

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092419** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.02.05

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.08

(54) **СЛИТЫЕ БЕЛКИ РОСТОВОГО ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ 15**

(31) **62/655,108**

(32) **2018.04.09**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/026369**

(87) **WO 2019/199685 2019.10.17**

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Сюн Юймэй, Уокер Кеннет Уилльям,
Вениант Эллисон Мюриэль Мари
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе представлены молекулы GDF15. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 представляет собой слитую молекулу GDF15-Fc, в которой область GDF15 слита с Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 слита с Fc-областью посредством линкера. Также в данном документе представлены способы получения и применения молекул GDF15.

202092419
A1

202092419

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565197EA/022

СЛИТЫЕ БЕЛКИ РОСТОВОГО ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ 15 РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/655108, поданной 9 апреля 2018 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием A-2239-WO-РСТ_SeqList_ST25.txt, созданного 15 марта 2019 года, размер которого составляет 109 КБ. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к молекулам GDF15, таким как слитые белки GDF15, их композициям и способам получения и применения таких белков.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ростовой фактор дифференцировки 15 (GDF15), также называемый цитокином, ингибирующим макрофаги 1 (MIC1) (Bootcov MR, 1997, Proc Natl Acad Sci 94:11514-9), костным морфогенетическим фактором плацентарного животного (PLAB) (Hromas R 1997, Biochim Biophys Acta. 1354:40-4), трансформирующим ростовым фактором бета плацентарного животного (PTGFB) (Lawton LN 1997, Gene. 203:17-26), фактором предстательной железы (PDF) (Paralkar VM 1998, J Biol Chem. 273:13760-7) и геном, активируемым нестероидными противовоспалительными препаратами (NAG-1) (Baek SJ 2001, J Biol Chem. 276: 33384-92), представляет собой секретируемый белок, который циркулирует в плазме крови в виде гомодимера ~25 кДа. GDF15 связывается с α -подобным рецептором семейства GDNF (GFRAL) с высокой аффинностью. Считается, что индуцированная GDF15 сигнальная система клетки требует взаимодействия GFRAL с корецептором RET.

GDF15 был связан с множеством видов биологической активности. Было показано, что повышенный уровень GDF15 коррелирует с потерей веса, а введение GDF15 снижает потребление пищи и вес тела. Соответственно, существует потребность в эффективных молекулах GDF15, которые можно вводить в качестве терапевтического средства. В настоящем изобретении предусмотрены молекулы GDF15, которые соответствуют данной необходимости и предусматривают связанные преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе представлены молекулы GDF15, способы получения молекул и способы применения молекул. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 представляет собой слитый белок GDF15-Fc. Слитый белок может содержать область GDF15, присоединенную к Fc-области. В некоторых вариантах осуществления область

GDF15 присоединена к Fc посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 и по меньшей мере одну мутацию, такую как мутация, затрагивающая аспарагин в положении 3 (N3), мутация аспартата в положении 5 (D5) или мутации аспарагина в положении 3 и аспартата в положении 5. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит мутацию по типу замены аспартата в положении 5 на глутамат (D5E). В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит мутацию по типу замены аспарагина в положении 3 на глутамин (N3Q), например, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14. В еще одних вариантах осуществления область GDF15 содержит мутации как N3Q, так и D5E. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит линкер, который представляет собой линкер G4S (SEQ ID NO: 19) или G4Q (SEQ ID NO: 24), такой как линкер (G4S)_n или (G4Q)_n, где n больше 0. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит линкер, который представляет собой линкер G4A (SEQ ID NO: 58), такой как линкер (G4A)_n, где n больше 0. В некоторых вариантах осуществления n равняется 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления n больше 2, например 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, или 58.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc-область, содержащую мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления Fc-область имеет усеченную шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область выбрана из таблицы 3.

В данном документе также предусмотрены димеры и тетрамеры, содержащие описанные в данном документе слитые белки. В одном варианте осуществления димер включает слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 39-57. В некоторых вариантах осуществления слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 или 57, димеризуется с доменом Fc, содержащим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, или 37, как показано в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления димеры образуют тетрамеры. Также представлены способы получения и применения молекул GDF15, раскрытых в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фигуре 1** представлен график, показывающий влияние на вес тела яванских макаков, которым вводили носитель, 3 мг/кг положительного контроля FGF21-Fc, 1,5 мг/кг scFc-GDF15 или 1,5 мг/кг димера FcΔ10(-)-(G4S)₄-GDF15:FcΔ10(+), которые вводили еженедельно в течение шести недель с последующей пятидневной отмывкой.

На **фигуре 2** представлен график, показывающий влияние на уровни триглицеридов у яванских макак, которым вводили носитель, 3 мг/кг положительного контроля FGF21-Fc, 1,5 мг/кг scFc-GDF15 или 1,5 мг/кг димера Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15:Fc Δ 10(+,K), которые вводили еженедельно в течение шести недель с последующей пятидневной отмывкой.

На **фигуре 3** показан профиль Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 после катионного обмена.

На **фигуре 4** показана пептидная карта Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15.

На **фигуре 5** показан график, показывающий влияние на потребление пищи мышцами в зависимости от дозы димеров Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 41 и 32); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D):Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 42 и 32); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K, CC) (SEQ ID NO: 43 и 34); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D):Fc Δ 10(+,K, CC) (SEQ ID NO: 44 и 34) и Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15:Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 39 и 32).

На **фигуре 6** представлен график концентрации в сыворотке крови Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 41); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 43); и Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44) в виде зависимости от времени у мышей.

На **фигуре 7** представлен график, показывающий влияние на вес тела яванских макак, которым вводили носитель, 3 мг/кг положительного контроля FGF21-Fc, 0,5 мг/кг или 3,0 мг/кг Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(Δ 3/D5E):Fc Δ 16(+,K, CC) (SEQ ID NO: 45 и 35), 0,5 мг/кг или 3,0 мг/кг Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K, CC) (SEQ ID NO: 46 и 35) или 0,5 мг/кг или 3,0 мг/кг Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K) (SEQ ID NO: 47 и 36), которые вводили еженедельно в течение четырех недель с последующей пятидневной отмывкой.

На **фигуре 8** представлен график, показывающий влияние на вес тела яванских макак, которым вводили носитель, 1,5 мг/кг Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15:Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 39 и 32), 1,5 мг/кг Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q):Fc Δ 16(+,K) (SEQ ID NO: 49 и 36); 1,5 мг/кг Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K) (SEQ ID NO: 50 и 36), 1,5 мг/кг Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K) (SEQ ID NO: 54 и 36) или 1,5 мг/кг Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A) (SEQ ID NO: 57 и 37), которые вводили еженедельно в течение двух недель.

На **фигуре 9** представлен график зависимости потребления пищи от вводимой дозы у мышей линии ob/ob, которым вводили Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K) (SEQ ID NO: 50 и 36).

На **фигуре 10** представлен график зависимости потребления пищи от вводимой дозы у мышей линии ob/ob, которым вводили Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A) (SEQ ID NO: 57 и 37).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе представлены молекулы GDF15, способы получения молекул и способы применения молекул. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 представляет собой слитый белок GDF15-Fc. Слитый белок может содержать область GDF15, присоединенную к Fc-области. В некоторых вариантах осуществления область

GDF15 присоединена к Fc посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит GDF15 дикого типа. И человеческий, и мышинный GDF15 имеют сигнальный пептид и продомен. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого GDF15 представляет собой:

```
atgccccgggc aagaactcag gacggtgaat ggctctcaga tgctcctggt gttgctgggt ctctcgtggc tgccgcatgg
gggcccctg tctctggccg aggcgagccg cgcaagttc cggggaccct cagagttgca ctccgaagac tccagattcc
gagagtgcg gaaacgctac gaggacctgc taaccaggct gcgggccaac cagagctggg aagattcgaa caccgacctc
gtccccggcc ctgcagtccg gatactcagc ccagaagtgc ggctgggata cggcggccac ctgcacctgc gtatctctcg
ggccgccctt cccgaggggc tccccgaggc ctcccgctt caccgggctc tgttccggtc gtccccgacg gcgtcaaggt
cgtgggacgt gacacgaccg ctgcggcgtc agctcagcct tgcaagacc caggcggccg cgctgcacct gcgactgtcg
ccggcgccgt cgcagtcgga ccaactgctg gcagaatctt cgtccgcaag gccccagctg gagtgcact tgcggccgca
agccgccagg gggcgccgca gagecgtgc gcgcaacggg gaccactgtc cgctcgggcc cggcggttgc tgccgtctgc
acacggtccg cgcgtcgtg gaagacctgg gctgggcca ttgggtgctg tcgccacggg aggtgcaagt gaccatgtgc
atcggcgcgt gcccagcca gttccgggcg gcaaacatgc acgcgcagat caagacgagc ctgcaccgcc tgaagccgca
cacggtgcca ggcacctgct gcgtgcccgc cagctacaat cccatggtgc tcaatcaaaa gaccgacacc ggggtgtcgc
tccagaccta tgatgacttg ttagccaaag actgccactg catatga (SEQ ID NO: 1)
```

Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого GDF15 (308 аминокислот) представляет собой:

```
MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSSELHSEDSRFRE
LRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLP
EASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSA
RPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTV
SLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 2)
```

Нуклеотидная последовательность человеческого GDF15 без его сигнальной последовательности представляет собой:

```
ctgtctctgg ccgagggcag ccgcgcaagt ttccccggac cctcagagtt gactccgaa gactccagat tccgagagtt
gcggaaacgc tacgaggacc tgctaaccag gctcggggcc aaccagagct gggaagattc gaacaccgac ctgctcccgg
cccctgcagt ccggatactc acgccagaag tgcggctggg atccggcggc cacctgcacc tgcgtatctc tcgggcccgc
cttcccaggg ggtccccga ggcctcccgc cttaccggg ctctgttccg gctgtccccg acggcgtaa ggtcgtggga
cgtgacacga ccgctcggc gtcagctcag ccttgcaaga ccccagggc ccgcgctgca cctgcgactg tcggcccgc
cgtcgcagtc ggaccaactg ctggcagaat cttcgtccgc acggccccag ctggagttgc acttgcggcc gcaagcccgc
agggggcgcc gcagagcgcg tgcgcgcaac ggggaccact gtccgctcgg gccccggcgt tgctgccgtc tgcacacggt
ccgcgctcg ctggaagacc tgggtgggc cgattgggtg ctgtcgccac gggaggtgca agtgaccatg tgcacggcg
cgtgcccag ccagttccgg gcggcaaca tgcacgcga gatcaagac agcctgcacc gcctgaagcc cgacacggtg
ccagcgcct gctcgtgcc cccagctac aatccatgg tgctattca aaagaccgac accggggtgt cgctccagac
ctatgatgac ttgttagcca aagactgcca ctgcatatga (SEQ ID NO: 3)
```

Аминокислотная последовательность человеческого GDF15 без сигнальной последовательности из 29 аминокислот (279 аминокислот) представляет собой:

LSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAP
 AVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQ
 LSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCP
 LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH
 RLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 4)

Нуклеотидная последовательность человеческого GDF15 без его сигнального пептида или продомена представляет собой:

gcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggccccggcggtgctgccgtctgcacacggctccgcgctcgtggaagacctg
 ggctgggccgattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgcgtcccgagccagttccggcggaacat
 gcacgcgcatcaagacgagcctgcaccgctgaagcccgcacacggtgccagcgcctgtcgtgccccccagctacaatcccatg
 gtgctcattcaaaagaccgacaccgggtgctgctccagacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcatatga (SEQ ID
 NO: 5)

Аминокислотная последовательность человеческого GDF15 без его сигнального пептида или продомена (активный домен GDF15 из 112 аминокислот) представляет собой:

ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFR
 AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
 (SEQ ID NO: 6)

Нуклеотидная последовательность полноразмерного мышинового GDF15 представляет собой:

atgccccgc ccgcgtcca ggcccagcct ccaggcggt ctcaactgag gttcctgctg ttctgctgc tgttctgct
 gctgctgca tggccatgc agggggacgc cctggcaatg cctgaacagc gacctccgg cctgagtc caactcaacg
 ccgacgagct acggggtcgc ttccaggacc tgetgagcgg gctgcatgcc aaccagagcc gagaggactc gaactcagaa
 ccaagtctg acccagctgt ccggatactc agtccagagg tgagattggg gtcccacggc cagctgctac tccgcgtcaa
 ccgggctcgc ctgagtcagg gtctccccga agcctaccgc gtgcaccgag cgtgctcct gctgacgccg acggcccccc
 cctgggacat cactaggccc ctgaagcgtg cgtcagcct ccggggaccc cgtgctccc cattacgct gcgctgacg
 ccgctccgg acctggctat gctgccctct ggcggcacgc agctggaact gcgttacgg gtagccgccg gcagggggcg
 ccgaagcgcg catgcgcacc caagagactc gtgcccactg ggtccggggc gctgctgca cttggagact gtgcaggcaa
 ctctgaaga cttgggctgg agcgactggg tgetgtccc gcgccagctg cagctgagca tgtgctggg cgagtgtccc
 cacctgtatc gctccgcgaa cacgcatgcg cagatcaaag cacgctgca tggcctgcag cctgacaagg tgctgcccc
 gtgctgtgc cctccagct acacccgggt ggtcttatg cacaggacag acagtgtgt gtcactgcag acttatgatg
 acctggtggc ccggggctgc cactgcgctt ga (SEQ ID NO: 7)

Аминокислотная последовательность полноразмерного мышинового GDF15 (303 аминокислоты) представляет собой:

MAPPALQAQPPGGSQRLRFLFLLLLLLLLLSWPSQGDALAMPEQRPSGPESQLNAD
 ELRGRFQDLLSRLHANQSREDSNSEPSDPAVRILSPEVRLGSHGQLLLRVNRASLSQGL
 PEAYRVHRALLLLTPTARPWDITRPLKRALSLRGPRAPALRLRLTPPPDLAMLPSGGTQL
 ELRLRVAAGRGRSAHANPRDSCPLGPGRCHLETVQATLEDLGWSDWVLSRQLQLS
 MCVGECPHLYRSANTHAQIKARLHGLQPKVPAPCCVPSSYTPVVLMMHRTDSGVSLQT
 YDDLVARGCHCA (SEQ ID NO: 8)

Нуклеотидная последовательность мышинового GDF15 без его сигнальной

последовательности представляет собой:

tcgcaggggggacgccctggcaatgcctgaacacgcacccctccggccctgagtcaccaactcaacgccgacgagctacgggggtcgttccaggacctgctgagccggctgcatgccaaccagagccgagaggactcgaactcagaaccaagtctgacctgacctgctccggat actcagtcagaggtgagattgggggtcccacggccagctgctactccgcgtcaaccgggctcgtgagtcagggtctccccgaagccta ccgcgtgcaccgagcgtgctcctgctgacgccgacggccccccctgggacatcactaggccccctgaagcgtgcgctcagcctccgg ggaacccgtgctccccgattacgctgctgacgccgctccggacctggctatgctgccctctggcgacgcagctggaactgcgct tacgggtagccggcaggggggcggcgaagcgcgcatgcgacccaagagactcgtgccactgggtccggggcgctgctgctact tggagactgtgcaggcaactctgaagactgggctggagcactgggtgctgtccccgcgccagctgcagctgagcatgtgctggggc agtgtccccacctgtatcgtccgcgaacacgcagatgagcagcctgcatggcctgcagcctgacaaggtgctgccccgt gctgtgccccctcagctacacccgggtgttcttatgcacaggacagacagtggtgtgctcactgcagacttatgatgacctggtggccccgg gctgccactgcgcttga (SEQ ID NO: 9)

