(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 039633 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.18

(21) Номер заявки
201490695

(22) Дата подачи заявки
2012.09.26

(51) Int. Cl. ***A61K 47/48*** (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА

(31) **61/539,280**
(32) **2011.09.26**
(33) **US**
(43) **2015.10.30**
(86) **PCT/US2012/057384**
(87) **WO 2013/049247 2013.04.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Беттхер Брайан Р., Каплан Шари Л., Дэниелс Дуглас С., Хамамацу Норио, Лихт Стюарт, Уэлдон Стивен Крейг (US)

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

(56) WO-A1-2010129503
WO-A2-2010129600
WO-A2-2006078463
KHARITONENKOV A. ET AL.: "FGF-21 as a novel metabolic regulator", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 115, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 1627-1635, XP002362553, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI23606, abstract, page 1629, column 1, lines 20-24

(57) Изобретение относится к идентификации слитых белков, содержащих варианты полипептидов и белков фактора роста фибробластов 21 (FGF21), с улучшенными фармацевтическими свойствами. Описаны также способы лечения ассоциированных с FGF21 нарушений, включая состояния нарушения метаболизма.

039633 B1

039633 B1

Область изобретения

Изобретение относится к новым слитым белкам, содержащим фактор роста фибробластов 21 (FGF21), известный как улучшающий профили метаболизма у субъектов, которым его вводят.

Предпосылки изобретения

Семейство фактора роста фибробластов (FGF) характеризуется 22 генетически различными, гомологичными лигандами, сгруппированными в семь подсемейств. FGF-21 является наиболее близко родственным и формирует подсемейство с FGF-19 и FGF-23. Это подсемейство FGF регулирует различные физиологические процессы, не являющиеся общераспространенными для классических FGF, а именно, гомеостаз энергии и желчной кислоты, метаболизм глюкозы и липидов, и гомеостаз фосфатов, также как витамина D. Более того, в отличие от других FGF, это подсемейство действует эндокринным образом. (Moore D.D. (2007) Science 316, 1436-8) (Beenken et al. (2009) Nature Reviews Drug Discovery 8, 235).

FGF21 представляет собой полипептид из 209 аминокислот, содержащий 28 аминокислотную лидерную последовательность (SEQ ID NO: 5). FGF21 человека обладает приблизительно 79% идентичностью аминокислот с FGF21 мыши и приблизительно 80% идентичностью аминокислот с FGF21 крысы. Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) описан в качестве лекарственного средства против ишемического заболевания сосудов, для заживления ран и против заболеваний, ассоциированных с потерей функций клеток легких, бронхов или альвеол (Nishimura et al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206; публикация патента WO 01/36640; и публикация патента WO 01/18172) Хотя FGF-21 активирует рецепторы FGF и молекулы нижележащей передачи сигнала, включая FRS2a и ERK, непосредственное взаимодействие FGFR и FGF-21 не было детектировано. Исследования идентифицировали β-klotho, на высоком уровне экспрессированный в печени, адипоцитах и поджелудочной железе, в качестве детерминанта клеточного ответа на FGF-21 и кофактора, опосредующего передачу сигнала FGF-21 через FGFR (Kurosu H. et al. (2007) J. Biol. Chem. 282, 26687-95). FGF21 является сильным агонистом комплексов передачи сигнала FGFR1 (IIIc), FGFR2(IIIc) и FGFR3(IIIc) β-klotho.

Показано, что FGF-21 индуцирует инсулин-независимое поглощение глюкозы. Показано также, что FGF-21 облегчает гипергликемию в ряде моделей диабета на крысах. Кроме того, обнаружено, что трансгенные мыши со сверхэкспрессией FGF-21 являются устойчивыми к индуцированными диетой аномалиям метаболизма и обладают уменьшенной массой тела и жировой массой, и усилением чувствительности к инсулину (Badman M.K. et al. (2007) Cell Metab. 5, 426-37). Введение FGF-21 не относящимся к человеку приматам с диабетом вызывало уменьшение уровней в плазме натощак глюкозы, триглицеридов, инсулина и глюкагона, и приводило к значительным улучшениям профилей липопротеинов, включая приблизительно 80% увеличение HDL холестерина (Kharitonenkov A. et al. (2007) Endocrinology 148, 774-81). Недавние исследования молекулярных механизмов действия FGF21 идентифицировали FGF21 в качестве важного эндокринного гормона, помогающего контролировать адаптацию к состоянию голода. (Badman et al., (2009) Endocrinology 150, 4931) (Inagaki et al. (2007) Cell Metab. 5, 415). Это предоставляет ранее отсутствовавшую связь ниже PPARa, посредством которой печень осуществляет коммуникацию с остальным организмом при регуляции биологии гомеостаза энергии (Galman et al. (2008) Cell Metabolism 8, 169) (Lundasen et al. (2007) Biochemical and Biophysical Research Communications 360, 437).

FGF21 регулирует гомеостаз адипоцитов посредством активации пути AMPK/SIRT1/PGC1 для ингибирования экспрессии PPARγ и усиления функции митохондрий. (Chau et al. (2010) PNAS 107, 12553) FGF21 также увеличивает поглощение глюкозы скелетной мускулатурой, как измерено в культивируемых мышечных трубочках человека и выделенной ткани мыши. Обработка FGF21 инсулоцитов грызунов приводит к улучшению функционирования и выживаемости посредством активации путей ERK1/2 и Akt. (Wente et al. (2006) Diabetes 55, 2470) Обработка FGF21 приводит также к измененной экспрессии генов ферментов липогенеза и окисления жирных кислот в печени крыс, подобно передаче сигнала через HNF4a и Foxa2.

Сложностью, связанной с использованием FGF-21 непосредственно в качестве биотерапевтического средства, является то, что время его полужизни является очень коротким. (Kharitonenkov A. et al. (2005) Journal of Clinical Investigation 1 15:1627-1635) У мышей время полужизни FGF21 человека составляет 0,5-1 ч, и у яванских макак время полужизни составляет 2-3 ч. FGF21 можно использовать в форме стерильного фармацевтического состава для многократного использования. Однако определили, что консерванты, т.е. м-крезол, оказывают неблагоприятный эффект на его стабильность в этих условиях.

При разработке белка FGF21 для использования в качестве лекарственного средства для лечения сахарного диабета типа 1 и типа 2 и других состояний нарушения метаболизма, увеличение времени полужизни и стабильности является желательным. Белки FGF21, обладающие увеличенными временем полужизни и стабильностью, могут позволять менее частое дозирование для пациентов, которым вводят белок. Понятно, что существует необходимость разработки стабильного водного состава белка для терапевтического белка FGF21.

Более того, серьезным испытанием при разработке FGF21 в качестве белковых лекарственных средств является преодоление его физической и химической нестабильности. Разнообразие и характеристики состава белков определяют специфическое поведение, такое как сворачивание, конформационная

стабильность и разворачивание/денатурация. К таким характеристикам следует обращаться с целью стабилизировать белки в ходе разработки условий для фармацевтических составов с использованием водных растворов белка (Wang W., Int. J. of Pharmaceutics, 18, (1999)). Желательным эффектом стабилизации интересующих терапевтических белков, например белков по настоящему изобретению, является увеличение устойчивости к протеолизу и ферментативной деградации, таким образом, улучшение стабильности белка и уменьшение агрегации белка.

Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение относится к идентификации новых слитых белков, которые содержат фактор роста фибробластов 21 (FGF21) и обладают улучшенными фармацевтическими свойствами по сравнению с FGF21 дикого типа и его вариантами в условиях фармацевтического состава, например являются более стабильными, обладают способностью улучшать параметры метаболизма у субъектов, которым их вводят, являются менее чувствительными к протеолизу и ферментативной деградации, и с меньшей вероятностью агрегируют и образуют комплексы. Слитые белки по изобретению содержат усечения, мутации и варианты FGF21.

Описаны также способы лечения ассоциированных с FGF21 нарушений, так же как других метаболических, эндокринных и сердечно-сосудистых нарушений, таких как ожирение, сахарный диабет типа 1 и типа 2, панкреатит, дислипидемия, заболевание неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), устойчивость к инсулину, гиперинсулинемия, непереносимость глюкозы, гипергликемия, метаболический синдром, острый инфаркт миокарда, гипертензия, сердечно-сосудистое заболевание, атеросклероз, болезнь периферических артерий, инсульт, сердечная недостаточность, коронарная болезнь сердца, заболевание почек, осложнения диабета, невропатия, гастропарез, нарушения, ассоциированные с серьезными инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина, и другие нарушения метаболизма, и уменьшения смертности и заболеваемости пациентов в критическом состоянии.

Слитые белки по настоящему изобретению можно использовать как поддающиеся инъекции раз в неделю, либо отдельно, либо в комбинации с пероральными средствами против диабета, которые могут улучшать гликемический контроль, массу тела и профиль липидов пациентов с сахарным диабетом типа 1 и типа 2. Белки можно использовать также для лечения ожирения или других ассоциированных с FGF21 состояний.

Слитые белки по изобретению преодолевают значительные трудности физической нестабильности, ассоциированные с белковыми лекарственными средствами, включая, например, введение FGF21 дикого типа, посредством предоставления белков, являющихся более стабильными, менее чувствительными к протеолизу и ферментативной деградации, и с меньшей вероятностью агрегирующими и образующими комплексы, чем FGF21 дикого типа, в условиях фармацевтического состава.

В первом аспекте изобретение относится к слитым белкам с фактором роста фибробластов 21 (FGF21), содержащим одну или несколько из последовательностей, перечисленных в табл. 1, и далее описанных в настоящем документе. Последовательности FGF21, перечисленные в табл. 1, могут представлять собой варианты последовательности FGF21 дикого типа, например последовательности FGF21 дикого типа с номером ссылки в NCBI NP_061986.1, и обнаруженные в таких выданных патентах, как, например, US 6716626 B1, принадлежащий Chiron Corporation.

Такие белки могут являться слитыми, например между вариантами последовательностей FGF21, например последовательностей из табл. 1, и другими молекулами (не относящаяся к FGF21 часть), например константный домен IgG или его фрагмент (например, Fc-область), человеческий сывороточный альбумин (HSA), или альбуминсвязывающие полипептиды. В предпочтительном варианте осуществления не относящаяся к FGF21 часть молекулы представляет собой Fc-область.

Другие варианты осуществления относятся к полинуклеотидам, кодирующим слитые белки по изобретению, к вектору, содержащему указанные полинуклеотиды, и к клетке-хозяину, несущей указанный вектор.

В настоящем документе представлены способы, используемые для получения слитых белков по изобретению, где такие способы включают в себя модификацию белка FGF21, посредством, например, сайт-специфического включения аминокислот в интересующих положениях в белке FGF21 дикого типа, также как слияния части FGF21 молекулы с другими молекулами, например константным доменом IgG или его фрагментом (например, Fc-областью), человеческим сывороточным альбумином (HSA), или альбуминсвязывающими полипептидами. Указанные модификации и слияния улучшают биологические свойства слитых белков по изобретению по сравнению с вариантами белков дикого типа, также как, в некоторых случаях, служат точками присоединения, например, для меток и средств для увеличения времени полужизни белка, и с целью фиксации указанных вариантов на поверхности твердой подложки. Родственные варианты осуществления изобретения представляют собой способы получения клеток, способных продуцировать указанные белки по изобретению, и получения векторов, содержащих ДНК, кодирующую указанные варианты и слитые белки.

В различных вариантах осуществления слитые белки по изобретению, описанные в настоящем документе, могут содержать один или несколько фрагментов последовательностей FGF21 дикого типа,

включая фрагменты, настолько малые, как длиной 8-12 аминокислотных остатков, и где полипептид является способным снижать уровень глюкозы в крови млекопитающего. В различных вариантах осуществления слитые белки по изобретению, описанные в настоящем документе, могут содержать один или несколько вариантов последовательностей FGF21 дикого типа, например с делецией, вставкой, добавлением или заменой одной или нескольких аминокислот по сравнению с их последовательностями дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки по изобретению, описанные в настоящем документе, можно ковалентно связывать с одним или несколькими полимерами, такими как полиэтиленгликоль (PEG) или полисиаловая кислота, либо в положении сайт-специфических модификаций аминокислот, внесенных относительно FGF21 дикого типа, либо в положении аминокислот, общих с вариантами этих белков дикого типа. Группу PEG присоединяют таким образом, чтобы создавать усиление, и/или не создавать помех для биологической функции частей, составляющих слитые белки по изобретению, например вариантов белка FGF21. В других вариантах осуществления полипептиды по изобретению можно сливать с гетерологичной аминокислотной последовательностью, необязательно, через линкер, такой как GS, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). Гетерологичная аминокислотная последовательность может представлять собой константный домен IgG или его фрагмент (например, Fc-область), человеческий сывороточный альбумин (HSA), или альбуминсвязывающие полипептиды. Такие слитые белки, описанные в настоящем документе, могут также формировать мультимеры.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичную аминокислотную последовательность (например, HSA, Fc и т.д.) сливают с амино-концом слитых белков по изобретению. В других вариантах осуществления сливаемую гетерологичную аминокислотную последовательность (например, HSA, Fc и т.д.) сливают с карбокси-концом слитых белков по изобретению.

В другом варианте осуществления описаны способы лечения пациента, страдающего одним или несколькими ассоциированными с FGF21 нарушениями, такими как ожирение, сахарный диабет типа 2, сахарный диабет типа 1, панкреатит, дислипидемия, заболевание неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), устойчивость к инсулину, гиперинсулинемия, непереносимость глюкозы, гипергликемия, метаболический синдром, острый инфаркт миокарда, гипертензия, сердечно-сосудистое заболевание, атеросклероз, болезнь периферических артерий, инсульт, сердечная недостаточность, коронарная болезнь сердца, заболевание почек, осложнения диабета, невропатия, гастропарез, нарушения, ассоциированные с инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина, и другие нарушения метаболизма, включающие в себя введение указанному пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества одного или нескольких белков по изобретению или их фармацевтической композиции.

Изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим слитые белки по изобретению, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое средство для составления. Такие фармацевтические композиции можно использовать в способе лечения нарушения метаболизма, и способ включает в себя введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтической композиции по изобретению. Неограничивающие примеры нарушений метаболизма, которые можно лечить, включают в себя сахарный диабет типа 1 и типа 2, и ожирение.

Эти и другие аспекты изобретения пояснены в следующем подробном описании изобретения.

Краткое описание рисунков

Фиг. 1A-1D показывают, что V188 обладает улучшенной эффективностью в модели диабета на мышах ob/ob по сравнению с V76. Для V188 показаны превосходные результаты при введении 1 мг/кг, по сравнению с 5 мг/кг, при которых вводили V76. На фиг. 1A показан уровень глюкозы в плазме после еды в качестве считываемого результата (круги представляют собой носитель (PBS - фосфатно-солевой буфер), квадраты представляют собой V76 при 5 мг/кг, и треугольники представляют собой V188 при 1 мг/кг. На фиг. 1B показан уровень инсулина в плазме после еды в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V188 при 1 мг/кг). На фиг. 1C показана масса тела в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V188 при 1 мг/кг). На фиг. 1D показано содержание липидов в печени в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V188 при 1 мг/кг);

на фиг. 2A-2D показано, что V101 обладает улучшенной эффективностью в модели диабета на мышах ob/ob по сравнению с V76. Для V101 показаны превосходные результаты при введении 1 мг/кг, по сравнению с 5 мг/кг, при которых вводили V76. На фиг. 2A показан уровень глюкозы в плазме после еды в качестве считываемого результата (круги представляют собой носитель (PBS - фосфатно-солевой буфер), квадраты представляют собой V76 при 5 мг/кг, и треугольники представляют собой V101 при 1 мг/кг. На фиг. 2B показан уровень инсулина в плазме крови после еды в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V101 при 1 мг/кг). На фиг. 2C показана масса тела в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V101 при 1 мг/кг). На фиг. 2D показано содержание липидов в печени в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V101 при 1 мг/кг);

на фиг. 3A-3D показано, что V103 обладает улучшенной эффективностью в модели диабета на мы-

шах ob/ob по сравнению с V76. Для V103 показаны превосходные результаты при введении 1 мг/кг, по сравнению с 5 мг/кг, при которых вводят V76. На фиг. 3A показан уровень глюкозы в плазме крови после еды в качестве считываемого результата (круги представляют собой носитель (PBS - фосфатно-солевой буфер), квадраты представляют собой V76 при 5 мг/кг, и треугольники представляют собой V103 при 1 мг/кг. На фиг. 3B показан уровень инсулина в плазме крови после еды в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V103 при 1 мг/кг). На фиг. 3C показана масса тела в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V103 при 1 мг/кг). На фиг. 3D показано содержание липидов в печени в качестве считываемого результата (слева направо: носитель, V76 при 5 мг/кг и V103 при 1 мг/кг);

на фиг. 4A-4D показаны превосходные фармакогенетические и термодинамические свойства, которыми обладают слитые белки по изобретению по сравнению со слитыми белками FGF21, описанными в данной области. На фиг. 4A показаны концентрации в плазме слитых белков по изобретению в Публикации PCT WO 10/129600, описанных как Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G) и Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E), с последующей IV инъекцией указанного слитого белка мышам. На фиг. 4B показаны фармакокинетические свойства слитых белков по изобретению (V101, V103 и V188) после однократной IV дозы у мышей, как анализировали посредством анти-Fc-ELISA по сравнению с данными фармакокинетики, полученными у мышей для V76 в предварительном исследовании с использованием ELISA с анти-FGF21 антителом. На фиг. 4C показана выборочная проверка слитых белков по изобретению на Вестерн-блоте с анти-FGF21, что согласуется с данными анти-Fc-ELISA через 120 ч и 15 суток. Образцы на блоте являются следующими: A представляет V101, B представляет V103 и C представляет V188. Контроль представляет собой V101 и сыворотку. На фиг. 4D показана значительно увеличенная термодинамическая стабильность слитых белков по изобретению по сравнению с V76. Сверху вниз, на фигуре представлены V101, V103, и V188, все из которых имеют улучшенные температуры плавления (T_m) по сравнению с V76 (T_m<50°C (не показано)) и FGF21 дикого типа (T_m=46,5°C±0,3 (не показано)).

Подробное описание изобретения

Слитые белки по изобретению представляют собой модифицированные варианты полноразмерного полипептида FGF21 дикого типа, как известно в данной области. Последовательность FGF21 дикого типа может служить в качестве контрольной последовательности (SEQ ID NO:1), например, когда необходимы сравнения между последовательностью FGF21 дикого типа и вариантами белка. Последовательность FGF21 дикого типа имеет контрольную последовательность номер NP_061986.1 в NCBI и может быть обнаружена в таких выданных патентах, как, например, US 6716626B1, принадлежащий Chiron Corporation (SEQ ID NO: 1)

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

Соответствующая последовательность мРНК, кодирующая полноразмерный полипептид FGF21 (контрольная последовательность номер NM_0191 13,2 в NCBI), показана ниже (SEQ ID NO: 2)

```
   1 ctgtcagctg aggatccagc cgaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc
  61 acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc
 121 ccggagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac
 181 tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt cttctgctgg gagcctgcca ggcacacccc
 241 atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac
 301 acagatgatg cccagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg
 361 ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt
 421 attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg
 481 tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac
 541 ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac ggcctcccgc tgcacctgcc agggaacaag
 601 tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgct tcctgccact accaggcctg
 661 ccccccgcac tcccggagcc acccggaatc ctggcccccc agccccccga tgtgggctcc
 721 tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc cagggccgaa gccccagcta cgcttcctga
 781 agccagaggc tgtttactat gacatctcct ctttatttat taggttattt atcttattta
 841 ttttttttatt tttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa
 901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

Зрелая последовательность FGF21 лишена лидерной последовательности и может включать также другие модификации полипептида, такие как протеолитический процессинг амино-конца (с лидерной последовательностью или без) и/или карбокси-конца, отщепление меньшего полипептида от большего предшественника, N-связанное и/или O-связанное гликозилирование, и другие посттрансляционные модификации, известные специалистам в данной области. Репрезентативный пример зрелой последовательности FGF21 обладает следующей последовательностью (SEQ ID NO: 3, которая представляет собой аминокислоты положений 29-209 полноразмерной белковой последовательности FGF21 (контрольная последовательность номер NP_061986.1 в NCBI))

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

Соответствующая последовательность кДНК, кодирующая зрелый полипептид FGF21 (SEQ ID NO: 3), показана ниже (SEQ ID NO: 4)

