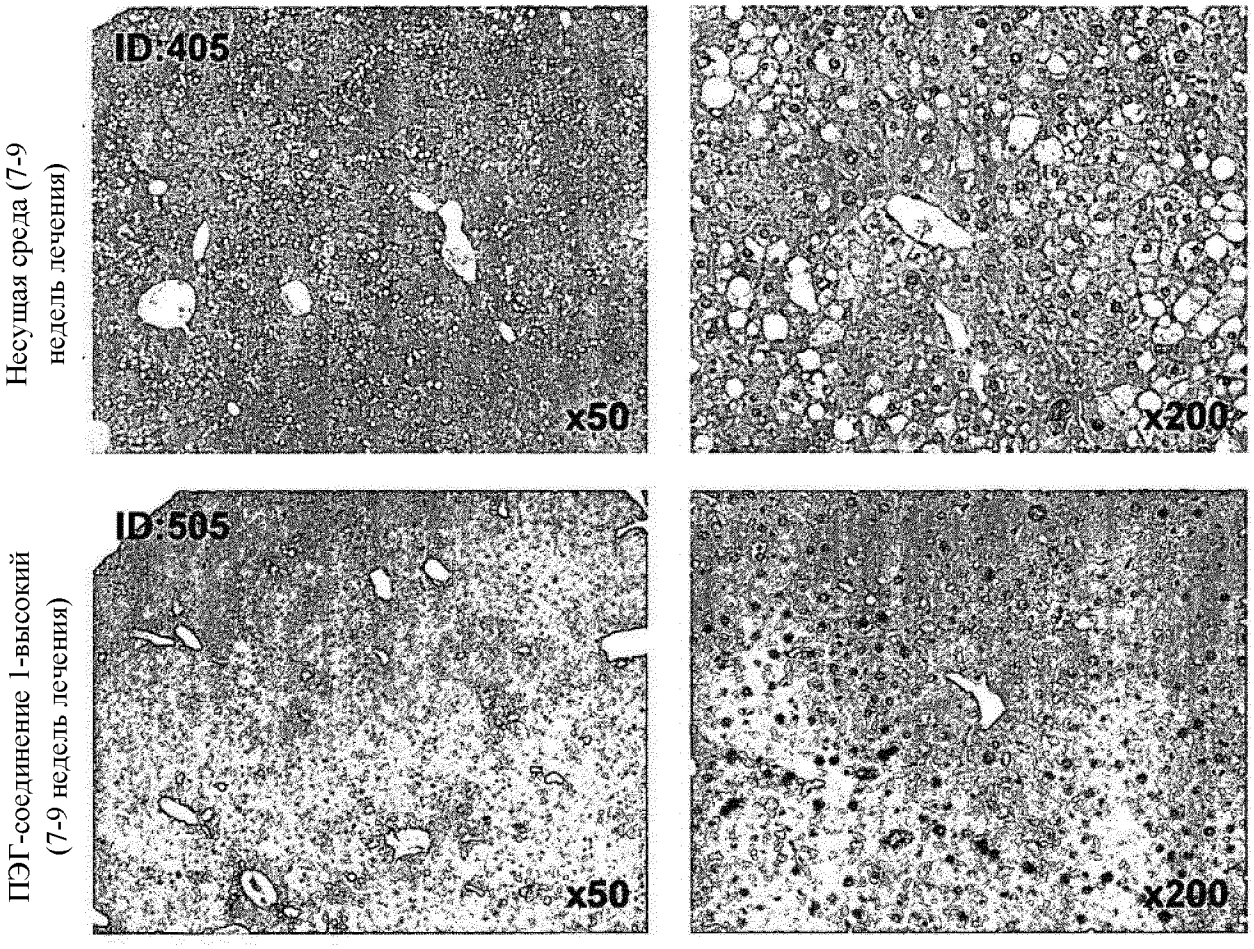
ФИГУРА 30А

Репрезентативные микрофотографии окрашенных НЕ срезов печени

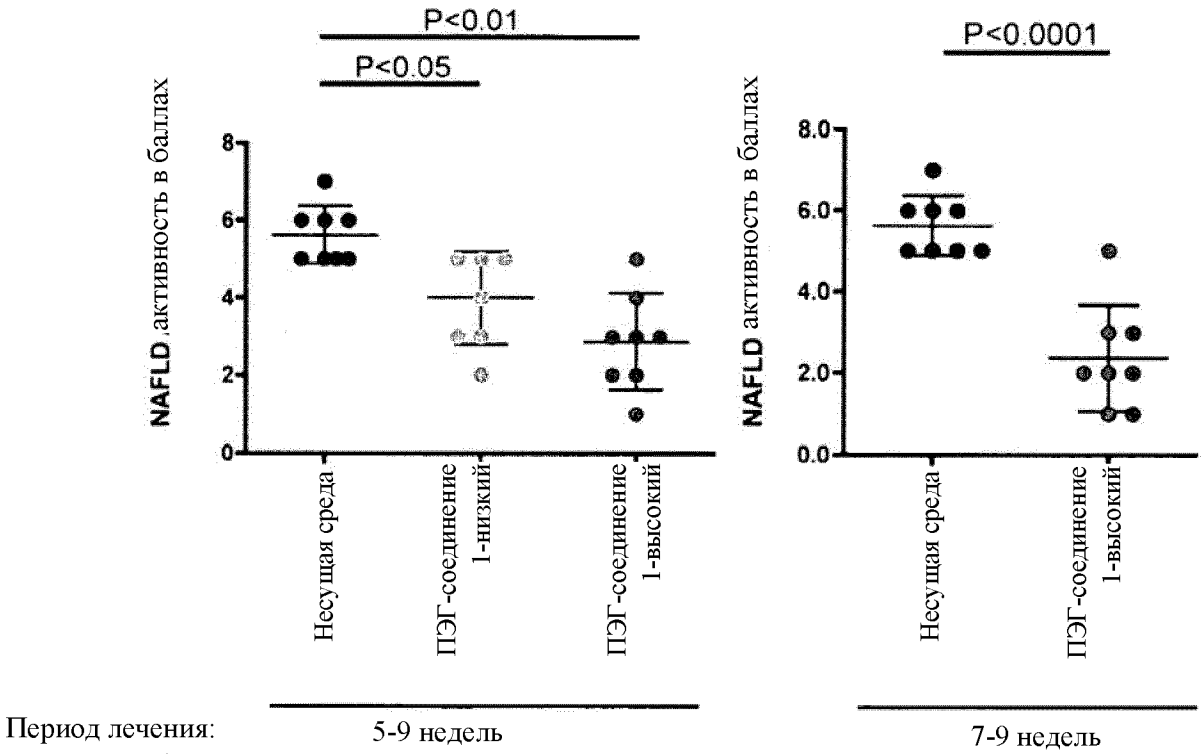


ФИГУРА 30B

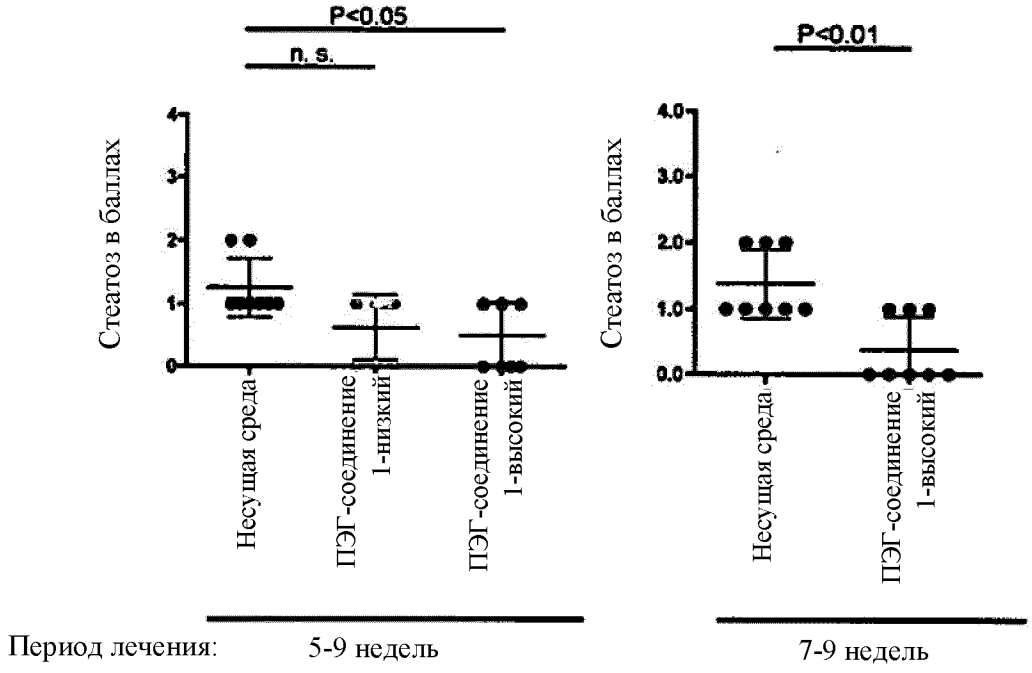
Репрезентативные микрофотографии окрашенных HE срезов печени (продолжение)



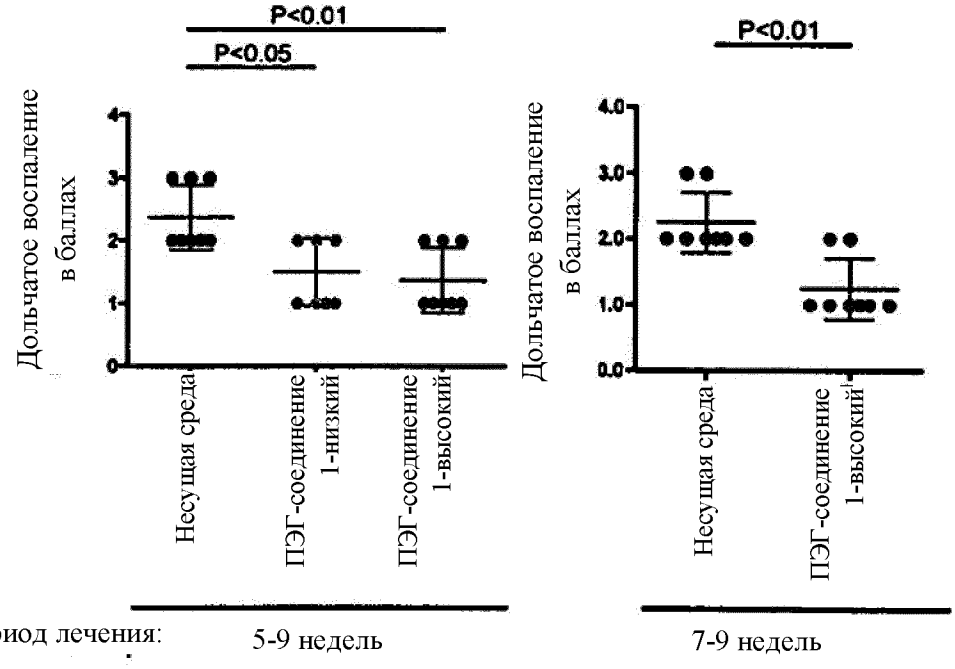
ФИГУРА 31 NAFLD **активность в баллах**



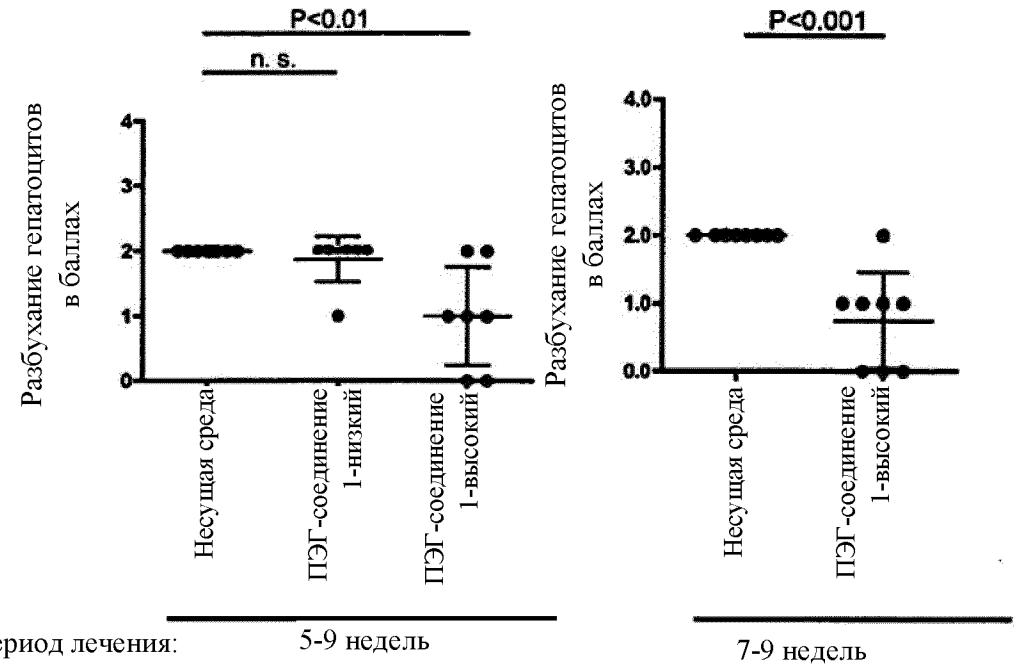
ФИГУРА 32A **Стеатоз в баллах**



ФИГУРА 32B **Дольчатое воспаление в баллах**

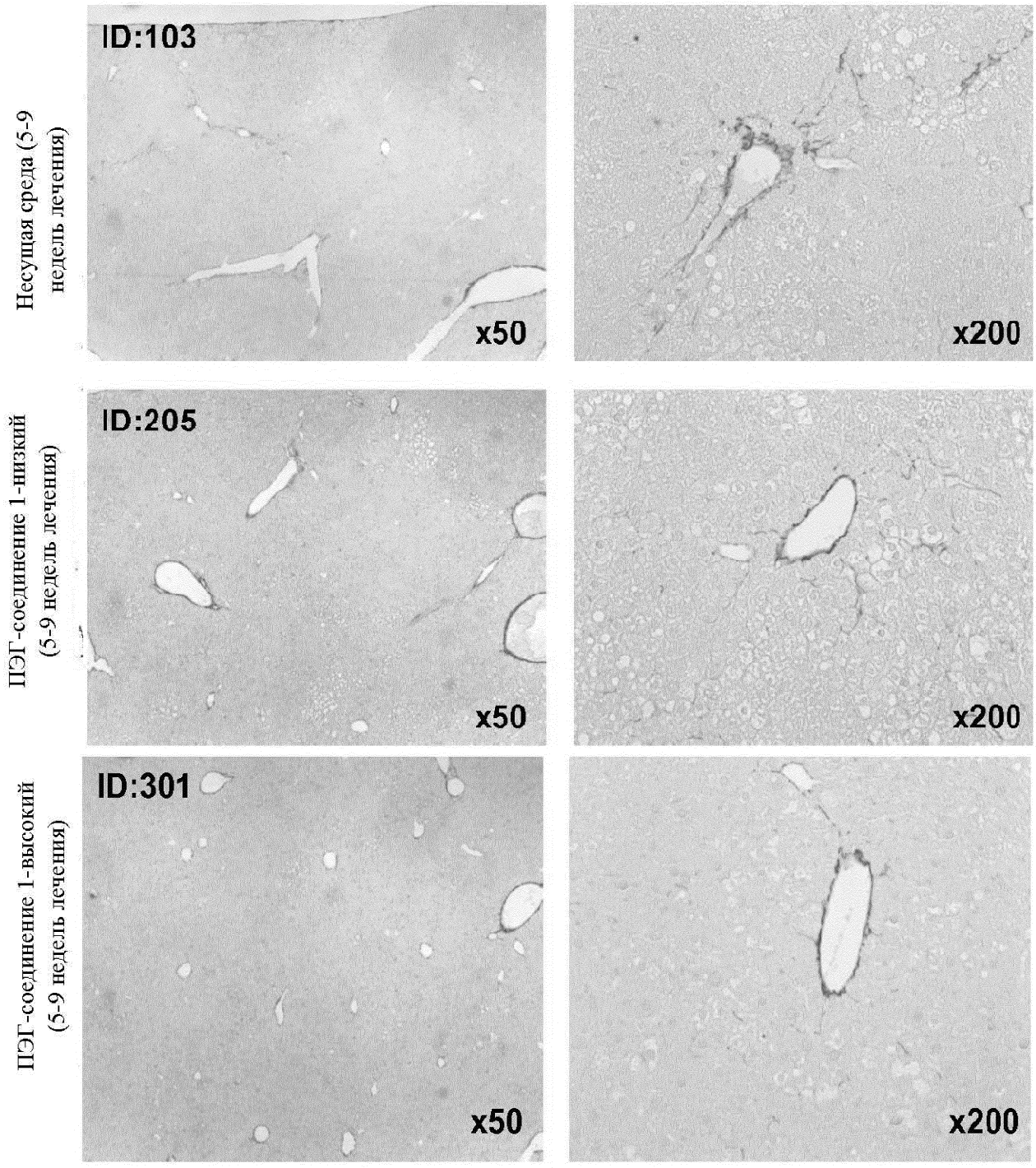


ФИГУРА 32С **Разбухание гепатоцитов в баллах**



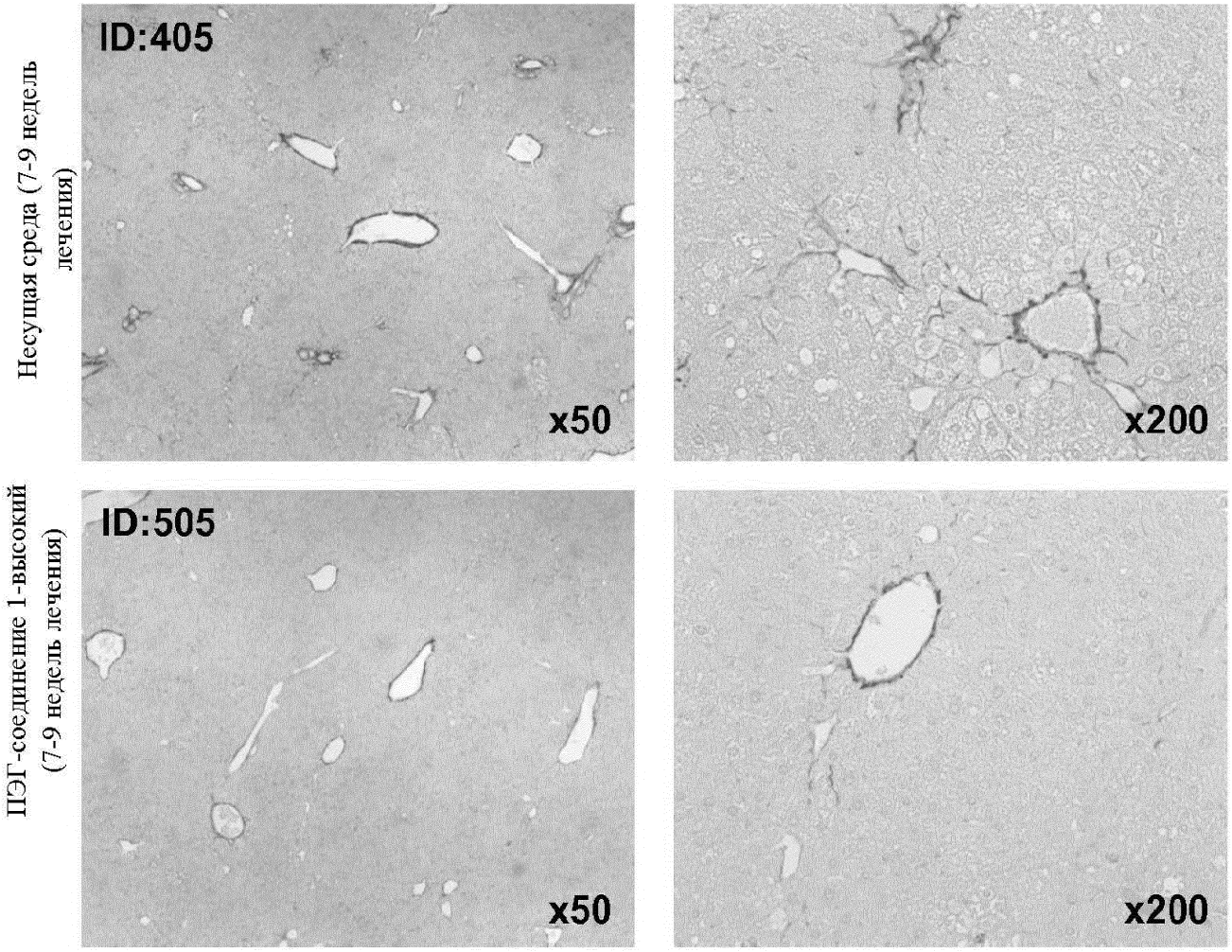
ФИГУРА 33А

Репрезентативные микрофотографии окрашенных сириусом красным срезов печени

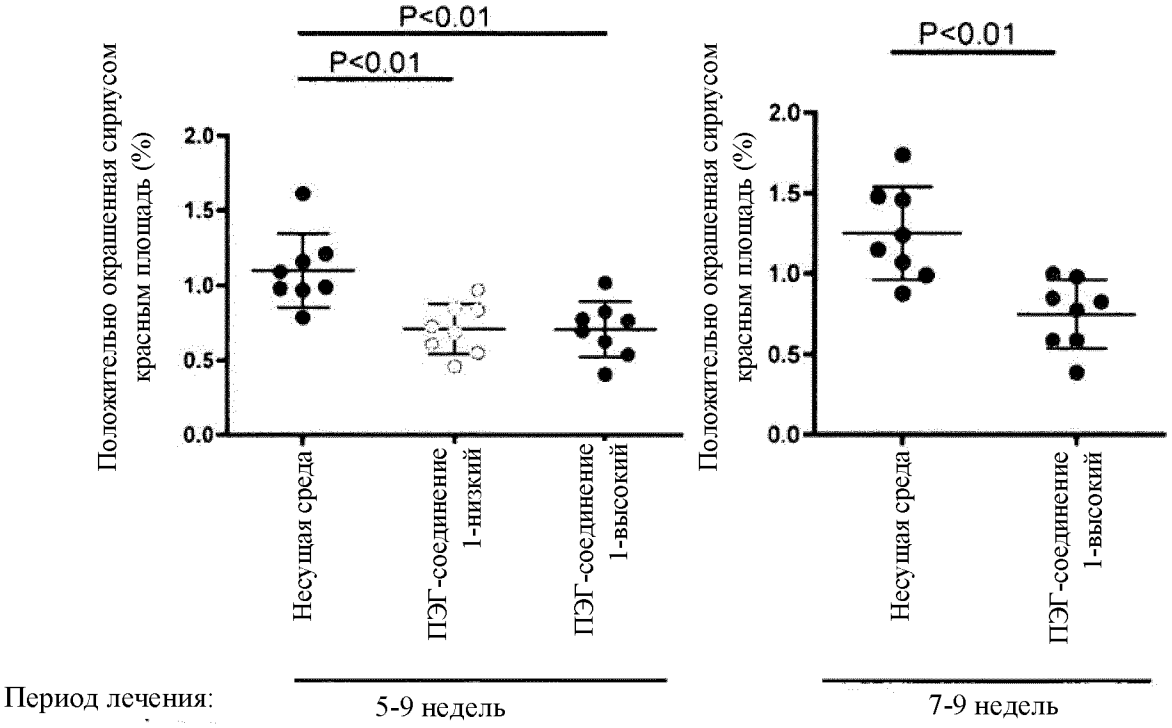


ФИГУРА 33В

Репрезентативные микрофотографии окрашенных сириусом красным срезов печени (продолжение)