Аминокислотная последовательность мышинового GDF15 без сигнальной последовательности из 32 аминокислот (271 аминокислота) представляет собой:

SQGDALAMPEQRPSGPESQLNADELGRFQDLSRLHANQSREDSNSEPSPDPAV RILSPEVRLGSHGQLLLRVNRSLSQGLPEAYRVHRALLLLTPTARPWDITRPLKRALS LRGPRAPALRLRLTPPPDLAMLPSGGTQLELRLRVAAGRGRSAHAHPRDSCPLGPGRC CHLETVQATLEDLGWSDWVLSRQLQLSMCVGECPHLYRSANTHAQIKARLHGLQPK VPAVCCVPSSYTPVVLHMRTDSGVSLQTYDDLVARGCHCA (SEQ ID NO: 10)

Нуклеотидная последовательность мышинового GDF15 без его сигнальной последовательности или продомена представляет собой:

agcgcgcatgcgcacccaagagactcgtgccactgggtccggggcgctgctgctcacttgagactgtgcaggcaactcttga agactgggctggagcagctgggtgctgtccccgcgccagctgcagctgagcatgtgctggggcgagtgccccacctgtatcgtccgc gaacacgcagatgagcagatcaaagcagcctgcatggcctgcagcctgacaaggtgctgccccgtgctgtgccccctcagctacacccc ggtgttcttatgcacaggacagacagtggtgtgctcactgcagacttatgatgacctggtggccccgggctgccactgcgcttga (SEQ ID NO: 11)

Аминокислотная последовательность мышинового GDF15 без его сигнального пептида или продомена (активный домен из 115 аминокислот) представляет собой:

SAHAHPRDSCPLGPGRCCHLETVQATLEDLGWSDWVLSRQLQLSMCVGECPH LYRSANTHAQIKARLHGLQPKVPAVCCVPSSYTPVVLHMRTDSGVSLQTYDDLVARG CHCA (SEQ ID NO: 12)

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит область GDF15, которая содержит активный домен GDF15, например, GDF15 без его сигнального пептида или продомена. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или 12. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит последовательность GDF15 с одной или несколькими мутациями, такими как по меньшей мере одна мутация в активном домене GDF15. В конкретных вариантах осуществления мутация или мутации не снижают и не устраняют активность GDF15. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит мутацию в активном домене человеческого GDF15. В одном варианте осуществления мутация представляет собой делецию первых трех аминокислот активного

домена, такого как "GDF15(Δ 3)", который является активным доменом человеческого GDF15, в котором удалены первые три аминокислоты (т.е., SEQ ID NO : 13).

В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит мутацию, затрагивающую аспарагин в положении 3 (N3) активного домена человеческого GDF15 (SEQ ID NO: 6). Мутация N3 может относиться к мутации остатка аспарагина в положении 3 под SEQ ID NO: 6 или мутации остатка аспарагина, соответствующего аспарагину в положении 3 под SEQ ID NO: 6 в аминокислотной последовательности GDF15. В некоторых вариантах осуществления аспарагин в положении 3 мутирован с заменой на глутамин (N3Q) или аспартат (N3D). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит область GDF15 GDF15(N3Q), которая имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14. В других вариантах осуществления молекула GDF15 содержит область GDF15 GDF15(N3D), которая имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления область GDF15 содержит мутацию аспартата в положении 5 (D5) активного домена человеческого GDF15 (SEQ ID NO: 6). Мутация D5 может относиться к мутации остатка аспартата в положении 5 под SEQ ID NO: 6 или мутации остатка аспартата, соответствующего аспартату в положении 5 под SEQ ID NO: 6 в аминокислотной последовательности GDF15. В одном варианте осуществления аспартат в положении 5 мутирован с заменой на глутамат (D5E). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит область GDF15 GDF15(D5E), которая имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

В других вариантах осуществления область GDF15 включает комбинацию мутаций, такую как комбинация мутаций Δ 3 и D5, например, GDF15(Δ 3/D5E) (SEQ ID NO: 17), или комбинацию мутаций N3 и D5, например, GDF15(N3D/D5E) или GDF15(N3Q/D5E). В область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

В таблице 1 приведены примеры областей GDF15, которые можно использовать в молекулах GDF15.

Таблица 1 - Области GDF15

SEQ ID NO:	Обозначение	Последовательность
6	GDF15	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
13	GDF15(Δ 3)	GDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

		<i>Первые три аминокислоты на N-конце последовательности GDF15 (SEQ ID NO: 6) удалены в этой области GDF15.</i>
14	GDF15(N3Q)	AR Q GDHCPLGPGRCCRLHTV R ASLEDLGWADWVLSP REVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTD T GVSLQTYDDLLAKDCH CI <i>Подчеркнутый и выделенный жирным остаток представляет собой мутацию N3Q.</i>
15	GDF15(N3D)	AR D GDHCPLGPGRCCRLHTV R ASLEDLGWADWVLSP REVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTD T GVSLQTYDDLLAKDCH CI <i>Подчеркнутый и выделенный жирным остаток представляет собой мутацию N3D.</i>
16	GDF15(D5E)	AR N GEHCPLGPGRCCRLHTV R ASLEDLGWADWVLSP REVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTD T GVSLQTYDDLLAKDCH CI <i>Подчеркнутый и выделенный жирным остаток представляет собой мутацию D5E.</i>
17	GDF15(Δ 3/D5E)	GEHCPLGPGRCCRLHTV R ASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAP CCVPASYNPMVLIQKTD T GVSLQTYDDLLAKDCHCI <i>Первые три аминокислоты на N-конце последовательности GDF15 (SEQ ID NO: 6) удалены в данной области GDF15; подчеркнутый и жирный остаток представляет собой мутацию D5E (положение относительно последовательности GDF15 дикого типа под SEQ ID NO: 6).</i>
18	GDF15(N3Q/D5E)	AR Q GEHCPLGPGRCCRLHTV R ASLEDLGWADWVLSP REVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKTD T GVSLQTYDDLLAKDCH CI <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатки</i>

		<i>представляют собой мутации N3Q и D5E.</i>
--	--	--

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 непосредственно слита с Fc. В других вариантах осуществления Fc слита с молекулой GDF15 посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер включает линкер G4S (SEQ ID NO: 19). В других вариантах осуществления линкер включает линкер G4Q (SEQ ID NO: 24). В других вариантах осуществления линкер включает линкер G4A (SEQ ID NO: 58). Линкер может быть линкером (G4S)_n или (G4Q)_n, где n больше 0. Линкер может быть линкером (G4A)_n, где n больше 0. В некоторых вариантах осуществления n равняется 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления n больше или равняется 2, а именно 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, или 58, как показано в таблице 2.

Таблица 2 - Линкеры

SEQ ID NO:	Обозначение	Последовательность
19	G4S	GGGGS
20	(G4S)2	GGGGSGGGGS
21	(G4S)4	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
22	(G4S)8	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
23	G4	GGGG
24	G4Q	GGGGQ
25	(G4Q)4	GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ
58	G4A	GGGGA

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит Fc-область. Fc-область может включать или быть полученной из домена Fc тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления Fc-область может включать Fc-домен с мутацией, такой как мутация по типу замены пары заряженных аминокислот, мутация в сайте гликозилирования или включение неприродной аминокислоты. Fc-область может быть получена из константного домена человеческого IgG IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит константный домен тяжелой цепи IgA, IgD, IgE и IgM.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит Fc-домен с мутацией по типу замены пары заряженных аминокислот. Путем введения мутации, приводящей к появлению заряда в Fc-области, молекула GDF15 может димеризоваться с соответствующей молекулой Fc, имеющей противоположный заряд. Например, мутация по типу замены аспартата на лизин (E356K, где 356 представляет собой положение согласно нумерации EU и соответствует положениям, указанным в таблицах 3-5) и мутация по типу замены глутамата на лизин (D399K, где 399 представляет собой

положение согласно нумерации EU и соответствует положениям, указанным в таблицах 3-5) может быть введена в Fc-область, которая присоединена к области GDF15, необязательно посредством линкера, что приводит к появлению положительного заряда в Fc-области молекулы GDF15. Мутации по типу замены лизина на аспартат (K392D, K409D; где 392 и 409 представляют собой положения согласно нумерации EU и соответствуют положениям, указанным в таблицах 3-5) могут быть введены в домен Fc отдельной молекулы, что приводит к появлению отрицательного заряда на молекуле Fc. Остатки аспартата отрицательно заряженной молекулы Fc могут связываться с остатками лизина положительно заряженной Fc-области молекулы GDF15 посредством электростатической силы, облегчая образование гетеродимеров Fc между Fc-областью молекулы GDF15 и молекулой Fc, при этом уменьшая или предотвращая образование гомодимеров Fc между областями Fc молекул GDF15 или между молекулами Fc.

В некоторых вариантах осуществления одна или более мутации по типу замены лизина на аспартат (K392D, K409D) вводят в Fc-область, которая присоединена к области GDF15, необязательно посредством линкера, а мутацию по типу замены аспартата на лизин (E356K) и глутамата на лизин (D399K) вводят в домен Fc другой молекулы. Остатки аспартата в Fc-области молекулы GDF15 могут связываться с остатками лизина молекулы Fc за счет электростатической силы, облегчая образование гетеродимеров Fc между Fc-областью молекулы GDF15 и Fc молекулой, и уменьшая или предотвращая образование гомодимеров Fc между Fc-областями молекул GDF15 или между молекулами Fc.

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит Fc-область, содержащую Fc-домен с мутацией в шарнирной области. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит делецию в шарнирной области. В некоторых вариантах осуществления удалены десять аминокислот из шарнирной области, например, Fc Δ 10. В других вариантах осуществления из шарнирной области удалены шестнадцать аминокислот, например, Fc Δ 16. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит делецию в шарнирной области (например, Fc Δ 10 или Fc Δ 16) и мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот, в результате чего Fc-домен имеет положительный или отрицательный заряд. Например, Fc-домен может содержать делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутации по типу замены лизина на аспартат (K392D, K409D), например, Fc Δ 10(-). В другом варианте осуществления Fc-домен может содержать делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены аспартата на лизин (E356K), и мутацию по типу замены глутамата на лизин (D399K), например, Fc Δ 10(+). В другом варианте осуществления Fc-домен может содержать делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области и мутации по типу замены лизина на аспартат (K392D, K409D), например, Fc Δ 16(-). В другом варианте осуществления Fc-домен может содержать делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены аспартата на лизин (E356K), и мутацию по типу замены глутамата на лизин (D399K), например, Fc Δ 16(+).

В некоторых вариантах осуществления молекула Fc, содержащий делецию в шарнирной области и мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот, гетеродимеризуется с такой молекулой GDF15. Например, молекула Fc может иметь делецию в шарнирной области и мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот, которая дополняет делецию в шарнирной области и мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот Fc-области молекулы GDF15. Например, молекула Fc может включать Fc-домен с делецией десяти аминокислот в шарнире и мутации по типу замены лизина на аспартат (K392D, K409D), например, Fc Δ 10(-), который необязательно может содержать С-концевой лизин (например, Fc Δ 10(-, K)). Молекула Fc может гетеродимеризоваться с молекулой GDF15, которая содержит Fc Δ 10(+). В другом варианте осуществления молекула Fc может содержать делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены аспартата на лизин (E356K), и мутацию по типу замены глутамата на лизин (D399K), например, Fc Δ 10(+), который необязательно может содержать С-концевой лизин (например, Fc Δ 10(+, K)). Молекула Fc может гетеродимеризоваться с молекулой GDF15, которая содержит Fc Δ 10(-). В другом варианте осуществления молекула Fc может содержать делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области и мутации по типу замены лизина на аспартат (K392D, K409D), например, Fc Δ 16(-), который необязательно может содержать С-концевой лизин (например, Fc Δ 16(-, K)). Молекула Fc, которая может гетеродимеризоваться с молекулой GDF15, которая содержит Fc Δ 16(+). В другом варианте осуществления молекула Fc может содержать делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены аспартата на лизин (E356K), и мутацию по типу замены глутамата на лизин (D399K), например, Fc Δ 16(+), который может необязательно содержать С-концевой лизин (например, Fc Δ 16(-, K)). Молекула Fc может гетеродимеризоваться с молекулой GDF15, которая содержит Fc Δ 16(-).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область или молекула Fc включает Fc-домен с мутацией L234A и/или L235A, где 234 и 235 представляют собой положения согласно нумерации EU и соответствуют положениям, указанным в таблицах 3-5. Fc-домен может содержать мутацию L234A, мутацию L235A, мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот, делецию в шарнирной области или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит обе мутации, и L234A, и L235A. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен содержит делецию в шарнирной области, мутацию L234A, мутацию L235A и мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот, например, Fc Δ 10(+, L234A/L235A), Fc Δ 10(-, L234A/L235A), Fc Δ 16(+, L234A/L235A) или Fc Δ 16(-, L234A/L235A). В некоторых вариантах осуществления Fc-домен необязательно содержит С-концевой лизин, например, Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A), Fc Δ 10(-,K, L234A/L235A), Fc Δ 16(+,K, L234A/L235A) или Fc Δ 16(-,K, L234A/L235A).

В некоторых вариантах осуществления Fc-область или молекула Fc включает Fc-домен с "цистеиновым зажимом". Мутация по типу цистеинового зажима включает введение цистеина в Fc-домен в определенном месте посредством мутации так, чтобы при

инкубации с другим Fc-доменом, который также имеет цистеин, введенный в конкретное место посредством мутации, дисульфидная связь (цистеиновый зажим) может быть образован между двумя Fc-доменами (например, между доменом FcΔ16 (+), имеющим мутацию "цистеинового зажима", и доменом FcΔ16(-), имеющим мутацию "цистеинового зажима"). Цистеин может быть введен в домен СНЗ Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления Fc-домен может содержать одну или несколько таких мутаций по типу цистеинового зажима. В одном варианте осуществления цистеиновый зажим обеспечивается введением серина в мутацию цистеина (S354C, где 354 представляет собой положение согласно нумерации EU и соответствует положению, указанному в таблицах 3-5) в первый Fc-домен, и тирозина в мутацию цистеина (Y349C, где 349 представляет собой положение согласно нумерации EU и соответствует положению, указанному в таблицах 3-5) во второй Fc-домен. В одном варианте осуществления молекула GDF15 включает Fc-область, содержащую Fc-домен с цистеиновым зажимом, мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот и делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области (например, GDF15- FcΔ16(-,CC)), и молекулу Fc, включающую Fc-домен, содержащий цистеиновый зажим, мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот и делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области и необязательно С-концевой лизин (например, FcΔ16(+,K, CC)). Цистеиновый зажим может усиливать гетероимеризацию молекулы GDF-Fc с молекулой Fc.

Примеры Fc-областей, которые можно использовать в молекуле GDF15, показаны в таблице 3.