```
  1 caccccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaagtccg gcagcggtac
 61 ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg
121 gtgggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg
181 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg
240 gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt
301 gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgctgca cctgccaggg
360 aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctcgcttcct gccactacca
421 ggcctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcctgg ccccccagcc ccccgatgtg
481 ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct
541 tcctga
```

Слитые белки по изобретению могут содержать варианты белков или мутанты белков дикого типа, перечисленных в настоящем документе, например, варианты FGF21. Как применяют в настоящем документе, термины "вариант белка", "человеческий вариант", "вариант полипептида или белка", "вариант", "мутант", так же как любые подобные термины или их конкретные варианты (например, "вариант белка FGF21", "вариант", "мутант FGF21" и т.д.), определяют последовательности белка или полипептида, содержащие модификации, усечения, другие варианты встречающихся в природе (т.е. дикого типа) эквивалентов белка или полипептида или соответствующих природных последовательностей. "Вариант FGF21" или "мутант FGF21", например, описан относительно белка FGF21 дикого типа (т.е. встречающегося в природе), как описано в настоящем документе.

Репрезентативные последовательности слитого белка по изобретению перечислены в табл. 1. Описания указанных слитых белков включают в себя вариант FGF21 и, где применимо, линкер. Изменения или замены, используемые в варианте FGF21, пронумерованы и описаны относительно FGF21 дикого типа. Например, "вариант 101 (V101)" (SEQ ID NO: 10) представляет собой слитый белок FC-FGF21 с аминокислотным линкером и следующими заменами, выполненными относительно FGF21 дикого типа: Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, P174L, S195A, P199G, G202A.

Таблица 1. FGF21 Варианты слитых с Fc белков

SEQ ID NO:	Последовательность	Наименование*
7	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD AQQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGALYGS LHFDPEACSF RELLLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPGNKSPH RDPAPRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LSMVGPSQGR SPSYAS	Полноразмерный слитый белок с Fc на N-конце с 2 ак линкером (GS) и FGF21 WT
8	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS	Полноразмерный слитый белок с Fc на N-конце с 15 ак линкером (GGGGS x 3) между Fc и FGF21 WT
9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQ**E**TEAHLE IREDGTVGGA A**H**QSPESLL**E** LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQ**K**PDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGN**R**SP H**C**DPAP**Q**GPA RFLPLPGLPP A**L**PEPPGILA PQPPDVGSSD PL**A**MVGPSQG RSPSYAS	Вариант #76 = Белок всего с 9 мутациями относительно FGF21 дикого типа (как в WO01/018172)
10	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD A**C**QTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDG**T**LYGS LHFDPEACSF RELLLEDGYN VYQSEAHGLP LHLP**C**N**R**SPH RDPA**S**RGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP L**A**MVG**G**SQ**A**R SPSYAS	Вариант # 101 = слитый белок с Fc на N-конце с 2 ак линкером (GS) между Fc и FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

11	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD A**C**QTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC Q**K**PDGALYGS LHFDPEACSF RELLLEDGYN VYQSEAHGLP LHLP**C**N**R**SPH RDPA**S**RGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP L**A**MVG**G**SQ**A**R SPSYAS	Вариант # 103 = слитый белок с Fc на N-конце с 2 ак линкером (GS) = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
12	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDA**C**QTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQ**K**PDGAL YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLP**C**N**R** SPHRDPA**S**RG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPL**A**MVG**G**S Q**A**RSPSYAS	Вариант #188 = V103 с 15 ак линкером (GGGGS x 3) между Fc и FGF21 = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
13	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSGGG GSDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDA**C**QTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDG**T**L YGSLHFDPEA CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLP**C**N**R** SPHRDPA**S**RG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPL**A**MVG**G**S Q**A**RSPSYAS	Вариант #204 = V101 с 15 ак линкером (GGGGS x 3) между и FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

*- Следует отметить, что последовательность FGF21 дикого типа в этой таблице относится к контрольной последовательности номер NP_061986.1 в NCBI (SEQ ID NO: 1), если не указано иначе. Все мутации в группе FGF21 и соответствующая нумерация аминокислот указанных мутаций обращаются к (SEQ ID NO: 1), а не к полноразмерным последовательностям в этой таблице, которые могут также включать области Fc и линкера.

Варианты или мутанты, используемые в слитых белках по изобретению, например варианты FGF21 дикого типа, характеризуются по меньшей мере одной замещенной, добавленной, и/или удаленной аминокислотой относительно белка дикого типа. Кроме того, варианты могут включать в себя N- и/или C-концевые усечения относительно белков дикого типа. Говоря в общем, вариант обладает некоторыми модифицированными свойствами, структурными или функциональными, белка дикого типа. Например, вариант может иметь усиленную или улучшенную физическую стабильность в концентрированных растворах (например, меньшую агрегацию, опосредованную гидрофобностью), усиленную или улучшенную стабильность в плазме при инкубации с плазмой крови или усиленную или улучшенную биоактивность с сохранением в то же время преимущественного профиля биоактивности.

Приемлемые замены и модификации аминокислот, составляющие различия между частями слитых белков по изобретению и их сравнительных белков дикого типа, включают в себя, но без ограничения, одну или несколько замен аминокислот, включая замены на не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, и усечения. Таким образом, слитые белки по изобретению (например, слитые белки по изобретению) включают в себя, но без ограничения, сайт-специфические мутанты, усеченные полипептиды, устойчивые к протеолизу мутанты, мутанты с уменьшением агрегации комбинированные мутанты, и слитые белки, как описано в настоящем документе.

Специалисту в области экспрессии белков понятно, что последовательности метионин или метионин-аргинин можно вводить на N-конце любого из слитых белков по изобретению для экспрессии в E.coli, и они предусмотрены в контексте этого изобретения.

Слитые белки по изобретению могут обладать увеличенной совместимостью с фармацевтическими консервантами (например, м-крезолом, фенолом, бензиловым спиртом), таким образом, обеспечивая

возможность получения содержащего консерванты фармацевтического состава, сохраняющего физико-химические свойства и биологическую активность белка в ходе хранения. Соответственно, варианты с усиленной фармацевтической стабильностью по сравнению с диким типом, обладают улучшенной физической стабильностью в концентрированных растворах, как в физиологических условиях, так и в условиях содержащего консерванты фармацевтического состава, с сохранением в то же время биологической активности. В качестве неограничивающего примера, слитые белки по изобретению могут являться более устойчивыми к протеолизу и ферментативной деградации; могут обладать улучшенной стабильностью; и могут иметь меньшую вероятность агрегации, по сравнению с их эквивалентами дикого типа или соответствующей природной последовательностью. Как применяют в настоящем документе, эти термины не являются взаимоисключающими или ограничивающими, вполне возможно, что данный вариант обладает одним или несколькими модифицированными свойствами белка дикого типа.

Изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим слитые белки по изобретению, включая, например, аминокислотную последовательность FGF21, которая является по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, но в которой конкретные остатки, придающие желательное свойство варианту белка FGF21, например, улучшенную активность по отношению к FGF21-рецепторам, устойчивость к протеолизу, увеличенное время полужизни или уменьшающие агрегацию свойства и их комбинации, не были дополнительно модифицированы. Иными словами, за исключением остатков в мутантной последовательности FGF21, модифицированных для придания устойчивости к протеолизу, уменьшения агрегации или других свойств, приблизительно 5% (альтернативно 4%, альтернативно 3%, альтернативно 2%, альтернативно 1%) всех других аминокислотных остатков в мутантной последовательности FGF21 могут являться модифицированными. Такие мутанты FGF21 обладают по меньшей мере одним видом активности полипептида FGF21 дикого типа.

Изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 85% идентичной, и более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно на 90-95% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, но в которой нуклеотиды, кодирующие аминокислотные остатки, придающие кодируемому белку устойчивость к протеолизу, уменьшение агрегации или другие свойства, не были дополнительно модифицированы. Иными словами, за исключением нуклеотидов, кодирующих остатки в мутантных последовательностях FGF21, модифицированных для придания устойчивости к протеолизу, уменьшения агрегации или других свойств, приблизительно 15%, и более предпочтительно, приблизительно 10-5% всех других нуклеотидов в мутантной последовательности могут являться модифицированными. Такие молекулы нуклеиновой кислоты кодируют белки, обладающие по меньшей мере одним видом активности их эквивалентов дикого типа.

В настоящем документе представлены способы, используемые для получения слитых белков по изобретению, где указанные способы включают в себя сайт-специфическую модификацию и не являющуюся сайт-специфической модификацию вариантов белков дикого типа (например, белка FGF21 дикого типа, как описано в настоящем документе), например, усечения белков дикого типа, и сайт-специфическое включение аминокислот в интересующих положениях в белках дикого типа. Указанные модификации улучшают биологические свойства слитых белков по изобретению по сравнению с белками дикого типа, так же как, в некоторых случаях, служат точками присоединения, например для меток и средств для увеличения времени полужизни белка, и с целью фиксации указанных вариантов на поверхности твердой подложки. Родственные варианты осуществления изобретения представляют собой способы получения клеток, способных продуцировать указанные слитые белки по изобретению, и получения векторов, содержащих ДНК, кодирующую указанные варианты.

В конкретных вариантах осуществления такие модификации, например сайт-специфические модификации, используют для присоединения конъюгатов, например групп PEG, к белкам, полипептидам и/или пептидам по изобретению, с целью, например, увеличения времени полужизни или иным способом улучшения биологических свойств указанных белков, полипептидов и/или пептидов. Такие способы описаны далее в настоящем документе.

В других вариантах осуществления такие модификации, например сайт-специфические модификации, используют для присоединения других полимеров, малых молекул и последовательностей рекомбинантных белков, увеличивающих время полужизни белка по изобретению. Один из таких вариантов осуществления включает в себя присоединение жирных кислот или специфических альбуминсвязывающих соединений к белкам, полипептидам и/или пептидам. В других вариантах осуществления модификации выполняют для конкретного типа аминокислот, и их можно присоединять в одном или нескольких участках в белке.

В других вариантах осуществления такие модификации, например сайт-специфические модификации, используют как средства для присоединения для получения мультимеров белка дикого типа и/или вариантов, например димеров (гомодимеров или гетеродимеров) или тримеров, или тетрамеров. Эти мультимерные молекулы белка могут, кроме того, иметь такие группы, как PEG, сахара и/или конъюгаты PEG-холестерин, присоединенные или слитые по амино-концу или карбокси-концу с другими белками,

такими как Fc, человеческий сывороточный альбумин (HSA) и т.д.

В других вариантах осуществления указанные сайт-специфические модификации используют для получения белков, полипептидов и/или пептидов, в которых положение сайт-специфически введенного пирролизина или аналога пирролизина или не встречающихся в природе аминокислот (пара-ацетил-Phe, пара-азидо-Phe) позволяет контролируемую ориентацию и присоединение таких белков, полипептидов и/или пептидов на поверхности твердой подложки или наличие таких присоединенных групп, как PEG, сахара и/или конъюгаты PEG-холестерин.

В других вариантах осуществления такие сайт-специфические модификации используют для сайт-специфического сшивания белков, полипептидов и/или пептидов, таким образом, формируя гетеро-олигомеры, включая, но без ограничения, гетеродимеры и гетеротримеры. В других вариантах осуществления такие сайт-специфические модификации используют для сайт-специфического сшивания белков, полипептидов и/или пептидов, таким образом, формируя конъюгаты белок-белок, конъюгаты белок-полипептид, конъюгаты белок-пептид, конъюгаты полипептид-полипептид, конъюгаты полипептид-пептид или конъюгаты пептид-пептид. В других вариантах осуществления сайт-специфическая модификация может включать в себя точку разветвления, чтобы позволять присоединение более одного типа молекул в отдельном участке белка, полипептида или пептида.

В других вариантах осуществления модификации, перечисленные в настоящем документе, можно осуществлять не сайт-специфическим способом, и они приводят к конъюгатам белок-белок, конъюгатам белок-полипептид, конъюгатам белок-пептид, конъюгатам полипептид-полипептид, конъюгатам полипептид-пептид или конъюгатам пептид-пептид по изобретению.

Определения.

Различные определения используют на протяжении этого документа. Большинство слов имеют значения, приписываемые этим словам специалистом в данной области. Слова, конкретно определенные либо ниже, либо или где-нибудь еще в этом документе, имеют значение, представленное в контексте настоящего изобретения в целом и как правило, как понимают специалисты в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "FGF21" относится к члену семейства белков факторов роста фибробластов (FGF). Аминокислотная последовательность FGF21 (номер доступа в GenBank NP_061986.1) указан как SEQ ID NO: 1, соответствующая ему полинуклеотидная последовательность указана как SEQ ID NO: 2 (контрольная последовательность номер NM_019113.2 в NCBI). "Вариант FGF21", "мутант FGF21" и сходные термины описывают модифицированный вариант белка FGF21, например, с составляющими аминокислотными остатками делетированными, добавленными, модифицированными или замененными.

Как применяют в настоящем документе, термин "рецептор FGF21" относится к рецептору для FGF21 (Kharitonenkov A. et al. (2008) Journal of Cellular Physiology 215:1 -7; Kurosu Het al. (2007) JBC 282:26687-26695; Ogawa Yet al. (2007) PNAS 104:7432-7437).

Термин "полипептид FGF21" относится к встречающемуся в природе полипептиду, экспрессируемому у человека. Для целей по этому описанию термин "полипептид FGF21" можно использовать взаимозаменяемо для обозначения любого полноразмерного полипептида FGF21, например, SEQ ID NO: 1, который состоит из 209 аминокислотных остатков и который кодирует нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 2; любой зрелой формы полипептида, которая состоит из 181 аминокислотных остатков и в котором 28 аминокислотных остатков на амино-конце полноразмерного полипептида FGF21 (т.е. составляющих сигнальный пептид) удалены.

"Вариант 76", как применяют в настоящем документе, представляет собой вариант белка FGF21, характеризующийся 40 кДа разветвленным PEG, связанным через Cys154, и восемью точечными мутациями по сравнению с белком дикого типа из 177 аминокислот. Синтез варианта описан более подробно в настоящем документе, и белковая последовательность представлена в табл. 1 и SEQ ID NO: 9.

Термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которая: (1) отделена по меньшей мере от приблизительно 50% белков, липидов, углеводов или других материалов, с которыми она встречается в природе, когда тотальную нуклеиновую кислоту выделяют из клеток-источников, (2) не связана со всем или с частью полинуклеотида, с которым "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" связана в природе, (3) функционально связана с полинуклеотидом, с которым не связана в природе, или (4) не встречается в природе в форме части большей полинуклеотидной последовательности. Предпочтительно, выделенная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению является по существу свободной от любых других загрязняющих молекул нуклеиновой кислоты или других загрязнений, обнаруженных в ее природном окружении, которые могут мешать ее использованию для получения полипептида или ее терапевтическому, диагностическому, профилактическому или исследовательскому использованию.

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

Термин "экспрессирующий вектор" относится к вектору, который является пригодным для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, управляющие экспрессией и/или контролирующие экспрессию вставленных гетерологичных последовательностей нуклеино-

вой кислоты. Экспрессия включает в себя, но без ограничения, такие процессы, как транскрипция, трансляция и сплайсинг РНК, если присутствуют интроны.

Термин "функционально связанный" применяют в настоящем документе для обозначения расположения фланкирующих последовательностей, где описанные таким образом фланкирующие последовательности скомпонованы или собраны так, чтобы выполнять их обычную функцию. Элементы слитых белков могут являться функционально связанными друг с другом, так чтобы позволять слитому белку функционировать, как если бы он представлял собой встречающийся в природе, эндогенный белок, и/или для объединения несовместимых элементов указанных слитых белков синергическим образом.

На уровне нуклеотидов, фланкирующая последовательность, функционально связанная с кодирующей последовательностью, может являться способной влиять на репликацию, транскрипцию и/или трансляцию кодирующей последовательности. Например, кодирующая последовательность является функционально связанной с промотором, когда промотор является способным управлять транскрипцией кодирующей последовательности. Фланкирующая последовательность не обязательно является смежной с кодирующей последовательностью, пока она функционирует корректно. Таким образом, например, вставка нетранслируемой, но транскрибируемой последовательности может присутствовать между промоторной последовательностью и кодирующей последовательностью, и промоторную последовательность еще можно считать "функционально связанной" с кодирующей последовательностью.

Термин "клетка-хозяин" используют для обозначения клетки, которая является трансформированной или является поддающейся трансформации последовательностью нуклеиновой кислоты и затем является способной экспрессировать выбранный интересующий ген. Термин включает в себя потомство родительской клетки, является или нет потомство идентичным по морфологии или по генетическому составу исходному родителю, при условии, что присутствует выбранный ген.

Термин "аминокислота", как применяют в настоящем документе, относится к природным аминокислотам, неприродным аминокислотам, аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, функционирующих сходным образом с природными аминокислотами, всем в их D- и L-стереоизомерах, если их структура позволяет такие стереоизомерные формы. Аминокислоты обозначены в настоящем документе по их наименованиям, их общеизвестным трехбуквенным символам или однобуквенным символам, рекомендованным Комиссией биохимической номенклатуры IUPAC-IUB.

Термин "природный" при использовании в связи с биологическими материалами, такими как молекулы нуклеиновой кислоты, полипептиды, клетки-хозяева и т.п., относится к материалам, обнаруженным в природе и не модифицированным человеком. Сходным образом, "неприродный", как применяют в настоящем документе, относится к материалу, не обнаруженному в природе или структурно модифицированному или синтезированному человеком. При использовании в связи с нуклеотидами, термин "природный" относится к основаниям аденину (A), цитозину (C), гуанину (G), тимину (T) и урацилу (U). При использовании в связи с аминокислотами, термин "природный" относится к 20 общепринятым аминокислотам (т.е. аланину (A), цистеину (C), аспарагиновой кислоте (D), глутаминовой кислоте (E), фенилаланину (F), глицину (G), гистидину (H), изолейцину (I), лизину (K), лейцину (L), метионину (M), аспарагину (N), пролину (P), глутамину (Q), аргинину (R), серину (S), треонину (T), валину (V), триптофану (W) и тирозину (Y)), так же как к селеноцистеину, пирролизину (Pyl, или O) и пирролин-карбоксилизину (Pel или Z).

Пирролизин (Pyl) представляет собой аминокислоту, обнаруженную в природе в составе метиламинметилтрансфераз метаногенных архебактерий семейства Methanosarcina. Пирролизин представляет собой аналог лизина, котрансляционно введенный в находящиеся в рамке кодоны UAG в соответствующей мРНК, и его рассматривают как 22-ю природную аминокислоту.

Как описано, по меньшей мере, в патентной публикации PCT WO 2010/48582 (заявитель IRM, LLC), попытки биосинтеза пирролизина (Pyl) в E.coli приводили к образованию "деметилированного пирролизина", обозначенного в настоящем документе как пирролин-карбоксилизин, или Pcl. "Pcl", как применяют в настоящем документе, относится к Pcl-A или Pc1-B.

Термины "не-природная аминокислота" и "неприродная аминокислота", как применяют в настоящем документе, взаимозаменяемо предназначены для представления структур аминокислот, которые невозможно получить биосинтетически в каком-либо организме с использованием немодифицированных или модифицированных генов из какого-либо организма, одинаковых или различных. Термины относятся к аминокислотному остатку, не присутствующему в природной (дикого типа) белковой последовательности FGF21 или последовательности по настоящему изобретению. Они включают в себя, но без ограничения, модифицированные аминокислоты и/или аналоги аминокислот, не являющиеся одной из 20 природных аминокислот, селеноцистеином, пирролизином (Pyl) или пирролин-карбоксилизином (Pcl, например, как описано в патентной публикации PCT WO 2010/48582). Такие неприродные аминокислотные остатки можно вводить посредством замены природных аминокислот и/или посредством вставки неприродных аминокислот в природную (дикого типа) белковую последовательность FGF21 или последовательности по изобретению. Можно включать также неприродный аминокислотный остаток такой, что желательную функциональность придают молекуле FGF21, например способность связывать функциональную группу (например, PEG). При использовании в связи с аминокислотами, символ "U" должен