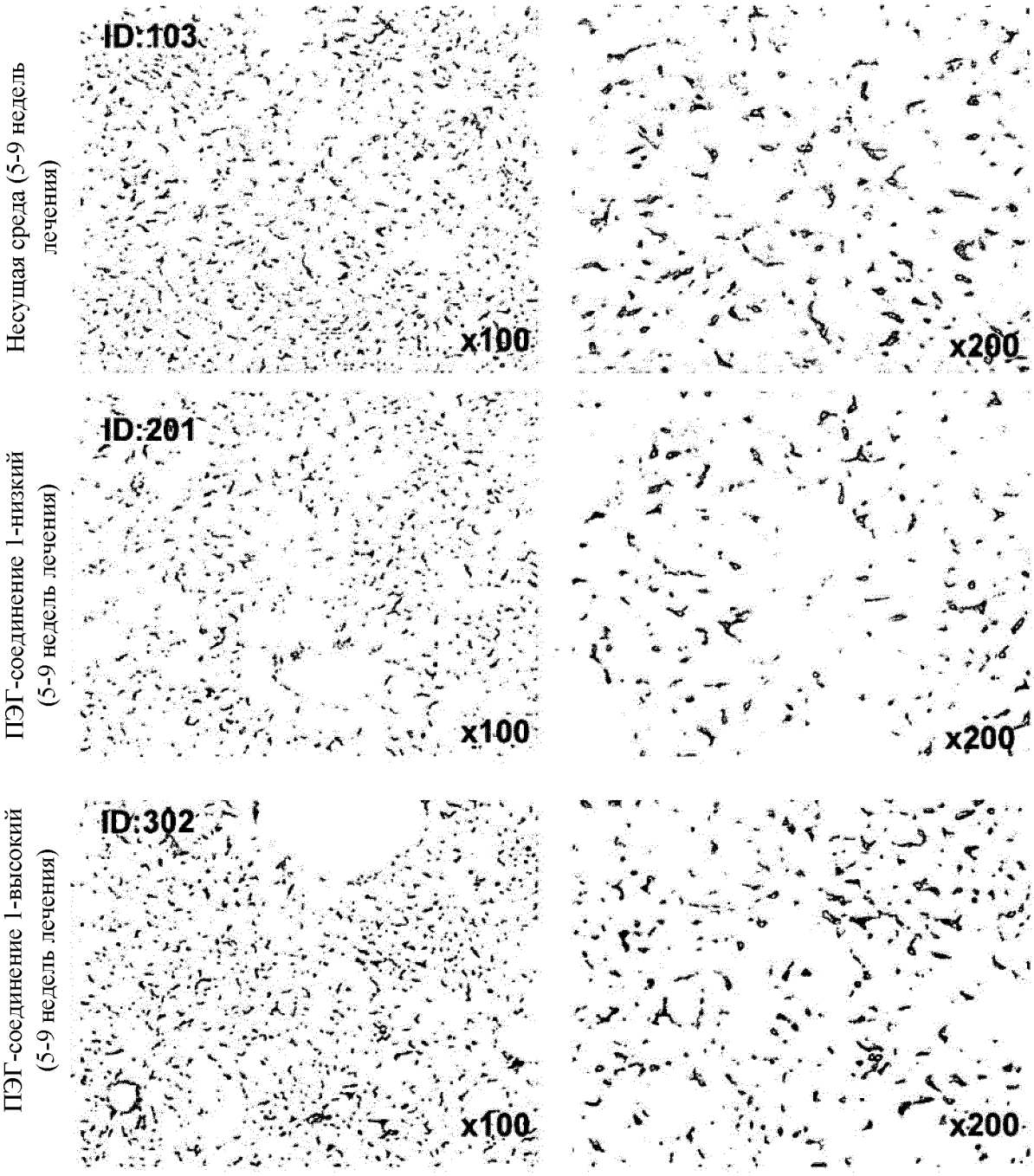


ФИГУРА 34 Площадь фиброза



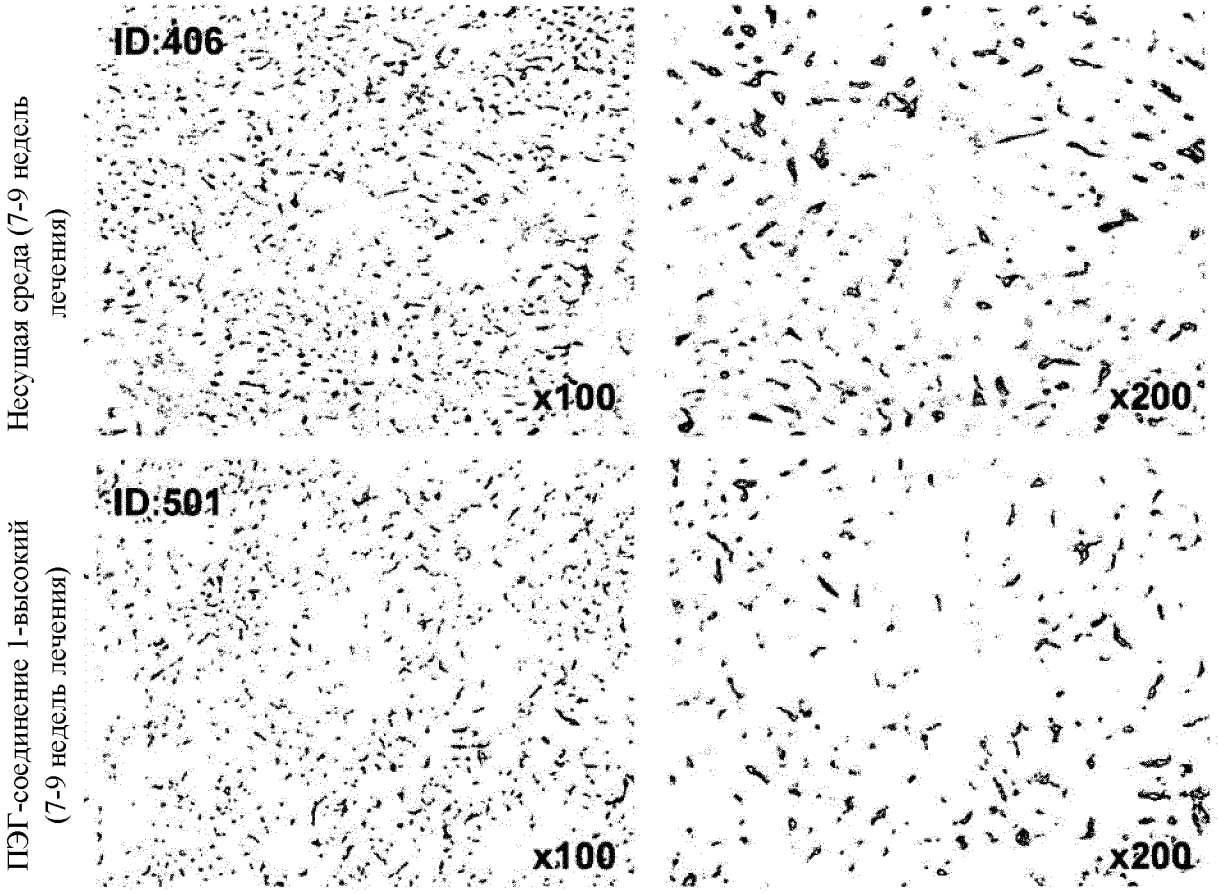
ФИГУРА 35А

Репрезентативные микрофотографии F4/80-иммуноокрашенных срезов печени

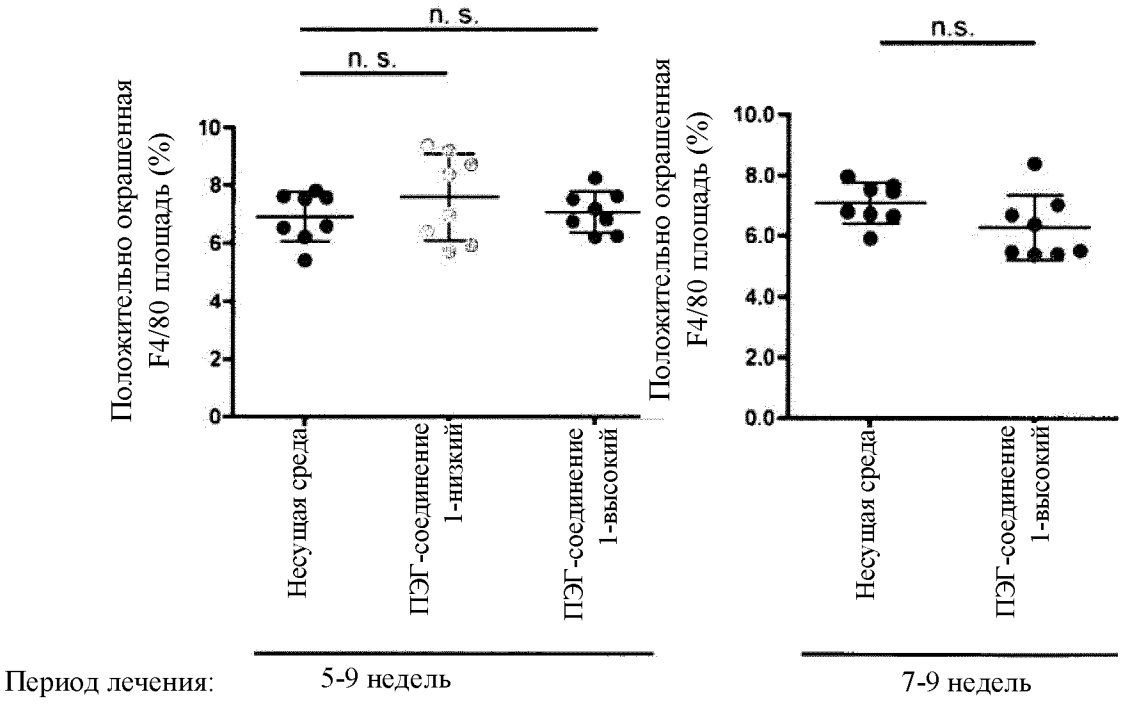


ФИГУРА 35B

Репрезентативные микрофотографии F4/80-иммуноокрашенных срезов печени (продолжение)

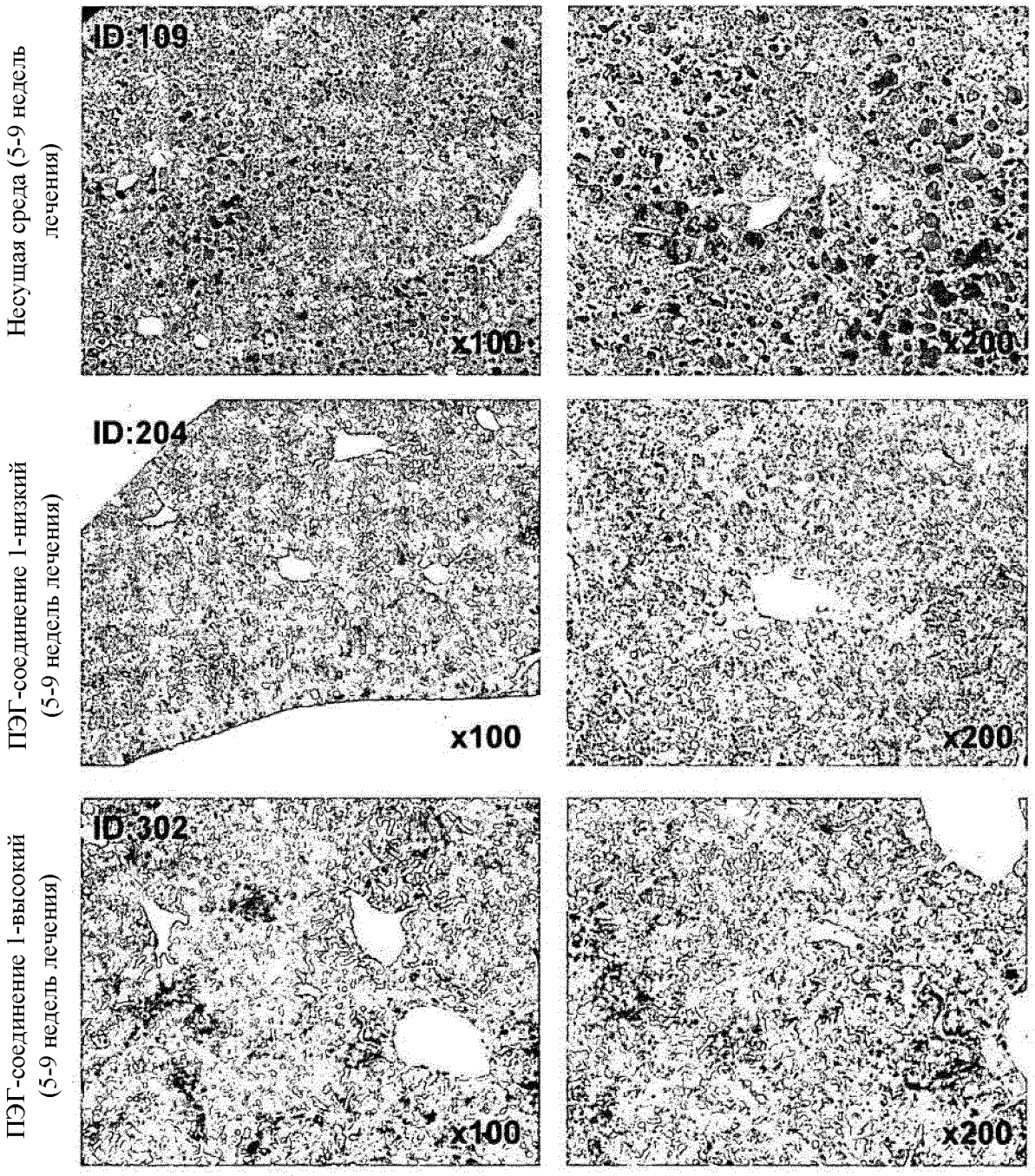


ФИГУРА 36 **Площадь воспаления**



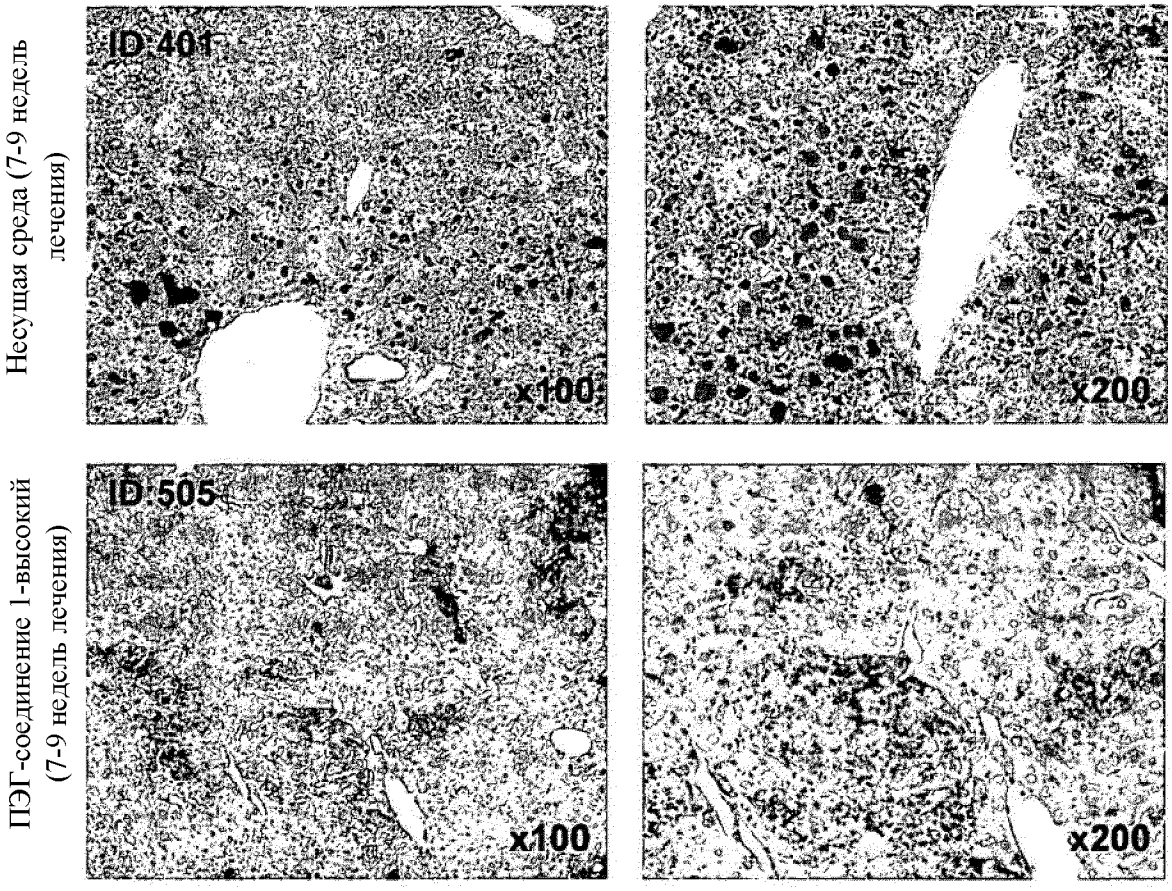
ФИГУРА 37А

Репрезентативные микрофотографии окрашенных масляным красным срезов печени

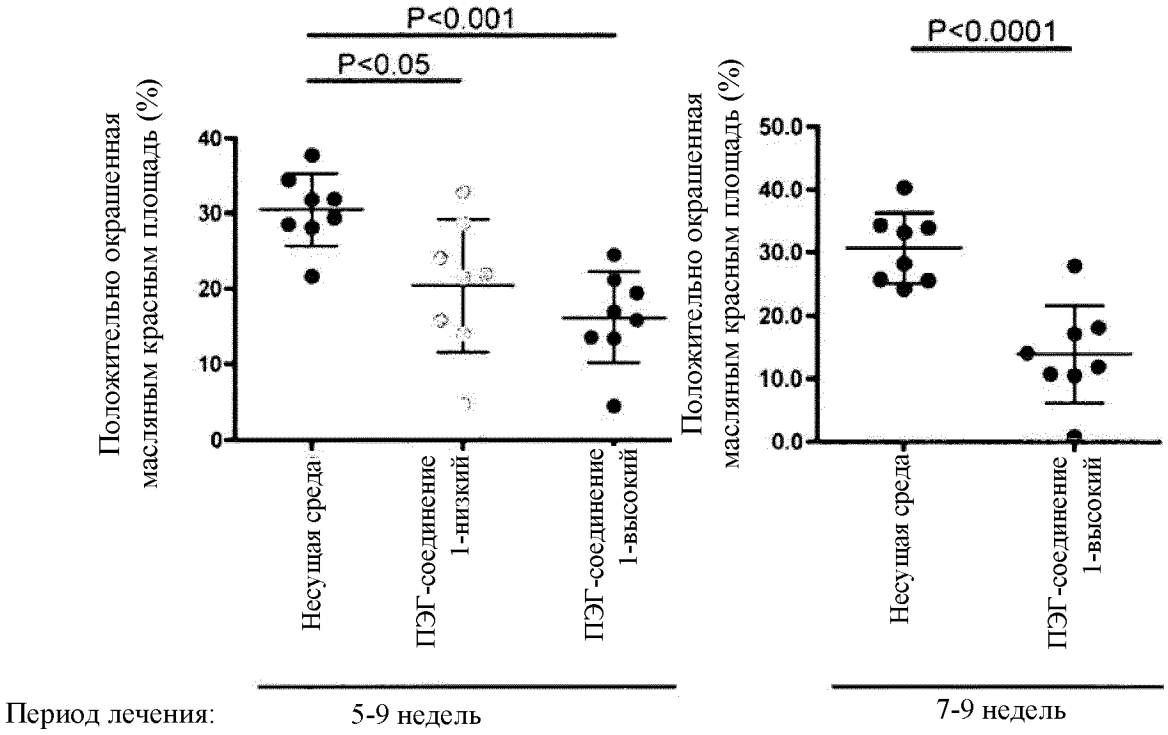


ФИГУРА 37B

Репрезентативные микрофотографии окрашенных масляным красным срезов печени (продолжение)