Таблица 3 - Fc-области

SEQ ID NO:	Обозначение	Последовательность
26	FcΔ10(-)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSF FLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>
27	FcΔ10(+)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLV</p>

		<p> KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации E356K и D399K.</i> </p>
28	FcΔ10(-,CC)	<p> APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFL YSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG <i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остаток представляет собой мутацию Y349C; подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i> </p>
29	FcΔ16(-,CC)	<p> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG <i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остаток представляет собой мутацию Y349C; подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i> </p>
30	FcΔ16(-)	<p> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками</i> </p>

		<i>представляют собой мутации K392D и K409D.</i>
31	FcΔ10(- ,L234A/L235A)	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSF FLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные курсивом остатки представляют собой мутации L234A и L235A; подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>

Примеры молекул Fc показаны в таблице 4, в которой С-концевой лизин является необязательным.

Таблица 4 - Молекулы Fc

SEQ ID NO:	Обозначение	Последовательность
32	FcΔ10(+,K)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации E356K и D399K.</i></p>
33	FcΔ10(-,K)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTP PVLDSDGSSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>

34	Fc Δ 10(+,K, CC)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLKS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p><i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остаток представляет собой мутацию S354C; подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации E356K и D399K.</i></p>
35	Fc Δ 16(+,K, CC)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p> <p><i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остаток представляет собой мутацию S354C; подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации E356K и D399K.</i></p>
36	Fc Δ 16(+,K)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации E356K и D399K.</i></p>
37	Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A)	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQ</p>

		<p>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные курсивом остатки представляют собой мутации L234A и L235A; подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации E356K и D399K.</i></p>
--	--	---

Молекулы Fc можно использовать для димеризации с молекулой, содержащей комплементарный Fc-домен. Например, молекула Fc Fc Δ 10(+,K) может димеризоваться с молекулой, содержащей Fc-область, содержащую делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, например, Fc Δ 10(-) (например, молекулой GDF15, содержащей Fc-область Fc Δ 10(-)). Молекула Fc Fc Δ 10(-,K) может димеризоваться с молекулой, содержащей Fc-область, содержащую делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, например, Fc Δ 10(+) (например, молекулой GDF15, содержащей Fc-область Fc Δ 10(+)).

Молекула Fc Fc Δ 10(+,K, CC) может димеризоваться с молекулой, содержащей Fc-область, содержащую делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, например, Fc Δ 10(-,CC) (например, молекулой GDF15, содержащей Fc-область Fc Δ 10(-, CC)). Молекула Fc Fc Δ 16(+,K, CC) может димеризоваться с молекулой, содержащей Fc-область, содержащую делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, например, Fc Δ 16(-, CC) (например, молекулой GDF15, содержащей Fc-область Fc Δ 16(-, CC)). Молекула Fc Fc Δ 16(+,K) может димеризоваться с молекулой, содержащей Fc-область, содержащую делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, например, Fc Δ 16(-) (например, молекулой GDF15, содержащей Fc-область Fc Δ 16(+)). Молекула Fc Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A) может димеризоваться с молекулой, содержащей Fc-область, содержащую делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, например, Fc Δ 10(-,L234A/L235A) (например, молекулой GDF15, содержащей Fc-область Fc Δ 10(-,L234A/L235A)).

Примеры молекул GDF15, которые представляют собой слитые белки GDF15-Fc, показаны в таблице 5.

Таблица 5 - Молекулы GDF15

Слитый белок GDF15-Fc			Компоненты слитого белка GDF15-Fc SEQ ID NO		
SEQ ID NO.	Обозначение	Последовательность	Fc-область	Линкер	Область GDF15
38	scFc-GDF15	GGGERKSSVECPAPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFPYSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSERKSSVECPAPV APPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVL VVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFPYSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGGSGGGGSG GGGGSGGGGSARNGDHCPL GPGRCCLHTVRASLEDLG WADWVLSPREVQVTMCIG	---	---	---

		ACPSQFRAANMHAQIKTSL HRLKPDTVPAPCCVPASYN PMVLIQKTDGTGVSLSLQTYDD LLAKDCHCI			
39	FcΔ10(-)- (G4S)4-GDF15	APELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYDTTPVLDS GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSARNGDHCPL GPGRCRLHTVRASLEDLG WADWVLSPREVQVTMCIG ACPSQFRAANMHAQIKTSL HRLKPDTVPAPCCVPASYN PMVLIQKTDGTGVSLSLQTYDD LLAKDCHCI <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i>	26	21	6
40	FcΔ10(+)-(G4)- GDF15	APELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRKEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE	27	23	6

		<p>SNGQPENNYKTTPPVLKSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTMC IGACPSQFRAANMHAQIKT SLHRLKPDTVPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTY D DLLAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации E356K и D399K.</i></p>			
41	Fc Δ 10(-)- GDF15(Δ 3)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYDTTPPVLDSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGDHCPLGPGR CRLHTVRASLEDLGWADW VLSPREVQVTMCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAPCCVPASYNPMVLI QKTDGTGVSLQTYD DLLAK DCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой</i></p>	26	---	13

		<i>мутации K392D и K409D.</i>			
42	Fc Δ 10(-)- GDF15(N3D)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYDTPPVLDSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGARDGDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTVPAPCCVPASYNP MVLIQKTDGTGVSLQTYDDL LAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>	26	---	15
43	Fc Δ 10(-,CC)- GDF15(Δ 3)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYDTPPVLDSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGDHCPLGPGRC</p>	28	---	13

		<p>CRLHTVRASLEDLGWADW VLSPREVQVTMCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAPCCVPASYNPMVLI QKTDGTGVSLQTYDDLAK DCHCI</p> <p><i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остаток представляет собой мутацию Y349C; подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>			
44	Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D)	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYDTPPVLDSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGARDGDHCPLGP GRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGA CPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPAPCCVPASYNP MVLIQKTDGTGVSLQTYDDL LAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остатки представляет собой</i></p>	28	---	15

		<p><i>мутацию Y349C;</i> <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>			
45	FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGEHCPLGPGRCRLHTVR ASLEDLGWADWVLSPREV QVTMCIGACPSQFRAANM HAQIKTSLHRLKPDTVPAP CCVPASYNPMVLIQKTDTG VSLQTYDDLAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остаток представляет собой мутацию Y349C; подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>	29	---	17
46	FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA</p>	29	---	18

		<p>PIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYD^TTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GARQGEHCPLGPGRCCRLH TVRASLEDLGWADWVLSLSP REVQVTMCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLHRLKPDTVP APCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутый и выделенный курсивом остаток представляет собой мутацию Y349C; подчеркнутые и выделенные жирным остатки представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>			
47	FcΔ16(-)- GDF15(N3Q/D 5E)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYD^TTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GARQGEHCPLGPGRCCRLH TVRASLEDLGWADWVLSLSP REVQVTMCIGACPSQFRAA NMHAQIKTSLHRLKPDTVP</p>	30	---	18

		<p>APCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>			
48	Fc Δ 16(-)- (G4Q)4-GDF15	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGQGGGGQGGGGQG GGGQARNGDHCPLGPGRC CRLHTVRASLEDLGWADW VLSPREVQVTMCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAAPCCVPASYNPMVLI QKTD TGVS LQTYDDLLAK DCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>	30	25	6
49	Fc Δ 16(-)- (G4Q)4- GDF15(N3Q)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT</p>	30	25	14

		<p>LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGQGGGGQGGGGQG GGGQARQGDHCPLGPGRC CRLHTVRASLEDLGWADW VLSPREVQVTCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAPCCVPASYNPMVLI QKTDTGVSLQTYDDLAK DCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>			
50	Fc Δ 16(-)- (G4Q)4- GDF15(N3Q/D 5E)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGQGGGGQGGGGQG GGGQARQGEHCPLGPGRC CRLHTVRASLEDLGWADW VLSPREVQVTCIGACPSQ FRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAPCCVPASYNPMVLI QKTDTGVSLQTYDDLAK</p>	30	25	18

		DCHCI <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i>			
51	Fc Δ 16(-)- (G4S)2- GDF15(N3Q)	GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSARQGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTMC IGACPSQFRAANMHAQIKT SLHRLKPDTVPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDTGVSQTY D DL LAKDCHCI <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i>	30	20	14
52	Fc Δ 16(-)- (G4S)2- GDF15(N3Q/D 5E)	GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE	30	20	18

		<p>NNYDTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSARQGEHC PLGPGRCCRLHTVRASLED LGWADWVLSPREVQVTMC IGACPSQFRAANMHAQIKT SLHRLKPDTVPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTY DDLLAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>			
53	Fc Δ 16(-)-G4S- GDF15(N3Q)	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSARQGDHCPLGPG RCCRLHTVRASLEDLGWA DWVLSPREVQVTMCIGACP SQFRAANMHAQIKTSLHRL KPDTVPAPCCVPASYNPMV LIQKTDGTGVSLQTYDDLLA KDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой</i></p>	30	19	14

		<i>мутации K392D и K409D.</i>			
54	FcΔ16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E)	GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTPPVLDSDGSFFLY SDL TVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSARQGEHCPLGPG RCCRLHTVRASLEDLGWA DWVLSPREVQVTMCIGACP SQFRAANMHAQIKTSLHRL KPDTVPAPCCVPASYNPMV LIQKTDGTGVSLQTYDDLLA KDCHCI <i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i>	30	19	18
55	FcΔ16(-)-GDF15(N3Q)	GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYDTPPVLDSDGSFFLY SDL TVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GARQGDHCPLGPGRCCRL	30	---	14

		<p>HTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRA ANMHAQIKTSLHRLKPDTV PAPCCVPASYNPMVLIQKT DTGVSLQTYDDLAKDCH CI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i></p>			
56	<p>FcΔ10(- ,L234A/L235A) -(G4Q)4- GDF15(N3Q)</p>	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYDTPPVLDSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGGQGGGGQ GGGGQGGGGQARQGDHCP LGPGRCRLHTVRASLEDL GWADWVLSPREVQVTMCI GACPSQFRAANMHAQIKTS LHRLKPDTVPAPCCVPASY NPMVLIQKTDTGVSLLQTYD DLLAKDCHCI</p> <p><i>Подчеркнутые и выделенные курсивом остатками представляют собой мутации L234A и L235A; подчеркнутые и выделенные жирным остатками</i></p>	31	25	14

		<i>представляют собой мутации K392D и K409D.</i>			
57	FcΔ10(- ,L234A/L235A) -(G4Q)4- GDF15(N3Q/D 5E)	<p> APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYDTPPVLDSD GSFFLYSDLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGGQGGGGQ GGGGQGGGGQARQGEHCP LGPGRCRLHTVRASLEDL GWADWVLSPREVQVTMCI GACPSQFRAANMHAQIKTS LHRLKPDTVPAPCCVPASY NPMVLIQKTDGTVSLQTYD DLLAKDCHCI <i>Подчеркнутые и выделенные курсивом остатки представляют собой мутации L234A и L235A; подчеркнутые и выделенные жирным остатками представляют собой мутации K392D и K409D.</i> </p>	31	25	18

В некоторых вариантах осуществления слитый белок представляет собой scFc-GDF15, в котором область GDF15 соединена с двумя Fc-областями. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38. При вычислении процента идентичности последовательности сравниваемые

последовательности выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Компьютерная программа, которую можно использовать для определения процента идентичности, представляет собой пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., (1984) Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, Университет штата Висконсин, Мэдисон, Висконсин). Компьютерный алгоритм GAP могут применять для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("охват совпадения", определяемый алгоритмом). Штраф за открытие гэпа (который рассчитывается как 3х средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали применяемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, присваиваемое каждому идеальному совпадению аминокислоты в соответствии с конкретной матрицей сравнения) и штраф за продление гэпа (который обычно составляет 1/10 часть от штрафа за открытие гэпа), а так же матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62, применяют вместе с данным алгоритмом. В определенных вариантах осуществления в данном алгоритме также применяется стандартная матрица сравнения (см., Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 касательно матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 9:10915-10919 касательно матрицы сравнения BLOSUM 62). Параметры, которые можно применять для определения процента идентичности с помощью программы GAP, следующие:

Алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

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

Штраф за открытие гэпа: 12 (но без штрафа за концевые гэпы)

Штраф за длину гэпа: 4

Пороговое значение степени сходства: 0

Определенные схемы выравнивания, применяемые для выравнивания двух аминокислотных последовательностей, могут приводить к совпадению только короткой области двух последовательностей, и эта небольшая выровненная область может характеризоваться очень высокой идентичностью последовательности даже при отсутствии значительной взаимосвязи между двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, выбранный способ выравнивания (например, программа GAP) при необходимости может быть скорректирован для обеспечения выравнивания, которое охватывает по меньшей мере 50 смежных аминокислот целевого полипептида.

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 представляет собой Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15, Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15, Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(Δ 3/D5E), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15, Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E),

Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q), Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) или Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E).

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, или 57. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется 80-99%, 85-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, или 57. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, или 57. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 90% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, или 57. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, или 57. В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, или 57.

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 представляет собой молекулу Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15, Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15, Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(Δ 3/D5E), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15, Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q), Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) или Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E). В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 представляет собой молекулу Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15, Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15, Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(Δ 3/D5E), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15, Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q), Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) или Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), которая характеризуется 80-99%, 85-99%, 90-99% или 95-99%

идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15.

В некоторых вариантах осуществления молекула GDF15 представляет собой молекулу Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15, Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15, Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3), Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(Δ 3/D5E), Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15, Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-(G4S)2-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q), Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E), Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q), Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) или Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E), которая характеризуется по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15. Например, молекула Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 с 80-99%, 85%-99%, 90-99%, или 95-99% идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15, включает молекулу GDF15 с Fc-областью, которая имеет делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, и характеризуется 80-99%, 85-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 26, и/или областью GDF15, которая характеризуется 80-99%, 85-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 6. Например, молекула Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 с по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15 включает молекулу GDF15 с Fc-областью, которая имеет делецию десяти аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот и характеризуется по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 26, и/или областью GDF15, которая характеризуется 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 6.

В другом примере молекула Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) с 80-99%, 85%-99%, 90-99%, или 95-99% идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15 включает молекулу GDF15 с Fc-областью, которая имеет делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, и которая характеризуется 80-99%, 85%-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 30, и/или областью GDF15, которая характеризуется 80-99%, 85-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 18. В другом примере молекула Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) с по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15 включает молекулу GDF15 с Fc-областью, которая имеет делецию шестнадцати аминокислот в шарнирной области и мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот, которая характеризуется 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 30, и/или областью GDF15, которая характеризуется 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 18.

В еще одном примере молекула Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) с 80-99%, 85%-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15 включает молекулу GDF15 с Fc-областью, которая имеет делецию десяти аминокислот в шарнирной области, мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот и мутации по типу замены лейцина на аланин в положениях 234 и 235, и характеризуется 80-99%, 85-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 31, и/или областью GDF15, которая характеризуется 80-99%, 85-99%, 90-99% или 95-99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 18. В еще одном примере молекула Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) с по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ее Fc-областью и/или областью GDF15 включает молекулу GDF15 с Fc-областью, которая имеет делецию десяти аминокислот в шарнирной области, мутацию по типу замены пары отрицательно заряженных аминокислот и мутации по типу замены лейцина на аланин в положениях 234 и 235, и характеризуется не менее 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 31, и/или областью GDF15, которая характеризуется 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности под SEQ ID NO: 18.