означать "не-природную аминокислоту" и "неприродную аминокислоту", как применяют в документе.

Кроме того, понятно, что такие "неприродные аминокислоты" требуют модифицированной тРНК и модифицированной тРНК-синтетазы (RS) для включения в белок. Эти "отобранные" ортогональные пары тРНК/RS получают посредством способа отбора, как разработано Schultz et al. или посредством случайной или направленной мутации. Например, пирролин-карбоксилизин является "природной аминокислотой", поскольку ее получают биосинтетически посредством генов, перенесенных от одного организма в клетки-хозяева и поскольку ее включают в белки с использованием природных генов тРНК и тРНК-синтетазы, в то время как п-аминофенилаланин (см. Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson J.C., Santoro S.W., Wang L., Martin A.B., King D.S., Horn D.M., Schultz PG. J. Am. Chem. Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9) является "неприродной аминокислотой", поскольку, хотя и образуется биосинтетически, ее включают в белки посредством "отобранной" ортогональной пары тРНК/тРНК-синтетаза.

Модифицированные кодируемые аминокислоты включают в себя, но без ограничения, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат, О-фосфосерин, азетидинкарбоновую кислоту, 2-аминоадипиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, β-аланин, аминопропионовую кислоту, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислота, 2-аминопимелиновую кислоту, третичный-бутилглицин, 2,4-диаминоизомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-метилглицин, N-этиласпарагин, гомопролин, гидроксилизин, алло-гидроксилизин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилаланин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-метилпентилглицин, N-метилвалин, нафталанин, норвалин, норлейцин, орнитин, пентилглицин, пипеколиновую кислоту и тиопролин. Термин "аминокислота" включает в себя природные аминокислоты, которые являются метаболитами в конкретных организмах, но не являются кодированными генетическим кодом для включения в белки. Такие аминокислоты включают в себя, но без ограничения, орнитин, D-орнитин и D-аргинин.

Термин "аналог аминокислоты", как применяют в настоящем документе, относится к соединениям, обладающим такой же основной химической структурой, как природная аминокислота, только в качестве примера, α-атом углерода, связанный с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R-группа. Аналоги аминокислот включают в себя природные и неприродные аминокислоты, являющиеся химически блокированными, обратимо или необратимо или их С-концевая карбоксируппа, их N-концевая аминогруппа и/или функциональные группы их боковых цепей являются химически модифицированными. Такие аналоги включают в себя, но без ограничения, метионинсульфоксид, метионинсульфон, S-(карбоксиметил)цистеин, S-(карбоксиметил)цистеинсульфоксид, S-(карбоксиметил)цистеинсульфон, (β-метиловый сложный эфир)аспарагиновой кислоты, N-этилглицин, аланинкарбоксамид, гомосерин, норлейцин и метионинметилсульфоний.

Термин "миметики аминокислот", как применяют в настоящем документе, относится к химическим соединениям, обладающим структурой, отличной от общей структуры аминокислоты, но функционирующим сходным образом с природной аминокислотой.

Термин "биологически активный вариант" относится к любому полипептиду, используемому в слитых белках по изобретению, например в качестве составляющего белка слитых белков, обладающего активностью эквивалентного ему белка или полипептида дикого типа (например, природного), например способностью модулировать уровни в крови глюкозы, HbA1c, инсулина, триглицерида или холестерина; усиливать функционирование поджелудочной железы; уменьшать уровни липидов в печени; уменьшать массу тела; и улучшать устойчивость к глюкозе, потребление энергии или чувствительность к инсулину, независимо от типа или количества модификаций, введенных в вариант полипептида. Варианты полипептида, обладающие несколько сниженным уровнем активности по сравнению с их вариантами дикого типа, тем не менее рассматривают как биологически активные варианты полипептида. Неограничивающим репрезентативным примером биологически активного полипептида по изобретению является вариант FGF21, впоследствии модифицированный и обладающий сходными или улучшенными биологическими свойствами по сравнению с FGF21 дикого типа.

Каждый из терминов "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относится к количеству слитого белка по изобретению, используемому для поддержания поддающегося наблюдению уровня одного или нескольких видов биологической активности эквивалентов полипептида или белка дикого типа, например способности уменьшать уровни в крови глюкозы, инсулина, триглицерида или холестерина; уменьшать уровни триглицеридов или липидов в печени; уменьшать массу тела; или улучшать устойчивость к глюкозе, потребление энергии или чувствительность к инсулину. Например, "терапевтически эффективное количество", введенное пациенту, обладающему, страдающему или, как доказано, страдающему ассоциированному с FGF21 нарушениями (такими как сахарный диабет типа 1 или типа 2, ожирение или метаболический синдром), в таком количестве, которое индуцирует, облегчает или иным образом вызывает улучшение патологических симптомов, прогрессирования заболевания, физиологических состояний или устойчивости к смертности из-за вышеупомянутых нарушений. Для

целей по настоящему изобретению "субъект" или "пациент" предпочтительно представляет собой человека, но может также представлять собой животное, более конкретно, домашних животных (например, собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторных животных (например, крыс, мышей, морских свинок и т.п.).

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "физиологически приемлемый носитель", как применяют в настоящем документе, относится к одному или нескольким материалам для получения состава, пригодным для осуществления или улучшения доставки слитого белка по изобретению.

Термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, способной являться связанной антителом, и кроме того, способной к использованию у животного для получения антител, способных связываться с эпитопом этого антигена. Антиген может иметь один или несколько эпитопов.

Термин "природный Fc" относится к молекуле или последовательности, содержащей последовательность не связывающего антиген фрагмента, которые получены расщеплением полноразмерного антитела или получены другими способами, в мономерной или мультимерной форме, и может содержать шарнирную область. Исходный иммуноглобулиновый источник природного Fc предпочтительно человеческого происхождения и может относиться к любому иммуноглобулину, хотя IgG1 и IgG2 являются предпочтительными. Природные Fc состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в димерные или мультимерные формы посредством ковалентной (т.е. дисульфидных связей) и нековалентной ассоциации. Количество межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами природных молекул Fc лежит в диапазоне от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgGl, IgG2, IgG3, IgA1 и IgGA2). Одним из примеров природного Fc является димер с дисульфидными связями, образующимися в результате расщепления папаином IgG (см. Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). Термин "природный Fc", как применяют в настоящем документе, является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм.

Термин "вариант Fc" относится к молекуле или последовательности, которая является модифицированной по сравнению с природным Fc, но все еще содержит участок связывания рецептора спасения, FcRn (неонатальный Fc рецептор). В международных публикациях WO 97/34631 и WO 96/32478 описаны иллюстративные варианты Fc, так же как взаимодействие с рецептором спасения, и таким образом они приведены в качестве ссылки. Таким образом, термин "вариант Fc" может включать в себя молекулу или последовательность, гуманизированную из не относящегося к человеку природного Fc. Более того, природный Fc содержит области, которые можно удалять, поскольку они обеспечивают структурные свойства или биологическую активность, которые не являются необходимыми для слитых молекул слитых белков по изобретению. Таким образом, термин "вариант Fc" включает в себя молекулу или последовательность, в которой отсутствуют один или несколько участков или остатков природного Fc, или в которой один или несколько участков или остатков Fc модифицировано, что влияет на: (1) формирование дисульфидной связи, (2) несовместимость с выбранной клеткой-хозяином, (3) гетерогенность N-конца при экспрессии в выбранной клетке-хозяине, (4) гликозилирование, (5) взаимодействие с комплементом, (6) связывание с Fc рецептором, отличным от рецептора спасения или (7) антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или вовлечено в них. Варианты Fc более подробно описаны в настоящем документе ниже.

Термин "домен Fc" включает в себя природный Fc и варианты и последовательности Fc, как определено выше. Как для вариантов Fc, так и для природных молекул Fc, термин "домен Fc" включает в себя молекулы в мономерной или мультимерной форме, отщепленные от полноразмерного антитела или полученные другими способами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен Fc может являться слитым с FGF21 или с мутантом FGF21 (включая укороченную форму FGF21 или мутант FGF21) посредством, например, ковалентной связи между доменом Fc и последовательностью FGF21. Такие слитые белки могут формировать мультимеры посредством ассоциации доменов Fc, и как эти слитые белки, так и их мультимеры, представляют собой аспект настоящего изобретения.

Термин "модифицированный Fc-фрагмент", как применяют в настоящем документе, должен обозначать Fc-фрагмент антитела, содержащий модифицированную последовательность. Fc-фрагмент представляет собой часть антитела, содержащую CH2, CH3 и часть шарнирной области. Модифицированный Fc-фрагмент может происходить, например, из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. FcLALA представляет собой модифицированный Fc-фрагмент с мутацией LALA (L234A, L235A), который запускает ADCC с более низкой эффективностью и связывает и активирует комплемент человека слабо. Hessell et al. 2007 Nature 449:101-104. Дополнительные модификации Fc-фрагмента описаны, например, в патенте США № 7217798.

Термин "гетерологичный" означает, что эти домены не обнаруживают в природе ассоциированными с константными областями антитела. В частности, такие гетерологичные связывающие домены не имеют типичной структуры вариабельного домена антитела, состоящего из 4 каркасных областей, FR1, FR2, FR3 и FR4, и 3 определяющих комплементарность областей (CDR) между ними. Каждое плечо слитого антитела таким образом содержит первый одноцепочечный полипептид, содержащий связывающий домен, ковалентно связанный с N-концевой частью константной области C_H1 тяжелой цепи антитела, и второй одноцепочечный полипептид, содержащий второй связывающий домен, ковалентно связанный с

N-концевой частью константной C_L легкой цепи антитела. Ковалентная связь может являться прямой, например посредством пептидной связи, или опосредованной, посредством линкера, например, пептидного линкера. Два гетеродимера слитого антитела являются ковалентно связанными, например, посредством по меньшей мере одного дисульфидного мостика в их шарнирной области, подобно структуре антитела. Примеры молекул со структурой слитого антитела описаны в данной области, в частности слитые антитела, содержащие связывающую лиганд область гетеродимерного рецептора (см., например, международные публикации патентов WO 01/46261 и WO 11/076781).

Термин "полиэтиленгликоль" или "PEG" относится к соединению полиалкиленгликоля или его производному, в присутствии или в отсутствие связывающих средств или дериватизации с помощью связывающих или активирующих групп.

Термин "ассоциированные с FGF21 нарушения", и термины, сходным образом применяемые в настоящем документе, включают в себя ожирение, сахарный диабет типа 1 и типа 2, панкреатит, дислипидемию, заболевание неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), устойчивость к инсулину, гиперинсулинемию, непереносимость глюкозы, гипергликемию, метаболический синдром, острый инфаркт миокарда, гипертензию, сердечно-сосудистое заболевание, атеросклероз, болезнь периферических артерий, инсульт, сердечную недостаточность, коронарную болезнь сердца, заболевание почек, осложнения диабета, невропатию, гастропарез, нарушения, ассоциированные с серьезными инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина и другие нарушения метаболизма.

Термин "нарушения, ассоциированные с серьезными инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина", и термины, сходным образом применяемые в настоящем документе, описывают состояния у субъектов, пораженных мутациями в рецепторе инсулина (или возможно, в белках непосредственно нижестоящих после него), которые вызывают серьезную устойчивость к инсулину, но которые часто (хотя не всегда) наблюдают в отсутствие ожирения, общераспространенного при сахарном диабете типа 2. Во многих случаях у субъектов, пораженных этими состояниями, проявляются комбинированные симптомы сахарного диабета типа 1 и сахарного диабета типа 2. Субъекты, пораженные таким образом, попадают в несколько категорий, в общих чертах по увеличению тяжести, включая устойчивость к инсулину типа A, устойчивость к инсулину типа C (известную также как синдром HAIR-AN), синдром Рабсона-Менденхолла и, наконец, синдром Донахью или Лепречаунизм. Эти нарушения ассоциированы с очень высокими уровнями эндогенного инсулина и очень часто - гипергликемией. У субъектов, пораженных таким образом, присутствуют также различные клинические признаки, ассоциированные с "токсичностью инсулина", включая гиперандрогенизм, синдром поликистоза яичников (PCOS), гирсутизм и акантокератодермию (избыточный рост и пигментацию) в складках кожи.

"Сахарный диабет типа 2" представляет собой состояние, характеризующееся избыточной продукцией глюкозы несмотря на доступность инсулина, и уровни глюкозы в кровотоке остаются избыточно высокими в результате неадекватного выведения глюкозы.

"Сахарный диабет типа 1" представляет собой состояние, характеризующееся высокими уровнями глюкозы, вызванными полным отсутствием инсулина. Это происходит, когда иммунная система организма атакует инсулинпродуцирующие β-клетки в поджелудочной железе и разрушает их. Затем поджелудочная железа продуцирует мало инсулина или не продуцирует инсулин.

"Непереносимость глюкозы" или нарушенная устойчивость к глюкозе (IGT) представляет собой преддиабетическое состояние дисгликемии, ассоциированное с увеличенным риском сердечно-сосудистой патологии.

Преддиабетическое состояние предотвращает у субъекта эффективное продвижение глюкозы в клетки и ее использование в качестве эффективного источника топлива, приводя к увеличенным уровням глюкозы в крови и некоторой степени устойчивости к инсулину.

"Гипергликемию" определяют как избыток сахара (глюкозы) в крови.

"Гипогликемия", называемая также низким уровнем сахара в крови, возникает, когда уровень глюкозы в крови человека падает слишком низко для обеспечения достаточной энергии для активности организма человека.

"Гиперинсулинемию" определяют как более высокий, чем нормальный, уровень инсулина в крови.

"Устойчивость к инсулину" определяют как состояние, при котором нормальное количество инсулина вызывает аномальный биологический ответ.

"Ожирение", в отношении субъекта-человека, можно определять как массу тела, более чем на 20% превышающую идеальную массу тела для данной популяции (R.H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p. 904-916).

"Диабетические осложнения" представляют собой проблемы, вызванные высокими уровнями глюкозы в крови, в других функциях организма, таких как почки, нервы (невропатии), ноги (язвы стопы и плохое кровообращение) и глаза (например, ретинопатии). Диабет также увеличивает риск заболевания сердца и нарушений костей и суставов. Другие длительные осложнения диабета включают в себя проблемы кожи, проблемы пищеварения, сексуальную дисфункцию и проблемы с зубами и деснами.

"Метаболический синдром" можно определять как кластер по меньшей мере из трех следующих

признаков: абдоминальное ожирение - у большинства мужчин, талия 40 дюймов (1,016 м) или более; высокий уровень сахара в крови - по меньшей мере 110 миллиграмм на децилитр (мг/дл) после голодания; высокий уровень триглицеридов - по меньшей мере 150 мг/дл в кровотоке; низкий уровень HDL - менее 40 мг/дл; и кровяное давление 130/85 мм рт.ст. или выше.

"Панкреатит" представляет собой воспаление поджелудочной железы.

"Дислипидемия" представляет собой нарушение метаболизма липопротеинов, включая сверхпродукцию или недостаточность липопротеинов. Дислипидемии могут проявляться повышением общего уровня холестерина, концентраций липопротеинов низкой плотности (LDL) холестерина и триглицеридов и снижением концентрации липопротеина высокой плотности (HDL) холестерина в крови.

"Заболевание неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD)" представляет собой заболевание печени, не ассоциированное с употреблением алкоголя, характеризующееся жировым перерождением гепатоцитов.

"Неалкогольный стеатогепатит (NASH)" представляет собой заболевание печени, не ассоциированное с употреблением алкоголя, характеризующееся жировым перерождением гепатоцитов, сопровождающихся интралобулярным воспалением и фиброзом.

"Гипертензия" или высокое кровяное давление, которое представляет собой временное или постоянное повышение системного артериального кровяное давления до уровня, с вероятностью индуцирующего сердечно-сосудистое повреждение или другие неблагоприятные последствия. Гипертензию условно определяют как систолическое кровяное давление выше 140 мм рт.ст. или диастолическое кровяное давление выше 90 мм рт.ст.

"Сердечно-сосудистые заболевания" представляют собой заболевания, относящиеся к сердцу или кровеносным сосудам.

"Острый инфаркт миокарда" возникает, когда присутствует прерывание кровоснабжения части сердца. Возникшие в результате ишемия и недостаток кислорода, если оставлены без лечения в течение достаточного периода времени, могут вызывать повреждение или гибель (инфаркт) ткани сердечной мышцы (миокарда).

"Заболевание периферических артерий" возникает, когда бляшка формируется в артериях, переносящих кровь к голове, органам и конечностям. С течением времени бляшки могут отверждаться и сужать артерии, которые ограничивают приток богатой кислородом крови к органам и другим частям организма.

"Атеросклероз" представляет собой сосудистое заболевание, характеризующееся неравномерно распределенными отложениями липидов в интиме больших и средних артерий, вызывающими сужение просветов артерий и приводящими, в конечном счете, к фиброзу и кальцификации. Бляшки обычно являются фокальными и прогрессируют медленно и периодически. Ограничение кровотока ответственно за большинство клинических проявлений, меняющихся с распределением и тяжестью очагов.

"Инсульт" представляет собой любое острое клиническое событие, относящееся к нарушению мозгового кровообращения, которое продолжается дольше 24 ч. Инсульт включает в себя необратимое повреждение головного мозга, где тип и тяжесть симптомов зависит от локализации и объема ткани головного мозга, кровообращение которой нарушено.

"Сердечная недостаточность", называемая также застойной сердечной недостаточностью, представляет собой состояние, при котором сердце не может далее перекачивать достаточно крови к остальной части организма.

"Коронарная болезнь сердца", называемая также болезнью коронарных артерий, представляет собой сужение небольших кровеносных сосудов, поставляющих кровь и кислород к сердцу.

"Заболевание почек" или нефропатия представляет собой любое заболевание почек. Диабетическая нефропатия является основной причиной заболеваемости и смертности у людей с сахарным диабетом типа 1 или типа 2.

"Невропатии" представляют собой любые заболевания, вовлекающие черепные нервы или периферическую или автономную нервную систему.

"Гастропарез" представляет собой слабость перистальтики желудка, приводящую к задержке опорожнения кишечника.

Пациенты в критическом состоянии, включенные в изобретение, как правило, испытывают нестабильное гиперметаболическое состояние. Это нестабильное метаболическое состояние обусловлено изменениями в метаболизме субстрата, которые могут приводить к относительной недостаточности некоторых питательных веществ. Как правило, присутствует увеличенное окисление как жира, так и мышц.

Более того, пациенты в критическом состоянии предпочтительно представляют собой пациентов, испытывающих синдром системного воспалительного ответа или дыхательной недостаточности. Снижение заболеваемости обозначает снижение вероятности того, что у пациента в критическом состоянии могут развиться дополнительные заболевания, состояния или симптомы, или снижение тяжести дополнительных заболеваний, состояний или симптомов. Например, снижение заболеваемости может соответствовать снижению частоты возникновения бактериемии или сепсиса или осложнений, ассоциированных с полиорганной недостаточностью.

Как применяют в настоящем документе, формы единственного числа включают в себя ссылки на

множественное число, если контекст явно не требует иного. Таким образом, например, ссылка на "антитело" включает в себя смесь двух или более таких антител.

Как применяют в настоящем документе, термин "приблизительно" относится к ±20%, более предпочтительно, ±10%, или еще более предпочтительно, ±5% от значения.

Термины "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и они относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать в себя кодируемые и некодируемые аминокислоты, природные и неприродные аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты, и полипептиды, имеющие модифицированные пептидные остовы. Термин включает в себя слитые белки, включая, но без ограничения, слитые белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слитые белки с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, с N-концевыми остатками метионина или без них; белки с иммунологической меткой; и т.п.