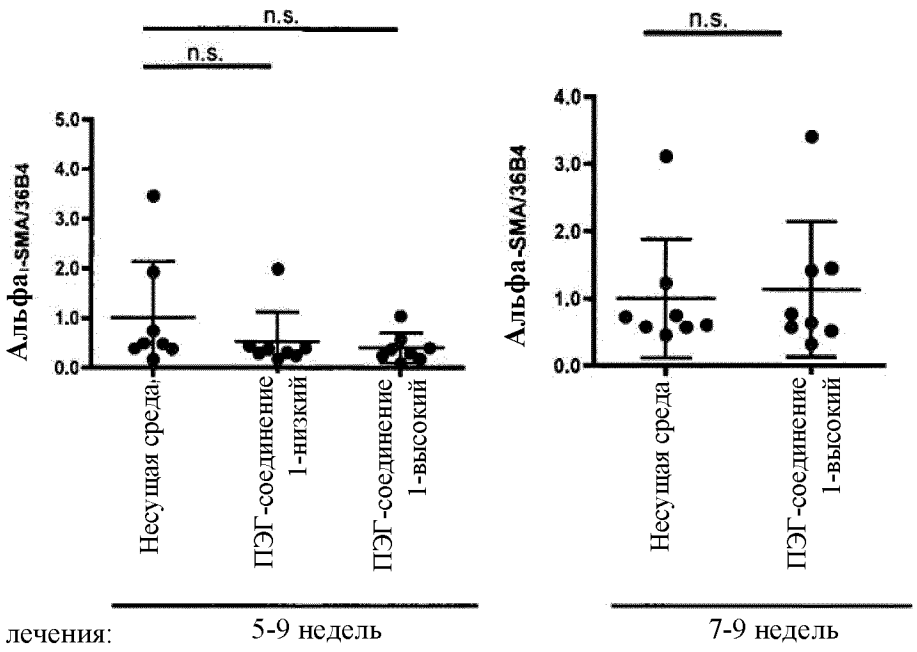


ФИГУРА 38 | **Площадь отложения жира**



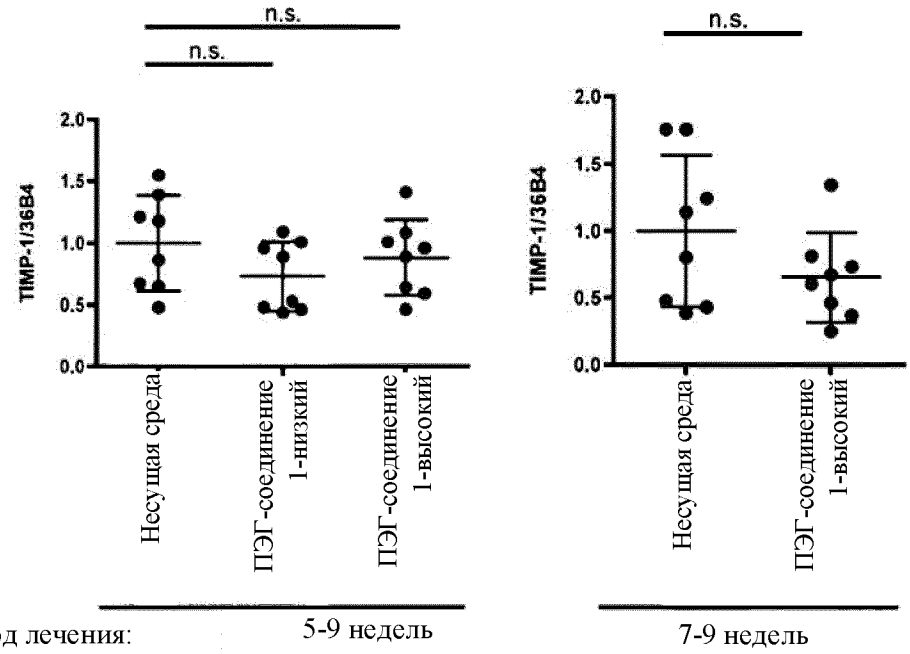
ФИГУРА 39A

Альфа-SMA



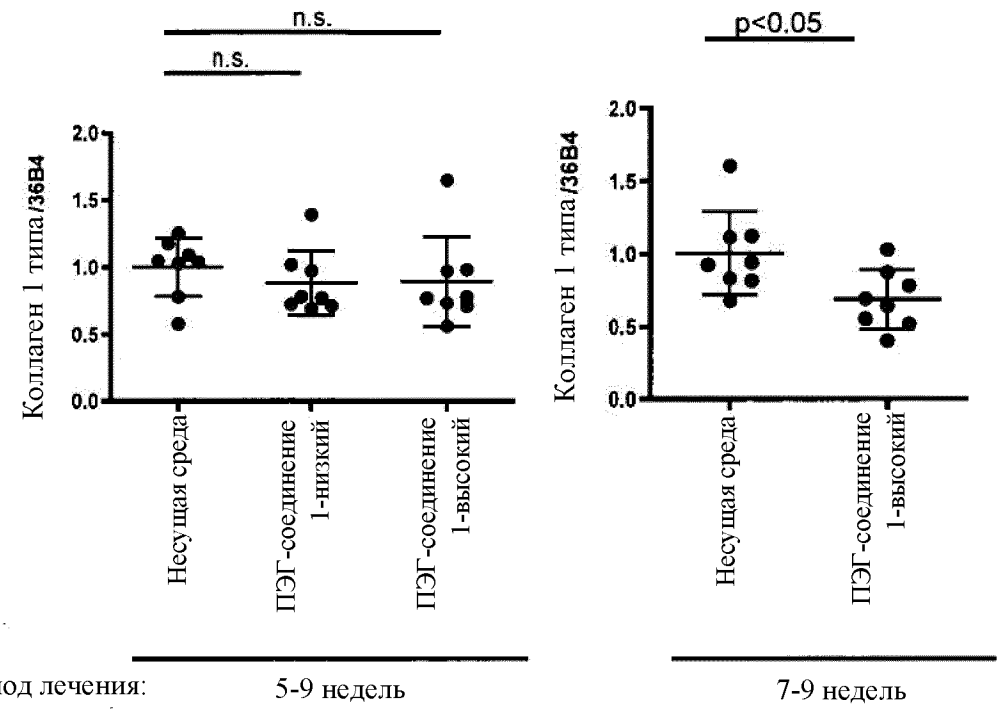
ФИГУРА 39B

TIMP-1



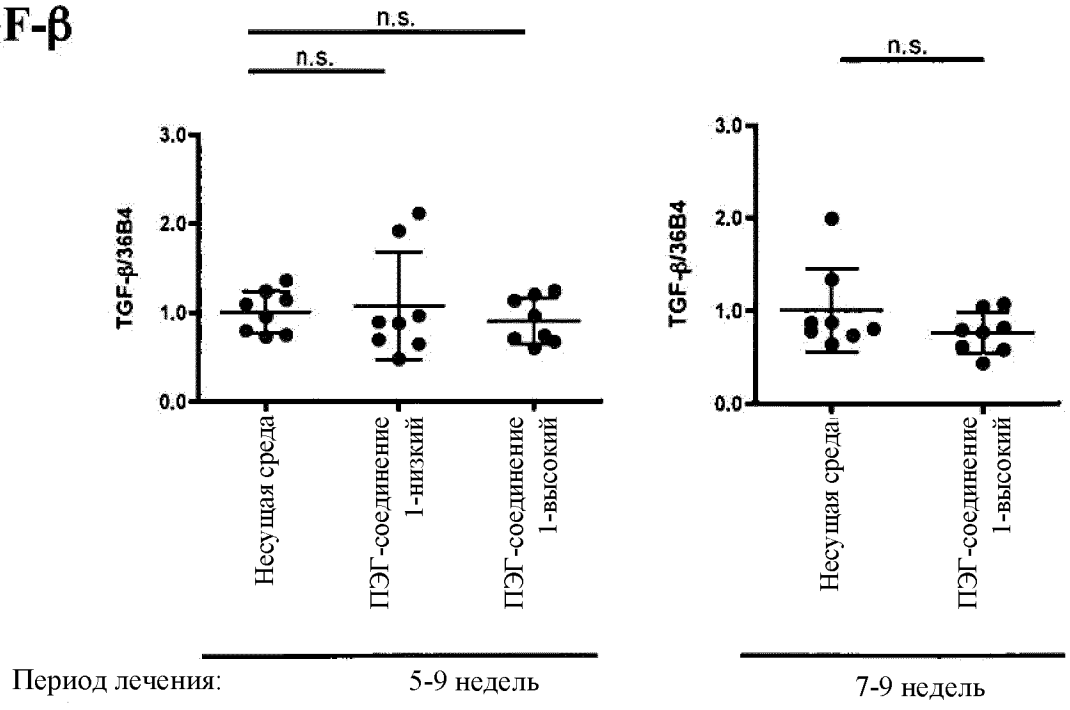
ФИГУРА 39C

Коллаген 1 типа



ФИГУРА 39D

TGF-β



ФИГУРА 40А

Модифицированные слитые белки полипептида FGF-21

Название соединения	SEQ ID NO:	Структура слияния	Линкерный пептид	SEQ ID NO:
Соединение 101	401	PKE(2)-L1-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
Соединение 102	402	PKE(2)-L2-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	355
Соединение 103	403	PKE(2)-L3-FGF21(Cmp. 2)	EEEEDEEEED	356
Соединение 104	404	PKE(2)-L4-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEP	357
Соединение 105	405	PKE(2)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHHGS	358
Соединение 106	406	PKE(2)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGS	359
Соединение 107	407	PKE(2)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGGSGGGGSGGGGS	360
Соединение 108	408	PKE(2)-L8-FGF21(Cmp. 2)	GSGSGSGSGSGSGSGS	361
Соединение 109	409	PKE(2)-L9-FGF21(Cmp. 2)	PSTPPTPSPSTPPTPSPS	362
Соединение 110	410	PKE(2)-L10-FGF21(Cmp. 2)	RGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP	363
Соединение 111	411	PKE(2)-L11-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	364
Соединение 112	412	PKE(2)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP	365
Соединение 113	413	PKE(2)-L13-FGF21(Cmp. 2)	PSTPPTPSPSTPPTPSPSPSTPPTPSPSTPPTPSPS	366
Соединение 114	414	PKE(2)-L14-FGF21(Cmp. 2)	PSPEP	367
Соединение 115	415	PKE(2)-L15-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP	368
Соединение 116	416	PKE(2)-L16-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP	369
Соединение 117	417	PKE(2)-L17-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPEPPTPEPPSPEP	370
Соединение 118	418	PKE(2)-L18-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPGGGSPTPEP	371
Соединение 119	419	PKE(2)-L19-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPEEEDPTPEP	372
Соединение 120	420	PKE(2)-L20-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEP	373
Соединение 121	421	PKE(2)-L21-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPPSPEP	374
Соединение 122	422	PKE(2)-L22-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPEPPTPEPGGGGSPSPEPPTPEPPSPEP	375
Соединение 123	423	PKE(2)-L23-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPEPPTPEPSPEPTPEP	376

ФИГУРА 40B

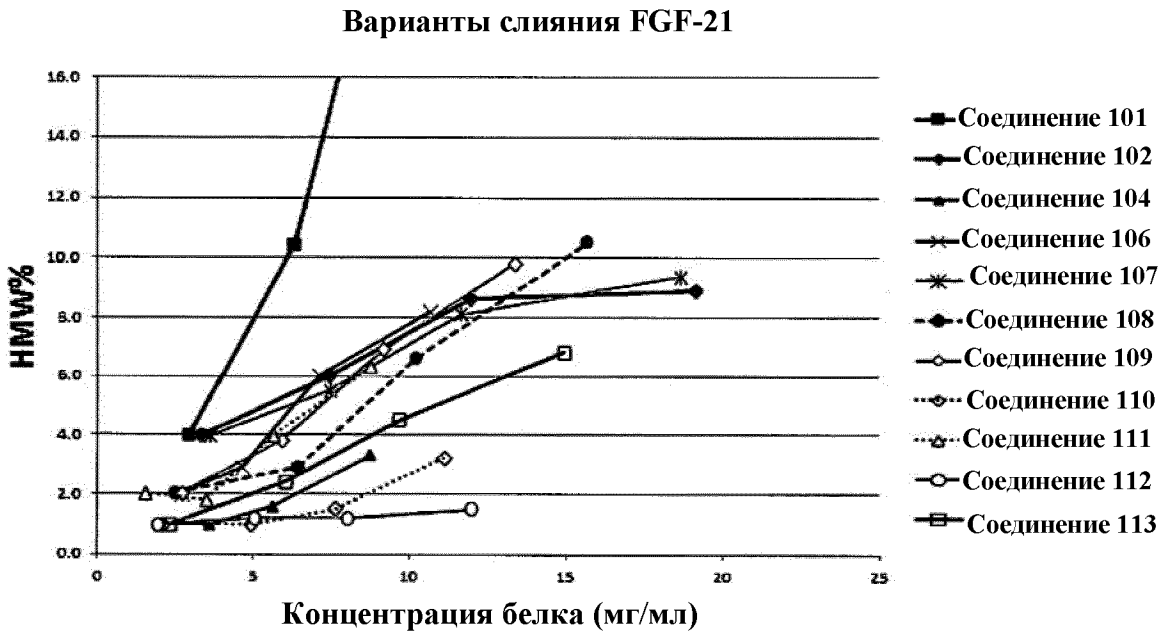
Название соединения	SEQ ID NO:	Структура слияния	Линкерный пептид	SEQ ID NO:
Соединение 124	424	HuSA(C34A)-L201-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
Соединение 125	425	HuSA(C34A)-L202-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	355
Соединение 126	426	HuSA(C34A)-L203-FGF21(Cmp. 2)	GETGS	377
Соединение 127	427	HuSA(C34A)-L204-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGS	378
Соединение 128	428	HuSA(C34A)-L205-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGT	379
Соединение 129	429	HuSA(C34A)-L206-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGS	359
Соединение 130	430	HuSA(C34A)-L207-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGS	380
Соединение 131	431	HuSA(C34A)-L208-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	381
Соединение 132	432	HuSA(C34A)-L209-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGSGAGES	382
Соединение 133	434	HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGS	359
Соединение 134	435	HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGS	380
Соединение 135	436	HuSA(C34A, des Leu-585)-L211-FGF21(Cmp. 1)	GGGGSGGGGSGGGGS	359
Соединение 136	437	HuSA(C34A, des Leu-585)-L207-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTGS	380
Соединение 137	440	FGF21(Cmp. 2)-L205-HuSA(C34A)	GETGSSGEGT	379
Соединение 138	441	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A)	GETGSSGEGTGSTGSGAGES	382
Соединение 139	442	FGF21(Cmp. 2)-L210-HuSA(C34A)	GETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGS	383
Соединение 140	443	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A)	GETGSSGEGTGSTGSGAGES	382
Соединение 141	446	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGSGAGES	382
Соединение 142	447	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTGSGAGES	382
Соединение 143	448	FGF21(Cmp. 2)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGSGAGES	382
Соединение 144	449	FGF21(Cmp. 1)-L209-HuSA(C34A, des Leu-585)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTGSGAGES	382
Соединение 145	450	FGF21(Cmp. 2)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 2)	GETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGS	383
Соединение 146	451	FGF21(Cmp. 1)-L210-HuSA(C34A)-G4Sx3-FGF21(Cmp. 1)	GETGSSGEGTGSTGSGAGESGTGESGEGGS	383

ФИГУРА 40C

Название соединения	SEQ ID NO:	Структура слияния	Линкерный пептид	SEQ ID NO:
Соединение 147	452	PKE(1)-L1-FGF21(Cmp. 2)	GS	354
Соединение 148	453	PKE(1)-L2-FGF21(Cmp. 2)	GGGGS	355
Соединение 149	454	PKE(1)-L3-FGF21(Cmp. 2)	EEEEDEEEED	356
Соединение 150	455	PKE(1)-L4-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEP	357
Соединение 151	456	PKE(1)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHHGS	358
Соединение 152	457	PKE(1)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGS	359
Соединение 153	458	PKE(1)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGGSGGGSGGGGS	360
Соединение 154	459	PKE(1)-L8-FGF21(Cmp. 2)	GSGSGSGSGSGSGSGS	361
Соединение 155	460	PKE(1)-L9-FGF21(Cmp. 2)	PSTPPTPSPSTPPTPSPS	362
Соединение 156	461	PKE(1)-L10-FGF21(Cmp. 2)	RGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP	363
Соединение 157	462	PKE(1)-L11-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	364
Соединение 158	463	PKE(1)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP	365
Соединение 159	464	PKE(1)-L13-FGF21(Cmp. 2)	PSTPPTPSPSTPPTPSPSPSTPPTPSPSTPPTPSPS	366
Соединение 160	465	PKE(1)-L14-FGF21(Cmp. 2)	PSPEP	367
Соединение 161	466	PKE(1)-L15-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP	368
Соединение 162	467	PKE(1)-L16-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP	369
Соединение 163	468	PKE(1)-L17-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPEPPTPEPPSPEP	370
Соединение 164	469	PKE(1)-L18-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPGGGSPTPEP	371
Соединение 165	470	PKE(1)-L19-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPEEEDPTPEP	372
Соединение 166	471	PKE(1)-L20-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEP	373
Соединение 167	472	PKE(1)-L21-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPEPPTPEPEEEDPSPEPPTPEPPSPEP	374
Соединение 168	473	PKE(1)-L22-FGF21(Cmp. 2)	PTPEPPSPEPPTPEPGGGGSPSPEPPTPEPPSPEP	375
Соединение 169	474	PKE(1)-L23-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPTPEPSPEPPTPEPSPEPTPEP	376

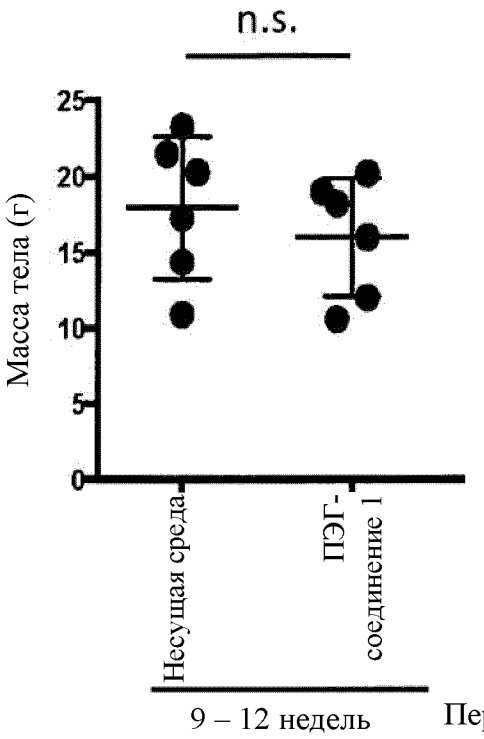
ФИГУРА 40D

Название соединения	SEQ ID NO:	Структура слияния	Линкерный пептид	SEQ ID NO:
Соединение 170	475	Fc(hIgG1a_191)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGGSGGGSGGGGS	360
Соединение 171	476	Fc(hIgG1a_191)-L250-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGGSGGGS	350
Соединение 172	477	Fc(hIgG1a_191)-L12-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP	365
Соединение 173	478	Fc(hIgG1a_191)-L251-FGF21(Cmp. 2)	PSPEPPTPEPPSPEP	351
Соединение 174	479	Fc(hIgG1a_191)-L5-FGF21(Cmp. 2)	GSHHHHHHHHGS	358
Соединение 175	480	Fc(hIgG1a_191)-L252-FGF21(Cmp. 2)	ELQLEESAAEAQEGELE	352
Соединение 176	481	Fc(hIgG1a_190)-L253-FGF21(Cmp. 2)	SSGGGGSGGGSGGGGGS	353
Соединение 177	482	Fc(hIgG1a_191)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGS	359
Соединение 178	483	Fc(hIgG1a_189)-L6-FGF21(Cmp. 2)	GGGGSGGGGSGGGGS	359
Соединение 179	484	Fc(hIgG1a_191)-L7-FGF21-1aa(Cmp. 2)	GGGGGSGGGSGGGGS	360
Соединение 180	485	Fc(hIgG1a_191)-L7-FGF21-3aa(Cmp. 2)	GGGGGSGGGSGGGGS	360
Соединение 181	486	Fc(hIgG1f_1.1_186)-L7-FGF21 (Cmp. 2)	GGGGGSGGGSGGGGS	360
Соединение 182	487	Fc(hIgG1a_191b)-L7-FGF21(Cmp. 2)	GGGGGSGGGSGGGGS	360

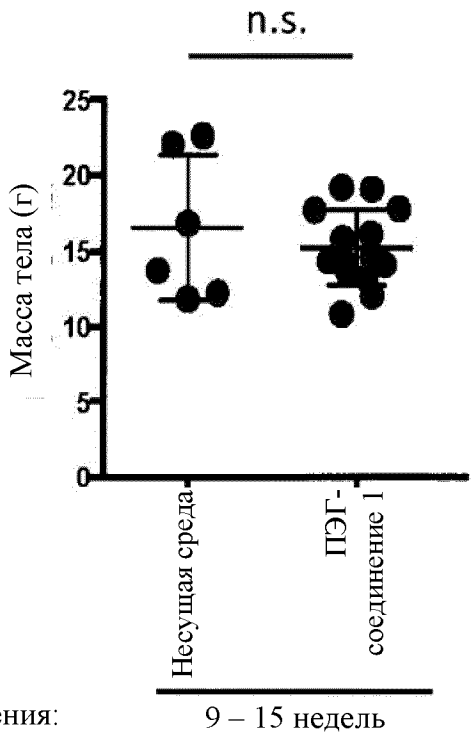

Варианты слияния FGF-21
HMW%
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0
5
10
15
20
25
Концентрация белка (мг/мл)
Соединение 101
Соединение 102
Соединение 104
Соединение 106
Соединение 107
Соединение 108
Соединение 109
Соединение 110
Соединение 111
Соединение 112
Соединение 113

ФИГУРА 41

ФИГУРА 42А

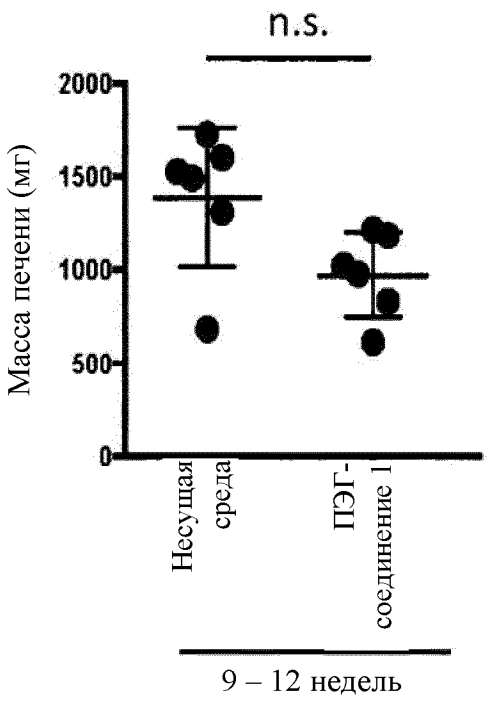


ФИГУРА 42В

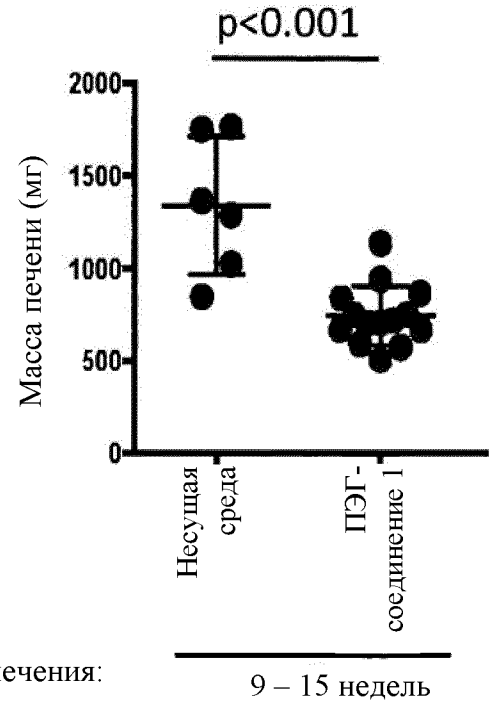


Период лечения:

ФИГУРА 43А

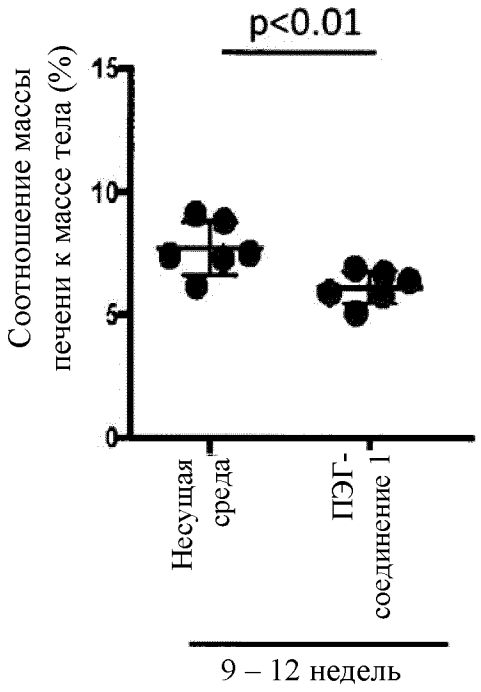


ФИГУРА 43В

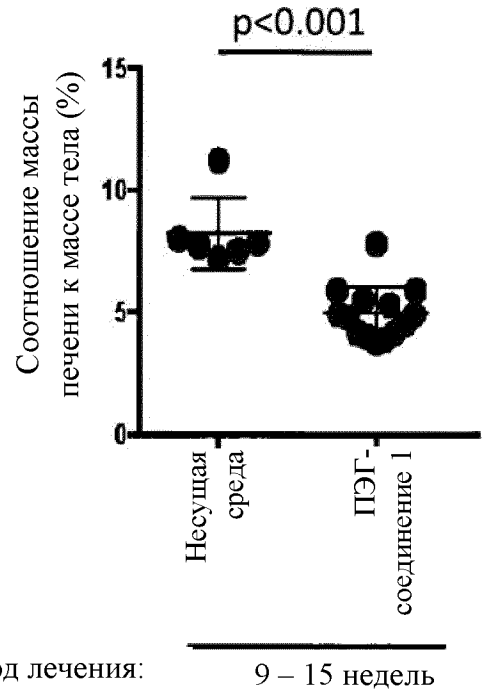


Период лечения:

ФИГУРА 44А

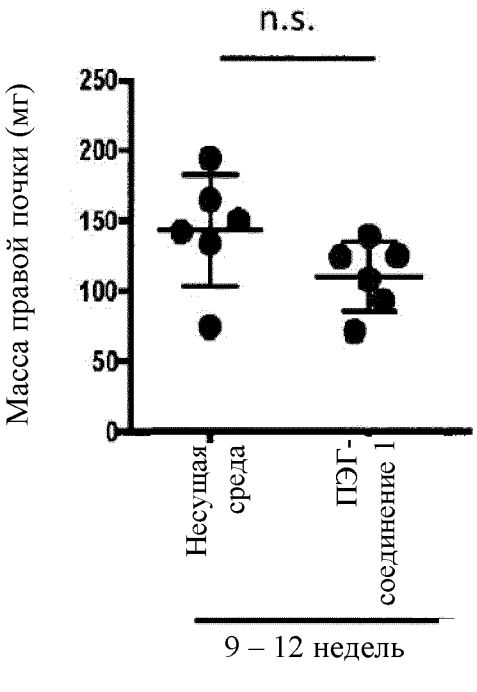


ФИГУРА 44В

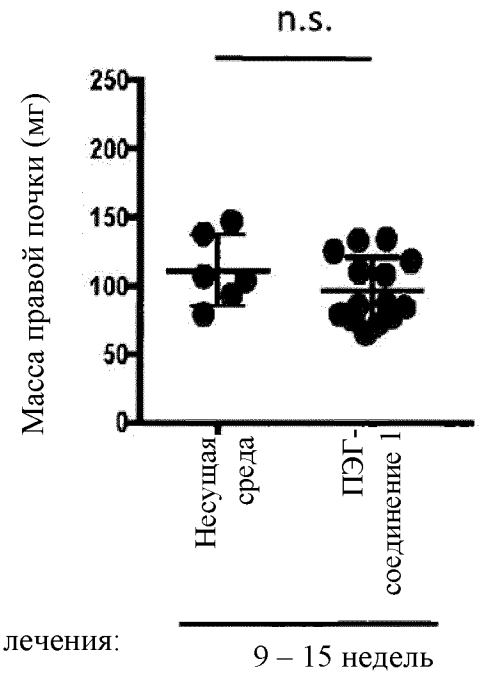


Период лечения:

ФИГУРА 45А

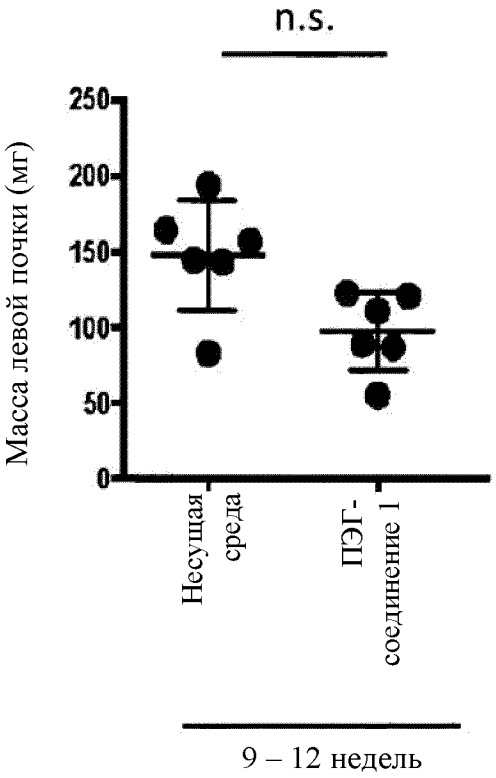


ФИГУРА 45В

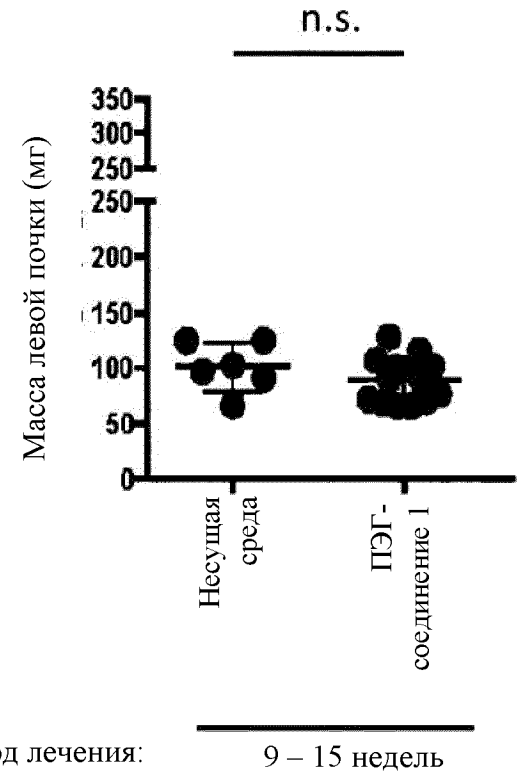


Период лечения:

ФИГУРА 46A

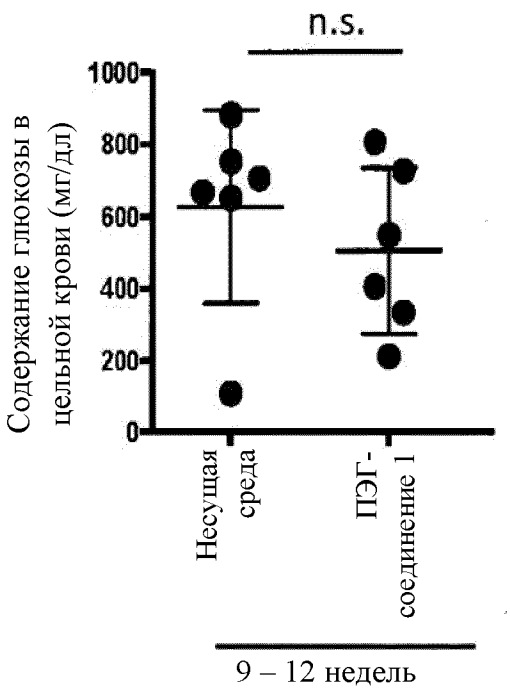


ФИГУРА 46B

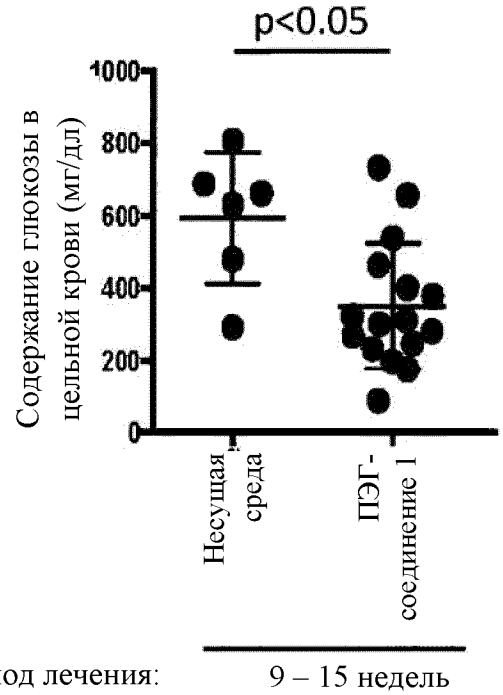


Период лечения:

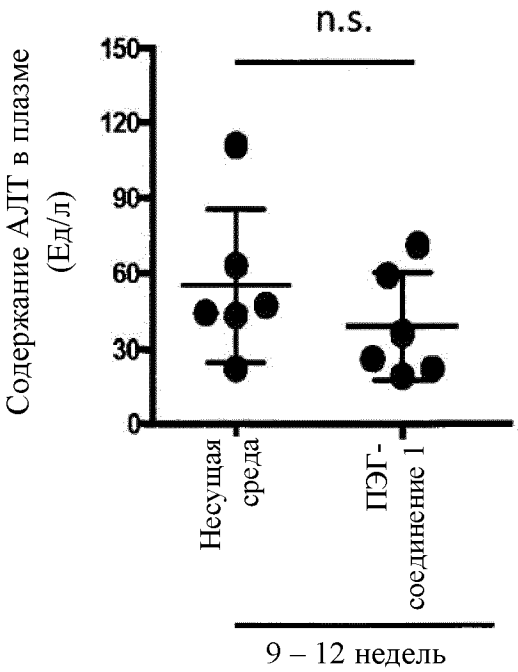
ФИГУРА 47A



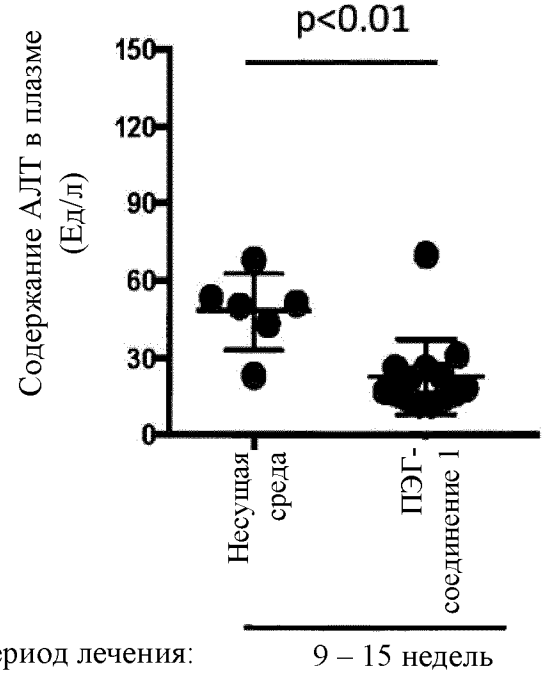
ФИГУРА 47B



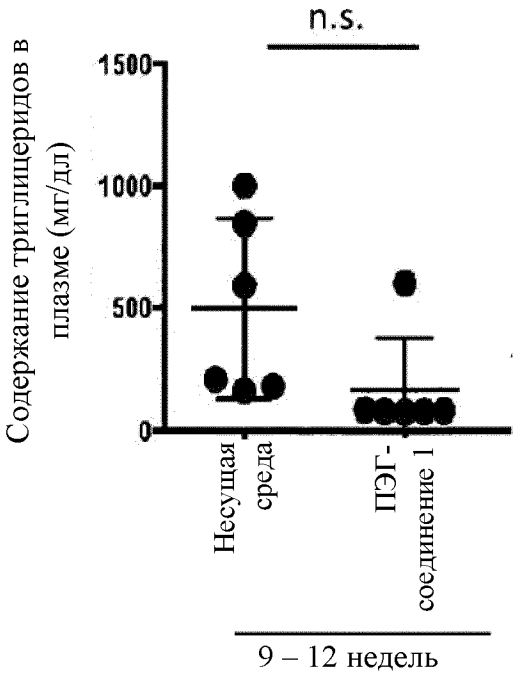
ФИГУРА 48A



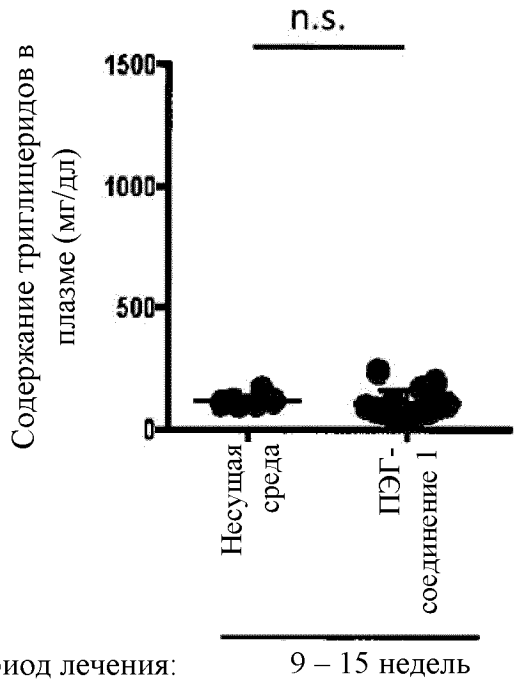
ФИГУРА 48B



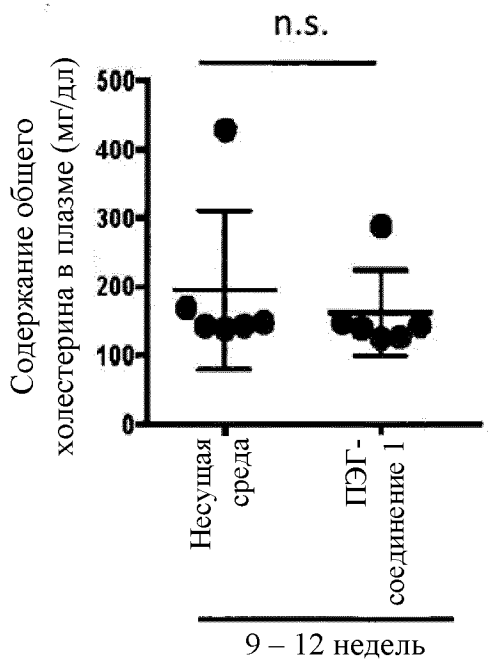
ФИГУРА 49A



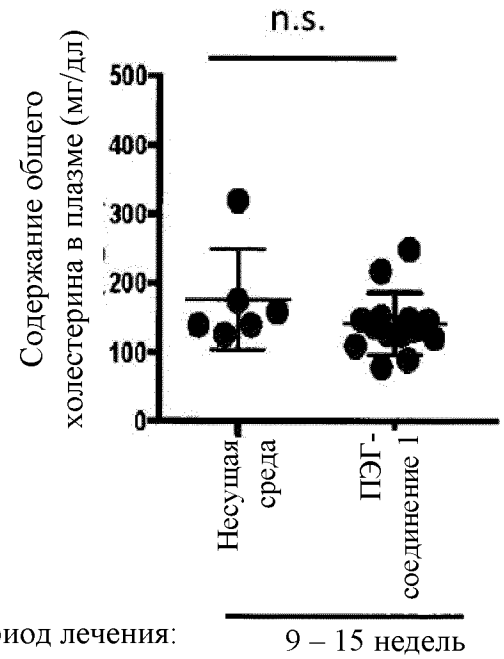
ФИГУРА 49B



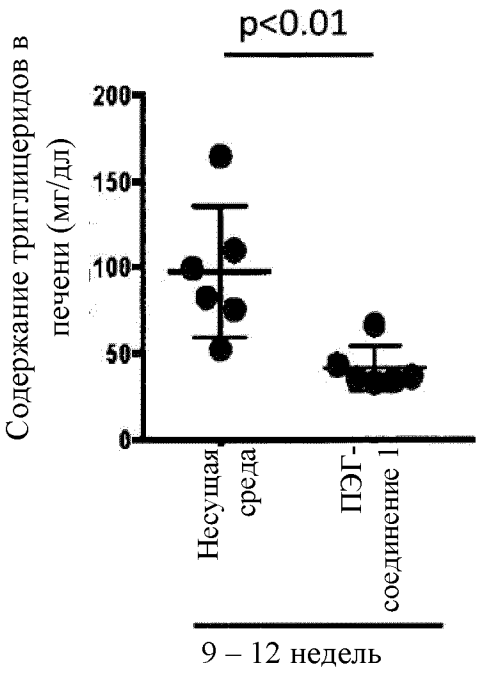
ФИГУРА 50A



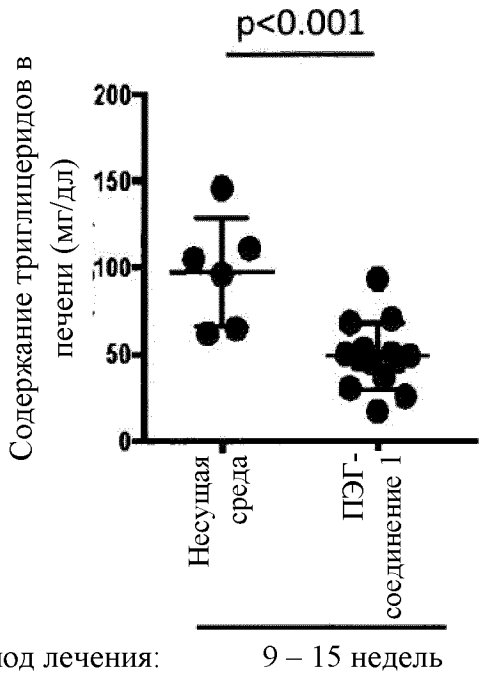
ФИГУРА 50B



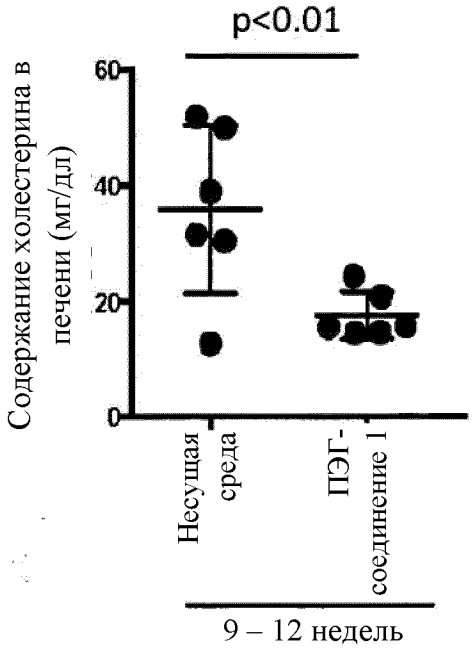
ФИГУРА 51А



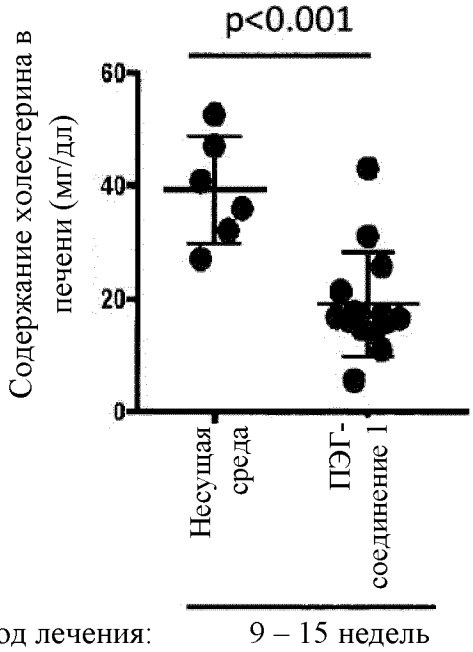
ФИГУРА 51В



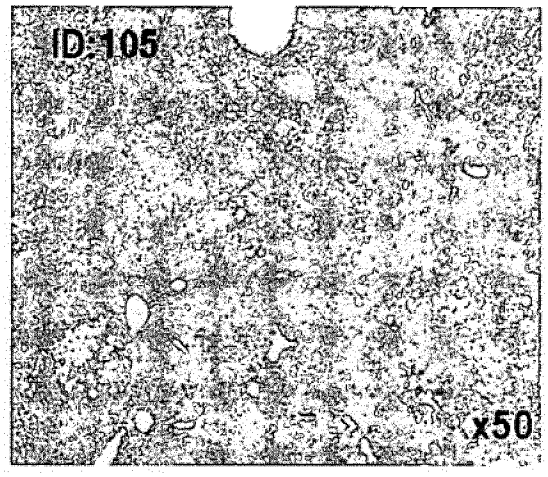
ФИГУРА 52А



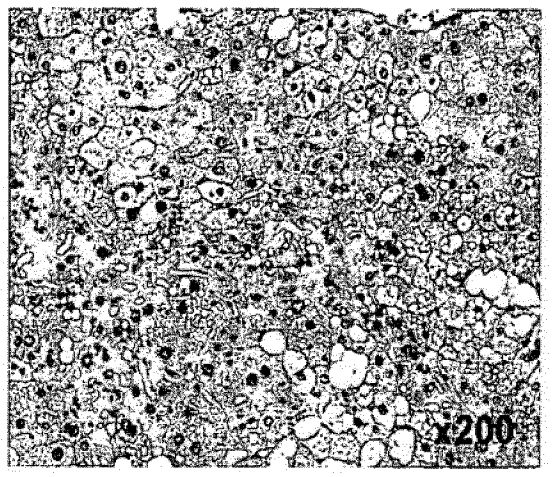
ФИГУРА 52В



Несущая среда (9 – 12 недель лечения)