В данном документе также предусмотрены димеры и тетрамеры, содержащие молекулу GDF15, представленную в данном документе. В одном варианте осуществления димер включает слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 39-57. В некоторых вариантах осуществления слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 или 57, димеризуется с молекулой Fc, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, или 37 (где C-концевой лизин является необязательным), как показано в таблице 6. Например, в некоторых вариантах осуществления димер представляет собой Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15: Fc Δ 10(+,K). В другом варианте осуществления димер представляет собой Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q): Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A). В еще одном варианте осуществления димер представляет собой Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q): Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A).

Таблица 6 - Димеры

Слитый белок GDF15-Fc под SEQ ID NO.	Обозначение слитого белка GDF15-Fc	Молекула Fc под SEQ ID NO.	Обозначение соответствующей молекулы Fc
39	Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15	32	Fc Δ 10(+,K)
40	Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15	33	Fc Δ 10(-,K)
41	Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3)	32	Fc Δ 10(+,K)
42	Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D)	32	Fc Δ 10(+,K)

43	FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3)	34	FcΔ10(+,K, CC)
44	FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D)	34	FcΔ10(+,K, CC)
45	FcΔ16(-,CC)- GDF15(Δ3/D5E)	35	FcΔ16(+,K, CC)
46	FcΔ16(-,CC)- GDF15(N3Q/D5E)	35	FcΔ16(+,K, CC)
47	FcΔ16(-)- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
48	FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15	36	FcΔ16(+,K)
49	FcΔ16(-)-(G4Q)4- GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
50	FcΔ16(-)-(G4Q)4- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
51	FcΔ16(-)-(G4S)2- GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
52	FcΔ16(-)-(G4S)2- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
53	FcΔ16(-)-G4S- GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
54	FcΔ16(-)-G4S- GDF15(N3Q/D5E)	36	FcΔ16(+,K)
55	FcΔ16(-)-GDF15(N3Q)	36	FcΔ16(+,K)
56	FcΔ10(-,L234A/L235A)- (G4Q)4-GDF15(N3Q)	37	FcΔ10(+,K, L234A/L235A)
57	FcΔ10(-,L234A/L235A)- (G4Q)4- GDF15(N3Q/D5E)	37	FcΔ10(+,K, L234A/L235A)

В одном варианте осуществления слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39 димеризуется с молекулой Fc, содержащей SEQ ID NO: 32 (необязательно С-концевой лизин). В другом варианте осуществления слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 димеризуется с молекулой Fc, содержащей SEQ ID NO: 33 (необязательно С-концевой лизин). В другом варианте осуществления слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 димеризуется с молекулой Fc, содержащей SEQ ID NO: 32 (необязательно С-концевой лизин). В другом варианте осуществления слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 димеризуется с молекулой Fc,

содержащей SEQ ID NO: 37 (необязательно С-концевой лизин). В другом варианте осуществления слитый белок GDF15-Fc, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57 димеризуется с молекулой Fc, содержащей SEQ ID NO: 37 (необязательно С-концевой лизин).

В некоторых вариантах осуществления димеры образуют тетрамеры. Например, димеры из таблицы 6 могут образовывать тетрамеры. В некоторых вариантах осуществления тетрамеры образованы из одних и тех же димеров. В некоторых вариантах осуществления два димера из Fc Δ 10(-)-(G4S)₄-GDF15:Fc Δ 10(+,K); Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15:Fc Δ 10(-,K); Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D):Fc Δ 10(+,K); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K, CC); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D):Fc Δ 10(+,K, CC); Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(Δ 3/D5E):Fc Δ 16(+,K, CC); Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K, CC); Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-(G4Q)₄-GDF15:Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-(G4Q)₄-GDF15(N3Q):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-(G4Q)₄-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-(G4S)₂-GDF15(N3Q):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-(G4S)₂-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q):Fc Δ 16(+,K); Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)₄-GDF15(N3Q):Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A); или Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)₄-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A) образуют тетрамер, например, за счет димеризации двух областей GDF15.

В настоящем документе также представлены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты и векторы для продуцирования молекул GDF15 и Fc, описанных в данном документе. В различных вариантах осуществления вектор или нуклеиновая кислота интегрируются в геном клетки-хозяина, при этом в других вариантах осуществления вектор или нуклеиновая кислота являются внехромосомными.

Предусмотрены рекомбинантные клетки, такие как дрожжи, бактериальные клетки (например, *E. coli*) и клетки млекопитающих (например, иммортализованные клетки млекопитающих), содержащие такую нуклеиновую кислоту, вектор или комбинации любого из них или обоих из них. В различных вариантах осуществления клетки содержат неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такие как линейный элемент экспрессии, который содержит кодирующую последовательность для экспрессии молекулы GDF15 и/или молекулы Fc. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеиновую кислоту для продуцирования молекулы GDF15, а другая клетка содержит нуклеиновую кислоту для продуцирования молекулы Fc для димеризации с молекулой GDF15 (например, вектор для кодирования молекулы GDF15 в одной клетке и второй вектор для кодирования молекулы Fc во второй клетке). В других вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту для продуцирования молекулы GDF15 и молекулы Fc (например, вектор, который кодирует обе молекулы). В другом варианте осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту для продуцирования молекулы GDF15 и другую нуклеиновую кислоту для продуцирования молекулы Fc (например, два отдельных вектора, один из которых кодирует молекулу GDF15, а другой

кодирует молекулу Fc, в одной клетке-хозяине).

Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу GDF15 и/или молекулу Fc, может быть введен в клетку-хозяина путем трансформации или трансфекции, например, способами, известными в данной области техники.

Нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу GDF15, может быть помещена и/или доставлена в клетку-хозяина или животное-хозяина с помощью вирусного вектора. Вирусный вектор может содержать любое количество вирусных полинуклеотидов, отдельно или в сочетании с одним или несколькими вирусными белками, которые облегчают доставку, репликацию и/или экспрессию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в требуемой клетке-хозяине. Вирусный вектор может представлять собой полинуклеотид, содержащий весь вирусный геном или его часть, конъюгат вирусного белок/нуклеиновой кислоты, вирусоподобную частицу (VLP) или интактную вирусную частицу, содержащую вирусные нуклеиновые кислоты и нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, содержащий область GDF15. Вирусный вектор на основе вирусной частицы может содержать вирусную частицу дикого типа или модифицированную вирусную частицу. Вирусным вектором может быть вектор, для репликации и/или экспрессии которого требуется наличие другого вектора или вируса дикого типа (например, вирусный вектор может быть вирусом, зависимым от помощника), такой как векторный ампликон на основе аденовируса. Подходящие в этом отношении вирусные векторные частицы включают, например, векторные частицы на основе аденовирусов (включая любой вирус из вирусов *Adenoviridae* или полученный из них), векторные частицы на основе аденоассоциированных вирусов (векторные частицы на основе AAV) или другие парвовирусы и векторные частицы на основе парвовирусов, векторные частицы на основе папилломавирусов, флавивирусные векторы, альфавирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса, векторы на основе вируса оспы, ретровирусные векторы, включая лентивирусные векторы.

Молекула GDF15 может быть выделена с применением стандартных способов очистки белка. Полипептид, содержащий область GDF15, может быть выделен из клетки, которая была сконструирована для экспрессии полипептида, содержащего область GDF15, например клетки, которая в естественных условиях не экспрессирует нативный GDF15. Способы очистки белка, известные в данной области техники, можно использовать для выделения молекул GDF15, а также связанных материалов и реагентов. Способы очистки молекулы GDF15 также представлены в приведенных в данном документе примерах. Дополнительные способы очистки, которые могут быть пригодны для выделения молекул GDF15, можно найти в ссылках, таких как Bootcov MR, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11514-9, Fairlie WD, 2000, *Gene* 254: 67-76.

Также представлены фармацевтические композиции, содержащие молекулу GDF15 (и необязательно молекулу Fc, такую как димер или тетрамер, описанные в данном документе). Такие фармацевтические композиции полипептидов могут содержать

терапевтически эффективное количество молекулы GDF15 в сочетании с фармацевтически или физиологически приемлемым составом средства или носителем, выбранным для соответствия способу введения. Фармацевтически или физиологически приемлемый состав средства может быть одним или несколькими составами средства, подходящими для осуществления или облегчения доставки молекулы GDF15 в организм человека или субъекта, не являющегося человеком. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность молекулы GDF15, также могут действовать как состав-носитель или быть его компонентом. Приемлемые фармацевтически приемлемые носители нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Фармацевтическая композиция может содержать средство(средства), предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции.

Эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей молекулу GDF15, которая должна использоваться терапевтически, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области будет принимать во внимание, что соответствующие уровни дозирования для лечения, таким образом, будут варьироваться в зависимости от доставляемой молекулы, показания, для которого применяют молекулу GDF15, пути введения и размера (веса тела, площади поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) субъекта. Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров молекул GDF15 в используемом составе.

Путь введения фармацевтической композиции может быть пероральным; введением посредством инъекции через внутривенный, внутрибрюшинный, интрацеребральный (интрапаренхиматозный), внутрицеребровентрикулярный, внутримышечный, внутриглазной, внутриартериальный, интрапортальный или внутриочаговый пути введения; с помощью систем с замедленным высвобождением (которые также можно вводить путем инъекции); или посредством имплантируемых устройств. При желании композиции можно вводить с помощью болюсной инъекции или непрерывно с помощью инфузии или с помощью имплантируемого устройства. Композиция также может вводиться локально путем имплантации мембраны, губки или другого соответствующего материала, в котором была абсорбирована или инкапсулирована требуемая молекула. Если применяют имплантируемые устройства, устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, а доставка требуемой молекулы может осуществляться путем диффузии, болюсной доставки с временем выдержки или непрерывного введения.

Молекула GDF15 может применяться для лечения, диагностики или улучшения интенсивности метаболического состояния или нарушения. В одном варианте

осуществления метаболическое нарушение представляет собой диабет, например, диабет 2 типа. В другом варианте осуществления метаболическое состояние или нарушение представляют собой ожирение. В других вариантах осуществления метаболическое состояние или нарушение представляют собой дислипидемию, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина или диабетическую нефропатию. Например, метаболическое состояние или нарушение, которые можно лечить или интенсивность которых можно уменьшать с применением молекул GDF15, включают состояние, при котором у субъекта-человека уровень глюкозы в крови натощак составляет 125 мг/дл или больше, например 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200 или более 200 мг/дл. Уровни глюкозы в крови могут определяться в состоянии после приема пищи или натощак или случайным образом. Метаболическое состояние или нарушение могут также предусматривать состояние, при котором субъект подвергается повышенному риску развития метаболического состояния. Для субъекта-человека, такие состояния предусматривают уровень глюкозы в крови натощак, составляющий 100 мг/дл. Состояния, которые можно лечить с применением фармацевтической композиции, содержащей молекулу GDF15, также можно найти в Стандартах медицинской помощи при диабете Американской диабетической ассоциации в *Diabetes Care* 2011, American Diabetes Association, *Diabetes Care* Vol. 34, No. Supplement 1, S11-S61, 2010.

Введение можно осуществлять, например, путем внутривенной (IV) инъекции, внутривентрикулярной (IP) инъекции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции или перорально в форме таблетки или жидкой лекарственной формы. Терапевтически эффективная доза молекулы GDF15 будет зависеть от схемы введения, однократной дозы вводимого средства, независимо от того, вводится ли молекула GDF15 в комбинации с другими терапевтическими средствами, иммунного статуса и состояния здоровья реципиента. Терапевтически эффективная доза представляет собой количество молекулы GDF15, которое вызывает биологический или медицинский ответ в системе тканей, животном или человеке, ожидаемый исследователем, медицинским специалистом или другим клиницистом, который включает ослабление или уменьшение интенсивности симптомов заболевания или нарушения, подлежащего лечению, т. е. количество молекулы GDF15, которое поддерживает обнаруживаемый уровень одного или нескольких требуемых биологических или медицинских ответов, например, снижение уровня глюкозы в крови, уровней инсулина, триглицерида, холестерина; снижение веса тела или повышение толерантности к глюкозе, затрат энергии или чувствительности к инсулину; или снижение потребления пищи. Терапевтически эффективная доза молекулы GDF15 также может варьировать в зависимости от требуемого результата.

В данном документе также представлен способ, включающий измерение исходного уровня одного или нескольких метаболически значимых соединений, таких как глюкоза, инсулин, холестерин, липиды, у субъекта, введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей молекулу GDF15, и измерение после требуемого периода времени уровня одного или нескольких метаболически значимых соединений (например,

глюкозы в крови, инсулина, холестерина, липидов) у субъекта. Затем можно сравнить два уровня, чтобы определить относительное изменение метаболически значимого соединения у субъекта. В зависимости от результата данного сравнения может вводиться другая доза фармацевтической композиции для достижения требуемого уровня одного или нескольких метаболически значимых соединений.

Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу GDF15, может вводиться совместно с другим соединением или терапевтическим средством. Молекула GDF15 (и необязательно соответствующая ей молекула Fc) может вводиться в комбинации с другим терапевтическим средством, таким как средство, которое снижает уровни глюкозы в крови, инсулина, триглицеридов или холестерина; снижает вес тела; снижает потребления пищи; снижает толерантность к глюкозе, расход энергии или чувствительность к инсулину; или любой их комбинацией (например, противодиабетическое средство, гиполипидемическое средство, средство против ожирения, антигипертензивное средство или агонист рецептора активатора пролифератора пероксисом). Идентичность и свойства соединения, вводимого совместно с молекулой GDF15, будут зависеть от характера состояния, подлежащего лечению или улучшению. Средство, вводимое с описанной в данном документе молекулой GDF15, может быть агонистом GLP-1R, таким как GLP-1 или его аналог; или эксендин, аналог эксендина или агонист эксендина. Неограничивающий список примеров соединений, которые можно вводить в комбинации с фармацевтической композицией, включает лираглутид, росиглитазон, пиоглитазон, репаглинид, натеглинид, метформин, экзенатид, стиаглиптин, прамлинтид, глипизид, глимеприридакарбоза, орлистат, лоркасерин, фентерминтопирамат, налтрексонбупропион, сетмеланотид, семаглутид, эфпегленатид, канаглифлозин, LIK-066, SAR-425899, Tt-401, FGFR4Rx, HDV-биотин и миглитол.

В одном варианте осуществления молекула GDF15, содержащая аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 или 57, вводится с другим соединением или терапевтическим средством, таким как лираглутид.

В другом варианте осуществления молекула GDF15 и соответствующая молекула Fc, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 39 и 32 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 40 и 33 (необязательно С-концевой лизин), под SEQ ID NO: 41 и 32 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 42 и 32 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 43 и 34 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 44 и 34 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 45 и 35 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 46 и 35 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 47 и 36 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 48 и 36 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 49 и 36 (необязательно С-концевой лизин)

соответственно; под SEQ ID NO: 50 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; под SEQ ID NO: 51 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; под SEQ ID NO: 52 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; под SEQ ID NO: 53 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; под SEQ ID NO: 54 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; под SEQ ID NO: 55 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; под SEQ ID NO: 56 и 37 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; или под SEQ ID NO: 57 и 37 (необязательно С-концевой лизин)
соответственно; вводят с другим соединением или терапевтическим средством, например, лираглутидом.