Термины "индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" используют взаимозаменяемо, и они относятся к любому субъекту, для которого являются желательными диагностика, лечение или терапия, в частности, к людям. Другие субъекты могут включать в себя крупный рогатый скот, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей и т.п. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Как применяют в настоящем документе, термин "образец" относится к биологическому материалу от пациента. Образец, анализируемый по настоящему изобретению, не является ограниченным каким-либо конкретным типом. Образцы включают в себя, в качестве неограничивающих примеров, отдельные клетки, множественные клетки, ткани, опухоли, биологические жидкости, биологические молекулы, или супернатанты или экстракты любого из вышеуказанного. Примеры включают в себя образцы ткани, удаленной для биопсии, ткани, удаленной в ходе резекции, крови, мочи, лимфатической ткани, лимфатической жидкости, спинномозговой жидкости, слизи и стула. Используемый образец может меняться на основе формата анализа, способа детекции и природы опухолей, тканей, клеток или экстрактов, подлежащих анализу. Способы получения образцов хорошо известны в данной области и могут быть легко адаптированы для получения образца, совместимого с используемым способом.

Как применяют в настоящем документе, термин "биологическая молекула" включает в себя, но без ограничения, полипептиды, нуклеиновые кислоты и сахариды.

Как применяют в настоящем документе, термин "модуляция" относится к изменению качества или количества гена, белка или любой молекулы, которая находится внутри, снаружи или на поверхности клеток. Изменение может представлять собой увеличение или уменьшение экспрессии или уровня молекулы. Термин "модулирует" включает в себя также изменение качества или количества биологической функции/активности, включая, без ограничения, способность снижать уровни в крови глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина; снижать уровни липидов в печени или триглицеридов в печени; снижать массу тела; и улучшать устойчивость к глюкозе, потребление энергии или чувствительность к инсулину.

Как применяют в настоящем документе, термин "модулятор" относится к композиции, модулирующей одно или несколько физиологических или биохимических событий, ассоциированных с FGF21-ассоциированным нарушением, таким как сахарный диабет типа 1 или типа 2 или метаболическое состояние, подобное ожирению. Указанные события включают в себя, но без ограничения, способность снижать уровни в крови глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина; снижать уровни липидов в печени или триглицеридов в печени; снижать массу тела; и улучшать устойчивость к глюкозе, потребление энергии или чувствительность к инсулину.

"Продукт гена" представляет собой биополимерный продукт, экспрессируемый или продуцируемый геном. Продукт гена может представлять собой, например, несплайсированную РНК, мРНК, вариант сплайсинга мРНК, полипептид, пост-трансляционно модифицированный полипептид, вариант сплайсинга полипептида и т.д. Этот термин включает в себя также биополимерные продукты, полученные с использованием продукта гена - РНК в качестве матрицы (т.е. кДНК из РНК). Продукт гена можно получать ферментативно, рекомбинантно, химически или внутри клетки, для которой ген является природным. В некоторых вариантах осуществления, если продукт гена является белковым, он обладает биологической активностью. В некоторых вариантах осуществления, если продукт гена представляет собой нуклеиновую кислоту, ее можно транслировать в белковый продукт гена, обладающий биологической активностью.

"Модуляция активности FGF21", как применяют в настоящем документе, относится к увеличению или уменьшению активности FGF21, которое может являться результатом, например, взаимодействия средства с полинуклеотидом или полипептидом FGF21, ингибирования транскрипции и/или трансляции FGF21 (например, посредством антисмысловой или миРНК с геном FGF21 или транскриптом FGF21, посредством модуляции факторов транскрипции, облегчающих экспрессию FGF21), и т.п. Например, модуляция биологической активности относится к увеличению или уменьшению биологической активности. Активность FGF21 можно оценивать способами, включающими в себя, без ограничения, анализ

уровней глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови субъекта, анализ уровней полипептида FGF21, или анализ уровней транскрипции FGF21. Сравнение активности FGF21 можно осуществлять также, например, посредством измерения уровней биомаркера, стоящего ниже FGF21, и измерения усиления передачи сигналов FGF21. Активность FGF21 можно оценивать также посредством измерения: передачи сигнала в клетке; активности киназы; поглощения глюкозы адипоцитами; колебаний уровней в крови инсулина, триглицеридов или холестерина; изменений уровней липидов в печени или триглицеридов в печени; взаимодействий между FGF21 и рецептором FGF21; или фосфорилирования рецептора FGF21. В некоторых вариантах осуществления фосфорилирование рецептора FGF21 может представлять собой фосфорилирование тирозина. В некоторых вариантах осуществления модуляция активности FGF21 может вызывать модуляцию связанного с FGF21 фенотипа.

Сравнения активности FGF21 можно осуществлять также, например, посредством измерения уровней биомаркера, стоящего ниже FGF21, и измерения усиления передачи сигналов FGF21. Активность FGF21 можно оценивать также посредством измерения: передачи сигнала в клетке; активности киназы; поглощения глюкозы адипоцитами; колебаний уровней в крови инсулина, триглицеридов или холестерина; изменений уровней липидов в печени или триглицеридов в печени; взаимодействий между FGF21 и рецептором (FGFR-1c, FGFR-2c или FGFR-3c); или фосфорилирования рецептора FGF21. В некоторых вариантах осуществления фосфорилирование рецептора FGF21 может представлять собой фосфорилирование тирозина. В некоторых вариантах осуществления модуляция активности FGF21 может вызывать модуляцию связанного с FGF21 фенотипа.

"Биомаркер, стоящий ниже FGF21", как применяют в настоящем документе, представляет собой ген или продукт гена, или поддающиеся измерению признаки гена или продукта гена. В некоторых вариантах осуществления ген или активность, являющиеся меркером, стоящим ниже FGF21, имеют измененный уровень экспрессии или в сосудистой ткани. В некоторых вариантах осуществления активность стоящего ниже маркера меняется в присутствии модулятора FGF21. В некоторых вариантах осуществления стоящие ниже маркеры имеют измененные уровни экспрессии, когда на FGF21 воздействуют с помощью модулятора FGF21 по настоящему изобретению. Стоящие ниже FGF21 маркеры включают в себя, без ограничения, поглощение глюкозы или 2-дезокси-глюкозы, уровни pERK и других фосфорилированных или ацетилированных белков, или NAD.

Как применяют в настоящем документе, термин "повышающая регуляция" относится к увеличению, активации или стимуляции активности или количества. Например, в контексте настоящего изобретения, модуляторы FGF21 могут увеличивать активность рецептора FGF21. В одном из вариантов осуществления, один или несколько из FGFR-1c, FGFR-2c или FGFR-3c можно подвергать повышающей регуляции в ответ на модулятор FGF21. Повышающая регуляция может относиться также к связанной с FGF21 активности, например, такой как способность снижать уровни в крови глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина; снижать уровни липидов в печени или триглицеридов в печени; снижать массу тела; улучшать устойчивость к глюкозе, потребление энергии или чувствительность к инсулину; или вызывать фосфорилирование рецептора FGF21; или увеличивать уровень маркера, стоящего ниже FGF21. Рецептор FGFR21 может представлять собой один или несколько из FGFR-1c, FGFR-2c или FGFR-3c. Повышающая регуляция может составлять по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 250%, по меньшей мере 400%, или по меньшей мере 500% по сравнению с контролем.

Как применяют в настоящем документе, термин "N-конец" относится по меньшей мере к первым 20 аминокислотам белка.

Как применяют в настоящем документе, термины "N-концевой домен" и "N-концевая область" используют взаимозаменяемо, и они относятся к фрагменту белка, который начинается на первой аминокислоте белка и заканчивается на любой аминокислоте в N-концевой половине белка. Например, N-концевой домен FGF21 находится от аминокислоты 1 SEQ ID NO: 1 до любой аминокислоты приблизительно между аминокислотами 10 и 105 SEQ ID NO: 1.

Как применяют в настоящем документе, термин "C-конец" относится, по меньшей мере, к последним 20 аминокислотам белка.

Как применяют в настоящем документе, термины "C-концевой домен" и "C-концевая область" используют взаимозаменяемо, и они относятся к фрагменту белка, который начинается на любой аминокислоте в C-концевой половине белка и заканчивается на последней аминокислоте белка. Например, C-концевой домен FGF21 начинается на любой аминокислоте от аминокислоты 105 до приблизительно аминокислоты 200 SEQ ID NO: 1 и заканчивается на аминокислоте 209 SEQ ID NO: 1.

Термин "домен", как применяют в настоящем документе, относится к структурной части биомолекулы, которая вносит вклад в известную или предполагаемую функцию биомолекулы. Домены могут иметь одинаковое пространственное расположение с областями или их частями и могут включать также часть биомолекулы, удаленную от конкретной области, в дополнение ко всей или части этой области.

Как применяют в настоящем документе, термин "сигнальный домен" (называемый также "сигнальная последовательность" или "сигнальный пептид") относится к пептидному домену, который находится в непрерывном отрезке аминокислотной последовательности в N-концевой области белка-предшест-

венника (часто связанного с мембраной или секретируемого белка) и является вовлеченным в посттрансляционный транспорт белка. Во многих случаях сигнальный домен удаляют из полноразмерного белка посредством специализированных сигнальных пептидаз после завершения процесса отбора. Каждый сигнальный домен определяет конкретное место назначения в клетке для белка-предшественника. Сигнальный домен FGF21 представляет собой аминокислоты 1-28 из SEQ ID NO: 1.

Как применяют в настоящем документе, термин "связывающий рецептор домен" относится к любой части или области белка, контактирующей со связанным с мембраной белком-рецептором, что приводит к клеточному ответу, такому как событие передачи сигнала.

Как применяют в настоящем документе, термин "связывающий лиганд домен" относится к любой части или области слитого белка по изобретению, сохраняющей по меньшей мере одну качественную связывающую активность соответствующей природной последовательности.

Термин "область" относится к физически непрерывной области первичной структуры биомолекулы. В случае белков область определяют по непрерывной части аминокислотной последовательности этого белка. В некоторых вариантах осуществления "область" является ассоциированной с функцией биомолекулы.

Термин "фрагмент", как применяют в настоящем документе, относится к физически непрерывной области первичной структуры биомолекулы. В случае белков часть определяют как непрерывную часть аминокислотной последовательности этого белка, и она относится к по меньшей мере 3-5 аминокислотам, по меньшей мере к 8-10 аминокислотам, по меньшей мере к 11-15 аминокислотам, по меньшей мере к 17-24 аминокислотам, по меньшей мере к 25-30 аминокислотам, и по меньшей мере к 30-45 аминокислотам. В случае олигонуклеотидов часть определяют как непрерывную часть последовательности нуклеиновой кислоты этого олигонуклеотида, и она относится по меньшей мере к 9-15 нуклеотидам, по меньшей мере к 18-30 нуклеотидам, по меньшей мере к 33-45 нуклеотидам, по меньшей мере к 48-72 нуклеотидам, по меньшей мере к 75-90 нуклеотидам и по меньшей мере к 90-130 нуклеотидам. В некоторых вариантах осуществления части биомолекул обладают биологической активностью. В контексте настоящего изобретения фрагменты полипептида FGF21 не содержат полную последовательность полипептида FGF21, указанную в SEQ ID NO: 1.

Полипептид с "природной последовательностью" представляет собой полипептид, имеющей ту же самую аминокислотную последовательность, что и полипептид, полученный из природных источников. Такие полипептиды с природной последовательностью можно выделять из природных источников или можно получать рекомбинантными или синтетическими способами. Таким образом, полипептид с природной последовательностью может иметь аминокислотную последовательность природного полипептида человека, полипептида мыши или полипептида из любых других видов млекопитающих.

Как применяют в настоящем документе, фраза "гомологичная нуклеотидная последовательность" или "гомологичная аминокислотная последовательность" или их варианты, относится к последовательностям, характеризующимся гомологией, на уровне нуклеотидов или на уровне аминокислот, по меньшей мере, на указанный процент, и ее используют взаимозаменяемо с "идентичностью последовательности".

Гомологичные нуклеотидные последовательности включают в себя последовательности, кодирующие изоформы белков. Такие изоформы могут экспрессироваться в различных тканях одного и того же организма в результате, например, альтернативного сплайсинга РНК. Альтернативно, изоформы могут быть кодированы различными генами. Гомологичные нуклеотидные последовательности включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие белок из видов, отличных от человека, включая, но без ограничения, млекопитающих. Гомологичные нуклеотидные последовательности включают в себя также, но без ограничения, встречающиеся в природе аллельные варианты и мутации нуклеотидных последовательностей, указанных в настоящем документе. Гомологичные аминокислотные последовательности включают в себя аминокислотные последовательности, которые содержат консервативные аминокислотные замены, и полипептиды которых имеют одинаковое связывание и/или активность. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная или аминокислотная последовательность является гомологичной, если она имеет по меньшей мере 60% или более, вплоть до 99%, идентичностью со сравнительной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная или аминокислотная последовательность является гомологичной, если она разделяет одно или несколько, вплоть до 60, замен, добавлений или делеций нуклеотидов/аминокислот со сравнительной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления гомологичные аминокислотные последовательности имеют не более 5 или не более 3 консервативных аминокислотных замен.

Процент гомологии или идентичности можно определять, например, посредством программы Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI), с использованием установок по умолчанию, с использованием алгоритма Смита и Уотермана (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489). В некоторых вариантах осуществления гомология между зондом и мишенью составляет между приблизительно 75% и приблизительно 85%. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты имеют нуклеотиды, по меньшей мере приблизительно на 95%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% и приблизительно на 100% гомологичные SEQ ID NO: 2 или его части.

Гомология может присутствовать также на уровне полипептида. В некоторых вариантах осуществ-

ления полипептиды, составляющие слитые белки по изобретению, могут являться по меньшей мере на 95% гомологичными их полноразмерным эквивалентам дикого типа или соответствующим природным последовательностям, или их частям. Степень или процент идентичности слитых белков по изобретению, или их частей, и различных аминокислотных последовательностей рассчитывают как количество точных совпадений при выравнивании двух последовательностей, деленное на длину "последовательности по изобретению" или "чужеродной последовательности", в зависимости от того, которая из них короче. Результат выражают как процент идентичности.

Как применяют в настоящем документе, термин "смешивание" относится к процессу объединения одного или нескольких соединений, клеток, молекул и т.п. вместе в одном и том же месте. Это можно осуществлять, например, в пробирке, чашке Петри или любом контейнере, позволяющем смешивание одного или нескольких соединений, клеток или молекул.

Как применяют в настоящем документе, термин "по существу очищенный" относится к соединению (например, к полинуклеотиду или полипептиду, или антителу), которое удалено из его природного окружения и является по меньшей мере на 60% свободным, по меньшей мере на 75% свободным и по меньшей мере на 90% свободным от других компонентов, с которыми оно ассоциировано в природе.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю для введения лекарственного средства, такого как антитела или полипептид, гены и другие лекарственные средства. Термин относится к любому фармацевтическому носителю, который сам не индуцирует продукцию антител, неблагоприятных для индивидуума, которому вводят композицию, и который можно вводить без неспецифической токсичности. Пригодные носители могут представлять собой большие, медленно подвергающиеся метаболизму макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты и неактивные вирусные частицы. Такие носители хорошо известны обычным специалистам в данной области. Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут включать в себя жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. Вспомогательные вещества, такие как увлажняющие средства или эмульгаторы, забуференные pH вещества и т.п., также могут присутствовать в таких носителях.

Увеличение физической стабильности слитых белков по изобретению.

Природные дисульфидные связи, обеспеченные остатками цистеина, как правило, увеличивают термодинамическую стабильность белков. Успешными примерами увеличенной термодинамической стабильности, как измерено по увеличению температуры плавления, являются мутанты с множественными дисульфидными связями ферментов лизоцима T4 (Matsumuraet al., PNAS 86:6562-6566 (1989)) и барназы (Johnson et al., J. Mol. Biol. 268:198-208 (1997)). Аспектом настоящего изобретения является увеличение физической стабильности FGF21 в присутствии консерванта, достигаемого присутствием в вариантах дисульфидных связей, стесняющих гибкость FGF21 дикого типа и таким образом ограничивающих доступ консерванта к гидрофобному кору белка.

Второй аспект изобретения таким образом относится к вариантам FGF21 человека или его биологически активного пептида с увеличенной фармацевтической стабильностью, вызванной включением дополнительных дисульфидных связей, например, посредством вставки или замены остатков цистеина в белке FGF21 дикого типа или в вариантах полипептида и белка по изобретению. Специалисту в данной области понятно, что природные остатки цистеина, цистеин 103 и цистеин 121, можно использовать в качестве локусов для введения новой дисульфидной связи, которая может придавать улучшенные свойства, в дополнение к предложенным вариантам осуществления, описанным в настоящем документе.

Это включает в себя слитые белки, содержащие FGF-21 дикого типа с заменой на цистеин двух или более из следующего: глутамин 46, аргинин 47, тирозин 48, лейцин 49, тирозин 50, треонин 51, аспартат 52, аспартат 53, аланин 54, глутамин 55, глутамин 56, треонин 57, глутамат 58, аланин 59, гистидин 60, лейцин 61, глутамат 62, изолейцин 63, валин 69, глицин 70, глицин 71, аланин 72, аланин 73, лейцин 144, гистидин 145, лейцин 146, пролин 147, глицин 148, аспарагин 149, лизин 150, серин 151, пролин 152, гистидин 153, аргинин 154, аспартат 155, пролин 156, аланин 157, пролин 158, аргинин 159, глицин 160, пролин 161, аланин 162, аргинин 163, фенилаланин 164, где нумерация аминокислот основана на полноразмерной последовательности FGF21 из 209 аминокислот из SEQ ID NO: 1.

Кроме того, слитые белки по изобретению могут содержать варианты человеческого FGF21 дикого типа или его биологически активного пептида, улучшенные с помощью сконструированных дисульфидных связей, в дополнение к природной связи Cys103-Cys121, которые являются следующими:

Gln46Cys-Ala59Cys, Gln46Cys-His60Cys, Gln46Cys-Leu61Cys, Gln46Cys-Glu62Cys, Gln46Cys-Ile63Cys, Arg47Cys-Ala59Cys, Arg47Cys-His60Cys, Arg47Cys-Leu61Cys, Arg47Cys-Glu62Cys, Arg47Cys-Ile63Cys, Tyr48Cys-Ala59Cys, Tyr48Cys-His60Cys, Tyr48Cys-Leu61 Cys, Tyr48Cys-Glu62Cys, Tyr48Cys-Ile63Cys, Leu49Cys-Ala59Cys, Leu49Cys-His60Cys, Leu49Cys-Leu61Cys, Leu49Cys-Glu62Cys, Leu49Cys-Ile63Cys, Tyr50Cys-Ala59Cys, Tyr50Cys-His60Cys, Tyr50Cys-Lue61Cys, Tyr50Cys-Glu62Cys, Tyr50Cys-Ile63Cys, Leu144Cys-Gly160Cys, Leu144Cys-Pro161Cys, Leu144Cys-Ala162Cys, Leu144Cys-Arg163Cys, Leu144Cys-Phe164Cys, His145Cys-Gly160Cys, His145Cys-Pro161Cys, His145Cys-Ala162Cys, His145Cys-Arg163Cys, His145Cys-Phe164Cys, Leu146Cys-Gly160Cys, Leu146Cys-Pro161Cys, Leu146Cys-Ala162Cys, Leu146Cys-Arg163Cys, Leu146Cys-Phe164Cys, Pro147Cys-Gly160Cys, Pro147Cys-Pro161 Cys, Pro147Cys-Ala162Cys, Pro147Cys-Arg163Cys, Pro147Cys-Phe164Cys, Gly148Cys-Gly160Cys, Gly148Cys-Pro161 Cys, Gly148Cys-Ala162Cys, Gly148Cys-Arg163Cys, Gly148Cys-Phe164Cys, Thr57Cys-Val69Cys, Thr57Cys-Gly70Cys, Thr57Cys-Gly71Cys, Thr57Cys-Ala72Cys, Thr57Cys-Ala73Cys,

Glu58Cys-Val69Cys, Glu58Cys-Glu70Cys, Glu58Cys-G71Cys,
Glu58Cys-Ala72Cys, Glu58Cys-Ala73Cys, Ala59Cys-Val69Cys,
Ala59Cys-Gly70Cys, Ala59Cys-Gly71Cys, Ala59Cys-Ala72Cys,
Ala59Cys-Ala73Cys, His60Cys-Val69Cys, His60Cys-Gly70Cys,
His60Cys-Gly71Cys, His60Cys-Ala72Cys, His60Cys-Ala73Cys,
Leu61Cys-Val69Cys, Leu61Cys-Gly70Cys, Leu61Cys-Gly71Cys,
Leu61Cys-Ala72Cys, Leu61Cys-Ala73Cys, Arg47Cys-Gly148Cys,
Tyr48Cys-Gly148Cys, Leu49Cys-Gly148Cys, Tyr50Cys-Gly148Cys,
Thr51Cys-Gly148Cys, Asp52Cys-Gly148Cys, Asp53Cys-Gly148Cys,
Ala54Cys-Gly148Cys, Gln55Cys-Gly148Cys, Gln56Cys-Gly148Cys,
Thr57Cys-Gly148Cys, Glu58Cys-Gly148Cys, Arg47Cys-Asn149Cys,
Tyr48Cys-Asn149Cys, Leu49Cys-Asn149Cys, Tyr50Cys-Asn149Cys,
Thr51Cys-Asn149Cys, Asp52Cys-Asn149Cys, Asp53Cys-Asn149Cys,
Ala54Cys-Asn149Cys, Gln55Cys-Asn149Cys, Gln56Cys-Asn149Cys,
Thr57Cys-Asn149Cys, Glu58Cys-Asn149Cys, Arg47Cys-Lys150Cys,
Tyr48Cys-Lys150Cys, Leu49Cys-Lys150Cys, Tyr50Cys-Lys150Cys,
Thr51Cys-Lys150Cys, Asp52Cys-Lys150Cys, Asp53Cys-Lys150Cys,
Ala54Cys-Lys150Cys, Gln55Cys-Lys150Cys, Gln56Cys-Lys150Cys,
Thr57Cys-Lys150Cys, Glu58Cys-Lys150Cys, Arg47Cys-Ser151Cys,
Tyr48Cys-Ser151Cys, Leu49Cys-Ser151Cys, Tyr50Cys-Ser151Cys,
Thr51Cys-Ser151Cys, Asp52Cys-Ser151Cys, Asp53Cys-Ser151Cys,
Ala54Cys-Ser151Cys, Gln55Cys-Ser151Cys, Gln56Cys-Ser151Cys,
Thr57Cys-Ser151Cys, Glu58Cys-Ser151Cys, Arg47Cys-Pro152Cys,
Tyr48Cys-Pro152Cys, Leu49Cys-Pro152Cys, Tyr50Cys-Pro152Cys,
Thr51Cys-Pro152Cys, Asp52Cys-Pro152Cys, Asp53Cys-Pro152Cys,
Ala54Cys-Pro152Cys, Gln55Cys-Pro152Cys, Gln56Cys-Pro152Cys,
Thr57Cys-Pro152Cys, Glu58Cys-Pro152Cys, Arg47Cys-His153Cys,
Tyr48Cys-His153Cys, Leu49Cys-His153Cys, Tyr50Cys-His153Cys,
Thr51Cys-His153Cys, Asp52Cys-His153Cys, Asp53Cys-His153Cys,
Ala54Cys-His153Cys, Gln55Cys-His153Cys, Gln56Cys-His153Cys,
Thr57Cys-His153Cys, Glu58Cys-His153Cys, Arg47Cys-Arg154Cys,
Tyr48Cys-Arg154Cys, Leu49Cys-Arg154Cys, Tyr50Cys-Arg154Cys,
Thr51Cys-Arg154Cys, Asp52Cys-Arg154Cys, Asp53Cys-Arg154Cys,
Ala54Cys-Arg154Cys, Gln55Cys-Arg154Cys, Gln56Cys-Arg154Cys,
Thr57Cys-Arg154Cys, Glu58Cys-Arg154Cys, Arg47Cys-Asp155Cys,
Tyr48Cys-Asp155Cys, Leu49Cys-Asp155Cys, Tyr50Cys-Asp155Cys,

Thr51Cys-Asp155Cys, Asp52Cys-Asp155Cys, Asp53Cys-Asp155Cys,
Ala54Cys-Asp155Cys, Gln55Cys-Asp155Cys, Gln56Cys-Asp155Cys,
Thr57Cys-Asp155Cys, Glu58Cys-Asp155Cys, Arg47Cys-Pro156Cys,
Tyr48Cys-Pro156Cys, Leu49Cys-Pro156Cys, Tyr50Cys-Pro156Cys,
Thr51Cys-Pro156Cys, Asp52Cys-Pro156Cys, Asp53Cys-Pro156Cys,
Ala54Cys-Pro156Cys, Gln55Cys-Pro156Cys, Gln56Cys-Pro156Cys,