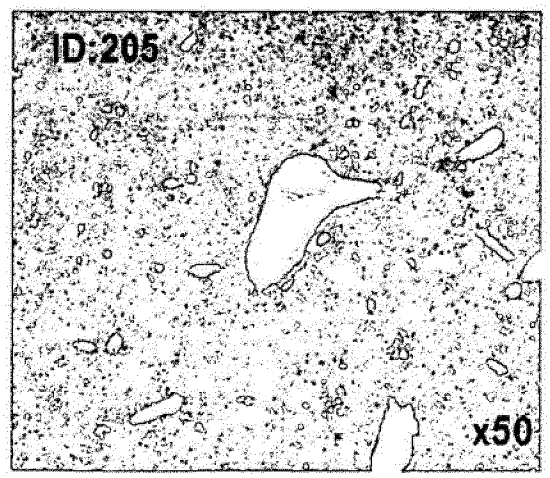


ФИГУРА 53A

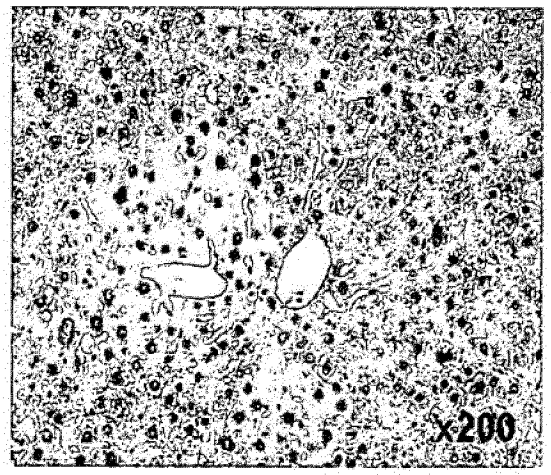


ФИГУРА 53B

ПЭГ-соединение 1 (9 – 12 недель лечения)

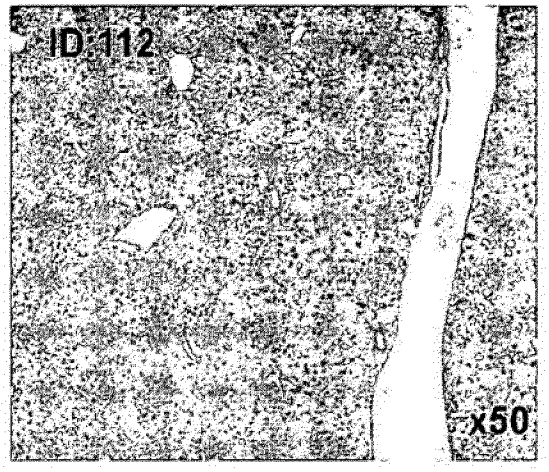


ФИГУРА 53C

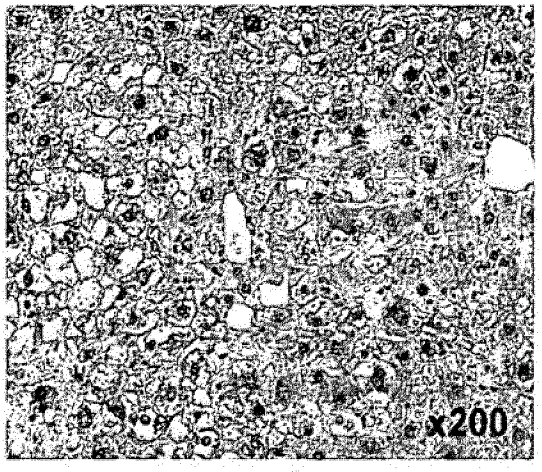


ФИГУРА 53D

Несущая среда (9 – 15 недель лечения)



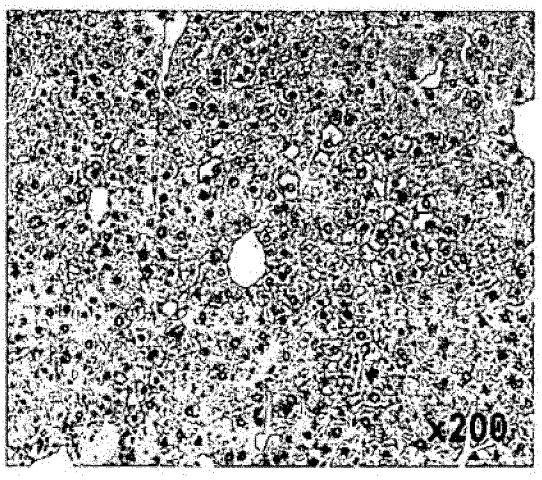
ФИГУРА 53E



ФИГУРА 53F

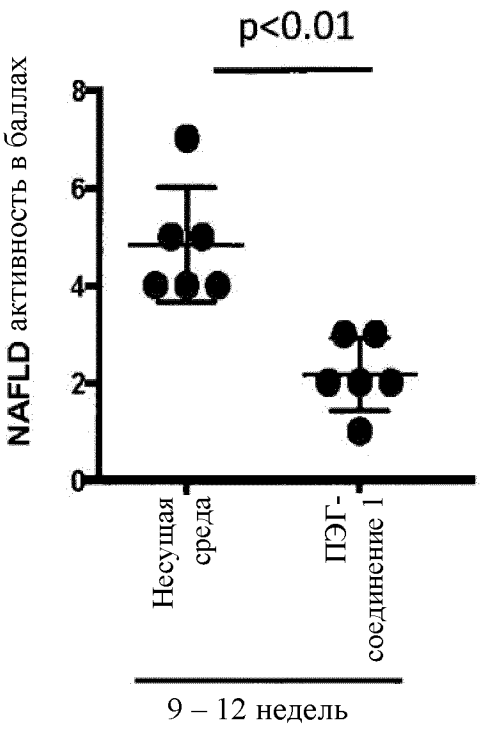
ПЭГ-соединение 1 (9 – 15 недель лечения)

ФИГУРА 53G

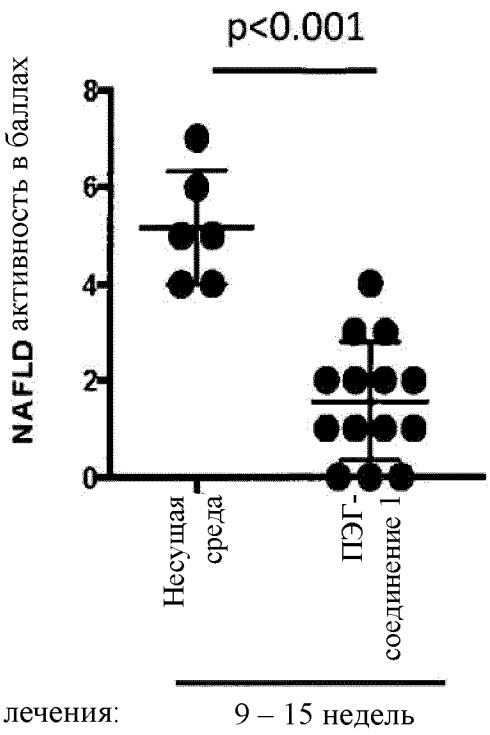


ФИГУРА 53H

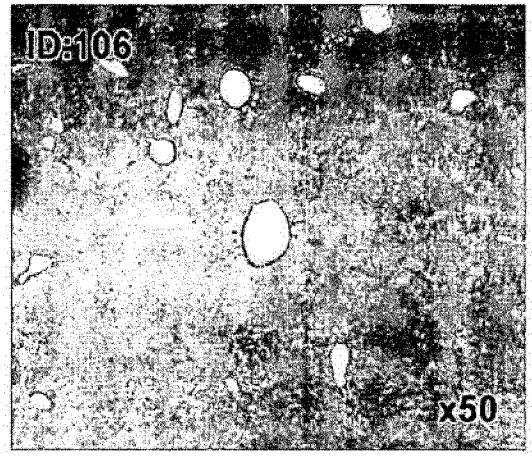
ФИГУРА 54А



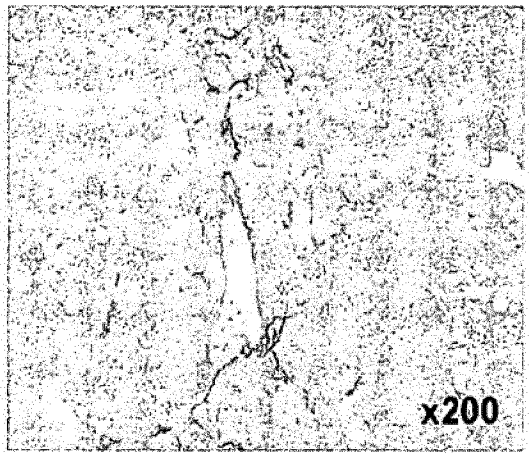
ФИГУРА 54В



Несущая среда (9 – 12 недель лечения)

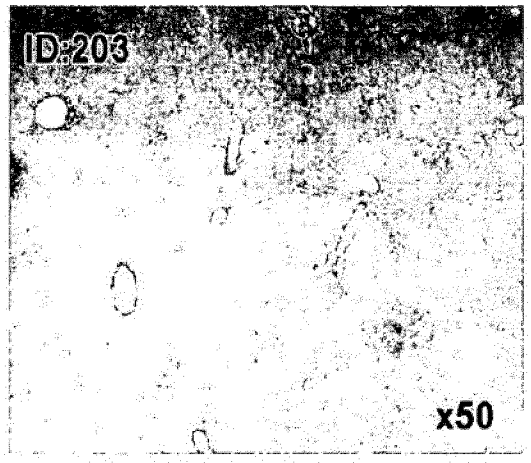


ФИГУРА 55A

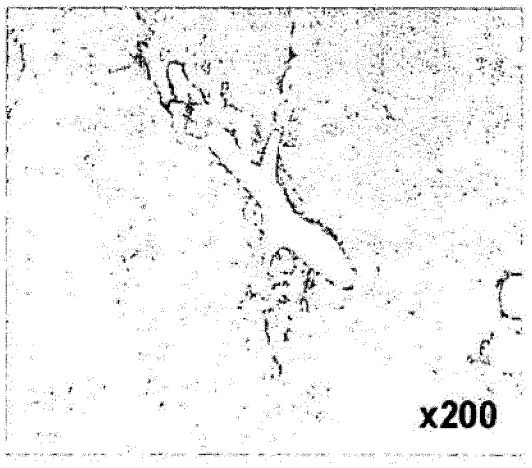


ФИГУРА 55B

ПЭГ-соединение 1 (9 – 12 недель лечения)

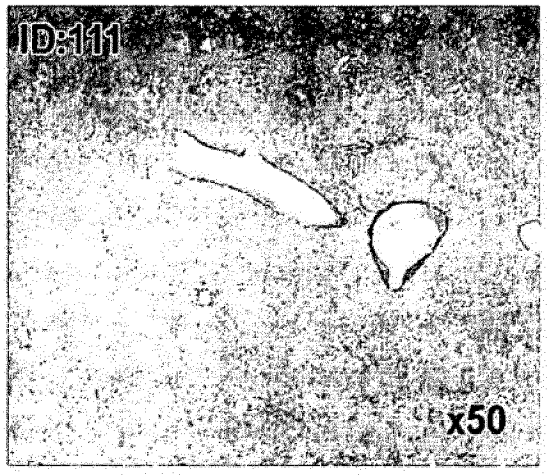


ФИГУРА 55C

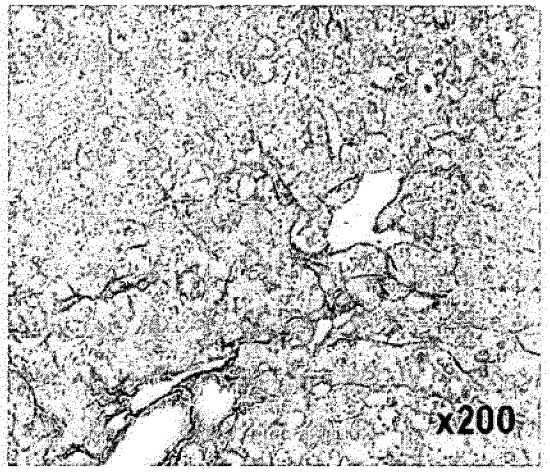


ФИГУРА 55D

Несущая среда (9 – 15 недель лечения)

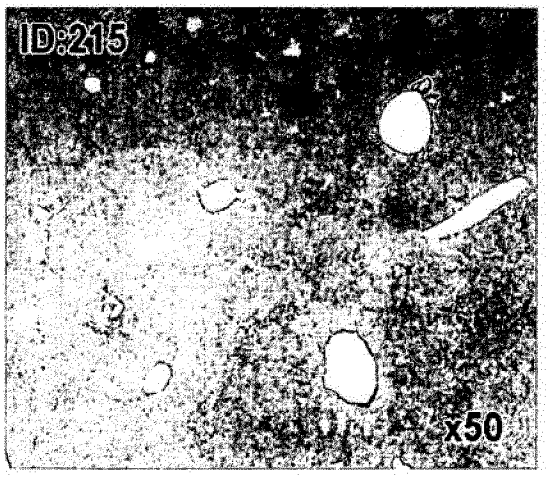


ФИГУРА 55E

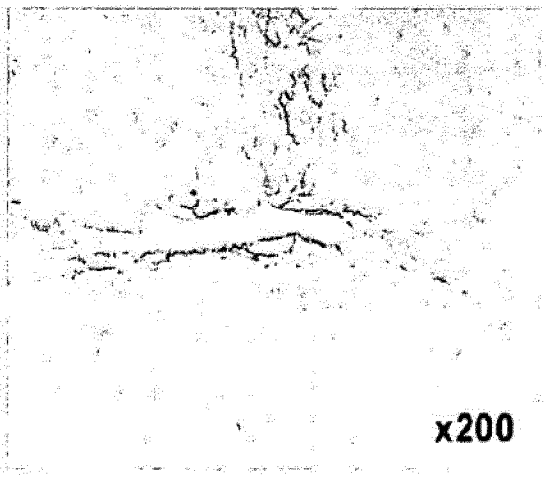


ФИГУРА 55F

ПЭГ-соединение 1 (9 – 15 недель лечения)

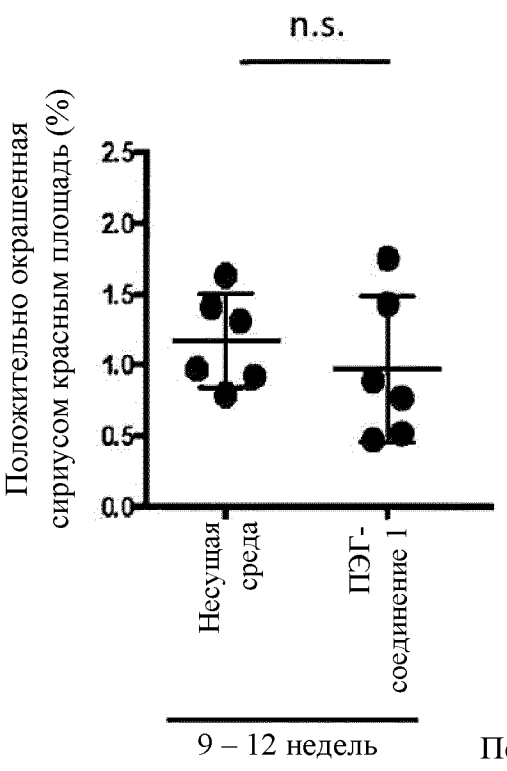


ФИГУРА 55G

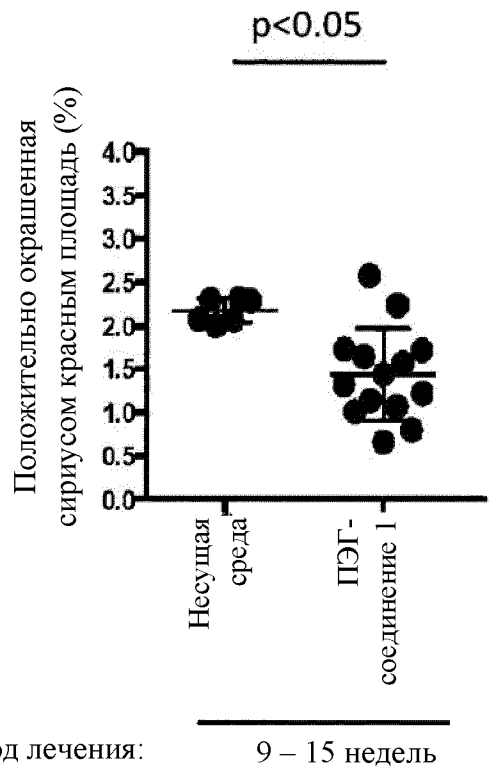


ФИГУРА 55H

ФИГУРА 56A

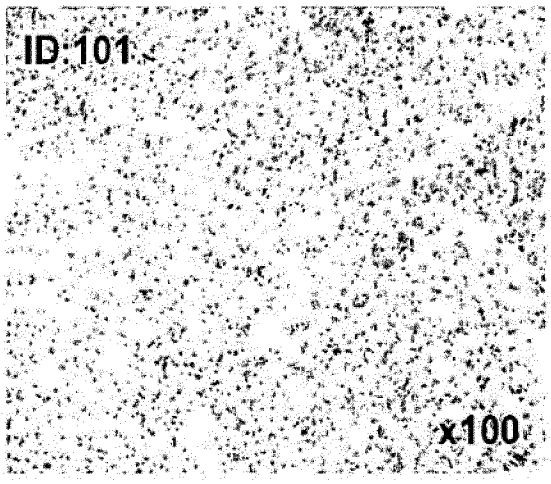


ФИГУРА 56B

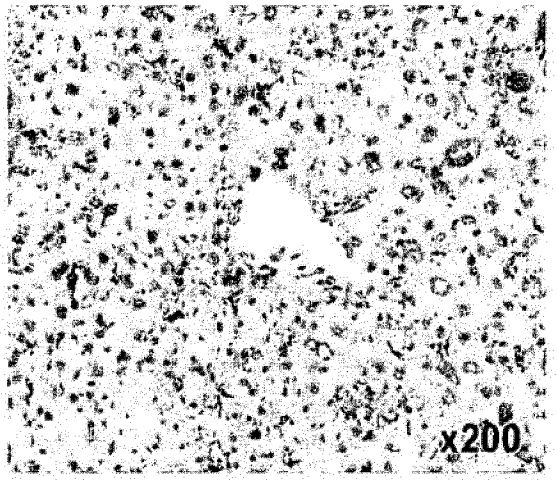


Период лечения:

Несущая среда (9 – 12 недель лечения)

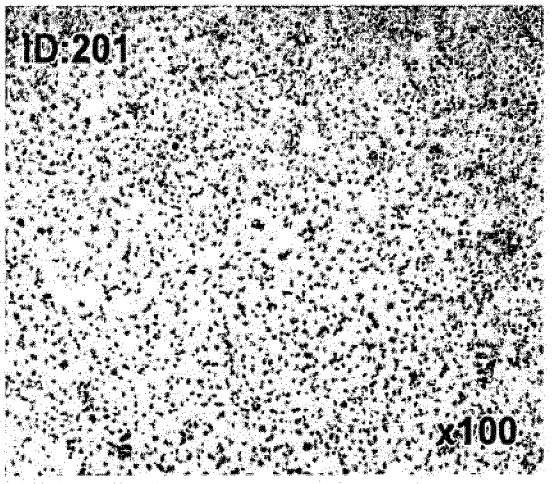


ФИГУРА 57A

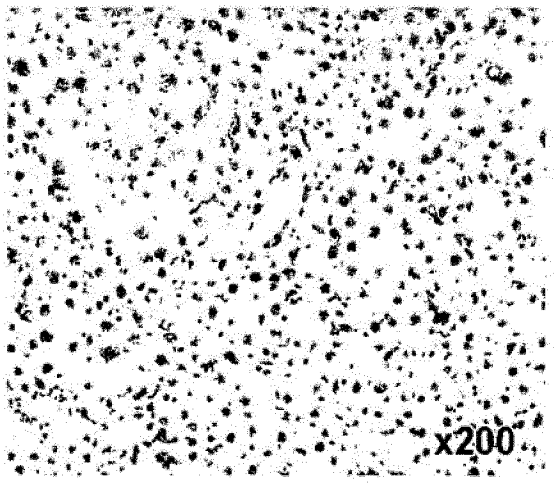


ФИГУРА 57B

ПЭГ-соединение 1 (9 – 12 недель лечения)

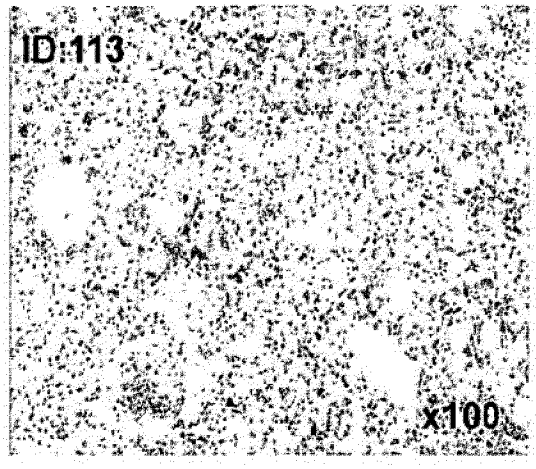


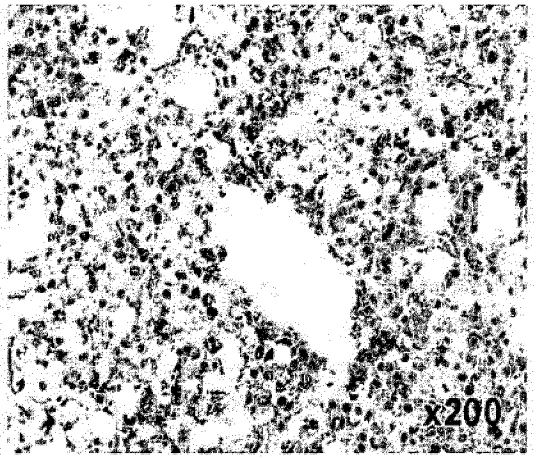
ФИГУРА 57C



ФИГУРА 57D

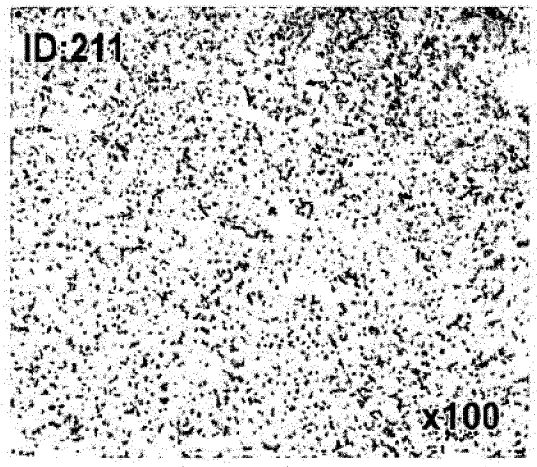
Несущая среда (9 – 15 недель лечения)