В другом варианте осуществления молекула GDF15 и соответствующая молекула Fc, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50 и 36 (необязательно С-концевой лизин) соответственно, вводят с другим соединением или терапевтическим средством, например, лираглутидом. В другом варианте осуществления молекула GDF15 и соответствующая молекула Fc, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 57 и 37 (необязательно С-концевой лизин) соответственно, вводят с другим соединением или терапевтическим средством, например, лираглутидом.

Введение молекулы GDF15, вводимой с другим терапевтическим средством, может включать одновременное введение терапевтически эффективного количества молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc) и терапевтически эффективного количества другого терапевтического средства. Введение молекулы GDF15, вводимой с другим терапевтическим средством, может включать одновременное введение терапевтически эффективного количества молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc) и терапевтически эффективного количества другого терапевтического средства, например, введение терапевтически эффективного количества молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc) с последующим введением терапевтически эффективного количества другого терапевтического средства или введением терапевтически эффективного количества другого терапевтического средства с последующим введением терапевтически эффективного количества молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc). Введение терапевтически эффективного количества молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc) может быть осуществлено по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения терапевтически эффективного количества другого терапевтического средства. В другом варианте осуществления введение терапевтически эффективного количества терапевтически эффективного количества другого терапевтического средства может быть осуществлено по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней через по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения терапевтически эффективного количества молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc).

Введение молекулы GDF15, вводимой с другим терапевтическим средством, может

включать одновременное введение терапевтически эффективного количества как молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc), так и терапевтически эффективного количества другого терапевтического средства, например, введение терапевтически эффективного количества молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc), которое перед введением комбинируют с терапевтически эффективным количеством другого средства. В другом варианте осуществления одновременное введение молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc) и другого терапевтического средства может включать одновременное введение первой композиции, содержащей молекулу GDF15, и второй композиции, содержащей другое терапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления введение молекулы GDF15 с другим терапевтическим средством имеет синергичный эффект. В одном варианте осуществления эффект больше, чем у молекулы GDF15 (и необязательно соответствующей ей молекулы Fc) в качестве монотерапии или другого средства. В другом варианте осуществления эффект больше, чем аддитивный эффект обоих средств (молекулы GDF15 и необязательно соответствующей ей молекулы Fc, плюс другое средство). В одном варианте осуществления комбинированная терапия (т. е. введение молекулы GDF15 и необязательно соответствующей ей молекулы Fc с другим терапевтическим средством) имеет более чем 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30-кратный эффект, чем при монотерапии GDF15 (введение молекулы GDF15 и необязательно соответствующей ей молекулы Fc). В другом варианте осуществления комбинированная терапия (т. е. введение молекулы GDF15 и необязательно соответствующей ей молекулы Fc с другим терапевтическим средством) имеет более чем 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30-кратный эффект, чем при монотерапии на основе другого средства. Эффект может представлять собой потерю веса тела (например, уменьшение общего веса или процента изменения размеров тела); снижение в крови уровней глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина; улучшение в отношении толерантности к глюкозе, расхода энергии или чувствительности к инсулину; или снижение потребления пищи. Синергичный эффект может наблюдаться примерно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, или 70 дней после введения.

В одном варианте осуществления молекула GDF15 и необязательно соответствующая ей молекула Fc, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 39 и 32 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 40 и 33 (необязательно С-концевой лизин), под SEQ ID NO: 41 и 32 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 42 и 32 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 43 и 34 (необязательно С-концевой лизин) соответственно; под SEQ ID NO: 44 и 34 (необязательно С-концевой лизин)

соответственно; под SEQ ID NO: 45 и 35 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 46 и 35 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 47 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 48 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 49 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 50 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 51 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 52 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 53 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 54 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 55 и 36 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; под SEQ ID NO: 56 и 37 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; или под SEQ ID NO: 57 и 37 (необязательно С-концевой лизин)
 соответственно; вводимые с агонистом GLP-1R (например, лираглутидом или эксендином, или их аналогом или агонистом) имеют более чем 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,26, 27, 28, 29, или 30-кратный эффект, чем при монотерапии GDF15; более чем 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,26, 27, 28, 29, или 30-кратный эффект, чем при монотерапии агонистом GLP-1R (т. е. при введении только агониста GLP-1R); или того и другого примерно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, или 70 дней после введения средства(средств).

Подробное описание и следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение. Специалисты в данной области техники могут произвести различные изменения и модификации на основе описания изобретения и такие изменения и модификации также включены в настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, предоставлены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1: Молекулы GDF15(WT)-линкер-Fc

Были получены молекулы GDF15 scFc-GDF15 (SEQ ID NO: 38) и FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) и активность молекул была протестирована.

FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) стабильно экспрессировались в бессывороточной адаптированной к суспензии клеточной линии CHO-K1. Их клонировали в стабильный вектор экспрессии, обладающий устойчивостью к пурамицину, в то время как Fc цепь для образования гетеродимера с FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15, FcΔ10(+,K) (SEQ ID NO: 32) была клонирована в вектор экспрессии, содержащий

гигромицин (Selexis, Inc.). Плазмиды трансфицировали в соотношении 1:1 используя липофектамин LTX, и клетки отбирали через 2 дня после трансфекции в запатентованной питательной среде, содержащей 10 мкг/мл пурамицина и 600 мкг/мл гигромицина. Замена среды происходила 2 раза в неделю во время отбора. Когда клетки достигали приблизительно 90% жизнеспособности, их количество увеличивали для проведения непоточного культивирования. Клетки высевали при 2×10^6 /мл в среду для продуцирования. Продуцируемую клетками кондиционированную среду (CM) собирали на 7 день и осветляли. Жизнеспособность в конечных точках как правило превышала 90%.

Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) (и любые парные Fc) осветляли. Кондиционированные среды очищали с использованием процедуры двухэтапной хроматографии. Приблизительно 5 л CM вносили непосредственно в колонку GE MabSelect SuRe, которая предварительно была уравновешена фосфатно-солевым буфером Дульбекко (PBS). Связанный белок подвергали трем стадиям промывки: первая, 3 объема колонки (CV) PBS; затем 1 CV 20 mM Tris, 100 mM хлорида натрия, pH 7,4; и, наконец, 3 CV 500 mM L-аргинина, pH 7,5. Эти стадии промывки удаляют несвязанные или слабо связанные компоненты среды и примеси клеток-хозяев. Затем колонку повторно уравновешивали 5 CV 20 mM Tris, 100 mM хлорида натрия при pH 7,4, что возвращало УФ-поглощение к исходному уровню. Требуемый белок элюировали 100 Мм уксусной кислотой при pH 3,6 и собирали в основной массе. Пул белка быстро титровали до диапазона pH от 5,0 до 5,5 с помощью 1 M Tris-HCl, pH 9,2. Затем пул белка с отрегулированным pH загружали в колонку GE SP Sepharose® HP, которая была предварительно уравновешена 20 mM 2-этансульфоновой кислотой (MES) при pH 6,0. Связанный белок затем промывали 5 CV буфера для уравновешивания и, наконец, элюировали 20 CV, линейным градиентом от 0 до 50% от 0 до 400 mM хлорида натрия в 20 mM MES при pH 6,0. Фракции собирали во время элюирования и анализировали при помощи аналитической эксклюзионной хроматографии (Superdex® 200) для определения подходящих фракций для объединения в однородный продукт. С помощью хроматографии SP HP удаляют связанные с продуктом примеси, такие как свободные Fc, усеченные частицы и мультимеры Fc-GDF15. Буфер в пуле SP HP затем заменяли на 10 mM ацетат натрия, 5% пролина, pH 5,2 при помощи диализа. Его концентрировали до примерно 15 мг/мл с использованием центробежного устройства Sartorius Vivaspin® 20 с отсечением по молекулярной массе десять килодальтон. Наконец, его фильтровали в стерильных условиях, и полученный раствор, содержащий очищенные молекулы Fc-GDF15, хранили при 5°C. Конечные продукты оценивали на соответствие и чистоту с помощью масс-спектрального анализа, электрофореза в полиакриламиде с додецилсульфатом натрия и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ScFc-GDF15 (SEQ ID NO: 38) получали аналогичным образом. Эти молекулы GDF15 стабильно экспрессировались в клеточной линии CHO/CS9. Молекулы клонировали в стабильный вектор экспрессии. Плазмиды (линеаризованные)

трансфицировали в соотношении 1:1 с применением электропорации, и клетки отбирали через 2 дня после трансфекции. Замена среды происходила 3 раза в неделю во время отбора. Когда клетки достигли приблизительно 90%, их количество увеличивали для проведения периодического культивирования с подпиткой. Клетки высеивали при 1×10^6 /мл в среду для продуцирования и подпитывали единожды, когда количество клеток достигло $4-5 \times 10^6$ /мл. Продуцируемую клетками кондиционированную среду (СМ) собирали на 10 день и осветляли. Жизнеспособность в конечных точках как правило превышала 90%. ScFc-GDF15 осветляли, и кондиционированную среду очищали с использованием двухэтапной процедуры сопряженной хроматографии. Кондиционированные среды из нескольких сборов объединяли и концентрировали почти в 5 раз путем ультрафильтрации с применением регенерированной целлюлозной мембраны (Millipore) Pellicon® 2 10 кДа площадью 1 кв. фут путем фильтрации в тангенциальном потоке. Приблизительно 5 л концентрированной СМ вносили непосредственно в колонку GE MabSelect SuRe, которая предварительно была уравновешена фосфатно-солевым буфером Дульбекко (PBS). Неспецифически связанный белок удаляли на этапе промывки 12CV PBS. Требуемый белок элюировали 0,5% уксусной кислотой при pH 3,5, 150 мМ NaCl в 3 CV и собирали в петле для хранения. Собранный пул белка непосредственно загружали в калибровочную колонку GE HiLoad 26/60 Superdex 200 Prep Grade, которую предварительно уравновешивали 30 ммоль ацетатом при pH 5,0, 150 мМ NaCl. Пиковые фракции, собранные во время калибровки, анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия для определения соответствующих фракций для объединения в однородный продукт. pH конечного калибровочного пула доводили до pH 4,5, добавляя 10% ледяную уксусную кислоту, а затем буфер заменяли на 10 мМ ацетат натрия, 9% (вес/об.) сахарозу, pH 4,5 путем диализа. Концентрировали до концентрации выше 15 мг/мл с использованием центробежного устройства с отсечением по молекулярной массе десять килодальтон. Устойчивость белка к замораживанию проверяли с помощью 3 циклов замораживания и оттаивания. Наконец, последнюю партию фильтровали в стерильных условиях, и полученный раствор, содержащий очищенные молекулы GDF15, хранили при -80°C . Конечные продукты оценивали на соответствие и чистоту с помощью масс-спектрального анализа, n-концевого секвенирования, электрофореза в полиакриламиде додецилсульфата натрия и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Затем scFc-GDF15 и Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 анализировали в отношении активности *in vivo*. Яванским макакам (n=10 в группе) вводили носитель, 3 мг/кг положительного контроля FGF21-Fc, 1,5 мг/кг scFc-GDF15 или 1,5 мг/кг Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15:Fc Δ 10(+,K) еженедельно в течение шести недель с последующей пятидневной отмывкой. Определяли вес тела и уровень триглицеридов. Самцов яванских макак со спонтанным ожирением, ранее не получавших лечения, предварительно обследовали в отношении состояния здоровья, а их индекс массы тела составлял >41 . Обезьян приучили к одиночному содержанию, экспериментальным процедурам и обращению с ними за 6

недель до лечения. Обезьяны были разделены на 4 группы, получавшие еженедельно SC инъекции в течение 6 недель (дни 0, 7, 14, 21, 28 и 35) для каждой группы, для того, чтобы обеспечить одинаковый исходный уровень. Образцы крови натошак в течение ночи собирали в дни перед введением дозы -24, -17 и -10, а также в дни 6, 13, 20, 27, 34 и 41 (6 дней после каждой еженедельной дозы) во время фазы лечения. Во время фазы отмывки образцы крови собирали на 48, 55, 62, 69 и 76 дни. Вес тела измеряли один раз в неделю, а потребление пищи контролировали ежедневно для каждой обезьяны на протяжении всего исследования. Каждая обезьяна получала неограниченное количество корма в течение ограниченного периода времени (1 час) при утреннем и вечернем кормлении с интервалом, составляющим приблизительно 8 часов. Между приемами пищи давали 150 г яблочной закуски в течение ограниченного времени (1 час). Оставшийся корм или яблоко убирали и взвешивали после каждого приема пищи или перекуса для расчета количества потребляемой пищи.

Слитые белки GDF15-Fc снижали вес тела (**фигура 1**) и уровни триглицеридов (**фигура 2**), как и FGF21-Fc.

Пример 2: Свойства молекулы GDF15(WT)-линкер-Fc

Молекулы Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39), описанные в примере 1, и Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15 (SEQ ID NO: 40) анализировали в отношении свойств, которые могут повлиять на их стабильность и возможность производства (например, коммерческое производство). Молекулы GDF15 (например, Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 и Fc Δ 10(+)-(G4)-GDF15) были определены как в значительной степени гетерогенные (например, анализ фракции Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 на ионообменной колонке показал, что молекулы в значительной степени гетерогенные, **фигура 3**), что является нежелательным признаком в отношении возможности производства молекул. Для определения свойств молекул GDF15, которые приводят к высокой степени гетерогенности популяции, был проведен анализ молекул с помощью эксклюзионной хроматографии, геля SDS PAGE и масс-спектрометрии. Отсутствие разницы во времени удерживания при эксклюзионной хроматографии указывает на то, что агрегация или крупномолекулярная деградация вряд ли будут приводить к гетерогенности. Также отсутствовали различия в анализе при помощи геля SDS PAGE, что указывает на то, что ошибочное спаривание дисульфидов или крупномолекулярная деградация также вряд ли будут приводить к гетерогенности.