Thr57Cys-Pro156Cys, Glu58Cys-Pro156Cys, Arg47Cys-Ala157Cys,
Tyr48Cys-Ala157Cys, Leu49Cys-Ala157Cys, Tyr50Cys-Ala157Cys,
Thr51Cys-Ala157Cys, Asp52Cys-Ala157Cys, Asp53Cys-Ala157Cys,
Ala54Cys-Ala157Cys, Gln55Cys-Ala157Cys, Gln56Cys-Ala157Cys,
Thr57Cys-Ala157Cys, Glu58Cys-Ala157Cys, Arg47Cys-Pro158Cys,
Tyr48Cys-Pro158Cys, Leu49Cys-Pro158Cys, Tyr50Cys-Pro158Cys,
Thr51Cys-Pro158Cys, Asp52Cys-Pro158Cys, Asp53Cys-Pro158Cys,
Ala54Cys-Pro158Cys, Gln55Cys-Pro158Cys, Gln56Cys-Pro158Cys,
Thr57Cys-Pro158Cys, Glu58Cys-Pro158Cys, Arg47Cys-Arg159Cys,
Tyr48Cys-Arg159Cys, Leu49Cys-Arg159Cys, Tyr50Cys-Arg159Cys,
Thr51Cys-Arg159Cys, Asp52Cys-Arg159Cys, Asp53Cys-Arg159Cys,
Ala54Cys-Arg159Cys, Gln55Cys-Arg159Cys, Gln56Cys-Arg159Cys,
Thr57Cys-Arg159Cys, Glu58Cys-Arg159Cys, Arg47Cys-G160Cys,
Tyr48Cys-G160Cys, Leu49Cys-G160Cys, Tyr50Cys-Gly160Cys,
Thr51Cys-Gly160Cys, Asp52Cys-Gly160Cys, Asp53Cys-Gly160Cys,
Ala54Cys-Gly160Cys, Gln55Cys-Gly160Cys, Gln56Cys-Gly160Cys,
Thr57Cys-Gly160Cys, Glu58Cys-Gly160Cys, Arg47Cys-Pro161Cys,
Tyr48Cys-Pro161Cys, Leu49Cys-Pro161Cys, Tyr50Cys-Pro161Cys,
Thr51Cys-Pro161Cys, Asp52Cys-Pro161Cys, Asp53Cys-Pro161Cys,
Ala54Cys-Pro161Cys, Gln55Cys-Pro161Cys, Gln56Cys-Pro161Cys,
Thr57Cys-Pro161Cys, Glu58Cys-Pro161Cys, Arg47Cys-Ala162Cys,
Tyr48Cys-Ala162Cys, Leu49Cys-Ala162Cys, Tyr50Cys-Ala162Cys,
Thr51Cys-Ala162Cys, Asp52Cys-Ala162Cys, Asp53Cys-Ala162Cys,
Ala54Cys-Ala162Cys, Gln55Cys-Ala162Cys, Gln56Cys-Ala162Cys,
Thr57Cys-Ala162Cys, Glu58Cys-Ala162Cys, Arg47Cys-Arg163Cys,
Tyr48Cys-Arg163Cys, Leu49Cys-Arg163Cys, Tyr50Cys-Arg163Cys,
Thr51Cys-Arg163Cys, Asp52Cys-Arg163Cys, Asp53Cys-Arg163Cys,
Ala54Cys-Arg163Cys, Gln55Cys-Arg163Cys, Gln56Cys-Arg163Cys,
Thr57Cys-Arg163Cys, Glu58Cys-Arg163Cys.

Другой аспект настоящего изобретения относится к слитым белкам, содержащим варианты человеческого FGF21 дикого типа или его биологически активного пептида, содержащие замену на любую заряженную и/или полярную, но незаряженную аминокислоту в любом из положений аминокислот, указанных в первом варианте осуществления настоящего изобретения, в комбинации с заменой на цистеин двух или более положений аминокислот, указанных во втором вариант осуществления изобретения.

Улучшения слитых белков по изобретению по сравнению со сравнительными белками дикого типа и их вариантами.

В данной области хорошо известно, что серьезным испытанием при разработке белковых лекарственных средств является преодоление физической и химической нестабильности белков. Это даже более очевидно, когда белковый фармацевтический состав предназначен, чтобы представлять собой пригодный для инъекций состав для множественного использования, требующий стабильного, концентрированного и содержащего консерванты раствора, при сохранении в то же время преимущественного профиля биоактивности. Биофизической характеризацией FGF21 дикого типа в литературе установлено, что концентрированный раствор белка (>5 мг/мл) при подвергании стрессовым условиям, таким как высокая температура или низкий pH, приводит к усиленной ассоциации и агрегации (т.е. плохой физической стабильности и биофармацевтическим свойствам). Воздействие на концентрированный раствор белка FGF21

фармацевтических консервантов (например, м-крезола) также оказывает отрицательное влияние на физическую стабильность.

Таким образом, вариант осуществления настоящего изобретения относится к улучшению физической стабильности концентрированных растворов, с сохранением в то же время химической стабильности и биологической активности как в физиологических условиях, так и в условиях содержащего консерванты состава. Считают, что ассоциация и агрегация могут возникать в результате гидрофобных взаимодействий, поскольку при данной концентрации белка температура и ионная сила оказывают значительное влияние на физическую стабильность. По большей части целью служили не консервативные, предположительно, экспонированные на поверхности аминокислотные остатки. Анализировали местное окружение этих остатков и те, которые, по-видимому, не являлись структурно важными, выбирали для мутагенеза. Одним из способов инициировать специфические изменения является дальнейшее снижение pI белка посредством введения остатков глутаминовой кислоты ("сканирование по глутаминовой кислоте"). Выдвинули гипотезу, что введение заряженных заместителей может ингибировать обусловленную гидрофобностью агрегацию посредством отталкивания заряд-заряд и потенциально улучшать совместимость с консервантом. Кроме того, специалисту в данной области понятно также, что при достаточной степени мутагенеза pI можно сдвигать в диапазон основного pH посредством введения положительного заряда с сопутствующим уменьшением отрицательного заряда или без него, таким образом, позволяя отталкивание заряд-заряд.

Дополнительной сложностью, связанной с терапевтическими применениями FGF21 дикого типа в качестве биотерапевтического средства, является, например, то, что время его полужизни in vivo является очень коротким (порядка 0,5 и 2 ч, соответственно, у мышей и приматов). Существует, таким образом, необходимость разработки последующих соединений, которые являются более эффективными за счет либо более высокой активности, либо более длительного времени полужизни. Слитые белки по изобретению разработаны в качестве способа достижения желательных эффектов лечения FGF21 при более высокой активности и в составе с увеличенным временем полужизни.

Как описано ранее в настоящем документе, слитые белки по изобретению имеют время полужизни более двух недель у мышей, в отличие от намного более короткого времени полужизни FGF21 дикого типа и времени полужизни 17 ч слитого белка Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) в Публикации PCT WO 10/129600. Слитые белки по изобретению обладают также улучшенным временем полужизни и фармакокинетическими свойствами по сравнению с пегилированным V76, как описано в настоящем документе и в патентной заявке США 61/415476, поданной 19 ноября 2010 г.

Более того, слитые белки по изобретению FC-FGF21 при 1 мг/кг являются более эффективными, чем V76 при 5 мг/кг, для уменьшения уровней глюкозы, инсулина, массы тела и уровня липидов в печени. В 12-суточном исследовании обработки ob/ob мышей, для слитых белков показаны следующие % изменения по сравнению с носителем (все слитые белки вводили при 1,0 мг/кг, и V76 вводили при 5,0 мг/кг):

% изменения общего уровня глюкозы (AUC) по сравнению с носителем: V76 - -42%; V101 - -53%, V103 - -46% и V188 - -42%;

% изменения общего уровня инсулина в плазме по сравнению с носителем: V76 - -46%; V101 - -82%, V103 - -69% и V188 - -59%;

% изменения общей масса тела по сравнению с носителем: V76 - -7%; V101 - -12%, V103 - -12% и V188 - -11%; и

% изменения общего уровня липидов в печени по сравнению с носителем: V76 - -30%; V101 - -44%, V103 - -50% и V188 - -51%.

Подобным образом, анализы in vitro выявляют такую же 5-кратную или большую активность слитых белков по изобретению по сравнению с V76:

в анализе pERK в адипоцитах человека (среднее EC50±SEM), V76 - 21±2 нМ (n=3); V101 - 1,0±0,1 нМ (n=3), V103 -1,3±0,2 нМ (n=3) и V188 - 1,4±0,4 нМ (n=3).

в анализе pERK в HEK293 с помощью β-klotho человека (среднее EC50±SEM), V76 - 13±4 нМ (n=5), V101 -0,60±0,06 нМ (n=5), V103 - 0,9±0,3 нМ (n=5) и V188 - 0,4±0,1 нМ (n=3); и

в анализе поглощения глюкозы на адипоцитах мыши (среднее EC50±SEM), V76 - 5±1 нМ (n=3), V101 - 0,60±0,06 нМ (n=3), V103 - 0,60±0,07 нМ (n=3), и V188 - 0,48±0,14 нМ (n=3).

Хотя варианты осуществления настоящего изобретения относятся к физической и химической стабильности как в физиологических условиях, так и в условиях содержащего, консервант фармацевтического состава, сохранение биологической активности слитых белков по изобретению по сравнению, например, с FGF21 дикого типа, также является важным учитываемым фактором. Таким образом, биологическую активность белков по изобретению определяют по способности белков влиять на поглощение глюкозы и/или снижение уровней глюкозы в плазме, как показано в настоящем документе в примерах.

Белки, полипептиды и/или пептиды по изобретению, вводимые по этому изобретению, можно получать и/или выделять любыми способами, известными в данной области. Наиболее предпочтительным способом получения варианта является способ с использованием рекомбинантной ДНК, и он хорошо

известен специалистам в данной области. Такие способы описаны в Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.), содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Кроме того, предпочтительные варианты осуществления включают в себя биологически активный пептид, полученный из варианта, описанного в настоящем документе. Такой пептид может содержать по меньшей мере одну из описанных замен, и вариант может обладать биологической активностью. Пептид можно получать всеми без исключения способами, известными специалистам в данной области, включающими в себя в качестве неограничивающих примеров способы ферментативного расщепления, химического синтеза или рекомбинантной ДНК.

В данной области известно, что фрагменты пептидов конкретных факторов роста фибробластов являются биологически активными. См., например, Baird et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85:2324-2328 (1988), и J. Cell. Phys. Suppl. 5:101-106 (1987). Таким образом, выбор фрагментов или пептидов варианта основан на критериях, известных в данной области. Например, известно, что дипептидил-пептидаза IV (DPP-IV или DPP-4) является протеазой серинового типа, вовлеченной в инактивацию нейропептидов, эндокринных пептидов и цитокинов (Damme et al., Chem. Immunol. 72: 42-56 (1999)). N-конец FGF21 (HisProIlePro) содержит два дипептида, которые потенциально могут являться субстратами для DPP-IV, с получением в результате фрагмента FGF21, усеченного с N-конца на 4 аминокислоты. Неожиданно показано, что этот фрагмент FGF21 дикого типа сохраняет биологическую активность, таким образом, белки по настоящему изобретению, усеченные на N-конце на вплоть до 4 аминокислот, представляют собой вариант осуществления настоящего изобретения.

Изобретение относится также к полинуклеотидам, кодирующим вышеописанные варианты, которые могут находиться в форме РНК или в форме ДНК, где ДНК включает в себя кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. ДНК может являться двухцепочечной или одноцепочечной. Кодирующие последовательности, кодирующие белки по настоящему изобретению, могут меняться в результате избыточности или вырожденности генетического кода.

Полинуклеотиды, кодирующие слитые белки по изобретению, могут включать в себя следующее: только кодирующую последовательность для варианта, кодирующую последовательность для варианта и дополнительную кодирующую последовательность, такую как функциональный полипептид, или лидерная или секреторная последовательность или про-белковая последовательность; кодирующую последовательность для варианта и некодирующую последовательность, такую как интроны или некодирующая последовательность на 5'- и/или 3'- от кодирующей последовательности для варианта. Таким образом, термин "полинуклеотид, кодирующий вариант", включает в себя полинуклеотид, который может включать не только кодирующую последовательность для варианта, но также полинуклеотид, который включает дополнительную кодирующую и/или не кодирующую последовательность.

Изобретение, кроме того, относится к вариантам описанных полинуклеотидов, кодирующих фрагменты, аналоги и производные полипептида, содержащего указанные замены. Вариант полинуклеотида может представлять собой природный вариант последовательности FGF21 человека, неприродный вариант или усеченный вариант, как описано выше. Таким образом, настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, кодирующим варианты, описанные выше, также как к вариантам таких полинуклеотидов, где варианты кодируют фрагмент, производное или аналог описанного варианта. Такие варианты нуклеотидов включают в себя варианты с делецией, варианты с заменой, усеченные варианты, и варианты с добавлением или вставкой, при условии, что присутствует по меньшей мере одна из указанных замен аминокислот из первого или второго варианта осуществления.

Полинуклеотиды по изобретению можно экспрессировать в хозяевах после того, как последовательности были функционально связаны (т.е. расположены для обеспечения функционирования) с последовательностью для контроля экспрессии. Эти экспрессирующие векторы, как правило, способны к репликации в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как интегральная часть хромосомальной ДНК хозяина. Как правило, экспрессирующие векторы могут содержать селективные маркеры, например тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, чтобы позволять детекцию клеток, трансформированных желательными последовательностями ДНК. Вариант FGF21 можно экспрессировать в клетках млекопитающих, насекомых, дрожжах, бактерий или других клеток под контролем подходящих промоторов. Бесклеточные системы трансляции также можно использовать для получения таких белков с использованием РНК, полученных с конструкций ДНК по настоящему изобретению.

E.coli представляет собой прокариотического хозяина, пригодного, в частности, для клонирования полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микроорганизмы-хозяева, пригодные для использования, включают в себя Bacillus subtilus, Salmonella typhimurium и различные виды Serratia, Pseudomonas, Streptococcus и Staphylococcus, хотя другие также можно выборочно использовать. В этих прокариотических хозяевах, также можно получать экспрессирующие векторы, которые, как правило, могут содержать последовательности для контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, может присутствовать любое количество хорошо известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (Trp), промоторная система β-лактамазы или промоторная система из фагов лямбда или T7. Промоторы могут, как правило, контролировать экспрессию, необязательно, с помощью последовательности оператора, и иметь после-

довательности участка связывания рибосомы и т.п., для инициации и завершения транскрипции и трансляции.

Специалисту в области экспрессии белков известно, что последовательность метионин или метионин-аргинин можно вводить на N-конце зрелой последовательности (SEQ ID NO: 3) для экспрессии в E.coli, и она предусмотрена в контексте этого изобретения. Таким образом, если не указано иначе, белки по настоящему изобретению, экспрессированные в E.coli, имеют последовательность метионина, введенную на N-конце.

Другие микроорганизмы, такие как дрожжи или грибы, также можно использовать для экспрессии. Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe и Pichia angusta представляют собой примеры предпочтительных хозяев-дрожжей, с пригодными векторами, имеющими последовательности для контроля экспрессии, такие как промоторы, включая промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, и точку начала репликации, последовательности терминации и т.п., как желательно. Aspergillus niger, Trichoderma reesei; и Schizophyllum commune, представляют собой примеры хозяев-грибов, хотя другие также можно выборочно использовать.

Культуру клеток млекопитающих также можно использовать для экспрессии и продукции полипептидов по настоящему изобретению. Эукариотические клетки являются в действительности предпочтительными, поскольку ряд пригодных линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные варианты, разработаны в данной области, и включают в себя линии клеток CHO, различные линии клеток COS, клетки NSO, линии клеток яичника сирийского хомяка, клетки HeLa или линии клеток эмбриональной почки человека (т.е. HEK293, HEK293EBNA).

Экспрессирующие векторы для этих клеток могут включать последовательности для контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер и необходимые для процессинга информативные участки, такие как участки связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Предпочтительные последовательности для контроля экспрессии представляют собой промоторы, полученные из SV40, аденовируса, вируса бычьей папилломы, цитомегаловируса, вируса саркомы Рауса и т.п. Предпочтительные участки полиаденилирования включают в себя последовательности, полученные из SV40 и бычьего гормона роста.

Векторы, содержащие интересующие полинуклеотидные последовательности (например, слитые белки по изобретению и последовательности для контроля экспрессии), можно переносить в клетку-хозяина хорошо известными способами, которые меняются в зависимости от типа клеточного хозяина. Например, трансфекция хлоридом кальция является общепринятой для прокариотических клеток, в то время как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеточных хозяев.

Можно использовать различные способы очистки белка, и такие способы известны в данной области и описаны, например, в Deutscher, Methods in Enzymology 182: 83-9 (1990) и Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982). Выбранная стадия(стадии) очистки могут зависеть, например, от характера способа получения, используемого для слитых белков по изобретению.

Белки, полипептиды, и/или пептиды по изобретению, например слитые белки по изобретению с двойной активностью, следует составлять и дозировать способом, соответствующим надлежащей медицинской практике, принимая во внимание клиническое состояние пациента, участок доставки белковых композиций, способ введения, расписание введения и другие факторы, известные практикующим специалистам в данной области. "Терапевтически эффективное количество" слитых белков по изобретению для целей по настоящему изобретению определяют таким образом из этих соображений.

Фармацевтические композиции белков по настоящему изобретению можно вводить любыми способами, позволяющими достигать общей намеченной цели: лечения сахарного диабета типа 1 и типа 2, ожирения, метаболического синдрома или пациентов в критическом состоянии. Допустимые способы введения включают в себя, без ограничения, например, введение посредством ингаляции или суппозитория или введение в слизистую ткань, например, посредством орошения в вагинальную, ректальную, уретральную, буккальную и подъязычную ткань, введение перорально, назально, местно, интраназально, внутрибрюшинно, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интрастернально, посредством внутрисуставной инъекции, в лимфатические узлы, интерстициально, внутриартериально, подкожно, внутрь суставов, трансэпителиально и чрескожно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции вводят посредством орошения, перорально или внутриартериально. Другие пригодные способы введения могут включать в себя также перезаряжаемые или биоразлагаемые устройства и замедляющие или откладывающие высвобождение полимерные устройства. Фармацевтические композиции по этому изобретению можно вводить также в качестве части комбинированной терапии с другими известными метаболическими средствами.

Вводимая доза может зависеть от возраста, состояния здоровья и массы реципиента, вида сопутствующего лечения, если оно присутствует, частоты лечения и характера желательного эффекта. Композиции, включенные в объем изобретения, включают в себя все композиции, где вариант FGF21 присутствует в количестве, которое является эффективным для достижения желательного медицинского эффекта

для лечения сахарного диабета типа 1 или типа 2, ожирения или метаболического синдрома. В то время как индивидуальные нужды могут меняться от одного пациента к другому, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств всех компонентов находится в пределах компетенции обычного специалиста-клинициста.

Белки по настоящему изобретению можно составлять известными способами для получения фармацевтически пригодных композиций. Желательным составом может являться тот, который представляет собой стабильный лиофилизированный продукт, который можно разбавлять подходящим разбавителем, или водный раствор высокой чистоты с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, консервантами, наполнителями или стабилизаторами [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition (1980)]. Белки по настоящему изобретению можно объединять с фармацевтически приемлемым буфером и доводить pH для обеспечения приемлемой стабильности и pH, приемлемого для введения.

Для парентерального введения в одном варианте осуществления слитые белки по изобретению, как правило, составляют посредством смешивания одного или нескольких из них с желательной степенью чистоты, в форме единичной пригодной для инъекции дозы (раствора, суспензии или эмульсии), с фармацевтически приемлемым носителем, т.е. тем, который является не токсичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и является совместимым с другими ингредиентами состава. Предпочтительно, можно добавлять одно или несколько фармацевтически приемлемых противомикробных средств. Фенол, м-крезол и бензиловый спирт являются предпочтительными фармацевтически приемлемыми противомикробными средствами.

Необязательно, можно добавлять одну или несколько фармацевтически приемлемых солей для доведения ионной силы или тоничности. Можно добавлять один или несколько наполнителей для дополнительного доведения изотоничности состава. Глицерин, хлорид натрия и маннит являются примерами наполнителей для доведения изотоничности.

Специалисты в данной области могут легко оптимизировать фармацевтически эффективные дозы и режимы введения для терапевтических композиций, содержащих белки по изобретению, как определено надлежащей медицинской практикой и клиническим состоянием индивидуального пациента. Типичный диапазон доз для белков по настоящему изобретению может лежать в диапазоне от приблизительно 0,01 мг в сутки до приблизительно 1000 мг в сутки (или от приблизительно 0,05 мг в неделю до приблизительно 5000 мг в неделю, вводимых один раз в неделю) для взрослого. Предпочтительно, доза лежит в диапазоне от приблизительно 0,1 мг в сутки до приблизительно 100 мг в сутки (или от приблизительно 0,5 мг в неделю до приблизительно 500 мг в неделю, вводимых один раз в неделю), более предпочтительно, от приблизительно 1,0 мг/сутки до приблизительно 10 мг/сутки (или от приблизительно 5 мг в неделю до приблизительно 50 мг в неделю, вводимых один раз в неделю). Наиболее предпочтительно, доза составляет приблизительно 1-5 мг/сутки (или от приблизительно 5 мг в неделю до приблизительно 25 мг в неделю, вводимых один раз в неделю). Подходящая доза введенного варианта FGF21, может приводить в результате к снижению уровней глюкозы в крови и увеличению потребления энергии посредством более быстрого и более эффективной утилизации глюкозы, и таким образом, является пригодной для лечения сахарного диабета типа 1 и типа 2, ожирения и метаболического синдрома.