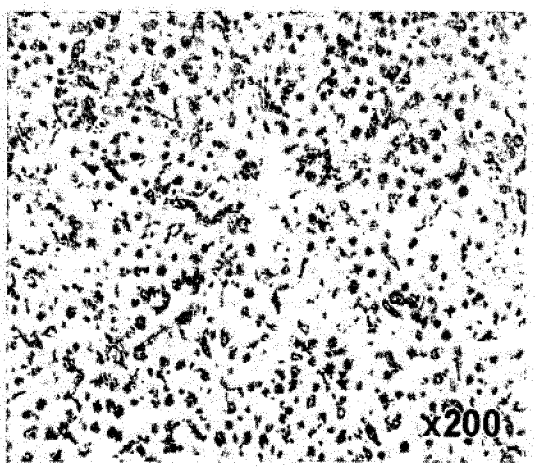




ФИГУРА 57E **ФИГУРА 57F**

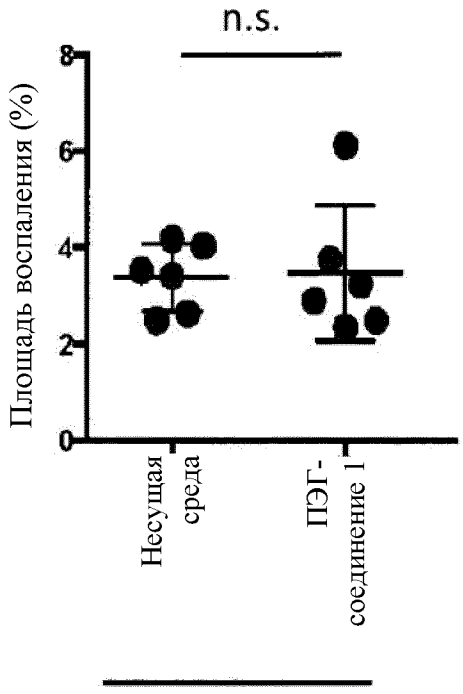
ПЭГ-соединение 1 (9 – 15 недель лечения)



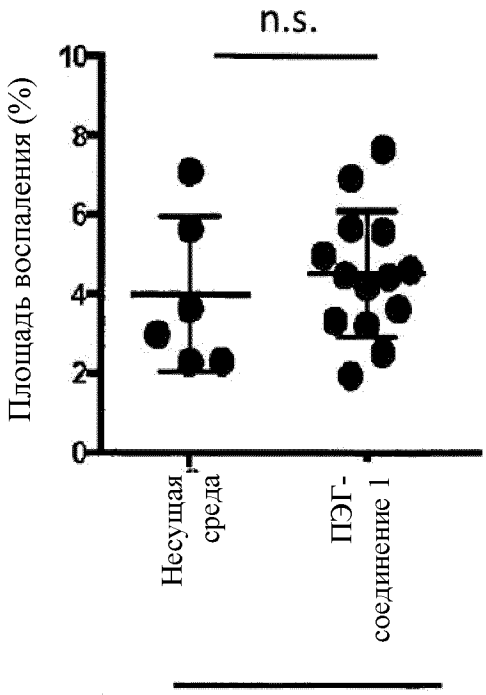


ФИГУРА 57G **ФИГУРА 57H**

ФИГУРА 58A

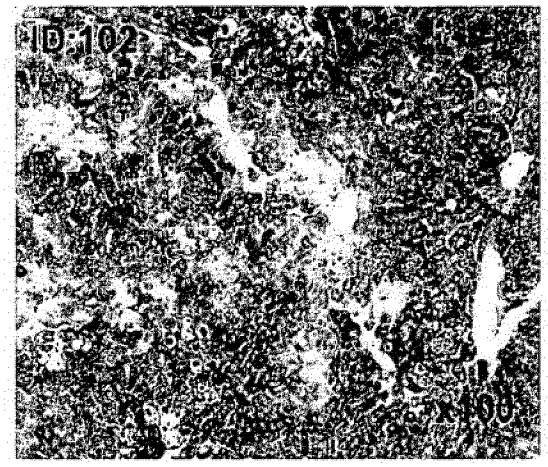


ФИГУРА 58B

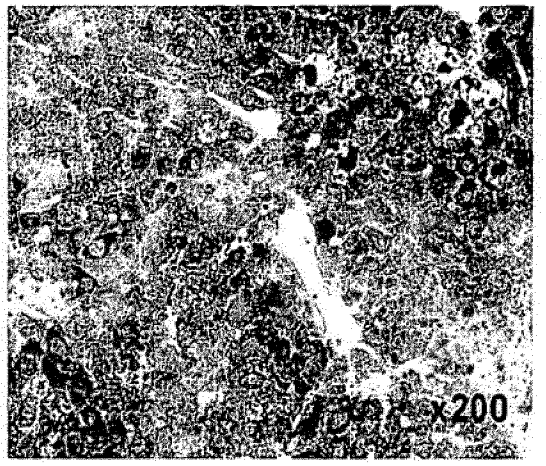


Период лечения: 9 – 12 недель | 9 – 15 недель

Несущая среда (9 – 12 недель лечения)

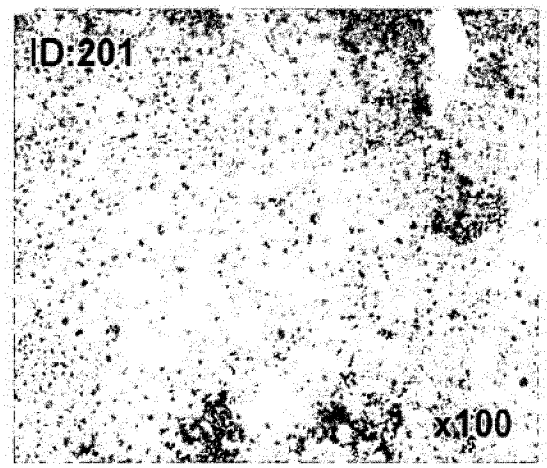


ФИГУРА 59A

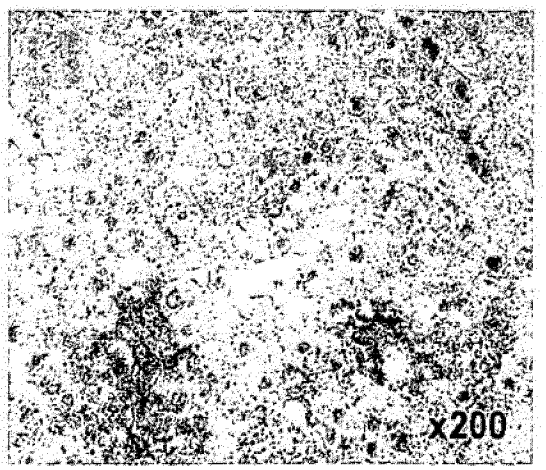


ФИГУРА 59B

ПЭГ-соединение 1 (9 – 12 недель лечения)

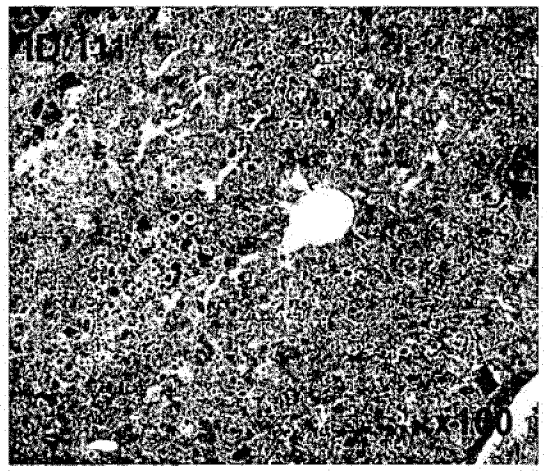


ФИГУРА 59C

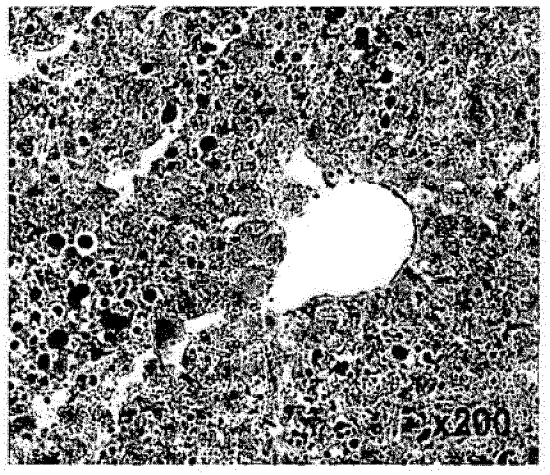


ФИГУРА 59D

Несущая среда (9 – 15 недель лечения)

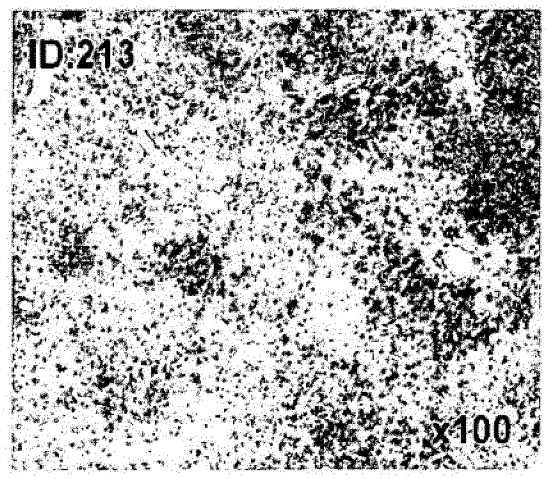


ФИГУРА 59E

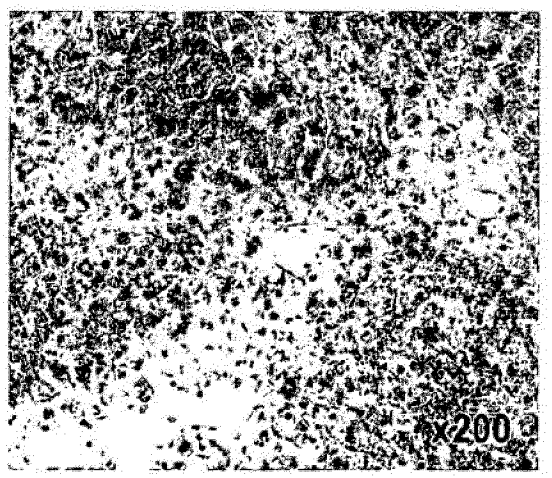


ФИГУРА 59F

ПЭГ-соединение 1 (9 – 15 недель лечения)

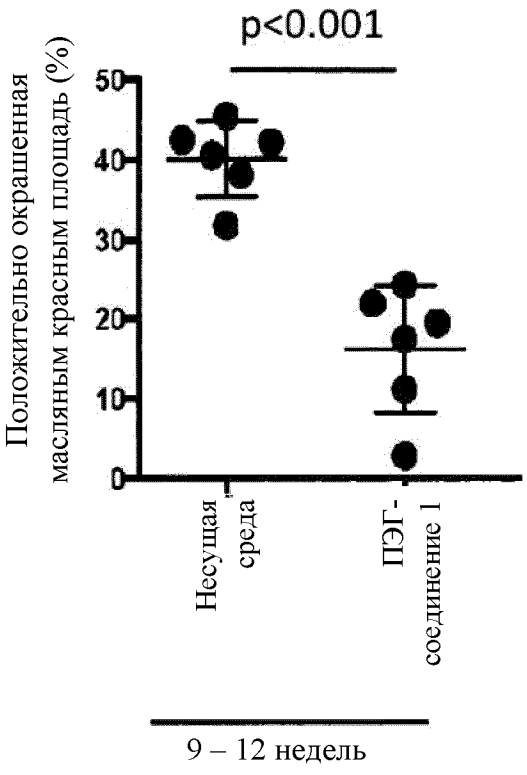


ФИГУРА 59G

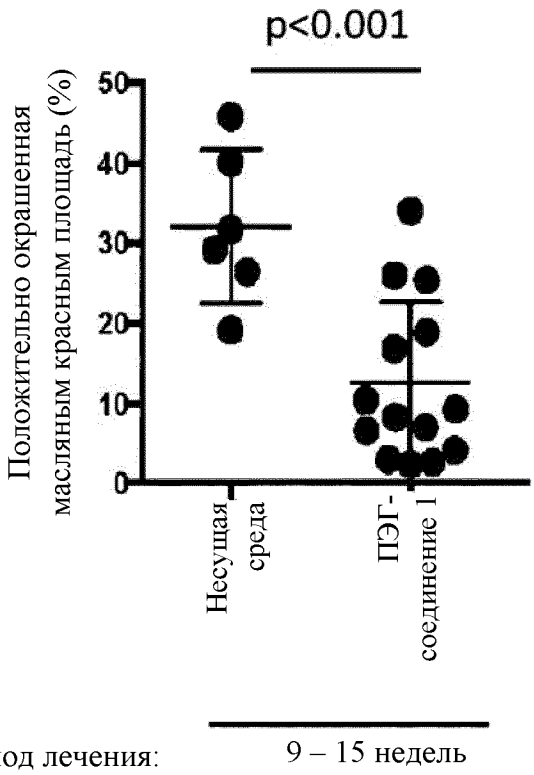


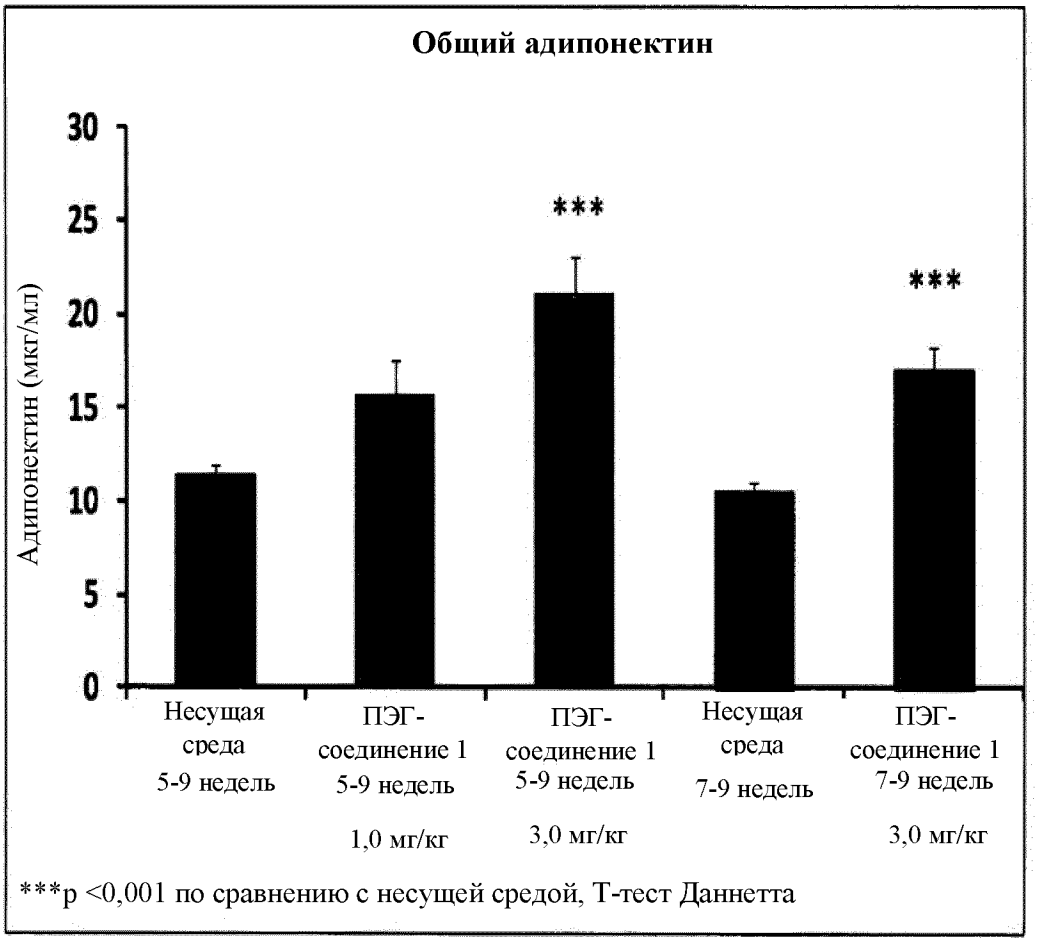
ФИГУРА 59H

ФИГУРА 60А

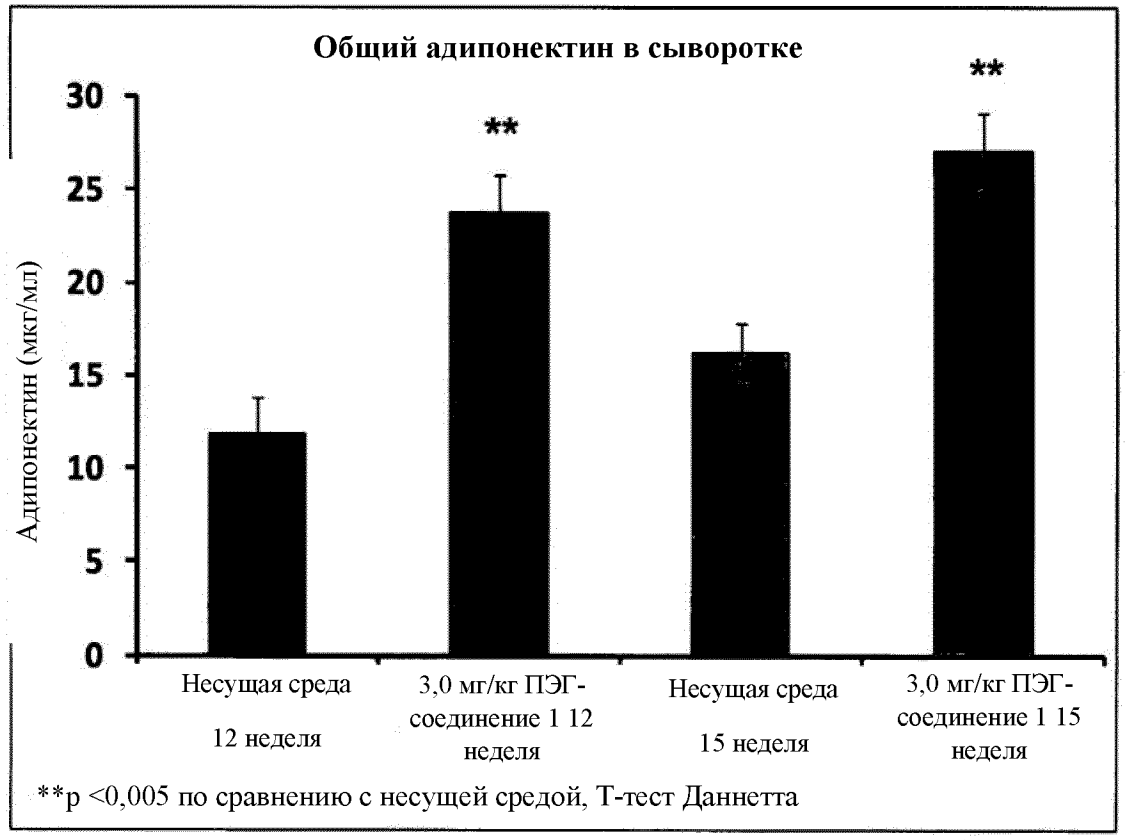


ФИГУРА 60В

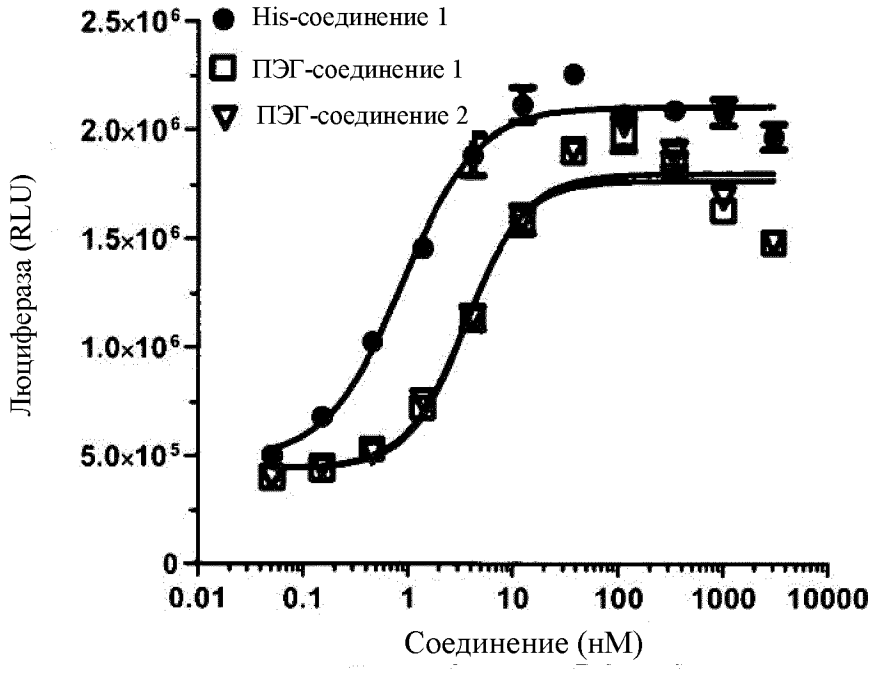



Общий адипонектин
Адипонектин (мкг/мл)
30
25
20
15
10
5
0
***
***
Несущая среда 5-9 недель
ПЭГ-соединение 1 5-9 недель 1,0 мг/кг
ПЭГ-соединение 1 5-9 недель 3,0 мг/кг
Несущая среда 7-9 недель
ПЭГ-соединение 1 7-9 недель 3,0 мг/кг
***p <0,001 по сравнению с несущей средой, Т-тест Даннетта

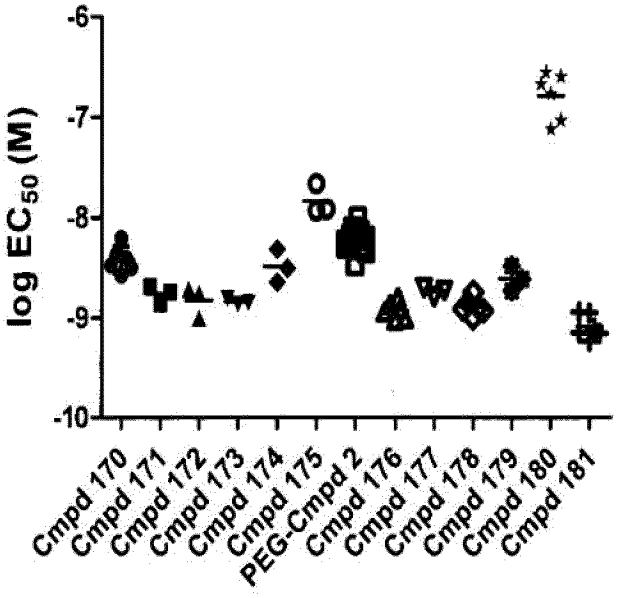
ФИГУРА 61


Общий адипонектин в сыворотке
Адипонектин (мкг/мл)
30
25
20
15
10
5
0
**
**
Несущая среда
12 неделя
3,0 мг/кг ПЭГ-соединение 1 12 неделя
Несущая среда
15 неделя
3,0 мг/кг ПЭГ-соединение 1 15 неделя
**p <0,005 по сравнению с несущей средой, Т-тест Даннетта