Для оценки гетерогенности также проводили MS-анализ Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39). Молекулы GDF15 очищали с использованием моно S, колонки объемом 1 мл, и фракцию номер 25 (P1), фракцию номер 28 (P2) и фракцию номер 31 (P3) (**фигура 3**) собирали и отправляли для MS-анализа. Около 50 мкг фракций сушили, ресуспендировали в 25 мкл 150 мМ Tris, pH 7,5/8 М мочевины/40 мМ гидроксиламина/10 мМ DTT, а затем инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Образцы алкилировали с помощью 20 мМ йодацетамида (IAM) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Затем образцы разбавляли до 100 мкл водой и 2 мкг трипсина (1:25) и расщепляли в течение ночи при 37°C. Продукты расщепления подкисляли с

последующей инъекцией в систему Waters (Milford, MA) NanoAcquity UPLC. Образцы сначала загружали в улавливающую колонку Symmetry C18 размером 180 мкм X 20 мм при 15 мкл/мин с последующим разделением пептидов на колонке Agilent (Santa Clara, CA) Zorbax 0,5 мм X 250 мм 300SB-C18. Буфер А представлял собой 0,1% муравьиная кислота/вода, тогда как буфер В представлял собой 0,1% муравьиная кислота/99,9% ацетонитрил. Градиент состоял из исходных условий при 1% В с последующим увеличением до 45% В в течение 85 минут, до 97% В в течение 1 минуты, изократического режима при 97% В в течение 6 минут, до 1% В в течение 3 минут, а затем изократического режима при 1% В в течение 20 минут. Элюат колонки UPLC распыляли в масс-спектрометр Orbitrap Velos Pro Thermo Fisher Scientific (Сан-Хосе, Калифорния) с применением стандартного источника ионизации с электрораспылением II (HESI II). Метод масс-спектрометрии состоял из полного MS сканирования с *масса/заряд* [300-2000] при разрешении 30К с последующим проведением MS/MS (активация CID) 10 самых распространенных ионов-предшественников. Для анализа использовались следующие параметры прибора: напряжение источника=3,5 кВ; капиллярная температура=275⁰ С; уровень RF S-линзы=50%; время активации=10 мсек; нормализованная энергия столкновения=35; ширина изоляции=2,0 Да; и порог=1,0E4. Компонент Xtract программного обеспечения Thermo Xcalibur 2.1 применяли для деконволюции данных MS высокого разрешения. Усредненные данные по [300-2000] были деконволютированы с применением S/N порогового значения соотношения сигнал/шум 1,2 и разрешения 100000 при *масса/заряд* 400. Деконволютированные пептидные массы (гликозилированные и негликозилированные) отображали как моноизотопные [M+H]⁺. Различные гликозилированные разновидности были идентифицированы по ступенчатой потере гликановых субъединиц и присутствию негликозилированного иона-предшественника как наиболее интенсивного фрагмента после активации CID.

Результаты MS показали, что разная степень дезамидированных видов (например, 70% P1, 47% P2 и 24% P3) и распределение гликозилирования (в основном моносахарид и трисахарид) на линкере способствовали высокой степени гетерогенности молекул GDF15, как показано в их профиле СЕХ (**фигура 3**). Было установлено, что линкер (G4S)4 (например, присутствующий в FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15) был в значительной степени гликозилирован и фосфорилирован с различной степенью и типами гликозилирования и/или фосфорилирования, а N-конец активного фрагмента человеческого GDF15 дикого типа был очень чувствителен к дезамидированию и изомеризации (см., например, **фигуру 4**, на которой показаны определенные массы, извлеченные из данных полных масс-спектров, которые соответствуют немодифицированным, дезамидированным и изомеризованным видам пептида, содержащим аспарагин в положении 3. Экстрагированные массы составляли *масса/заряд* [590,25-590,75] из двухзарядных версий пептида). Аспарагин в положении 3 (со ссылкой под SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность, кодирующая активный фрагмент hGDF15) был очень чувствителен к дезамидированию и изомеризации, а аспарат в положении 5 (со ссылкой под SEQ ID NO:

б, аминокислотная последовательность, кодирующая активный фрагмент hGDF15) был очень чувствителен к изомеризации.

Основываясь на этих признаках, производство в целом гомогенной популяции слитого белка GDF15-Fc, имеющего активный фрагмент человеческого GDF15 дикого типа с линкером в Fc-области (например, для коммерческого производства), было бы сложной задачей.

Пример 3: Активность слитых белков GDF15-Fc без линкера

Для решения проблем гетерогенности, описанных в примере 2, в новых слитых белках GDF15-Fc 1) удаляли линкер между областью GDF15 и Fc-областью и 2) удаляли или заменяли N-концевые остатки активного фрагмента человеческого GDF15 дикого типа (например, GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 13), где удалены первые три аминокислоты активного фрагмента человеческого GDF15 дикого типа, или GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 16), при этом аспарагин в положении 3 активного фрагмента человеческого GDF15 дикого типа мутирован по типу замены аспарагина на аспарат).

В дополнение к мутации по типу замены пары заряженных аминокислот в Fc-области слитого белка GDF15-Fc и молекулы Fc для нековалентной ассоциации молекулы Fc с Fc-областью слитого белка GDF15-Fc с образованием гетеродимера, некоторые из новых молекул были разработаны так, чтобы также включать межцепочечную дисульфидную связь в области CH3 или "цистеиновый зажим" (молекулы, которые включают в себя "CC" в своем обозначении), чтобы усилить гетеродимеризацию молекулы GDF-Fc с молекулой Fc.

Были созданы четыре новых слитых белка GDF15-Fc, в которых 1) удален линкер между областью GDF15 и Fc-областью и 2) удалены или заменены N-концевые остатки GDF15. Также была введена межцепочечная дисульфидная связь в домен CH3 Fc-области в двух из четырех молекулах слитого белка GDF15-Fc (а также в соответствующей ему молекуле Fc для гетеродимеризации). Эффективность и фармакокинетические (PK) свойства этих молекул (Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 41); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3) (SEQ ID NO: 43); Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44)) сравнивали с Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 более раннего поколения (SEQ ID NO: 39) у мышей.

Чтобы определить активность молекул, определяли потребление пищи. Самцов мышей линии ob/ob в возрасте от семи до восьми недель, которых содержали в одном помещении, разделяли на разные группы лечения, причем каждая группа до лечения имела сопоставимые вес тела и уровни потребления пищи. Животные получали 0,32 мкг/кг, 1,6 мкг/кг, 8 мкг/кг, 40 мкг/кг, 0,2 мг/кг, 1 мг/кг или 5 мг/кг слитого белка GDF15-Fc (димер Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 41 и 32); Fc Δ 10(-)-GDF15(N3D):Fc Δ 10(+,K) (SEQ ID NO: 42 и 32); или Fc Δ 10(-,CC)-GDF15(Δ 3):Fc Δ 10(+,K, CC) (SEQ ID NO: 39 и 32)) посредством подкожной инъекции, и измеряли потребление пищи в течение ночи. Представленные данные представляют собой среднее 2-4 независимых исследований (**фигура 5**). Четыре новые молекулы Fc Δ 10(-)-GDF15(Δ 3)

(SEQ ID NO: 41); FcΔ10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3) (SEQ ID NO: 43); и FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44) имели сравнимую эффективность со слитым белком GDF15-Fc более раннего поколения FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39).

Для определения фармакокинетики молекул самцам мышей линии C57Bl/6 с ожирением, вызванным диетой, в возрасте 18 недель подкожно вводили дозу, составляющую 1 мг/кг белка и производили серийный отбор проб через 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240 и 336 часов после введения дозы. Четыре новые молекулы FcΔ10(-)-GDF15(Δ3) (SEQ ID NO: 41); FcΔ10(-)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 42); FcΔ10(-,CC)-GDF15(Δ3) (SEQ ID NO: 43); и FcΔ10(-,CC)-GDF15(N3D) (SEQ ID NO: 44) имели сравнимые фармакокинетические свойства со слитым белком GDF15-Fc более раннего поколения FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15 (SEQ ID NO: 39) (**фигура 6**).

Пример 4: Дальнейшая разработка слитых белков GDF15-Fc без линкера

Поскольку недавно разработанные молекулы с улучшенными характеристиками технологичности и стабильности обладали такой же эффективностью и РК-свойствами, что и молекулы более раннего поколения, молекулы были дополнительно сконструированы для уменьшения возможной гетерогенности и снижения эффекторной функции Fc и повышения эффективности.

Для того, чтобы в большей степени снизить гетерогенность области GDF15, вместо замены аспарагина в положении 3 на аспартат аспарагин заменяли на глутамин. Кроме того, молекулы были сконструированы с двумя изменениями, внесенными в N-концы GDF15, например, GDF15(Δ3/D5E) (SEQ ID NO: 17), GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 18) для устранения высокой скорости дезамидирования и изомеризации нативного белка GDF15. Для снижения эффекторной функции Fc и повышения эффективности, молекулы также были сконструированы так, чтобы шарнирная область Fc-области была удалена дополнительно за счет дополнительных шести аминокислот, удаленных из шарнирной области Fc (например, FcΔ16 вместо FcΔ10) для уменьшения связывания с FcγR. Такую же разработку шарнирной области осуществляли для соответствующих молекул Fc, с которыми гетеродимеризуются слитые белки GDF15-Fc.

Активность дополнительно разработанных слитых белков GDF15-FcFcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E) (SEQ ID NO: 45), FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 46) и FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 47) тестировали на яванских макаках. Самцы яванских макаков со спонтанным ожирением, ранее не получавшие лечения, были акклиматизированы/тренированы для процедурных манипуляций (например, сбора крови, подкожной инъекции, измерения веса тела, режима кормления) в течение 10 недель до начала лечения. Восемьдесят (80) обезьян разделяли на 8 групп лечения по n=10 обезьян в каждой на основании данных, собранных во время фазы акклиматизации/тренировки (химический состав крови и вес тела). Каждой группе лечения вводили носитель, 3 мг/кг положительного контроля FGF21-Fc, 0,5 мг/кг FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E) (вместе с партнером по гетеродимеризации, FcΔ16(+,K, CC) (SEQ ID NO: 35)), 3,0 мг/кг FcΔ16(-

,CC)-GDF15(Δ 3/D5E) (вместе с его партнером по гетеродимеризации Fc Δ 16(+,K, CC) (SEQ ID NO: 35)), 0,5 мг/кг Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E) (вместе с его партнером по гетеродимеризации Fc Δ 16(+,K, CC)), 3,0 мг/кг Fc Δ 16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E) вместе с его партнером по гетеродимеризации Fc Δ 16(+,K, CC)), 0,5 мг/кг Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E) (вместе с его партнером по гетеродимеризации Fc Δ 16(+,K) (SEQ ID NO: 36)) или 3,0 мг/кг Fc Δ 16(-)-GDF15(N3Q/D5E) (вместе с его партнером по гетеродимеризации Fc Δ 16(+,K) (SEQ ID NO: 36)). Каждое из них вводили подкожно один раз в неделю в течение 4 недель во время фазы лечения с последующей 4-недельной фазой отмывки; забор крови и мониторинг веса тела проводили еженедельно, а потребление пищи происходило ежедневно во время фаз лечения и отмывки. На графике представлено n=5-6/группа, а данные представлены как средние значения для группы+SEM. Статистический анализ проводили с помощью ANCOVA, и статистическая значимость составила *p<0,05, **p<0,01 и ***p<0,001 по сравнению с носителем. У обезьян с быстрым выведением препарата предполагалось наличие антител к препарату (ADA) и они были исключены из анализа.

Неожиданно недавно сконструированные слитые белки GDF15-Fc потеряли почти всю эффективность (**фигура 7**). Ни один из недавно сконструированных слитых белков GDF15-Fc не снижал вес тела в той же степени, в какой FGF21-Fc, в отличие от ранее созданных слитых белков GDF15-Fc (см. пример 1, **фигура 1**).

Пример 5: Восстановление активности слитого белка GDF15-Fc у яванских макак

Слитые белки GDF15-Fc в примере 4 по сравнению со слитым белком GDF15-Fc в примере 1 имели следующие различия, показанные в таблице 7:

Таблица 7. Различия между слитыми белками GDF15-Fc в примерах 1 и 4

Молекулы GDF15-Fc в примере 1: эффективны у яванских макак	Молекулы GDF15-Fc в примере 5: неэффективны у яванских макак
Δ 10 в Fc-области	Δ 16 в Fc-области
Без цистеинового зажима	С цистеиновым зажимом
С линкером	Без линкера
GDF15 дикого типа	Две мутации на N-конце GDF15

Для восстановления активности различные признаки молекул, которые способствовали их эффективности у обезьян, были повторно введены в новые слитые белки GDF15-Fc. Был удален цистеиновый зажим (межцепочечная дисульфидная связь CH3), и повторно введен линкер для Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) (SEQ ID NO: 49); Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 50) и Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 54). Однако линкер, используемый в данном примере, должен быть не гликозилированным (например, G4Q) или быть более коротким (G4S вместо (G4S)4) для уменьшения гликозилирования. Также для Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) была устранена мутация в положении 5. Наконец, для новой молекулы Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (SEQ ID NO: 57) меньшая делеция в шарнирной области Fc-области

была введена повторно, однако вместе с мутациями L234A/L235A в Fc-области, которые должны устранить связывание Fc γ R.

Эти новые молекулы сравнивали с Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15, эффективность которых у яванских макаков была показана в примере 1. Самцы яванских макаков со спонтанным ожирением, ранее не получавшие лечения, были акклиматизированы/тренированы для процедурных манипуляций (например, сбора крови, подкожной инъекции, измерения веса тела, режима кормления) в течение 2 недель до начала лечения. Сорок две (42) обезьян разделяли на 6 групп лечения по n=7 обезьян в каждой на основании данных, собранных во время фазы акклиматизации/тренировки (химический состав крови и вес тела). Каждой группе лечения вводили носитель, 1,5 мг/кг Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (вместе с его партнером по гетеродимеризации, Fc Δ 10(+,K)), 1,5 мг/кг Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q) (вместе с его партнером по гетеродимеризации, Fc Δ 16(+,K)), 1,5 мг/кг Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (вместе с его партнером по гетеродимеризации, Fc Δ 16(+,K)), 1,5 мг/кг Fc Δ 16(-)-G4S-GDF15(N3Q/D5E) (вместе с его партнером по гетеродимеризации, Fc Δ 16(+,K)) или 1,5 мг/кг Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (вместе с его партнером по гетеродимеризации, Fc Δ 10(+,K, L234A/L235A) (SEQ ID NO: 37). Подкожные инъекции проводились один раз в неделю в течение 2 недель во время фазы лечения; забор крови и мониторинг веса тела проводили еженедельно, а потребление пищи контролировали ежедневно в течение фазы лечения. На графике представлено n=7/группа, а данные представлены как средние значения для группы+SEM. Статистический анализ проводили с помощью ANCOVA, и статистическая значимость составила *p<0,05, **p<0,01 и ***p<0,001 по сравнению с носителем. Новые молекулы восстанавливали эффективность (**фигура 8**).

На основании этих результатов было установлено, что мутация N3Q не влияет на активность GDF15 у обезьян, и что двойная мутация в GDF15 (N3Q/D5E) также не влияет на активность GDF15 у обезьян. Также было показано, что делеция 16 аминокислот (Δ 16) в шарнирной области Fc имеет тот же эффект, что и делеция 10 аминокислот (Δ 10) в шарнирной области Fc у обезьян. Наконец, было показано, что линкер является критическим компонентом в отношении активности у обезьян. Хотя то, является ли линкер G4S или G4Q, не влияет на активность, длина линкера важна для активности. Более длинные линкеры (например, (G4S)4 и (G4Q)4 на **фигуре 8**) более эффективны по сравнению с более короткими линкерами (например, G4S).

Пример 6: Анализ потребления пищи у мышей линии ob/ob в отношении Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) и Fc Δ 10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)

Анализ потребления пищи использовали для оценки эффективности двух разных слитых белков GDF15-Fc. Самцов мышей линии ob/ob в возрасте от семи до восьми недель, которых содержали в одном помещении, разделяли на разные группы лечения (n=5 на группу), причем каждая группа до лечения имела сопоставимый вес тела и уровни потребления пищи. Животные получали 0,32 мкг/кг, 1,6 мкг/кг, 8 мкг/кг, 40 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 1 мг/кг или 5 мг/кг гетеродимера Fc Δ 16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):Fc Δ 16(+,K)

или FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E):FcΔ10(+,K, L234A/L235A) путем подкожной инъекции, а потребление пищи было измерено накануне вечером. Результаты репрезентативного эксперимента для каждого слитого белка GDF15-Fc показаны на кривой доза-ответ для FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (фигура 9) и FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E) (фигура 10). Результаты показывают, что оба слитых белка GDF15-Fc снижают потребление пищи у мышей линии ob/ob с острой формой нарушения. ED50 для данного анализа показана в таблице 8.