Кроме того, поскольку гипергликемия и устойчивость к инсулину являются общераспространенными у пациентов в критическом состоянии с вводимым парентеральным питанием, в некоторых ICU вводят инсулин для лечения избыточной гипергликемии при питании пациентов в критическом состоянии. Фактически, в недавних исследованиях документировано, что использование экзогенного инсулина для поддержания глюкозы в крови на уровне не выше 110 мг на децилитр снижало заболеваемость и смертность среди пациентов в критическом состоянии в хирургическом отделении интенсивной терапии, независимо от того, имеют ли они диабет в анамнезе (Van den Bergheet al. N. Engl. J. Med., 345(19):1359, (2001)). Таким образом, белки по настоящему изобретению уникально подходят для того, чтобы помогать восстанавливать стабильность метаболизма у пациентов в критическом состоянии с нестабильностью метаболизма. Белки по изобретению, такие как белки, содержащие варианты FGF21, являются уникальными в том, что они стимулируют поглощение глюкозы и усиливают чувствительность к инсулину, но не индуцируют гипогликемию.

Другой аспект настоящего изобретения относится к белкам по изобретению для использования в качестве лекарственного средства для лечения ожирения, сахарного диабета типа 1 и типа 2, панкреатита, дислипидемии, заболевания неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, острого инфаркта миокарда, состояний, ассоциированных с серьезными инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина, и других нарушений метаболизма.

Сайт-специфические мутанты FGF21.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки по изобретению включают в себя дополнительные мутанты FGF21 или аналоги FGF21 с неприродными аминокислотами.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки по изобретению содержат агонисты FGF21 с одной или несколькими из следующих дополнительных модификаций FGF21 дикого типа:

(i) дополнительные дисульфиды, неприродные аминокислоты или модификации для стимуляции

димеризации, например образование дисульфида на R154C или введение цистеина в другом участке, или димеризация посредством слитого домена Fc, или формирование димера посредством сшивающего средства, такого как бифункциональный PEG;

(ii) фрагменты FGF21;

(iii) белки, выбранные как обладающие активностью FGF21 (связыванием с бета-klotho и связыванием и активацией FGFR); и

(iv) антитело-миметик FGF21 (различных форматов, таких как Fab, unibody, svFc и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления слитые белки по изобретению содержат один или несколько из следующих линкеров: простая амидная связь, короткие пептиды (в частности, повторы Ser/Gly), дополнительные остатки от транслированной последовательности FGF21 или более длинный линкер вплоть до целого белка (например, Fc домен, пучок HSA-связывающих спиралей, HSA и т.д.). Две группы могут являться также связанными другими химическими средствами, например, через неприродные аминокислоты или общепринятые химические линкеры (малеинимид-Cys, NHS-Lys, click и т.д.).

Другие варианты осуществления изобретения включают в себя, но без ограничения, следующие присоединения к мономерному или димерному варианту слитого белка для продления времени полужизни: HSA-связывающий липид или малая молекула или мицелла.

В конкретных вариантах осуществления изобретения можно осуществлять другие присоединения к белкам, полипептидам и/или пептидам по изобретению, для достижения продления времени полужизни и других улучшенных биологических свойств. Они могут включать в себя присоединение конъюгатов PEG-холестерин (включая мицеллы и липосомы) к белкам, полипептидам и/или пептидам по изобретению, и/или присоединение сахаров (гликозилирование) к белкам, полипептидам и/или пептидам по изобретению. В других вариантах осуществления подобные способы используют для добавления к белкам, полипептидам и/или пептидам конъюгатов, например, полисиаловой кислоты (PSA), гидроксиэтилкрахмала (HES), альбуминсвязывающих лигандов или углеводных экранов.

Способом HESилирования, например, присоединяют разветвленные цепи гидроксиэтилкрахмала (HES) (60 или 100 кДа, высоко разветвленные фрагменты амилопектина из кукурузного крахмала) к белку, полипептидам и/или пептидам посредством восстановительного алкилирования. Полисиалированием конъюгируют интересующие белки, полипептиды и/или пептиды с полимерами полисиаловой кислоты (PSA) способом, сходным с пегилированием. Полимеры PSA представляют собой отрицательно заряженные, неиммуногенные полимеры, которые естественным образом встречаются в организме и являются доступными с молекулярной массой 10-50 кДа.

В других вариантах осуществления изобретения можно осуществлять другие присоединения к белкам, полипептидам и/или пептидам по изобретению или другие модификации белков, полипептидов и/или пептидов по изобретению, для достижения продления времени полужизни и других улучшенных биологических свойств. Они включают в себя создание групп рекомбинантного PEG (rPEG) и их присоединение к белкам, полипептидам и/или пептидам по изобретению, как разработано компанией Amunix, Inc. Способ rPEG основан на белковых последовательностях с подобными PEG свойствами, которые генетически сливают с биофармацевтическими средствами, исключая дополнительную стадию химической конъюгации. rPEG представляют собой эксенатидные конструкции с увеличенным временем полужизни, которые содержат длинный неструктурированный хвост из гидрофильных аминокислот, и которые являются способными как увеличивать время полужизни в сыворотке белка или пептида, так и замедлять скорость его абсорбции, таким образом, значительно уменьшая отношение максимального действия к остаточному. rPEG имеют увеличенный гидродинамический радиус и имеют кажущуюся молекулярную массу, превышающую приблизительно в 15 раз их истинную молекулярную массу, мимикрируя способ, которым достигают длительное время полужизни в сыворотке с помощью пегилирования.

Усеченные полипептиды FGF21.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к усеченным формам зрелого полипептида FGF21 (SEQ ID NO: 3). Этот вариант осуществления настоящего изобретения возник из попытки идентификации усеченных полипептидов FGF21, способных обеспечивать активность, сходную с активностью, и в некоторых случаях превосходящую активность неусеченных форм зрелого полипептида FGF21.

Как применяют в настоящем документе, термин "усеченный полипептид FGF21" относится к полипептиду FGF21, в котором остатки аминокислот удалены с амино-конца (или N-конца) полипептида FGF21, остатки аминокислот удалены с карбокси-конца (или C-конца) полипептида FGF21, или остатки аминокислот удалены как с амино-конца, так и с карбокси-конца полипептида FGF21. Различные усечения, описанные в настоящем документе, получены, как описано в настоящем документе.

Активность усеченных по N-концу полипептидов FGF21 и усеченных по C-концу полипептидов FGF21 можно анализировать с использованием анализа in vitro фосфо-ERK. Конкретные подробности анализов in vitro, которые можно использовать для анализа активности усеченных полипептидов FGF21, можно обнаружить в примерах.

Активность усеченных полипептидов FGF21 по настоящему изобретению можно оценивать также в анализе in vivo, например, на мышах ob/ob. В общем, для оценки активности in vivo усеченного полипеп-

тида FGF21, усеченный полипептид FGF21 можно вводить тестируемому животному внутрибрюшинно. После желательного периода инкубации (например, один час или более), можно отбирать образец крови, и можно измерять уровни глюкозы в крови.

a. N-концевые усечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения N-концевые усечения содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков от N-конца зрелого полипептида FGF21. Усеченные полипептиды FGF21, имеющие N-концевые усечения менее 9 аминокислотных остатков, сохраняют способность зрелого полипептида FGF21 снижать уровень глюкозы в крови индивидуума. Соответственно, в конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к усеченным формам зрелого полипептида FGF21 или к вариантам белка FGF21, имеющим N-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков.

b. C-концевые усечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, C-концевые усечения содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков от C-конца зрелого полипептида FGF21. Усеченные полипептиды FGF21, имеющие C-концевые усечения менее 13 аминокислотных остатков, обладают эффективностью по меньшей мере 50% эффективности FGF21 дикого типа в анализе ELK-люциферазы in vitro (Yie J. et al. FEBS Letts 583:19-24 (2009)), что указывает на то, что эти мутанты FGF21 сохраняют способность зрелого полипептида FGF21 снижать уровень глюкозы в крови индивидуума. Соответственно, в конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к усеченным формам зрелого полипептид FGF21 или к вариантам белка FGF21, имеющим C-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков.

c. N-Terminal и C-Terminal усечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения усеченные полипептиды FGF21 могут иметь комбинацию N-концевых и C-концевых усечений. Усеченные полипептиды FGF21, имеющие комбинацию N-концевых и C-концевых усечений, разделяют активность соответствующих усеченных полипептидов FGF21, имеющих только N-концевые или C-концевые усечения. Иными словами, усеченные полипептиды FGF21, имеющие как N-концевые усечения менее 9 аминокислотных остатков, так и C-концевые усечения менее 13 аминокислотных остатков, обладают сходной или большей активностью снижения уровня глюкозы в крови, по сравнению с усеченными полипептидами FGF21, имеющими N-концевые усечения менее 9 аминокислотных остатков или усеченными полипептидами FGF21, имеющими C-концевые усечения менее 13 аминокислотных остатков. Соответственно, в конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к усеченным формам вариантов зрелого полипептида FGF21 или белка FGF21, имеющим как N-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных остатков, так и C-концевые усечения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков.

Как и все варианты FGF21 по настоящему изобретению, усеченные полипептиды FGF21 могут, необязательно, содержать амино-концевой остаток метионина, который можно вводить посредством направленной мутации или в результате процесса экспрессии в бактериях.

Усеченные полипептиды FGF21 по настоящему изобретению можно получать, как описано в примерах, описанных в настоящем документе. Обычные специалисты в данной области, знакомые с общепринятыми способами молекулярной биологии, могут использовать эти знания, вместе с настоящим описанием, для получения и использования укороченных полипептидов FGF21 по настоящему изобретению. Общепринятые способы можно использовать для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культивирования клеток и трансформации (например, электропорации, липофекции). См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, выше, содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки для всех целей. Ферментативные реакции и способы очистки можно осуществлять в соответствии с описаниями производителя, как является общепринятым в данной области, или как описано в настоящем документе. Если не приведены конкретные определения, номенклатура, используемая в этой связи, и лабораторные процедуры и способы аналитической химии, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, являются такими, какие хорошо известны и общеприняты в данной области. Общепринятые способы можно использовать для химического синтеза; химического анализа; получения, составления и доставки фармацевтических средств; и лечения пациентов.

Усеченные полипептиды FGF21 по настоящему изобретению можно также сливать с другой молекулой, которая может придавать дополнительные свойства усеченному полипептиду FGF21. В одном варианте осуществления настоящего изобретения усеченный полипептид FGF21 можно сливать с константным доменом IgG или его фрагментом (например, Fc-областью), человеческим сывороточным альбумином (HSA), или альбуминсвязывающими полипептидами. Такое слияние можно осуществлять с использованием известных способов молекулярной биологии и/или руководства, предоставленного в настоящем документе.

Преимущества этих слитых полипептидов, также как способы получения таких слитых полипептидов, более подробно обсуждают в настоящем документе.

Слитые белки FGF21.

Как применяют в настоящем документе, термин "слитый полипептид FGF21" или "слитый белок FGF21" относится к слиянию одного или нескольких аминокислотных остатков (таких как гетерологичный белок или пептид) с N-концом или С-концом любого из вариантов белка FGF21, описанных в настоящем документе.

Слитые белки FGF21 можно получать слиянием гетерологичных последовательностей либо с N-концом, либо с С-концом, например, варианта белка FGF21, как определено в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, гетерологичная последовательность может представлять собой аминокислотную последовательность или не содержащий аминокислот полимер. Гетерологичные последовательности можно сливать с вариантом белка FGF21 либо напрямую, либо через линкерную или адаптерную молекулу. Линкерная или адаптерная молекула может представлять собой один или несколько аминокислотных остатков (или -меров), например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 остатков (или -меров), предпочтительно от 10 до 50 аминокислотных остатков (или -меров), например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 остатков (или -меров), и более предпочтительно, от 15 до 35 аминокислотных остатков (или -меров). Линкерную или адаптерную молекулу можно конструировать также с участком расщепления ДНК рестрикционной эндонуклеазой или с участком для протеазы, чтобы позволять разделение слитых групп.

Гетерологичные пептиды и полипептиды включают в себя, но без ограничения, эпитоп, позволяющий детекцию и/или выделение варианта белка FGF21; трансмембранный рецепторный белок или его часть, такую как внеклеточный домен или трансмембранный и внутриклеточный домен; лиганд или его часть, которая связывается с трансмембранным рецепторным белком; фермент или его часть, которая является каталитически активной; полипептид или пептид, стимулирующий олигомеризацию, такой как домен лейциновой молнии; полипептид или пептид, увеличивающий стабильность, такой как константная область иммуноглобулина; функциональное или нефункциональное антитело, или его тяжелую или легкую цепь; и полипептид, обладающий активностью, такой как терапевтическая активность, отличной от активности вариантов белка FGF21 по настоящему изобретению. Настоящее изобретение относится также к мутантам FGF21, слитым с человеческим сывороточным альбумином (HSA).

a. Слитые с Fc белки.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вариант белка FGF21 является слитым с одним или несколькими доменами Fc-области IgG человека. Антитела содержат две функционально независимых части, вариабельный домен, известный как "Fab", связывающий антиген, и константный домен, известный как "Fc", вовлеченный в эффекторные функции, такие как активация комплемента и атака фагоцитирующими клетками. Fc имеет длительное время полужизни в сыворотке, в то время как Fab является короткоживущим (Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31). При присоединении к терапевтическому белку домен Fc может обеспечивать более длительное время полужизни или вводить такие функции, как связывание рецептора Fc, связывание белка A, фиксация комплемента и, возможно, даже перенос через плаценту (Capon et al., 1989).

На протяжении описания FC-FGF21 относится к слитому белку, в котором последовательность Fc является слитой с N-концом FGF21. Подобным образом, на протяжении описания, FGF21-Fc относится к слитому белку, в котором последовательность Fc является слитой с С-концом FGF21.

Предпочтительными вариантами осуществления изобретения являются слитые белки FC-FGF21, содержащие варианты FGF21, как определено в настоящем документе. Особенно предпочтительными вариантами осуществления являются слитые белки Fc-FGF21, содержащие модифицированный Fc-фрагмент (например, FcLALA) и варианты FGF21, как определено в настоящем документе.

Слитый белок можно очищать, например, с использованием аффинной колонки с белком A. Обнаружено, что пептиды и белки, слитые с Fc-областью, обладают значительно большим временем полужизни in vivo, чем неслитый эквивалент. А также, слитый белок с Fc-областью позволяет димеризацию/мультимеризацию слитого полипептида. Fc-область может представлять собой природную Fc-область или может быть изменена для улучшения конкретных качеств, таких как терапевтические качества, время циркуляции или уменьшенная агрегация.

Пригодные модификации белковых лекарственных средств посредством слияния с доменом "Fc" антитела подробно обсуждают в Публикации PCT No. WO 00/024782. В этом документе обсуждают связывание с "носителем", таким как полиэтиленгликоль (PEG), декстран или Fc-область.

b. Линкеры слитых белков.

При получении слитых белков по настоящему изобретению можно, но необязательно, использовать линкер. Когда линкер присутствует, его химическая структура может не являться критической, поскольку он служит в первую очередь спейсером. Линкер может состоять из аминокислот, связанных вместе пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер состоит из 1-20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 природных аминокислот. В различных вариантах осуществления 1-20 аминокислот выбраны из аминокислот глицина, серина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из большинства аминокислот, являющихся стерически незатрудненными, такими как глицин и

аланин. В некоторых вариантах осуществления линкеры представляют собой полиглицины, полиаланины, комбинации глицина и аланина (такие как поли(Gly-Ala)), или комбинации глицина и серина (такие как поли(Gly-Ser)). В то время как обнаружено, что линкер из 15 аминокислотных остатков действует особенно хорошо для слитых белков FGF21, настоящее изобретение относится к линкерам любой длины или состава.

Линкеры, описанные в настоящем документе, являются иллюстративными, и линкеры, являющиеся намного более длинными и содержащие другие остатки, включены в настоящее изобретение. Непептидные линкеры также включены в настоящее изобретение. Например, можно использовать алкильные линкеры. Эти алкильные линкеры можно дополнительно замещать любыми стерически незатрудненными группами, включая, но без ограничения, низший алкил (например, C1-C6), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH_2, или фенил. Иллюстративный непептидный линкер представляет собой полиэтиленгликольный линкер, где линкер имеет молекулярную массу 100-5000 кДа, например 100-500 кДа.

Химически модифицированные слитые белки.

Описанные в настоящем документе химически модифицированные формы слитых белков, включая, например, усеченные формы и формы вариантов слитых белков FGF21, описанные в настоящем документе, может получить специалист в данной области, принимая во внимание описания, описанные в настоящем документе. Такие химически модифицированные слитые белки являются измененными так, что химически модифицированный мутант является отличным от немодифицированного мутанта, либо по типу, либо по локализации молекул, естественным образом присоединенных к мутанту. Химически модифицированные мутанты могут включать в себя молекулы, образованные посредством делеции одной или нескольких естественным образом присоединенных химических групп.

В одном из вариантов осуществления белки по настоящему изобретению можно модифицировать ковалентным присоединением одного или нескольких полимеров. Например, выбранный полимер является, как правило, водорастворимым, так что белок, к которому его присоединяют, не осаждается в водном окружении, таком как физиологическое окружение. Включенные в объем настоящего изобретения пригодные полимеры представляют собой смесь полимеров. Предпочтительно, для терапевтического использования препарата конечного продукта, полимер является фармацевтически приемлемым. Нерастворимые в воде полимеры, конъюгированные с белками по настоящему изобретению, также составляют аспект изобретения.

Каждый из иллюстративных полимеров может иметь любую молекулярную массу и может являться разветвленным или неразветвленным. Каждый из полимеров, как правило, имеет среднюю молекулярную массу от приблизительно 2 кДа до приблизительно 100 кДа (термин "приблизительно" указывает на то, что в препаратах водорастворимого полимера некоторые молекулы могут иметь массу более, а некоторые менее указанной молекулярной массы). Средняя молекулярная масса каждого полимера предпочтительно составляет между приблизительно 5 кДа и приблизительно 50 кДа, более предпочтительно между приблизительно 12 кДа и приблизительно 40 кДа, и наиболее предпочтительно, между приблизительно 20 кДа и приблизительно 35 кДа.

Пригодные водорастворимые полимеры или их смеси включают в себя, но без ограничения, N-связанные или 0-связанные углеводы, сахара, фосфаты, полиэтиленгликоль (PEG) (включая формы PEG, используемые для дериватизации белков, включая моно-(C1-C10), алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль), монометоксиполиэтиленгликоль, декстран (такой как низкомолекулярный декстран, например, приблизительно 6 кДа), целлюлозу или другие полимеры на основе углеводов, поли(N-винилпирролидон) полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт. Настоящее изобретение относится также к бифункциональным сшивающим молекулам, которые можно использовать для получения ковалентно соединенных мультимеров вариантов белка FGF21. Настоящее изобретение относится также к мутантам FGF21, ковалентно присоединенным к полисиаловой кислоте.

Полисахаридные полимеры являются другим типом водорастворимого полимера, который можно использовать для модификации белка. Таким образом, слитые белки по изобретению, слитые с полисахаридным полимером, составляют варианты осуществления настоящего изобретения. Декстраны представляют собой полисахаридные полимеры, состоящие из отдельных субъединиц глюкозы, преимущественно, связанные альфа 1-6 связями. Собственно декстран является доступным во многих диапазонах молекулярной массы, и является легко доступным с молекулярной массой от приблизительно 1 кДа до приблизительно 70 кДа. Декстран является пригодным водорастворимым полимером для использования в качестве носителя отдельно или в комбинации с другим носителем (например, Fc). См., например, Международную публикацию WO 96/11953. Опубликовано использование декстрана, конъюгированного с терапевтическими или диагностическими иммуноглобулинами. См., например, Европейскую Патентную публикацию № 0315456, содержание которой таким образом приведено в качестве ссылки. Настоящее изобретение относится также к использованию декстрана от приблизительно 1 кДа до приблизительно 20 кДа.

Как правило, химическую модификацию можно осуществлять в любых подходящих условиях, используемых для реакции белка с молекулой активированного полимера. Способы получения химически