ФИГУРА 62

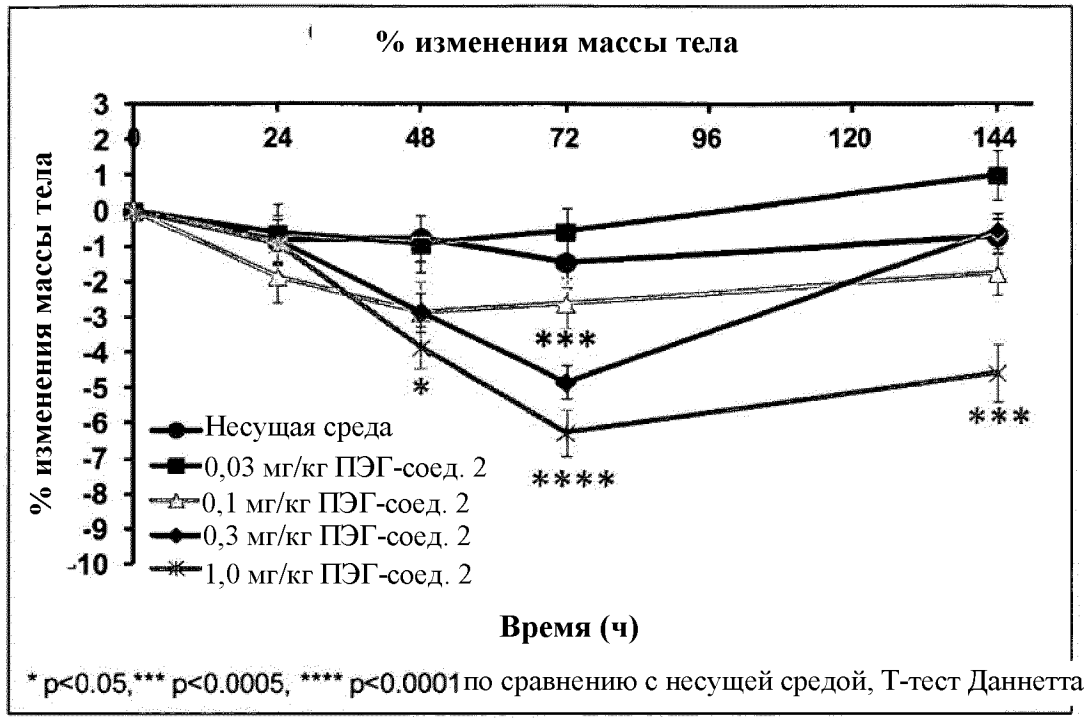

His-соединение 1
ПЭГ-соединение 1
ПЭГ-соединение 2
Люцифераза (RLU)
2.5x10⁶
2.0x10⁶
1.5x10⁶
1.0x10⁶
5.0x10⁵
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Соединение (нМ)

ФИГУРА 63


log EC50 (M)
-6
-7
-8
-9
-10
Cmpd 170
Cmpd 171
Cmpd 172
Cmpd 173
Cmpd 174
Cmpd 175
PEG-Cmpd 2
Cmpd 176
Cmpd 177
Cmpd 178
Cmpd 179
Cmpd 180
Cmpd 181

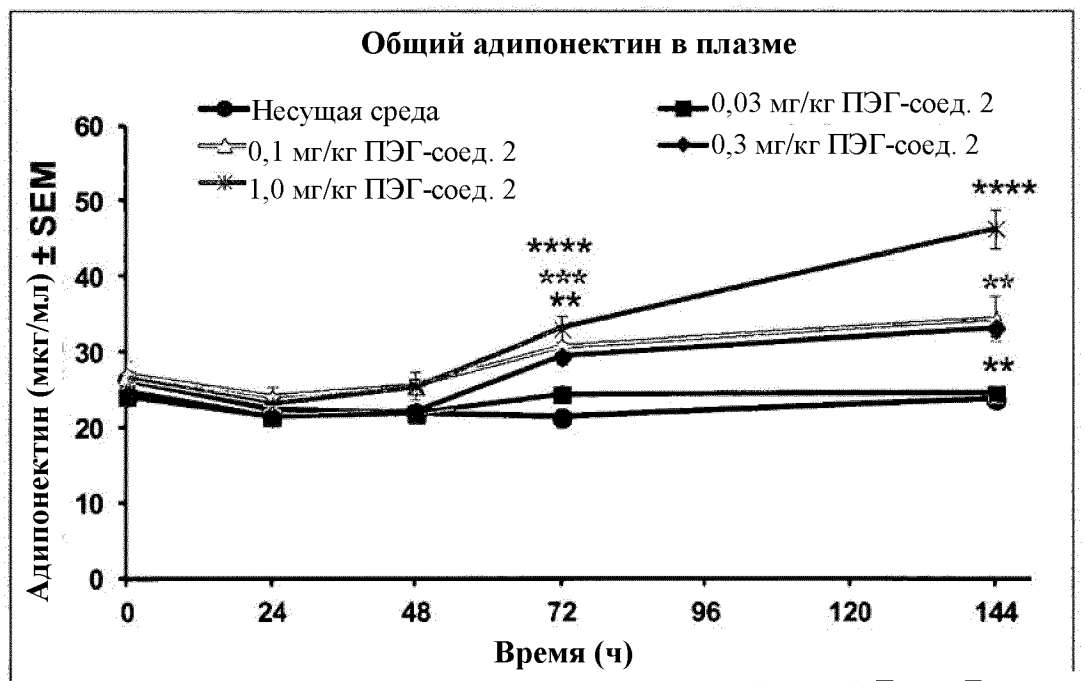
ФИГУРА 64

ФИГУРА 65



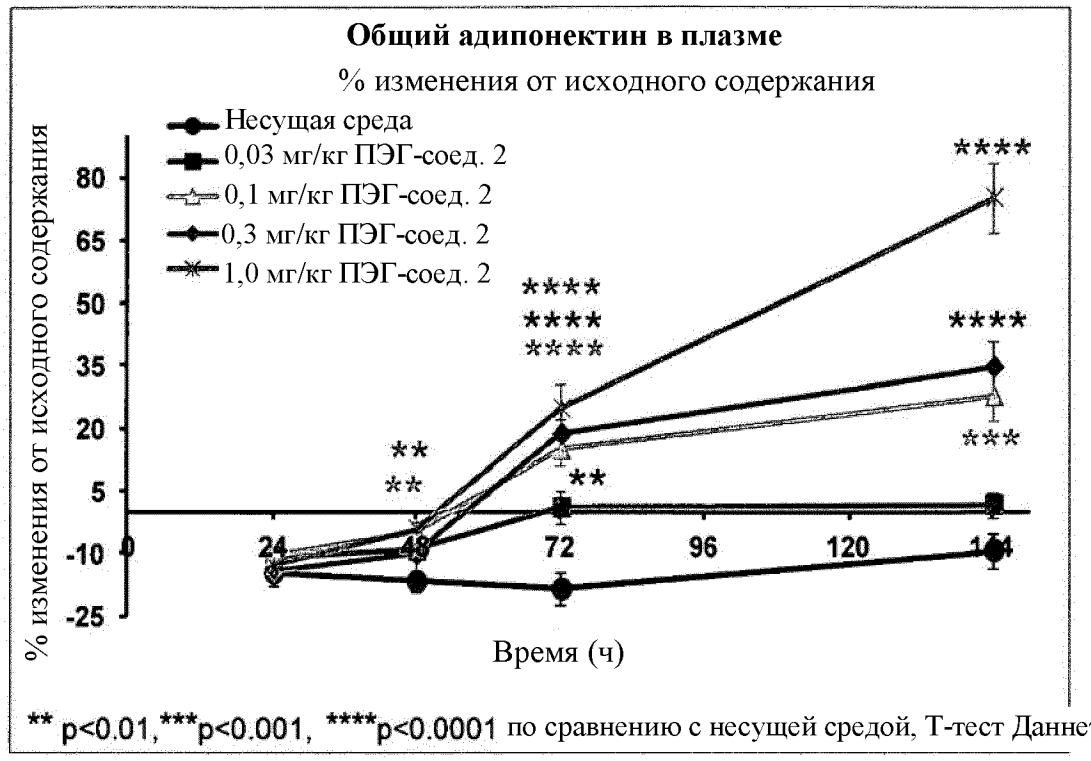
* p<0.05,*** p<0.0005, **** p<0.0001 по сравнению с несущей средой, Т-тест Даннетта

ФИГУРА 66А



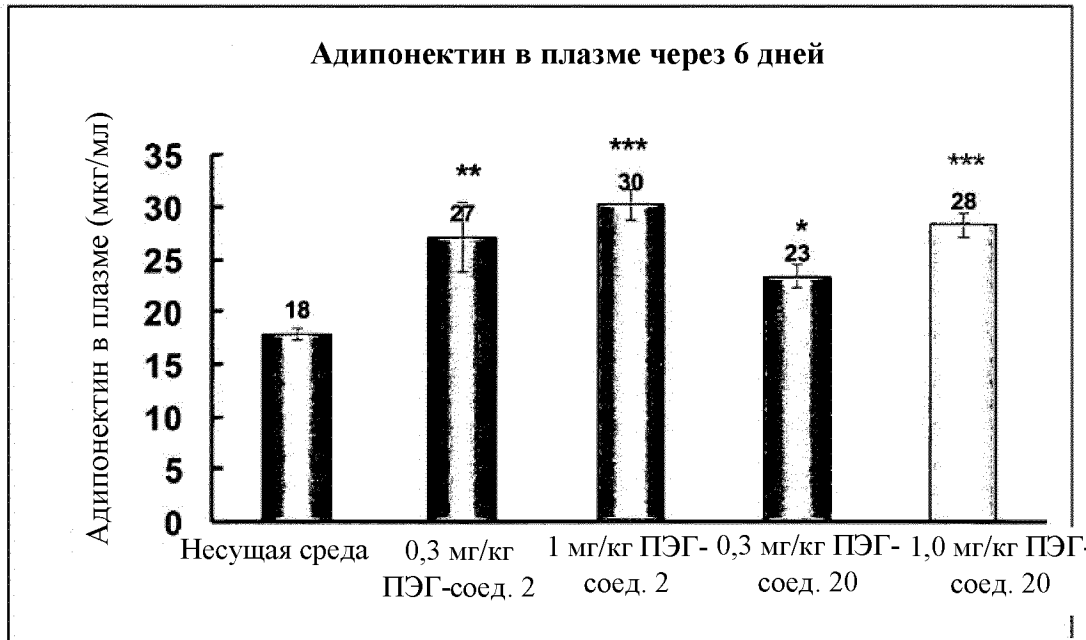
**p<0.01, *** p<0.001, ****p<0.0001 по сравнению с несущей средой, Т-тест Даннетта

ФИГУРА 66B



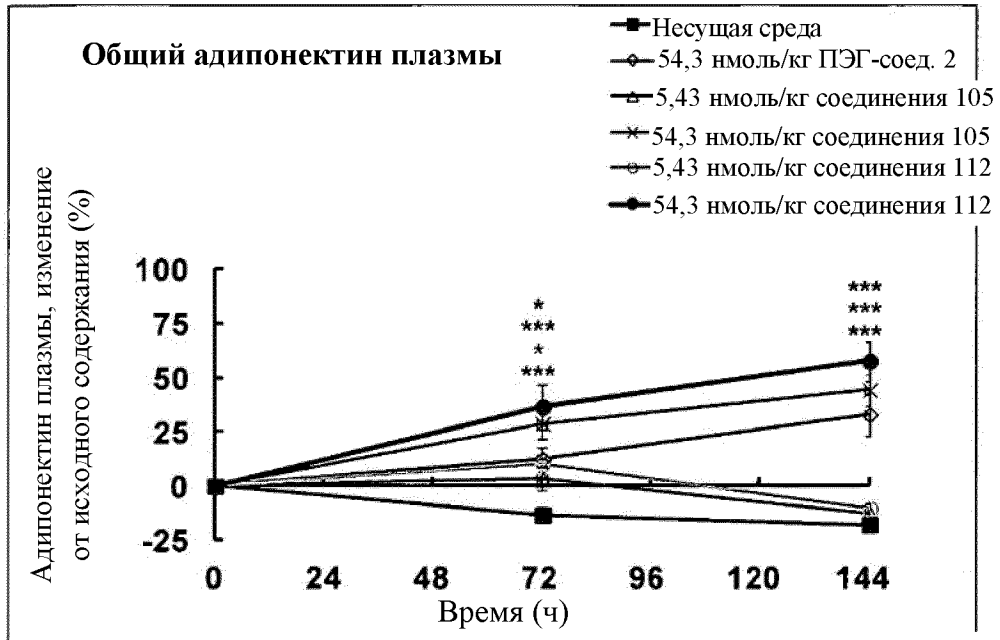
** p<0.01,***p<0.001, ****p<0.0001 по сравнению с несущей средой, Т-тест Даннетта

ФИГУРА 67A



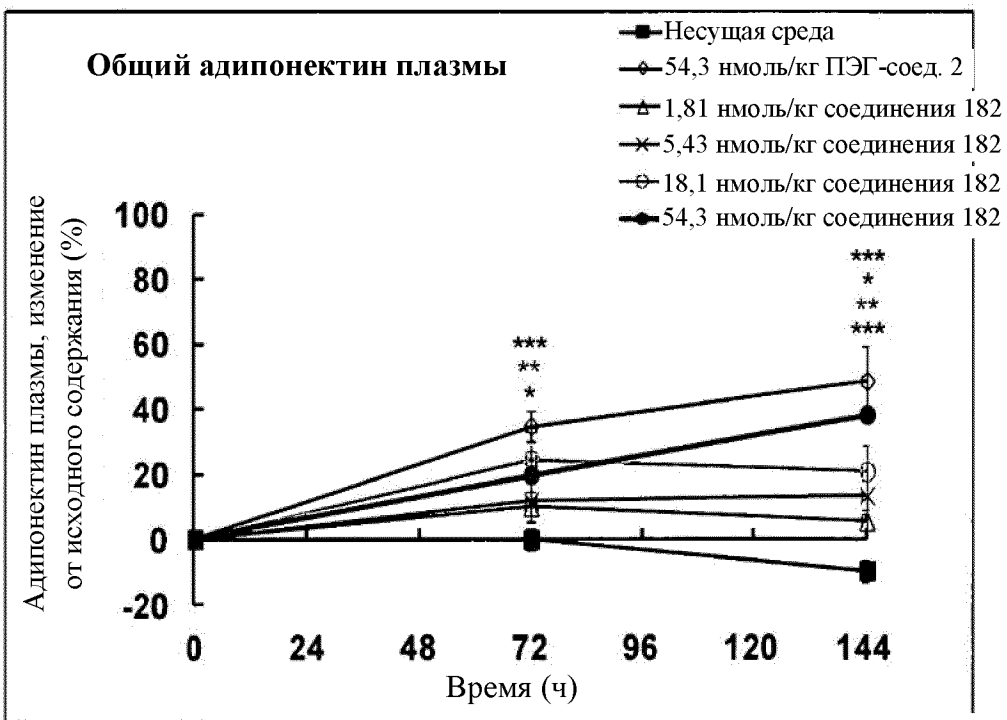
* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 по сравнению с несущей средой, (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 67B



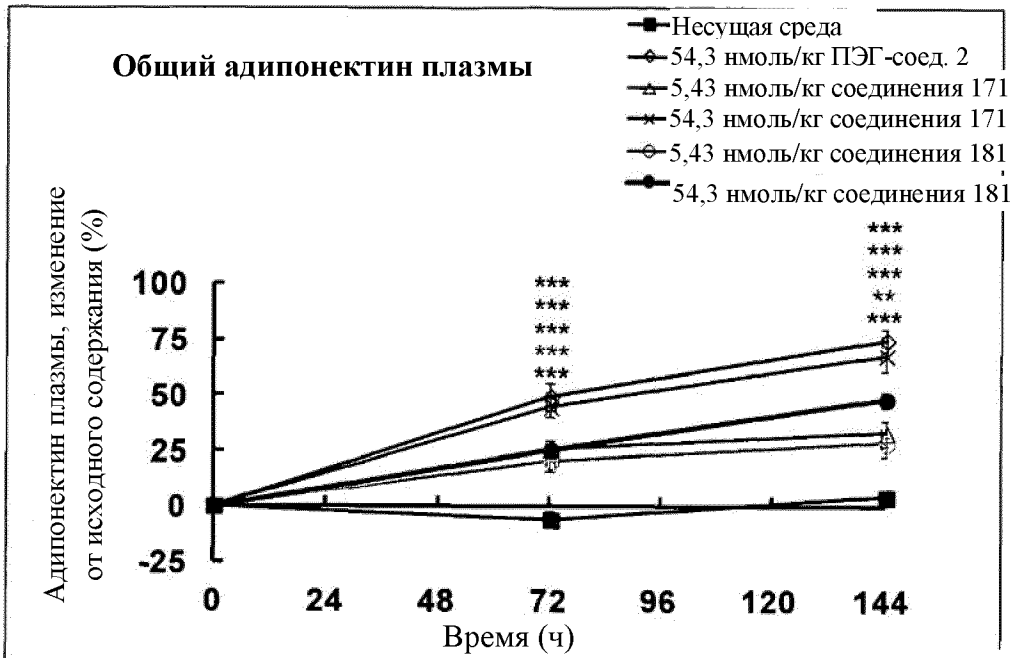
* p<0.05, *** p<0.001 по сравнению с несущей средой, (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 67C



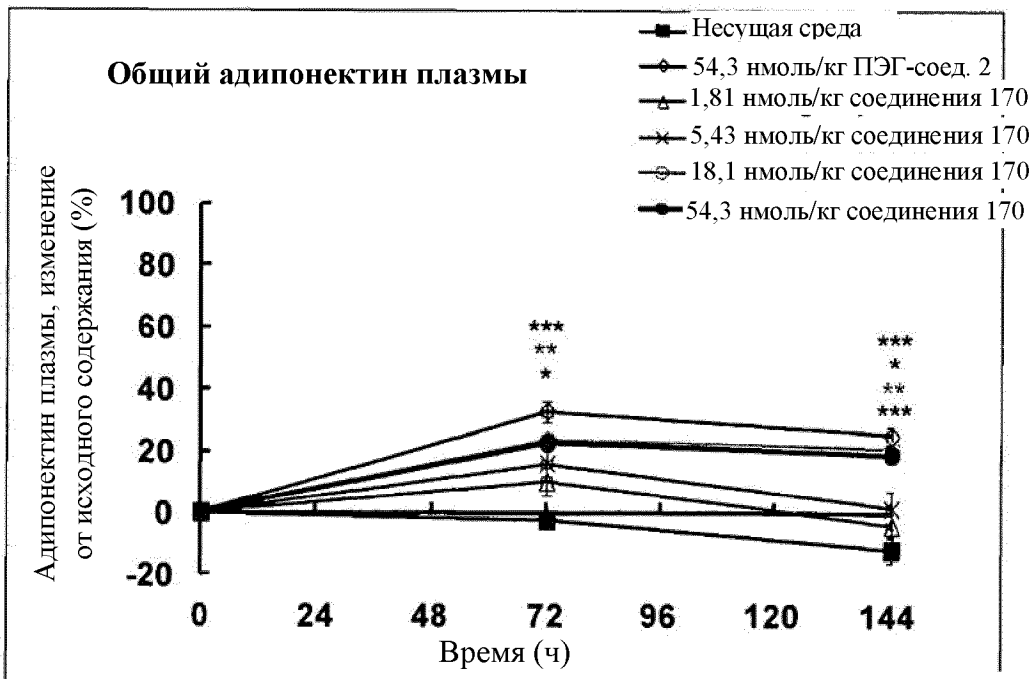
* p<0.05, *** p<0.001 по сравнению с несущей средой, (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 67D



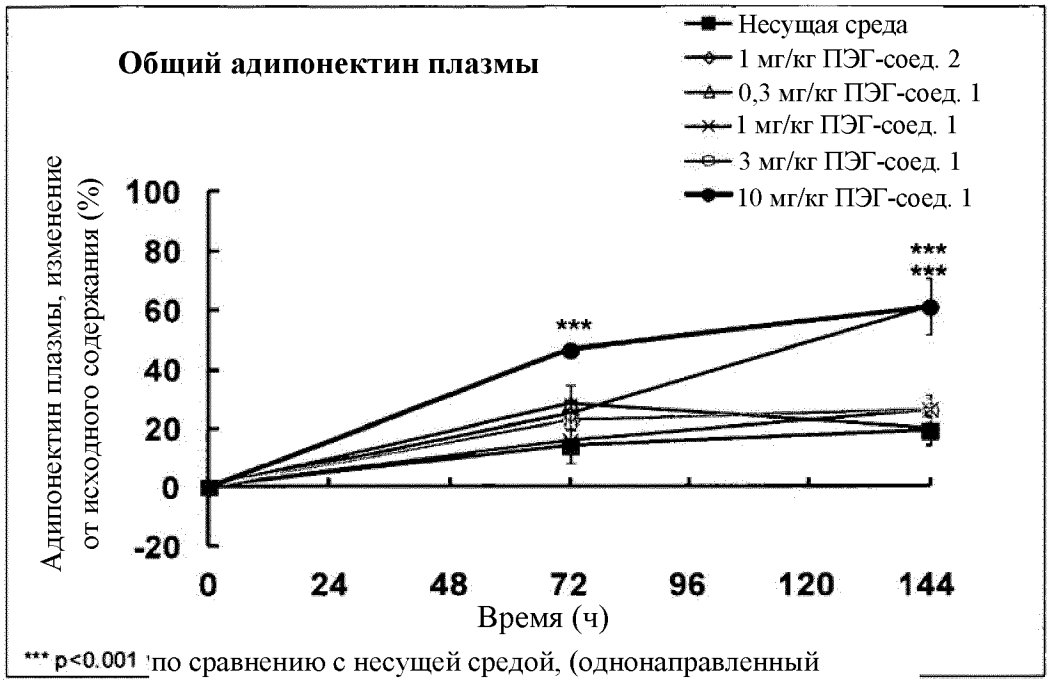
** p<0.01, *** p<0.001 по сравнению с несущеи средой, (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