Таблица 8. ED50 для анализа потребления пищи

Молекула	ED50 (мг/кг) n=3-5
FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)	7,4 ±4,2
FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)	5,8 ±0,7

Хотя настоящее изобретение было описано в терминах различных вариантов осуществления, понятно, что изменения и модификации будут понятны специалистам в данной области техники. Следовательно, предполагается, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные варианты, которые входят в объем заявленного изобретения. Кроме того, заголовки разделов, используемые в данном документе, служат только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект изобретения.

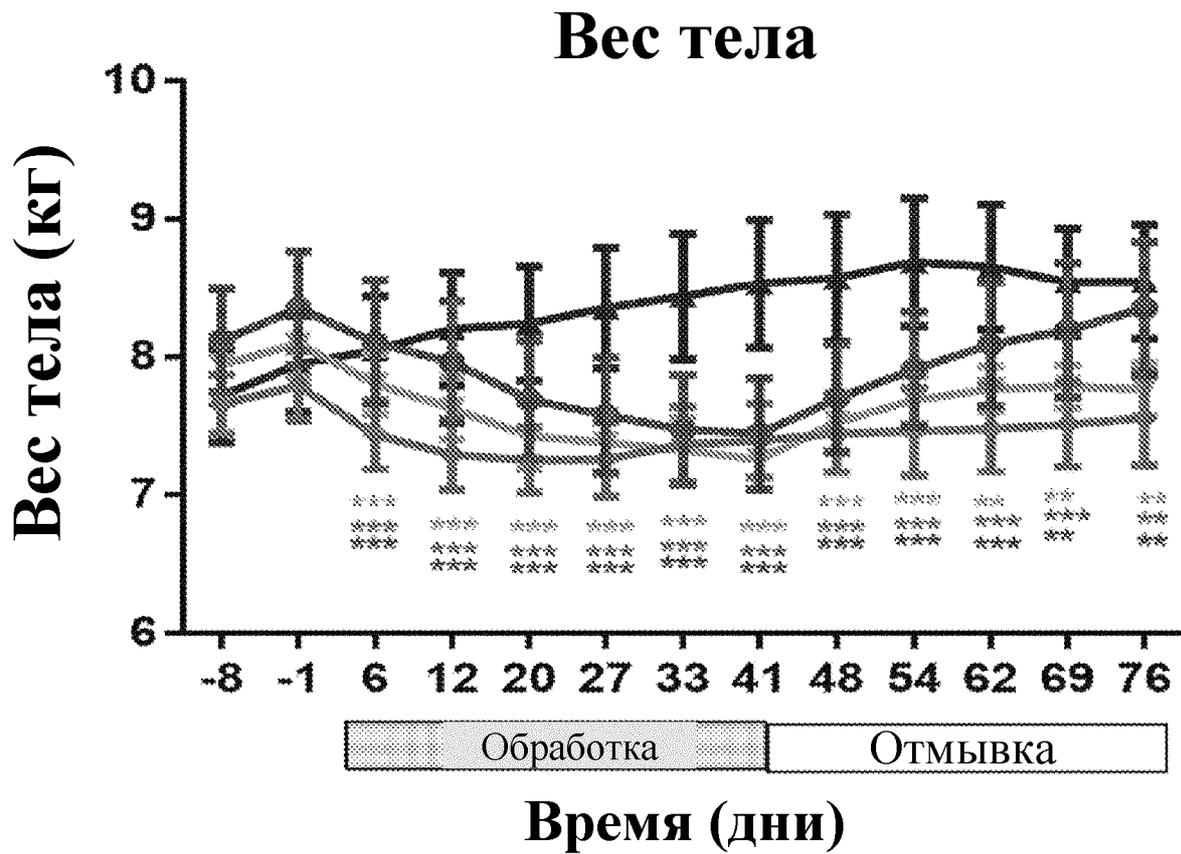
Все ссылки, цитируемые в данной заявке, в явной форме включены в данный документ посредством ссылки для любых целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий область GDF15, соединенную с Fc-областью посредством линкера, при этом область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 и по меньшей мере одну мутацию, при этом по меньшей мере одна из мутаций затрагивает аспарат в положении 5.
2. Слитый белок по п. 1, где аспарат в положении 5 мутирован с заменой на глутамат.
3. Слитый белок по п. 2, где область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.
4. Слитый белок по п. 1 или п. 2, где область GDF15 дополнительно содержит мутацию, затрагивающую аспарагин в положении 3.
5. Слитый белок по п. 3, где аспарагин в положении 3 мутирован с заменой на глутамин.
6. Слитый белок по п. 5, где область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.
7. Слитый белок по любому из пп. 1-6, где линкер представляет собой линкер $(G4S)_n$ или $(G4Q)_n$, где n больше 0.
8. Слитый белок по п. 7, где n равняется 1 или 2.
9. Слитый белок, содержащий область GDF15, соединенную с Fc-областью посредством линкера, при этом область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO 6 и по меньшей мере одну мутацию, при этом по меньшей мере одна из мутаций затрагивает аспарагин в положении 3 или аспарат в положении 5, и где линкер представляет собой линкер $(G_4Q)_n$, а n больше 2.
10. Слитый белок по п. 7 или п. 9, где n равняется 3 или 4.
11. Слитый белок по п. 9 или п. 10, где область GDF15 содержит мутацию по типу замены аспартата в положении 5 на глутамат.
12. Слитый белок по п. 11, где область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.
13. Слитый белок по любому из пп. 9-11, где область GDF15 содержит мутацию по типу замены аспарагина в положении 3 на глутамин.
14. Слитый белок по п. 13, где область GDF15 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.
15. Слитый белок по любому из пп. 1-14, где Fc-область содержит мутацию по типу замены пары заряженных аминокислот.
16. Слитый белок по любому из пп. 1-14, где Fc-область содержит усеченную шарнирную область.
17. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где Fc-область выбрана из таблицы 3.
18. Способ лечения метаболического состояния или нарушения, включающий введение слитого белка по любому из пп. 1-17.

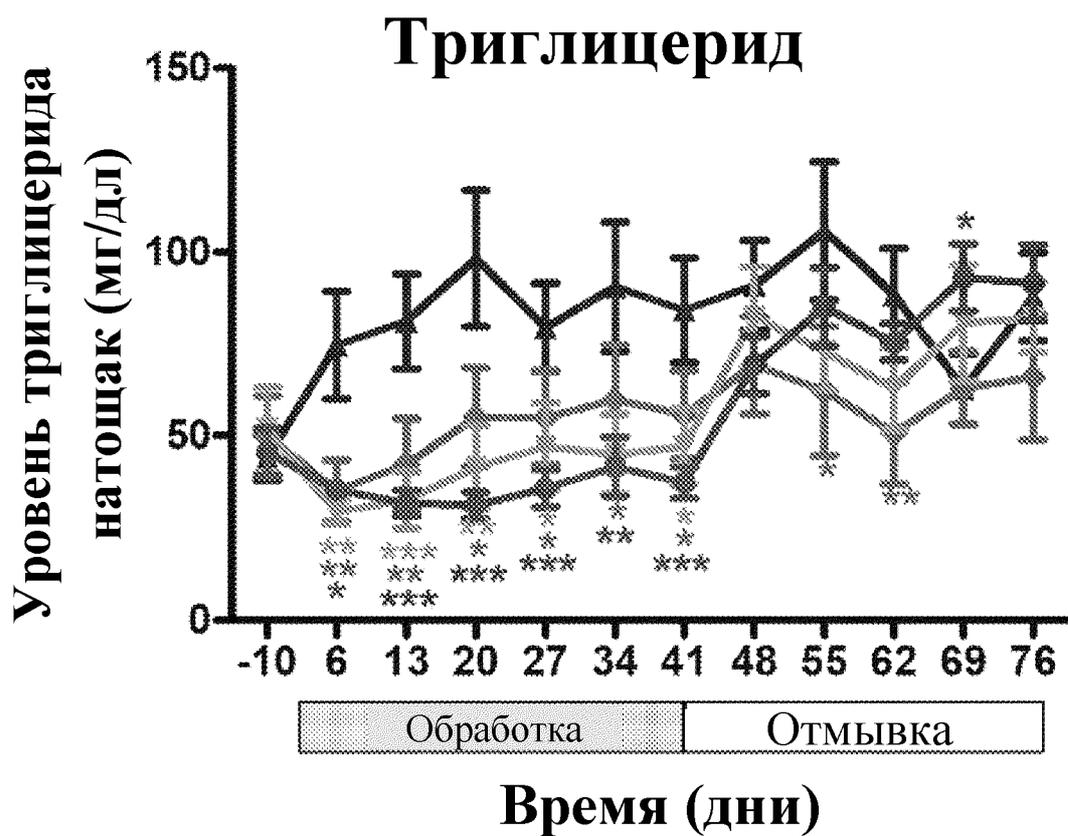
По доверенности

Фигура 1



- ▲ Носитель
- FGF21-Fc (3 мг/кг/вес)
- ▼ scFc-GDF15 (1,5 мг/кг/вес)
- ◆ Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15(1,5 мг/кг/вес)

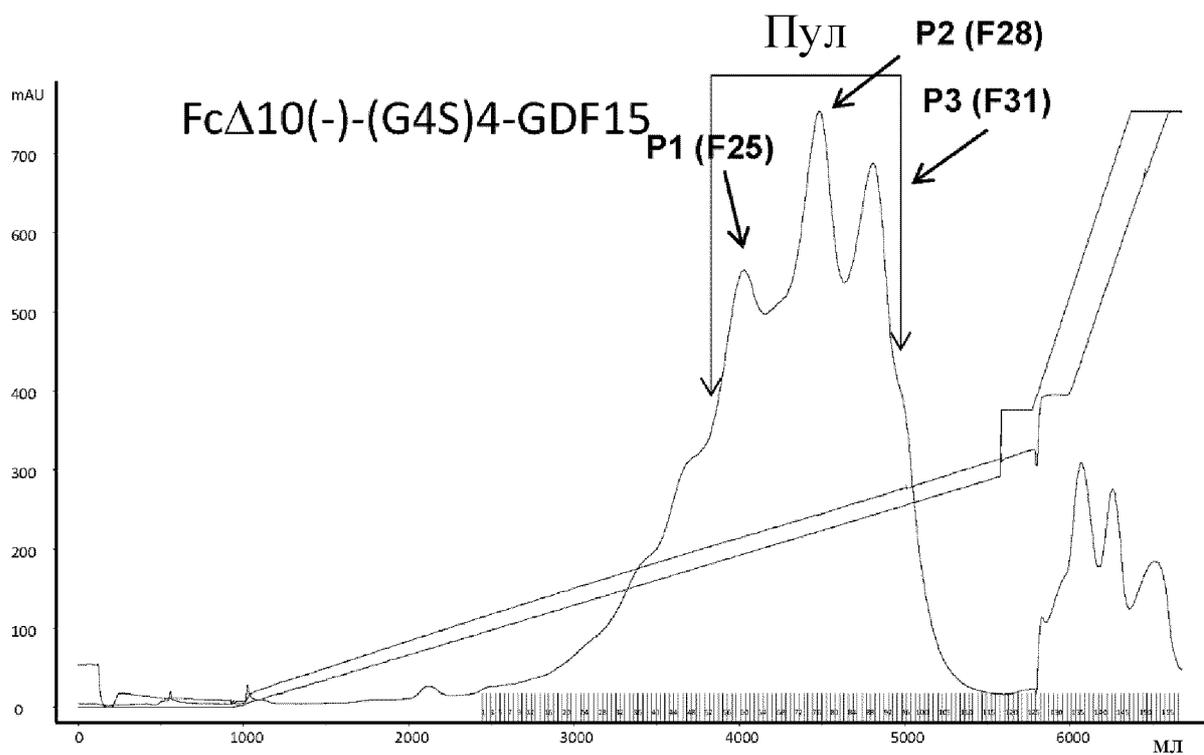
Фигура 2



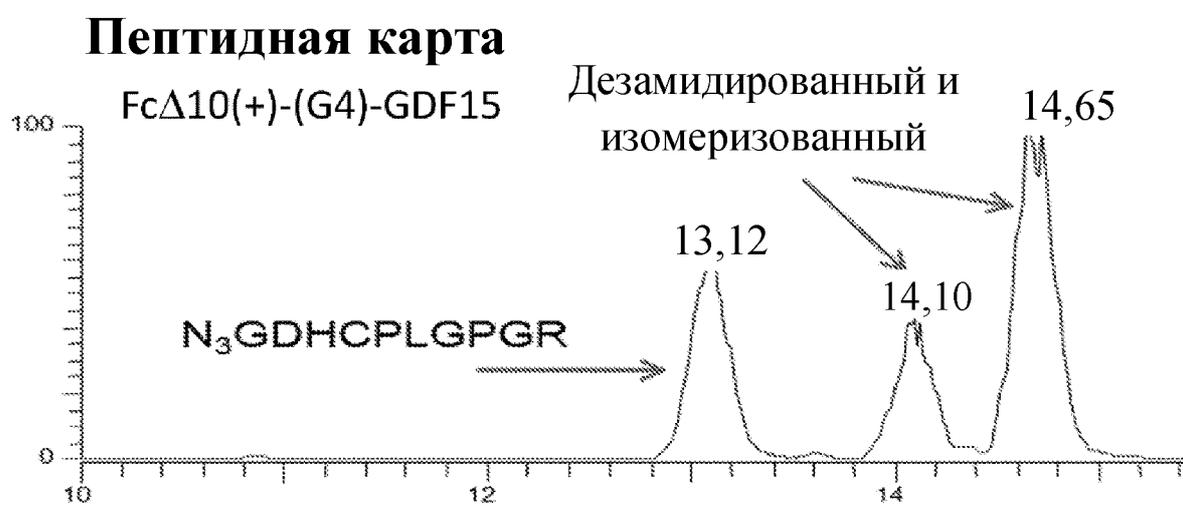
- ▲ Носитель
- FGF21-Fc (3 мг/кг/вес)
- ▼ scFc-GDF15 (1,5 мг/кг/вес)
- ◆ Fc Δ 10(-)-(G4S)4-GDF15 (1,5 мг/кг/вес)