модифицированных полипептидов, как правило, включают в себя стадии: (a) реакции полипептида с молекулой активированного полимера (такой как реакционноспособное производное сложного эфира или альдегида молекулы полимера) в условиях, при которых вариант белка FGF21 становится присоединенным к одной или нескольким молекулам полимера, и (b) получения продуктов реакции. Оптимальные условия реакции можно определять на основании известных параметров и желаемого результата. Например, чем больше соотношение молекул полимера к белку, тем больше процент присоединенных молекул полимера. В одном варианте осуществления настоящего изобретения химически модифицированные мутанты FGF21 могут иметь одиночную группу молекулы полимера на амино-конце (см., например, патент США № 5234784).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения белки по изобретению можно химически присоединять к биотину. Затем биотину/белкам по изобретению позволяют связываться с авидином, что приводит в результате к тетравалентным авидину/биотину/белкам по изобретению. Белки по изобретению можно также ковалентно присоединять к динитрофенолу (DNP) или тринитрофенолу (TNP), и полученные конъюгаты преципитировать с помощью анти-DNP или анти-TNP-IgM с формированием декамерных конъюгатов с валентностью 10.

Как правило, состояния, которые можно облегчать или модулировать посредством введения химически модифицированных мутантов FGF21 по настоящему изобретению, включают в себя состояния, описанные в настоящем документе для белков по изобретению. Однако, химически модифицированные мутанты FGF21, описанные в настоящем документе, могут обладать дополнительными видами активности, увеличенной или уменьшенной биологической активностью, или другими характеристиками, такими как увеличенное или уменьшенное время полужизни, по сравнению с немодифицированными мутантами FGF21.

Терапевтические композиции слитых белков и их введение.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим композициям, содержащим один или несколько слитых белков по изобретению, описанных в настоящем документе, и в сочетании с фармацевтически или физиологически приемлемым средством для получения состава или фармацевтически приемлемым носителем, выбранным по совместимости со способом введения. Композиции являются конкретно предусмотренными в свете, например, идентификации слитых белков, обладающих улучшенными свойствами.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции получают в форме пригодных для инъекции, в форме либо жидких растворов, либо суспензий; можно получать также твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Липосомы включены в определение фармацевтически приемлемого носителя. В фармацевтической композиции могут присутствовать также фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых наполнителей доступно в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkins.

Пригодные для получения составов материалы предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

Фармацевтическая композиция может содержать материалы для получения составов для модификации, поддержания или сохранения, например pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или пенетрации композиции. Пригодные материалы для получения составов включают в себя, но без ограничения, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин), противомикробные средства, антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия), буферы (такие как борат, бикарбонат, Трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты), придающие объем средства (такие как маннит или глицин), хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)), комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, β-циклодекстрин или гидроксипропил-β-циклодекстрин), наполнители, моносахариды, дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины), белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины), средства для окрашивания, ароматизации и разведения, эмульгаторы, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон), низкомолекулярные полипептиды, солеобразующие противоионы (такие как натрий), консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода), растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль, или полиэтиленгликоль), сахарные спирты (такие как маннит или сорбит), суспендирующие средства, поверхностно-активные вещества или увлажняющие средства (такие как плюроники; PEG; сложные эфиры сорбитана; полисорбаты, такие как полисорбат 20 или полисорбат 80; тритон; трометамин; лецитин; холестерин или тилоксапал), увеличивающие стабильность средства (такие как сахароза или сорбит), увеличивающие тоничность средства (такие как галогениды щелочных металлов; предпочтительно, хлорид натрия или калия; или маннит, сорбит), носители для доставки, разбавители, наполни-

тели и/или фармацевтические адъюванты (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), и его последующие издания, содержание которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки для всех целей).

Оптимальную фармацевтическую композицию может определять специалист в данной области в зависимости, например, от предназначенного способа введения, формата доставки и желательной дозы (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, выше). Такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения in vivo, и скорость выведения in vivo слитого белка по изобретению.

Первичный наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может являться водным или неводным по природе. Например, пригодный наполнитель или носитель для инъекции может представлять собой воду, физиологический солевой раствор или искусственную спинномозговую жидкость, возможно, дополненные другими материалами, общепринятыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными иллюстративными носителями. Другие иллюстративные фармацевтические композиции содержат Трис буфер с pH приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер с pH приблизительно 4,0-5,5, которые могут дополнительно содержать сорбит или пригодный заменитель. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, фармацевтические композиции с двойной функцией можно получать для хранения посредством смешивания выбранной композиции, имеющей желательную степень чистоты, с необязательными средствами для получения состава (Remington's Pharmaceutical Sciences, выше) в форме лиофилизированного осадка или водного раствора. Кроме того, белковый продукт с двойной функцией можно составлять в форме лиофилизата с использованием пригодных наполнителей, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции, содержащие слитые белки по изобретению, можно выбирать для парентеральной доставки. Альтернативно, композиции можно выбирать для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в компетенции специалистов в данной области.

Компоненты состава присутствуют в концентрациях, которые являются приемлемыми в участке введения. Например, буферы используют для поддержания композиции при физиологическом pH или немного более низком pH, как правило, в диапазоне pH от приблизительно 5 до приблизительно 8.

Когда предусмотрено парентеральное введение, терапевтические композиции для использования по этому изобретению могут находиться в форме апирогенного, приемлемого для парентерального введения, водного раствора, содержащего желательный белок с двойной функцией в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно пригодным носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой белок с двойной функцией составляют в форме стерильного, изотонического раствора, содержащего соответствующие консерванты. Другой способ получения может включать в себя составление желательной молекулы с таким средством, как пригодные для инъекции микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), бусины или липосомы, обеспечивающие контролируемое или замедленное высвобождение продукта, которые затем можно доставлять посредством инъекции-депо. Можно использовать также гиалуроновую кислоту, и это может оказывать эффект, способствующий продленному присутствию в кровотоке. Другие пригодные средства для введения желательной молекулы включают в себя поддающиеся имплантации устройства для доставки лекарственных средств.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию можно составлять для ингаляции. Например, белок с двойной функцией по изобретению можно составлять в форме сухого порошка для ингаляции. Можно также составлять растворы для ингаляции белка с двойной функцией с пропеллентом для аэрозольной доставки. В другом варианте осуществления растворы можно распылять. Введение в легкие дополнительно описано в Международной публикации WO 94/20069, где описана доставка в легкие химически модифицированных белков.

Предусмотрено также, что конкретные составы можно вводить перорально. В одном варианте осуществления настоящего изобретения слитые белки по изобретению, которые вводят этим способом, можно составлять в присутствии или в отсутствие этих носителей, общеиспользуемых в получении твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. Например, может быть разработана капсула для высвобождения активной части состава в тот момент в желудочно-кишечном тракте, когда биодоступность является максимизированной, а пресистемная деградация является минимизированной. Можно включать дополнительные средства для облегчения абсорбции слитых белков по изобретению. Можно использовать также разбавители, ароматизирующие средства, легкоплавкие воски, растительные масла, смазывающие средства, суспендирующие средства, дезинтегрирующие таблетку средства и связующие вещества.

Другая фармацевтическая композиция может включать эффективное количество слитых белков по изобретению в смеси с нетоксичными наполнителями, пригодными для изготовления таблеток. Растворением этих таблеток в стерильной воде или другом подходящем наполнителе можно получать растворы в форме единичной дозы. Пригодные наполнители включают в себя, но без ограничения, инертные раз-

бавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связующие вещества, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; или смазывающие средства, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции, содержащие слитые белки по изобретению, очевидны специалистам в данной области, включая составы, включающие слитые белки по изобретению в составах с замедленной или контролируемой доставкой. Способы составления множества других средств для замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые бусины и инъекции-депо, также известны специалистам в данной области (см., например, Международную публикацию WO 93/15722, в которой описано контролируемое высвобождение из пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций, и Wischke & Schwendeman, 2008, Int. J. Pharm. 364: 298-327, и Freiberg & Zhu, 2004, Int. J. Pharm. 282: 1-18, в которых обсуждают получение и использование микросфер/микрочастиц).

Дополнительные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые полимерные матриксы в форме сформованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матриксы для замедленного высвобождения могут включать в себя полиэфиры, гидрогели, полилактиды (патент США № 3773919 и Европейский патент № 0058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22: 547-56), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., выше) или поли-D-3-гидроксимасляную кислоту (Европейский Патент № 0133988). Композиции с замедленным высвобождением могут включать в себя также липосомы, которые можно получать любым из нескольких способов, известных в данной области. См., например, Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-92; и Европейские патенты № 0036676, 0088046 и 0143949.

Фармацевтические композиции по изобретению, подлежащие использованию для введения in vivo, как правило, должна являться стерильной. Это можно осуществлять фильтрацией через мембраны для стерилизации фильтрацией. Когда композиция является лиофилизированной, стерилизацию с использованием этого способа можно проводить либо до, либо после лиофилизации и разведения. Композицию для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие для доступа, например, мешок для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции.

После приготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в форме раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или дегидратированного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой для использования форме, либо в форме (например, лиофилизированной), требующей разведения перед введением.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к наборам для получения единицы введения однократной дозы. Каждый из этих наборов может содержать как первый контейнер, содержащий высушенный белок, так и второй контейнер, содержащий водный состав. В объем этого изобретения включены также наборы, содержащие одно- и мультикамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

Дозы слитых белков и их введение.

Эффективное количество фармацевтической композиции по изобретению для терапевтического использования может зависеть, например, от терапевтического контекста и терапевтических целей. Специалисту в данной области понятно, что подходящие для лечения уровни дозирования могут, таким образом, зависеть, частично, от доставляемой молекулы, показания, для которого используют вариант слитого белка, способа введения и размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) данного пациента. Соответственно, клиницист может титровать дозу и модифицировать способ введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная доза может лежать в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг/кг вплоть до приблизительно 100 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. В других вариантах осуществления доза может лежать в диапазоне от 0,1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг; или от 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг.

Частота дозирования может зависеть от фармакокинетических параметров белка с двойной функцией в используемом составе. Как правило, клиницист вводит композицию до достижения дозы, дающей желаемый эффект. Таким образом, композицию можно вводить в форме однократной дозы, в форме двух или более доз (которые могут содержать или не содержать одинаковое количество желательной молекулы) на протяжении времени или в форме непрерывной инфузии посредством имплантированного устройства или катетера. Дополнительное уточнение подходящей дозы специалисты в данной области выполняют общепринятым образом, и оно находится в их обычной компетенции. Подходящие дозы можно уточнять с использованием соответствующих данных доза-ответ.

Способ введения фармацевтической композиции согласуется с известными способами, например перорально, посредством инъекции внутривенным, внутрибрюшинным, интрацеребральным (интрапаренхимальным), интрацеребровентрикулярным, внутримышечным, внутриартериальным, интрапорталь-

ным или внутриочаговым способами; посредством систем для замедленного высвобождения (которые можно также инъецировать); или посредством имплантируемых устройств. Если желательно, композиции можно вводить посредством болюсной инъекции или непрерывно посредством инфузии или посредством имплантированного устройства.

Альтернативно или дополнительно, композицию можно вводить местно посредством имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, в котором была абсорбирована или инкапсулирована желательная молекула. При использовании имплантируемого устройства это устройство можно имплантировать в любые подходящие ткань или орган и доставку желательной молекулы можно осуществлять посредством диффузии, болюса с высвобождением в определенной время или непрерывного введения.

Терапевтические применения слитых белков.

Белки по изобретению можно использовать для лечения, диагностики, облегчения или предотвращения ряда заболеваний, нарушений или состояний, включая, но без ограничения, нарушения метаболизма. В одном варианте осуществления нарушение метаболизма, подлежащее лечению, представляет собой диабет, например, сахарный диабет типа 2. В другом варианте осуществления, нарушение метаболизма представляет собой ожирение. Другие варианты осуществления включают в себя такие состояния или нарушения метаболизма, как сахарный диабет типа 1, панкреатит, дислипидемия, заболевание неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), устойчивость к инсулину, гиперинсулинемия, непереносимость глюкозы, гипергликемия, метаболический синдром, гипертензия, сердечно-сосудистое заболевание, острый инфаркт миокарда, атеросклероз, болезнь периферических артерий, инсульт, сердечная недостаточность, коронарная болезнь сердца, заболевание почек, осложнения диабета, невропатия, нарушения, ассоциированные с серьезными инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина, гастропарез и другие нарушения метаболизма.

При применении, нарушение или состояние, такое как сахарный диабет типа 1 или типа 2, или ожирение, можно лечить введением варианта белка FGF21, как описано в настоящем документе, нуждающемуся в этом пациенту в количестве терапевтически эффективной дозы. Введение можно проводить, как описано в настоящем документе, например, посредством IV инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции, или перорально в форме таблетки или жидкого состава. В большинстве случаев желательную дозу может определять клиницист, как описано в настоящем документе, и она может представлять собой терапевтически эффективную дозу мутантного полипептида FGF21. Специалистам в данной области понятно, что терапевтически эффективная доза мутантного полипептида FGF21 может зависеть, среди прочего, от расписания введения, однократной дозы вводимого антигена, от того, вводят ли молекулу нуклеиновой кислоты или полипептид в комбинации с другими лекарственными средствами, от иммунного статуса и состояния здоровья реципиента. Термин "терапевтически эффективная доза", как применяют в настоящем документе, означает то количество мутантного полипептида FGF21, которое вызывает биологический или медицинский ответ в системе ткани, у животного или у человека, как считает исследователь, врач или другой клиницист, что включает в себя облегчение симптомов заболевания или нарушения, подлежащего лечению.

При наличии подробно описанного сейчас настоящего изобретения его можно более ясно понять со ссылкой на следующие примеры, которые приведены в настоящем документе только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения.

В практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать, если не указано иначе, общепринятые способы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, известные в данной области. Такие способы полностью объяснены в литературе. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); и Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); и Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989).

Примеры

Пример 1. Получение вариантов белков FGF21.

Экспрессирующая конструкция для FGF21 V76: варианты FGF21 клонировали в модифицированный экспрессирующий вектор для E.coli pET30a, описанный Achmuller et al. (2007) (Nature Methods 4:1037-1043), для получения слитых белков в рамке с гекса-гистидиновой меткой с последующей меткой N^{pro}-EDDIE на N-конце FGF21 (ак 33-209).

Экспрессия и очистка FGF21 V76: экспрессирующей плазмидой pET30a-His-N^{pro}-EDDIE-FGF21 трансформировали компетентные клетки E.coli BL21 Star (DE3) (Invitrogen). Выросшие в течение ночи клетки из отдельной колонии свежетрансформированных клеток переносили в 50 мл Terrific Broth (TB), содержащей 50 мкг/мл канамицина при 37°C. Предварительную культуру переносили в 1 л среды TB с канамицином и культивировали в колбах с отражателями при 37°C с покачиванием при 250 об./мин. После 6 ч культивирования экспрессию FGF21 индуцировали добавлением IPTG в конечной концентрации 1 мМ, и культуры выращивали в течение ночи при 37°C. Затем клетки собирали и ресуспендировали в 50 мл ледяного буфера для лизиса; 50 мМ Трис-HCl, pH 8, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, с последующим лизи-

сом с использованием микрофлюидизатора™.

Тельца включения (IB) осаждали центрифугированием при 30000×g в течение 1 ч при 4°C. IB промывали 50 мМ Трис-HCl, pH 8, 150 мМ NaCl и затем растворяли в 30 мл буфера для растворения; 10 мМ Трис-HCl, pH 8, 100 мМ NaH_2PO_4, 6М GnHCl. Растворенные IB осветляли центрифугированием при 30000×g в течение 1 ч при 25°C. Раствор IB наносили на 5 мл колонку высокоэффективной смолы Ni-NTA (GE Healthcare), уравновешенной буфером для растворения. Белки, связавшиеся со смолой, элюировали уменьшением pH до 4,5. Элюат модифицировали доведением pH и добавлением дитиотреитола (DTT) в концентрации 20 мМ. Модифицированный элюат медленно разводили в 1 л буфера для пересворачивания; 50 мМ Трис-HCl, pH 8, 0,5М аргинин, 20 мМ DTT, с последующей инкубацией в течение 2 суток при 4°C. Разведенный образец концентрировали, и буфер меняли на 20 мМ Трис-HCl, pH 9 с использованием способа ультрафильтрации. Концентрированный образец наносили на 10 мл колонку со смолой Q сефароза fast flow (GE Healthcare), уравновешенной с помощью 20 мМ Tri-HCl (pH9).

После промывки смолы буфером для уравновешивания белки, связавшиеся со смолой, элюировали 20 мМ Трис-HCl, pH 9, 500 мМ NaCl. Для удаления отщепленного фрагмента слитого белка His-N^{pro} и всего нерасщепленного слитого белка от повторно свернутого белка FGF21, элюат наносили на 5 мл колонку с высокоэффективной смолой Ni-NTA, уравновешенной 20 мМ Трис, pH 8,0, 50 мМ имидазолом, и фракцию проскока, содержащую FGF21, собирали. Для уменьшения уровней эндотоксинов фракцию FGF21 обрабатывали смолой EndoTrap HD (Hyglos), уравновешенной 10 мМ Трис, pH 8, 50 мМ имидазолом, 500 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$. Образец с низким содержанием эндотоксинов диализовали против PBS и затем стерилизовали с помощью фильтра 0,22 мкм. Очищенный белок FGF21 быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Концентрацию белка определяли по оптической плотности при 280 нм с использованием 9362 M^{-1} $см^{-1}$ в качестве молярного коэффициента поглощения для FGF21. Чистоту и целостность белка определяли посредством HPLC, SDS-PAGE и жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

Пегилирование вариантов FGF21 с помощью цистеина: вариант V76 FGF21 (R154C) вариант имел тенденцию к димеризации через сконструированный цистеин; таким образом, перед пегилированием раствор белка (как правило, 5 мг/мл в Трис буфере) мягко восстанавливали с помощью 5 мМ меркаптоэтиламина в течение 30 мин на льду и немедленно обессоливали в 20 мМ Трис, pH 7. Затем свежевосстановленный белок (как правило, 3 мг/мл) немедленно пегилировали 1,5 эквивалентами реагента 40 кДа разветвленный малеимидо-PEG (NOF, кат. # GL2-400MA из серий Sunbright) в течение 3 ч на льду. Наконец, пегилированный белок очищали анионообменной хроматографией (MonoQ) с общим выходом приблизительно 25%.

Экспрессирующие конструкции для вариантов слитого белка FC-FGF21: кДНК для вариантов человеческого FGF21, кодирующие аминокислоты 33-209, клонировали в экспрессирующий вектор для млекопитающих ниже промотора цитомегаловируса (CMV) в одной рамке с N-концевыми последовательностями, включая лидерный пептид (каппа-цепи иммуноглобулина) для управления секрецией белков, со следующими за ним Fc-доменом и коротким линкером.