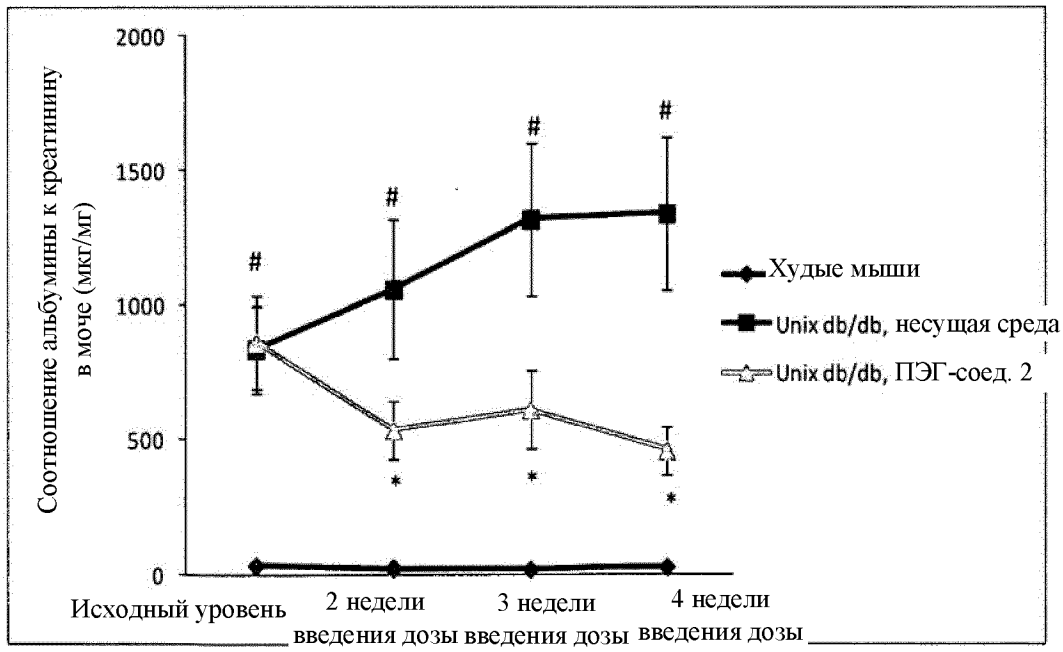
ФИГУРА 67E



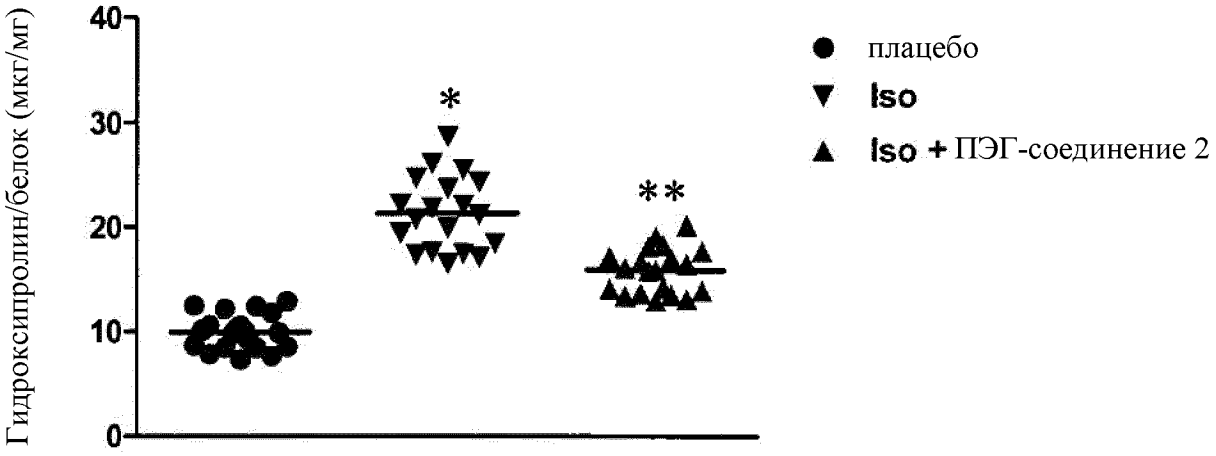
* p<0.05, *** p<0.001 по сравнению с несущей средой, (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

ФИГУРА 67F



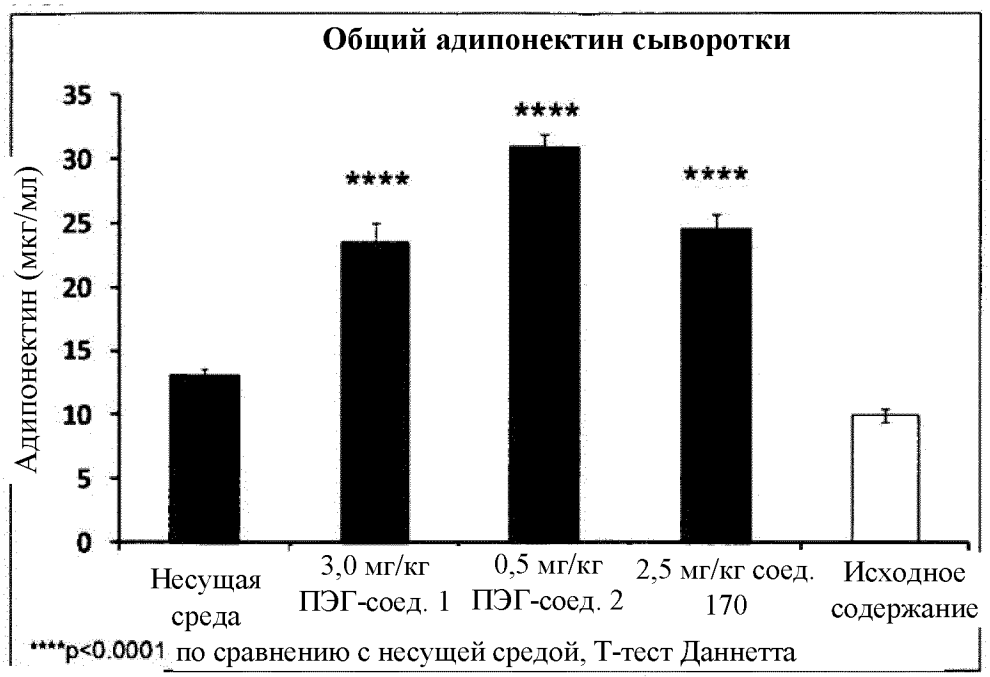


ФИГУРА 68

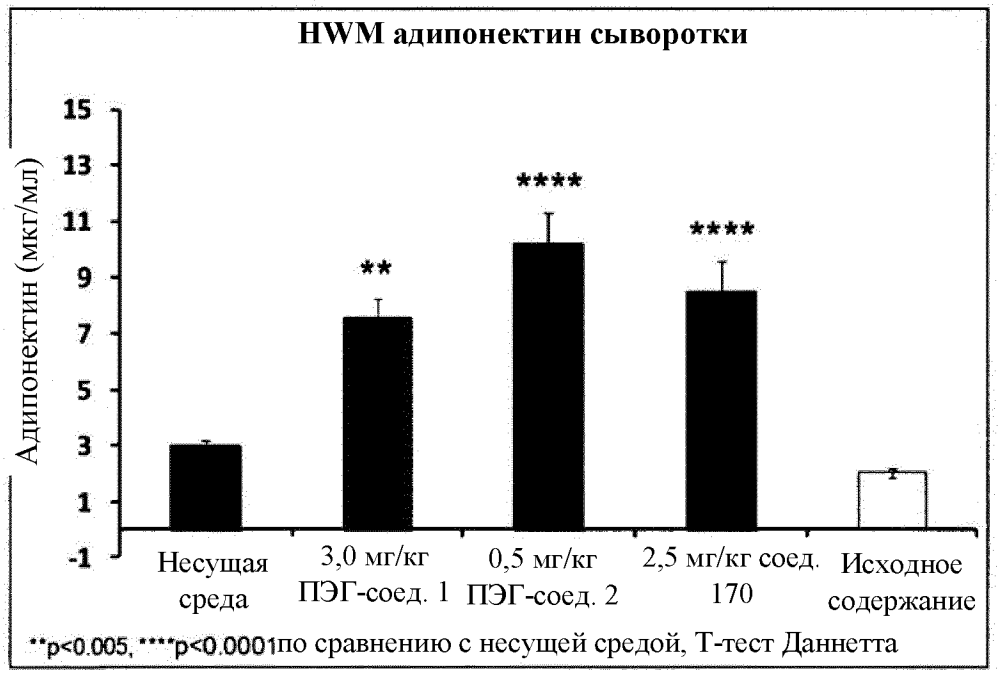

Гидроксипролин/белок (мкг/мг)
40
30
20
10
0
*
**
плацебо
Iso
Iso + ПЭГ-соединение 2

ФИГУРА 69

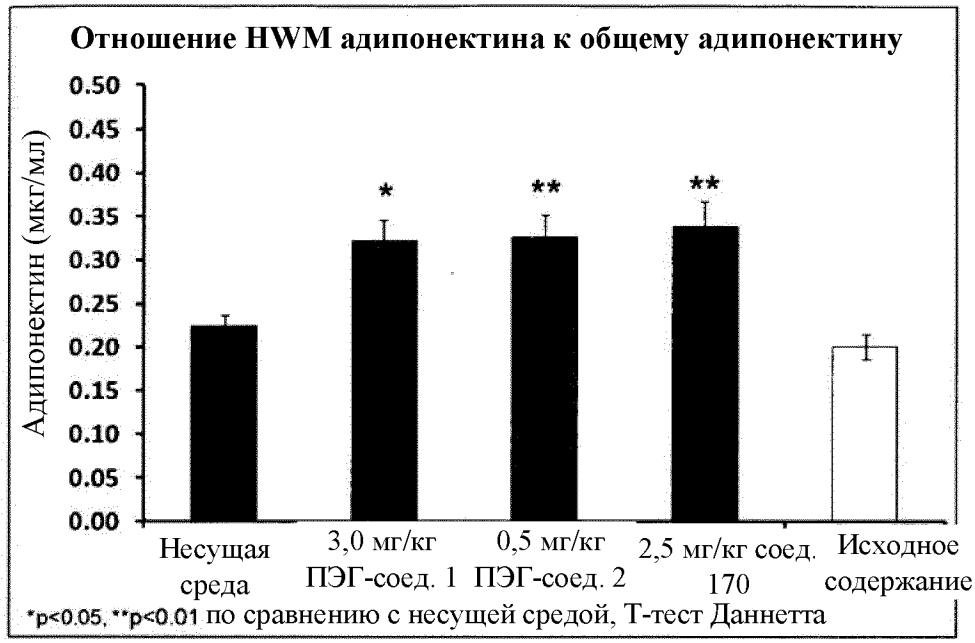
ФИГУРА 70A



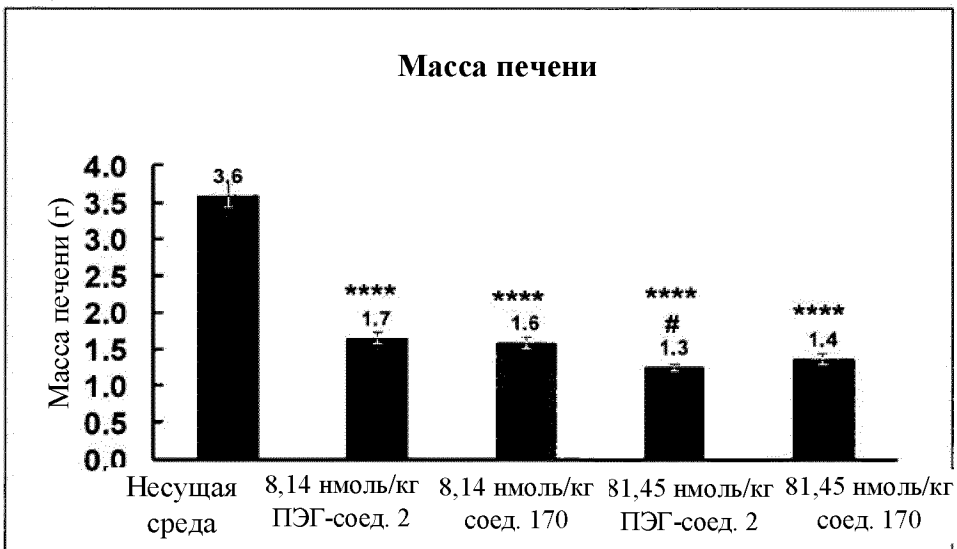
ФИГУРА 70B



ФИГУРА 70C



ФИГУРА 71A



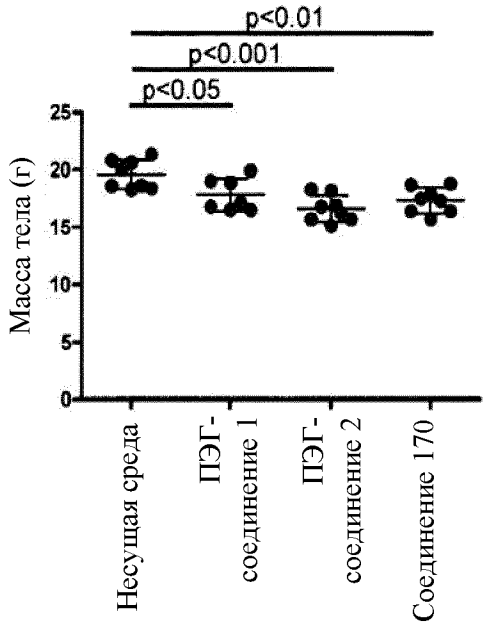
**** p <0,0001 по сравнению с несущей средой, (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

# p <0,05 по сравнению с более низкой дозой того же соединения (критерий Тьюки-Крамера)

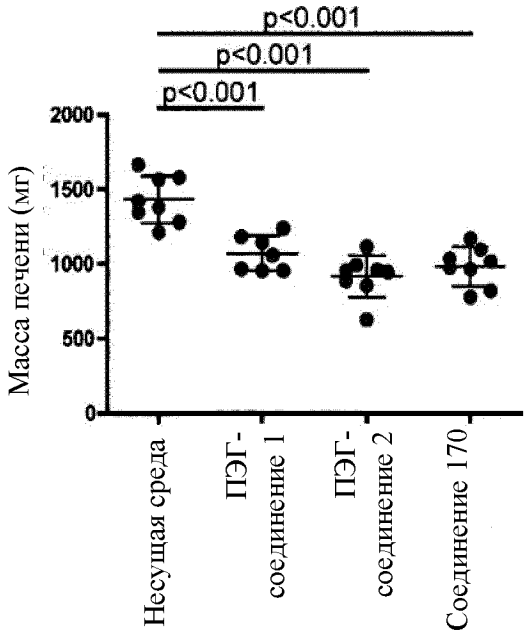
ФИГУРА 71B

****p<0.0001 по сравнению с несущей средой, (однонаправленный дисперсионный анализ, за которым следует тест Даннетта)

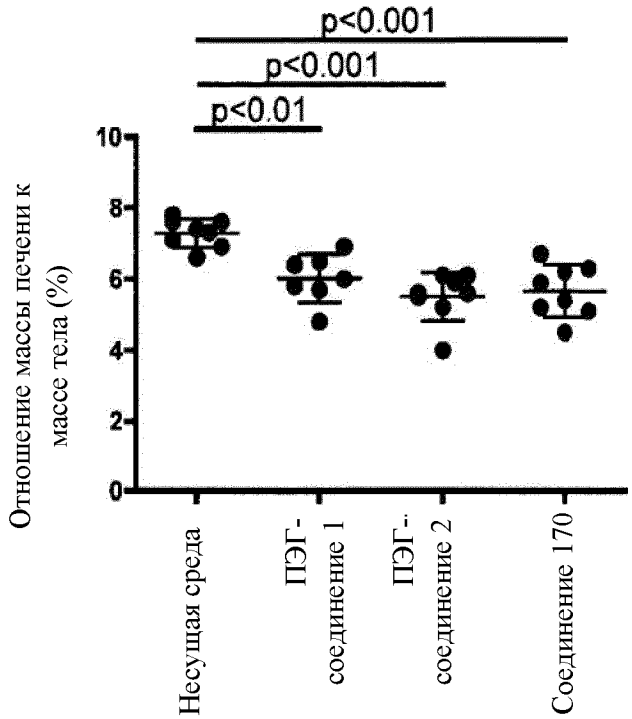
ФИГУРА 72A



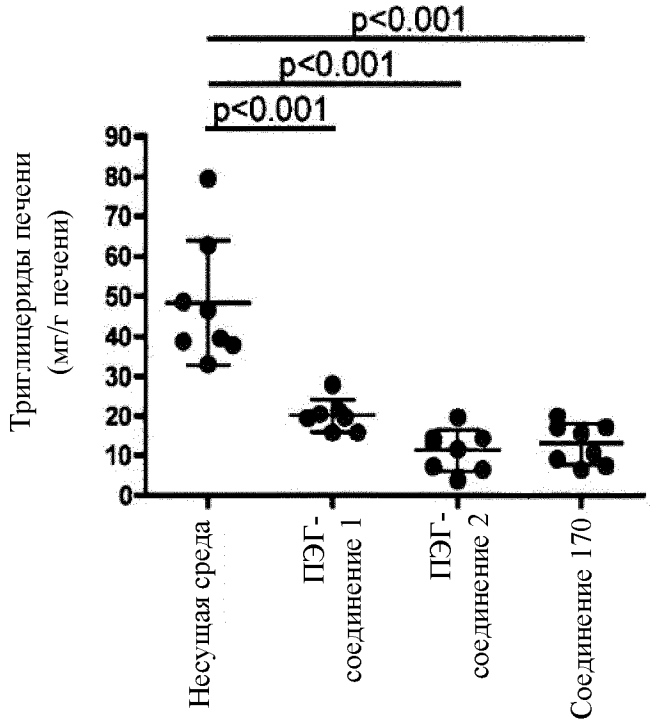
ФИГУРА 72B



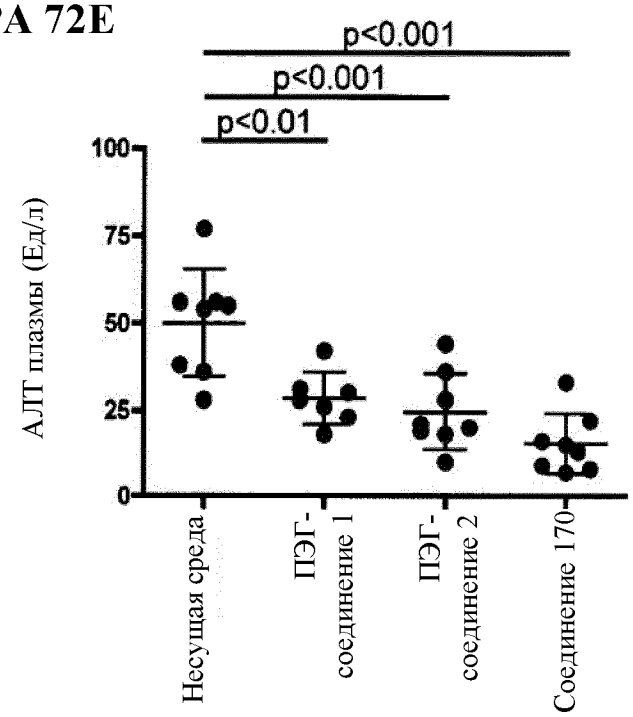
ФИГУРА 72C



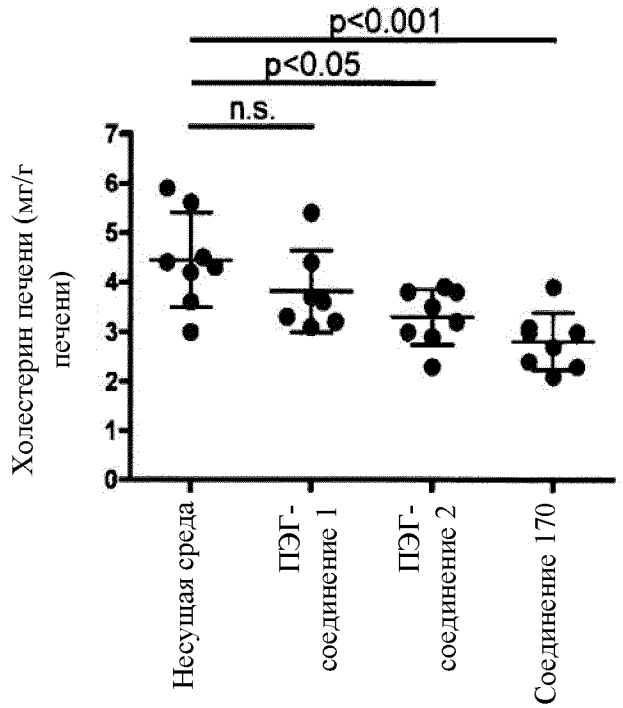
ФИГУРА 72D



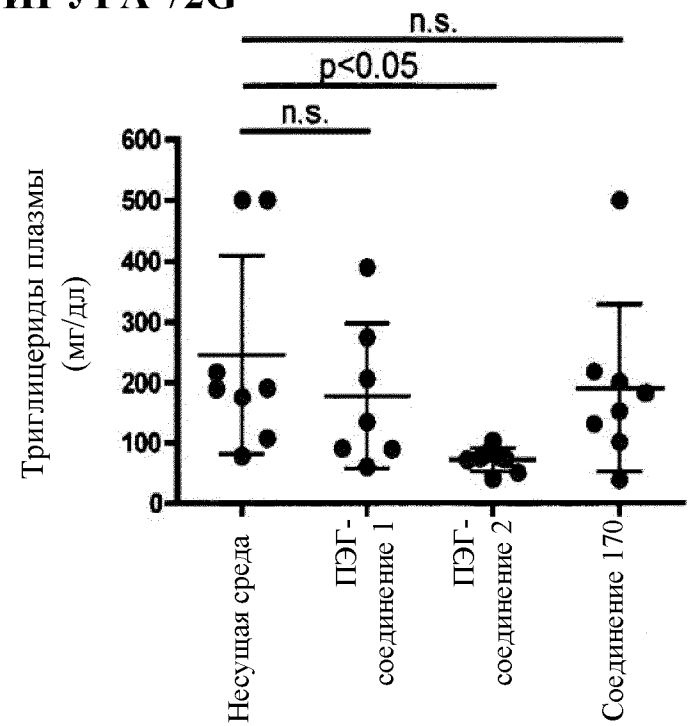
ФИГУРА 72E



ФИГУРА 72F



ФИГУРА 72G


n.s.
p<0.05
n.s.
Триглицериды плазмы (мг/дл)
600
500
400
300
200
100
0
Несущая среда
ПЭГ-соединение 1
ПЭГ-соединение 2
Соединение 170