Фигура 3

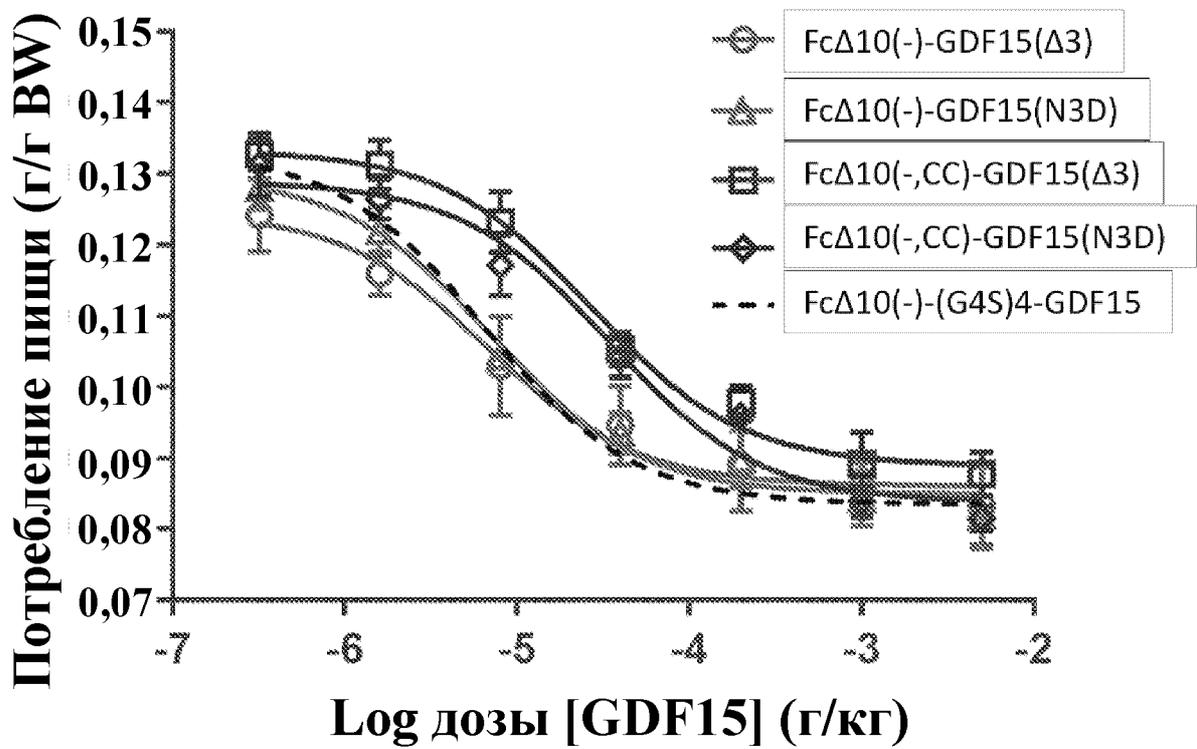
График, демонстрирующий катионообменный профиль



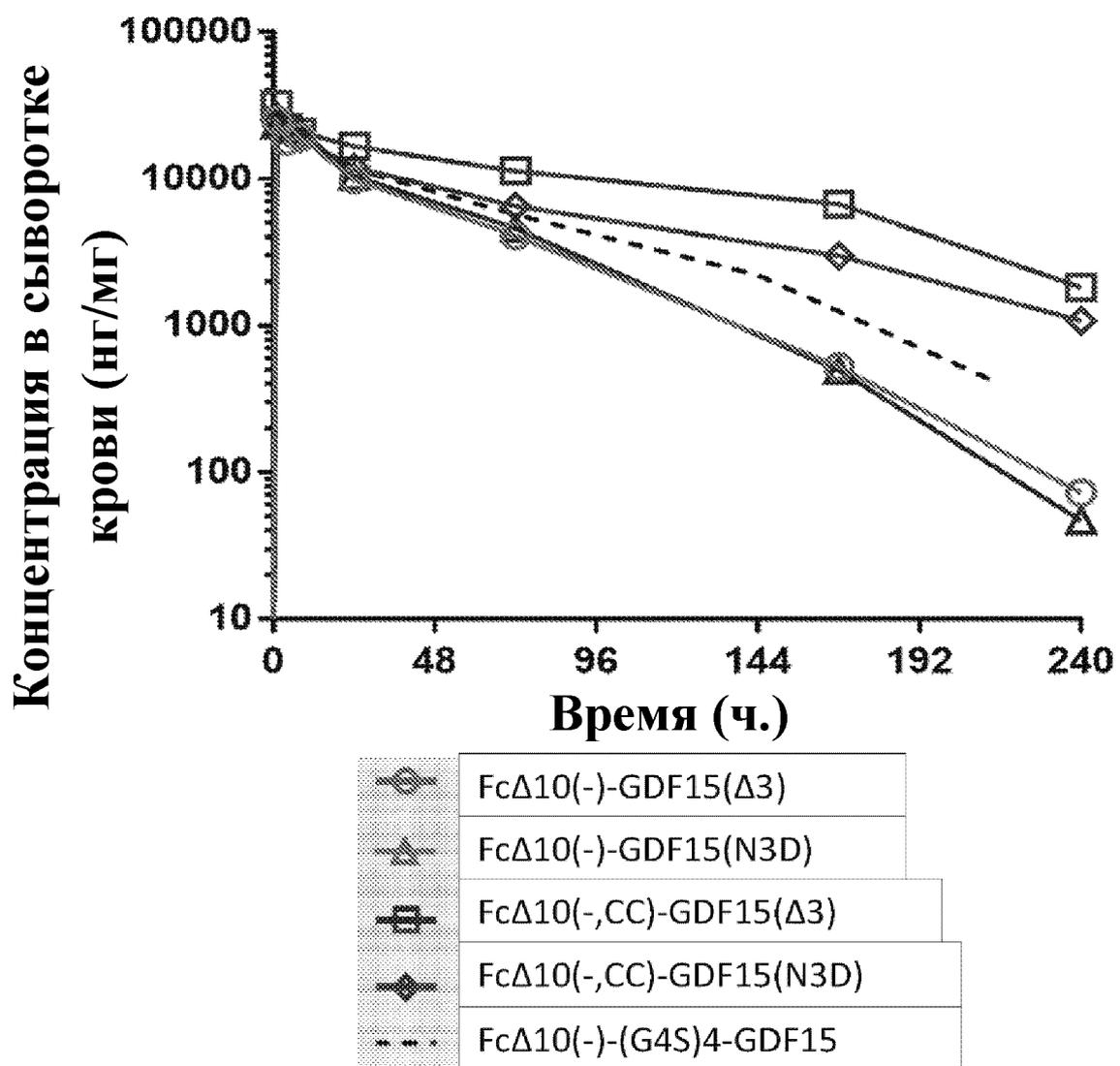
Фигура 4



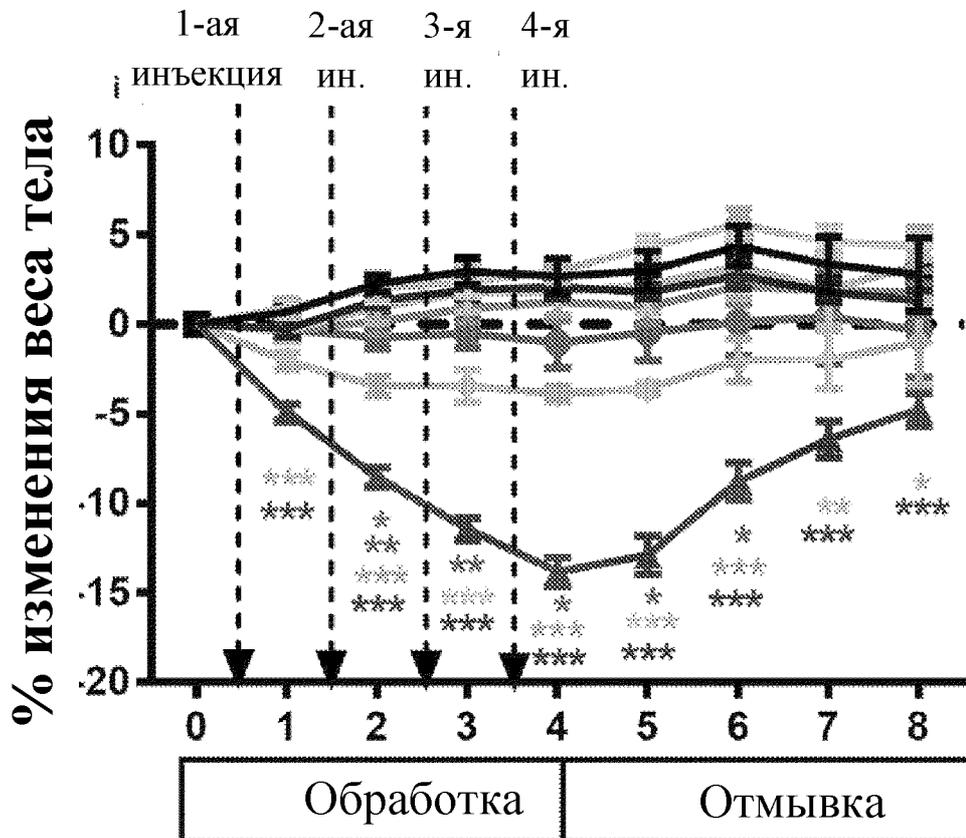
Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7

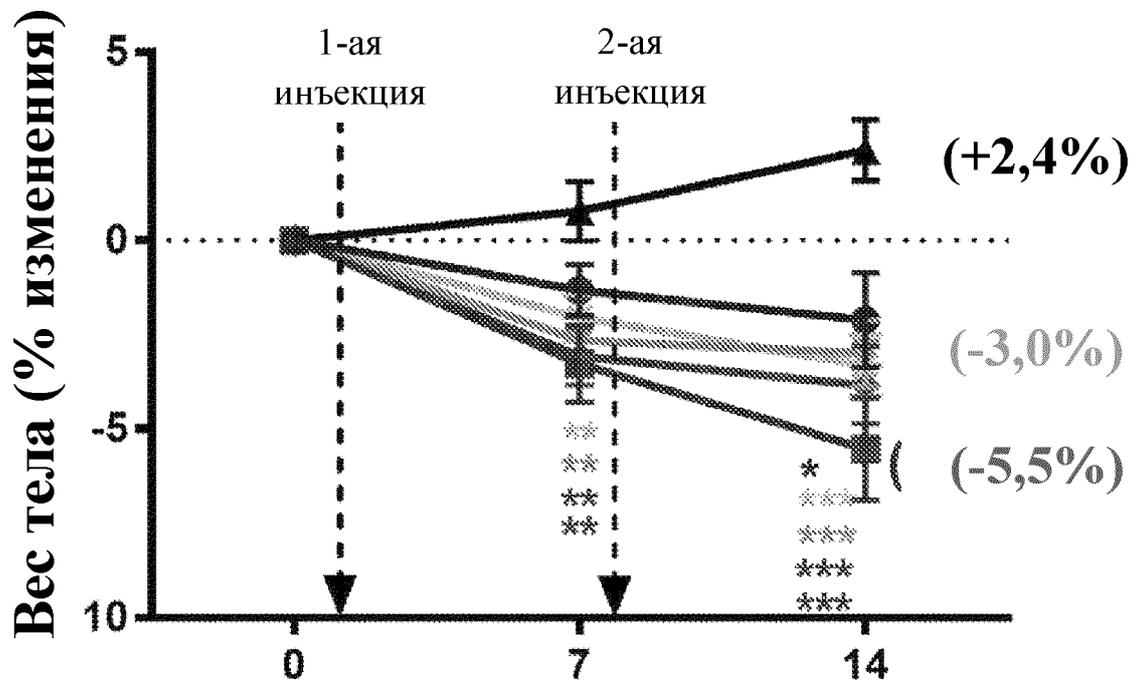


N=5-6/группа, представленная на графике
CASTMD ANCOVA; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

относительно носителя

- Носитель
- ★ 3,0 мг/кг FGF21-Fc
- ◆ 0,5 мг/кг | FcΔ16(-,CC)-GDF15(Δ3/D5E)
- 3,0 мг/кг |
- ◆ 0,5 мг/кг | FcΔ16(-,CC)-GDF15(N3Q/D5E)
- ◆ 3,0 мг/кг |
- ◆ 0,5 мг/кг | FcΔ16(-)-GDF15(N3Q/D5E)
- ◆ 3,0 мг/кг |

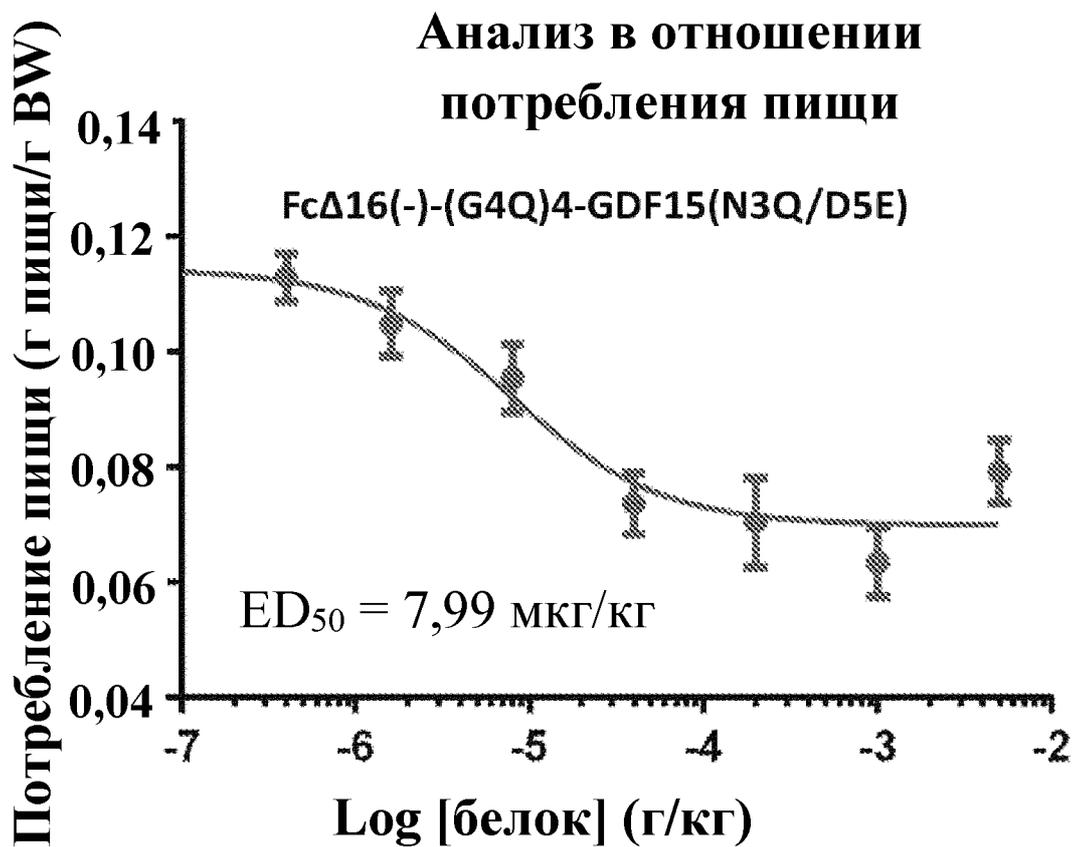
Фигура 8



Время (день)

- ▲ \ Носитель
- ▨ FcΔ10(-)-(G4S)4-GDF15
- ✱ FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q)
- ◆ FcΔ16(-)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)
- FcΔ16(-)-(G4S)-GDF15(N3Q/D5E)
- FcΔ10(-,L234A/L235A)-(G4Q)4-GDF15(N3Q/D5E)

Фигура 9



Фигура 9