Экспрессия и очистка вариантов FC-FGF21: варианты белков FC-FGF21 экспрессировали в клетках HEK293T (Американская коллекция типовых культур). Клетки выращивали в суспензионной культуре при 37°C, 8% CO_2, в среде для экспрессии Freestyle 293 (Invitrogen, кат. #12338-018) до суток трансфекции. Клетки центрифугировали при 1000×g в течение 7 мин в бакет-роторе и подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток. Клетки разводили в 900 мл среды Freestyle 293 до конечной концентрации $1,4\times10^6$ клеток/мл и помещали в 3 л колбу без отражателей (Corning, Cat. #431252). Клетки трансфицировали с использованием смеси полиэтиленимина (PEI) и плазмиды следующим образом. Три мл стерильного исходного раствора 1 мг/мл линейного PEI, M.W. 25000, (Alfa Aesar, кат.#43896) добавляли к 50 мл среды Freestyle 293, осторожно перемешивали и инкубировали при 25°C в течение 5 мин. В то же самое время 1 мг свободной от эндотоксина плазмиды добавляли к 50 мл среды Freestyle 293 и стерилизовали фильтрованием с использованием фильтра 0,22 мкм. Затем смесь PEI добавляли к стерильной фильтрованной ДНК, осторожно перемешивали и оставляли для инкубации при 25°C в течение 10 мин. Затем смесь PEI-плазмида добавляли в 3 л колбу, содержащую разведенные клетки HEK 293T и помещали в инкубатор с покачиванием при 125 об./мин, 37°C, 8% CO_2.

На сутки 6 после трансфекции клетки центрифугировали при 2000×g в течение 10 мин и собирали супернатант. Супернатант дополнительно осветляли фильтрацией через фильтр 0,8/0,2 мкм (Pall Corporation, кат. #4628).

Периодическую очистку белка FGF21 выполняли посредством добавления 1 мл сефарозы Fast Flow с рекомбинантным белком A (GE, кат. #17-5138-03), на 20 мг ожидаемого белка, подлежащего очистке, непосредственно к осветленному супернатанту и инкубации в течение 1 ч при 4°C с осторожным вращением. Затем смесь супернатанта заливали в одноразовую хроматографическую колонку Poly-Prep (Bio-Rad, кат. #731-1550), и проскок выбрасывали. Оставшиеся бусины промывали 5 объемами колонки DPBS, pH7,4 (Invitrogen, кат. #14190-144). Элюцию белка с бусин с белком A выполняли посредством добавления 20 объемов колонки буфера 50 мМ цитрата натрия, pH 3,0. Буфер для элюции нейтрализова-

ли добавлением 20% буфера Трис-HCl, pH 9,0. Эксклюзионную хроматографию проводили в качестве стадии вторичной дополнительной очистки посредством пропускания материала после периодической очистки с белком А через колонку High Load 26/600 Superdex 200 pg (GE, кат. #28-9893-36). Выход очищенного белка оценивали количественно как A280. Проводили SDS-Page для верификации чистоты и молекулярной массы. Уровень эндотоксинов оценивали количественно с использованием системы Endosafe PTS (Charles River Labs).

Пример 2. Измерение зависимого от FGF21 поглощения 2-дезоксиглюкозы (2-DOG).

Показано, что FGF21 стимулирует поглощение глюкозы в адипоцитах мыши 3T3-L1 в присутствии и в отсутствие инсулина, и уменьшает уровни глюкозы, триглицеридов и глюкагона в крови после еды и натощак у ob/ob и db/db мышей, и крыс ZDF в возрасте 8 недель зависимым от дозы образом, таким образом, предоставляя основание для использования FGF21 в качестве лекарственного средства для лечения диабета и ожирения (см., например, патентную публикацию WO 03/011213, и Kharitonenkov et al., (2005) Jour, of Clinical Invest. 1 15:1627-1635). Наблюдали также, что FGF21 стимулирует фосфорилирование тирозина FGFR-1 и FGFR-2 в адипоцитах 3T3-L1.

Фибробласты 3T3-L1 закупали из ATCC (кат. # CL173). Клетки выращивали до конфлюентности в чашках Петри 150 см и поддерживали в DMEM с высоким содержанием глюкозы (Invitrogen, кат. # 11995065), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой и 1% пенициллином-стрептомицином, в течение дополнительных 4 суток. Затем клетки подвергали дифференцировке в вышеуказанной среде, дополненной 4 мкг/мл инсулина (Sigma, кат. #1-5500), 115 мкг/мл IBMX (Sigma, кат. #15879) и 0,0975 мкг/мл дексаметазона (Sigma, кат. #D1756) в течение 3 суток, после чего среду для дифференцировки заменяли на полную DMEM. Один планшет дифференцированных 3T3-L1 адипоцитов рассевали в четыре 96-луночных планшета через сутки после замены среды.

Затем адипоциты обрабатывали FGF21-WT и вариантом белка FGF21 (см. список вариантов в табл. 2; 30 пМ - 100 нМ представляет собой обычный используемый диапазон концентраций) в течение ночи в полной среде. Образцы адипоцитов, обработанных FGF21, подвергали голоданию по сыворотке в 50 мкл на лунку буфера KRH (0,75% NaCl; 0,038% KCl; 0,0196% $CaCl_2$; 0,032% $MgSO_4$; 0,025M HEPES, pH 7,5; 0,5% BSA; 2 мМ пируват натрия) в течение 2 ч. В лунки для нуля добавляли 1 мкл (конечная концентрация 5 мкг/мл) цитохалазина B на 15 мин. [3H]-2-DOG (20,6 мКи/моль (762,2 МБк/моль), 1 мКи/мл (37 МБк/мл)) разводили 1:20 в 5,1 мМ холодном 2-DOG и добавляли 1 мкл разведенного 2-DOG на лунку, и клетки инкубировали в течение 5 мин. Клетки промывали 100 мкл/лунку буфера KRH три раза. 40 мкл/лунку 1% SDS добавляли к клеткам, и клетки встряхивали в течение по меньшей мере 10 мин. Добавляли 200 мкл/лунку сцинтилляционной жидкости, и планшеты встряхивали в течение ночи и считывали в бета-счетчике для микропланшетов. Значения, полученные для целого столбца/ряда, обработанных цитохалазином B, усредняли и вычитали из всех других значений. Данные анализировали посредством программного обеспечения GraphPad Prism, результаты чего обобщены в таблице 2. Варианты слитого белка Fc-FGF21 V101, V103 и V188 превосходили пегилированный вариант FGF21 V76 по индукции поглощения 2-дезоксиглюкозы адипоцитами 3T3L1 мыши.

Пример 3. pERK в Вестерн-анализе клеток (ICW).

Клетки HEK293, стабильно трансфицированные β-klotho человека, культивированные в DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, 1% PS и 600 нг/мл G418, рассевали в покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты (BD bioscience, кат. #356640) при 30000 клеток на лунку в течение ночи. Клетки подвергали голоданию по сыворотке в DMEM с высоким содержанием глюкозы, 0,5% BSA и 10 мМ HEPES в течение 4 ч. WT FGF21 и варианты FGF21 (см. список вариантов в табл. 3) разводили до различных концентраций (100 пМ - 300 нМ представляет собой обычный используемый диапазон концентраций) в среде для голодания. Клетки стимулировали FGF21 в течение 10 мин. После стимуляцией FGF21 или вариантами белка FGF21, среду отбирали из лунок, и клетки промывали один раз 100 мкл холодного PBS и затем фиксировали с помощью 100 мкл 4% формальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре и затем дополнительно инкубировали 10 мин с 100 мкл ледяного метанола.

После фиксации клетки промывали 0,3% Тритон X-100 в PBS четыре раза, 5 мин каждый. 150 мкл блокирующего буфера Odyssey добавляли к пермеабилизированным клеткам при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Антитело против фосфо-ERK (pERK) разводили до концентрации 0,17 мкг/мл (разведение 1:200 или указанные разведения) и антитело против тотального ERK (tERK) разводили до концентрации 2,2 мкг/мл (разведение 1:200 или указанные разведения) в блокирующем буфере Odyssey. 50 мкл добавляли в каждую лунку, исключая один столбец, который обрабатывали только вторичным антителом для нормализации по фону. Планшет накрывали влажным бумажным полотенцем и крышкой для предотвращения испарения и затем инкубировали при 4°C в течение ночи.

Затем первичное антитело отбирали и клетки промывали четыре раза 0,3% Твин 20 в PBS в течение 5 мин каждый. Во время отмывки подготавливали реакционную смесь для вторичного антитела в блокирующем буфере Odyssey, содержащую разведенное 1:1000 (или в указанных разведениях) антитело козы против антител мыши с Alexa 680 и разведенное 1:1000 (или в указанных разведениях) антитело козы против антител кролика с IRDye800. После завершения отмывки 40 мкл реакционной смеси добавляли в каждую лунку. Планшеты накрывали черной крышкой для защиты вторичного антитела от света и инку-

бировали планшеты при комнатной температуре в течение 1 ч в встряхивателе. Наконец, клетки снова промывали четыре раза 0,3% Твин 20 в PBS в течение 5 мин каждый и затем сканировали в системе визуализации LI-COR Bioscience Odyssey Infrared (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) в каналах 700 нм (красном) и 800 нм (зеленом). Alexa 680 окрашивал tERK с помощью флуоресценции в дальнем красном диапазоне (длина волны излучения 668 нм), в то время как IRDye800 окрашивал pERK с помощью зеленой флуоресценции (длина волны излучения 800 нм). Для исключения флуоресцентного фона, значения, полученные для целого столбца/ряда, обработанного только вторичным антителом, усредняли и вычитали из всех других значений, полученных для планшета. Для нормализации количества pERK, присутствующего в каждом образце, значения для pERK в каждой лунке делили на значения для tERK. Данные анализировали посредством программного обеспечения GraphPad Prism, результаты чего обобщены в табл. 2. Варианты слитого белка Fc-FGF21 V101, V103 и V188 превосходили пегилированный вариант FGF21 V76 в этом анализе фосфорилирования ERK.

Таблица 2. Обобщение результатов для ERK в Вестерн-анализе клеток и поглощения глюкозы адипоцитами 3T3L1 мыши

ID варианта FGF21	pERK (HEK293/β-klotho человека) EC50±SEM	поглощение глюкозы (адипоциты 3T3L1 мыши) EC50±SEM
V76	13± 4 нМ (n=5)	5±1 нМ (n=3)
V101	0,60±0,06 нМ (n=5)	0,60±0,06 нМ (n=3)
V103	0,9±0,3 нМ (n=5)	0,60±0,07 нМ (n=3)
V188	0,4±0,1 нМ (n=3)	0,48±0,14 нМ (n=3)

Пример 4. Тесты вариантов FGF21 in vivo.

Мышь ob/ob представляет собой модель на мышах диабета типа 2. Мыши лишены функционального лептина и характеризуются гипергликемией, устойчивостью к инсулину, гиперфагией, гепатостеатозом и ожирением. Самцов мышей ob/ob (в возрасте 10-13 недель) использовали для измерения эффекта на уровень глюкозы в крови следующих пегилированного варианта V76 FGF21 и вариантов V101, V103 и V188 слитого белка FC-FGF21.

Варианты FGF21 или носитель PBS вводили s.c. при 1 мг/кг (V101, V103 и V188) или s.c при 5 мг/кг V76 дважды в неделю 12 суток (всего 4 дозы). На первые сутки исследования измеряли уровень глюкозы в крови из хвоста и массу тела и мышей распределяли в различные группы (n=8 на группу) со средним уровнем глюкозы и массой тела, совпадающими в группе. Уровень глюкозы в крови измеряли с использованием глюкометра (OneTouch). Уровень инсулина в плазме измеряли на сутки 1 перед дозированием и на сутки 12, через 24 ч после последней дозы. Результаты этих исследований суммированы в табл. 5.

Результаты этих исследований суммированы в табл. 3 и на фиг. 1-3. Варианты V101, V103 и V188 слитого белка Fc-FGF21 превосходили пегилированный вариант V76 FGF21 в каждой конечной точке, измеряемой в этих исследованиях и при меньшей в пять раз дозе.

Таблица 3. % изменений по сравнению с носителем уровней глюкозы, инсулина в плазме, увеличения массы тела (BW), уровней TG/липидов в печени посредством вариантов FGF21 в ходе 12-суточных исследованиях на мышах ob/ob

Обобщение 12-суточного исследования лечения мышей ob/ob с диабетом (% изменений по сравнению с носителем)					
ID варианта FGF21	Доза (мг/кг)	Общий уровень глюкозы (AUC)	Уровень инсулина в плазме	Масса тела	Уровень липидов в печени
V76	5,0	-42%	-46%	-7%	-30%
V101	1,0	-53%	-82%	-12%	-44%
V103	1,0	-46%	-69%	-12%	-50%
V188	1,0	-42%	-59%	-11%	-51%

Пример 5. Фармакокинетика вариантов слитых белков FGF21 у мышей.

Для определения фармакокинетического профиля вариантов V101, V103 и V188 слитых белков FC-FGF21 мышам C57BL/6J инъецировали IV 1 мг/кг тестируемого вещества и отбирали кровь в различных временных точках вплоть до 16 суток (384 ч). Образцы крови собирали в покрытые ЭДТА пробирки-микроконтейнеры из подчелюстной или ретроорбитальной сети. Приблизительно 50 мкл крови отбирали в каждой временной точке, получая ~ 25 мкл плазмы.

Для измерения концентраций в плазме тестируемых веществ посредством ELISA, 384-луночные

планшеты покрывали в течение ночи при комнатной температуре (RT) 2 мкг/мл поликлонального антитела козы против Fc-γ человека (30 мкл/лунку) и затем блокировали разбавителем на основе казеина в течение 2 ч при RT (100 мкл/лунку). Разведенные образцы, стандарты и контроль добавляли в планшет (30 мкл/лунку) и инкубировали в течение 2 ч при RT. После удаления образцов лунки промывали 3 раза раствором для промывки на основе фосфата (100 мкл/лунку). Антитело для детекции, меченный HRP вариант антитела для связывания, добавляли в планшет и инкубировали в течение 1 ч при RT (30 мкл/лунку). После того как планшет снова промывали 3 раза раствором для промывки на основе фосфата (100 мкл/лунку), добавляли хемилюминесцентный субстрат (30 мкл/лунку) и люминесценцию планшета считывали в пределах 5 мин с использованием подходящего считывателя для планшетов. Как показано на фиг. 4A и 4B, варианты слитого белка Fc-FGF21 обладали намного увеличенным временем полужизни в плазме по сравнению с известными в данной области слитыми белками Fc-FGF21 (фиг. 4A) и по сравнению с пегилированным вариантом V76 FGF21 (фиг. 4B).

Уровни в сыворотке тестируемых веществ FC-FGF21 подтверждали Вестерн-блоттингом для сравнения с уровнями, измеренными посредством ELISA, чтобы убедиться, что полноразмерный вариант FC-FGF21, а не один Fc детектирован посредством ELISA. Два микролитра сыворотки крови мыши объединяли с 2,5 мкл 4X буфера для нанесения, 1 мкл 10X денатурирующего средства и 4 мкл dH_2O, нагревали до 95°C в течение 5 мин, наносили в 4-12% градиентный полиакриламидный гель и подвергали электрофорезу в течение 1 ч при 100 В (постоянное напряжение). Образцы переносили на нитроцеллюлозную фильтровальную бумагу посредством Вестерн-блоттинга с использованием системы iblot (Invitrogen, кат. #IB1001, время переноса 7 минут). Нитроцеллюлозные фильтры блокировали с помощью 30 мл блокирующего раствора Rockland (кат. #MB-070), обрабатывали согласно протоколу системы snap iblot первичным антителом козы против FGF21 в разведении 1:2000 (R&D systems, кат. #BAF2539) и флуоресцентно меченным стрептавидином в качестве вторичного реагента в разведении 1:10000 (Licor, кат. #926-68031). Уровни белка визуализировали в системе Licor Odyssey при 700 нм и сравнивали с разделением 2 нМ контроля V101 в том же самом геле. Как показано на фиг. 4C, варианты V101, V103 и V188 полноразмерного FC-FGF21 поддаются детекции с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антитела против FGF21 вплоть до 15 суток в сыворотке мышей из фармакокинетического исследования.

Пример 6. Варианты V101, V103 и V188 слитого белка FC-FGF21 являются необычайно термодинамически стабильными.

Белки можно разворачивать в специфическом диапазоне температур. Температура разворачивания белка представляет собой свойственный ему параметр для описания термостабильности белков. Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) используют для детекции температуры разворачивания белка. Эту характерную температуру описывают как температуру плавления (Tm), представляющую собой пик температуры в ходе разворачивания белка.

Исходные образцы белка разводили в PBS до концентрации ~ 1 мг/мл (0,5-1,2 мг/мл) до общего объема 0,5 мл. Аликвоту 0,4 мл на лунку разведенного образца белка, стандарта, PBS и DI воды добавляли в 96-луночный планшет DSC. Затем планшет покрывали герметичной пленкой. Образцы анализировали в 96-луночном дифференциальном сканирующем калориметре из MicroCal. Температуру сканировали при 10-110°C со скоростью 1° в минуту.

Как показано на фиг. 4D, температуры плавления вариантов V101, V103 и V188 FGF21 являются необычайно высокими. Это отличается от более низких температур плавления варианта V76 FGF21 и FGF21 дикого типа (не показано). Авторы настоящего изобретения приписывают улучшенную стабильность V101, V103 и V188 специфическому добавлению второй дисульфидной связи из новых мутаций Q55C и G148C. Известно, что этот тип термодинамической стабильности защищает белки от протеолиза и может, кроме того, переходить в значительно продленную стабильность in vivo и улучшенные фармакокинетические профили, проиллюстрированные данными на фиг. 4B и 4C.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий вариант фактора роста фибробластов 21 (FGF21) и Fc-область, где указанная Fc-область связана с N-концом указанного варианта FGF21, где указанный вариант FGF21 содержит следующие мутации по отношению к полноразмерной последовательности hFGF21 SEQ ID NO: 1: Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G и G202A и где указанный слитый белок имеет улучшенные фармацевтические свойства по сравнению с FGF21 дикого типа.

2. Слитый белок по п.1, где указанные улучшенные фармацевтические свойства по сравнению с FGF21 дикого типа включают любые одно или более из: улучшенной фармацевтической стабильности, способности улучшать метаболические параметры для субъектов, которым указанный белок вводят, меньшей подверженности протеолизу и ферментативной деградации, меньшей вероятности агрегации и образования комплексов, улучшенной активности в отношении FGF21-рецепторов и повышенного времени полужизни.

3. Слитый белок по п.1 или 2, где указанный слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

4. Слитый белок по п.1 или 2, где указанный слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

5. Слитый белок по п.1, где указанная Fc-область связана с указанным вариантом FGF21 посредством линкера.

6. Слитый белок по п.5, где указанный линкер представляет собой GS-линкер.

7. Слитый белок по п.5, где указанный линкер имеет длину от 1 до 20 аминокислот.

8. Слитый белок по п.5, где указанный линкер содержит остатки глицина и серина.

9. Слитый белок по п.1 или 2, где указанный вариант FGF21 содержит дисульфидную связь между остатками цистеина в положениях 103 и 121, относящихся к полноразмерной аминокислтной последовательности hFGF21 SEQ ID NO: 1.

10. Слитый белок по п.1 или 2, где указанная Fc-область слитого белка представляет собой модифицированный Fc-фрагмент.

11. Слитый белок по п.10, где указанная Fc-область представляет собой модифицированный Fc-фрагмент с мутацией L234A и L235A.

12. Применение фармацевтической композиции, включающей слитый белок по любому из пп.1-11, для одного или более из следующих: понижения уровней глюкозы в крови, понижения уровней инсулина, понижения уровней триглицеридов, понижения уровней холестерина, понижения уровней липидов в печени, понижения уровней триглицеридов в печени, понижения массы тела, улучшения устойчивости к глюкозе и улучшения чувствительности к инсулину у пациента.

13. Применение по п.12, где указанный пациент страдает одним или более расстройств, выбранных из ожирения, дислипидемии, сахарного диабета типа 1, сахарного диабета типа 2, неалкогольной жировой инфильтрации печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гиперглицемии, метаболического синдрома и гастропареза.

14. Применение по п.13, где указанное нарушение представляет собой NASH.

15. Применение фармацевтической композиции, включающей слитый белок по любому из пп.1-11, в способе лечения у пациента метаболического нарушения, выбранного из ожирения, дислипидемии, сахарного диабета типа 1, сахарного диабета типа 2, NAFLD, NASH, устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гиперглицемии, метаболического синдрома и гастропареза.

16. Применение по п.15, где указанное метаболическое нарушение представляет собой ожирение, сахарный диабет, NAFLD, NASH, дислипидемию или гиперглицемию.

17. Применение по п.15, где указанное метаболическое нарушение представляет собой NASH.

18. Применение слитого белка по любому из пп.1-11 в производстве лекарственного средства для применения в одном или более из следующих: понижении уровней глюкозы в крови, понижении уровней инсулина, понижении уровней триглицеридов, понижении уровней холестерина, понижении уровней липидов в печени, понижении уровней триглицеридов в печени, понижении массы тела, улучшении устойчивости к глюкозе и улучшении чувствительности к инсулину у пациента.

19. Применение по п.17, где указанный пациент страдает одним или более расстройств, выбранных из ожирения, дислипидемии, сахарного диабета типа 1 и типа 2, NAFLD, NASH, устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гиперглицемии, метаболического синдрома и гастропареза.

20. Применение по п.19, где указанное нарушение представляет собой NASH.

21. Применение слитого белка по любому из пп.1-11 в производстве лекарственного средства для применения в способе лечения у пациента метаболического нарушения, выбранного из ожирения, дислипидемии, сахарного диабета типа 1, сахарного диабета типа 2, NAFLD, NASH, устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гиперглицемии, метаболического синдрома и гастропареза.

22. Применение по п.21, где указанное метаболическое нарушение представляет собой ожирение, сахарный диабет, NAFLD, NASH, дислипидемию или гиперглицемию.

23. Применение по п.22, где указанное метаболическое нарушение представляет NASH.

24. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп.1-11.

25. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.24.

26. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.25 или полинуклеотид по п.24.

27. Способ получения слитого белка по любому из пп.1-11, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по п.26 в подходящих условиях для того, чтобы указанная клетка-хозяин продуцировала слитый белок.

28. Способ по п.27, дополнительно включающий очистку слитого белка.

29. Способ одного или более из следующих: понижения уровней глюкозы в крови, понижения уровней инсулина, понижения уровней триглицеридов, понижения уровней холестерина, понижения уровней липидов в печени, понижения уровней триглицеридов в печени, понижения массы тела, улучшения устойчивости к глюкозе и улучшения чувствительности к инсулину у пациента, где указанный способ включает введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-11.

30. Способ по п.29, где указанный пациент страдает одним или более расстройств, выбранных из ожирения, дислипидемии, сахарного диабета типа 1 и типа 2, NAFLD, NASH, устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гиперглицемии, метаболического синдрома, диабетических осложнений, гастропареза и нарушений, ассоциированных с серьезными инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина.

31. Способ по п.30, где указанное метаболическое нарушение представляет собой сахарный диабет типа 2.

32. Способ по п.30, где указанное нарушение представляет собой NASH.

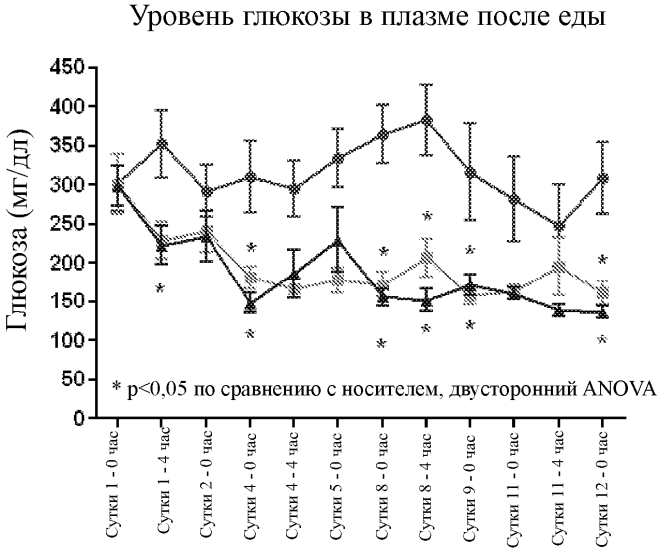
33. Способ по п.30, где указанное нарушение представляет собой гиперглицемию.

34. Способ лечения пациента, страдающего одним или более расстройств, выбранных из ожирения, дислипидемии, сахарного диабета типа 1 и типа 2, NAFLD, NASH, устойчивости к инсулину, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гиперглицемии, метаболического синдрома, диабетических осложнений, гастропареза или нарушений, ассоциированных с серьезными инактивирующими мутациями в рецепторе инсулина, где указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества слитого белка по любому из пп.1-11.

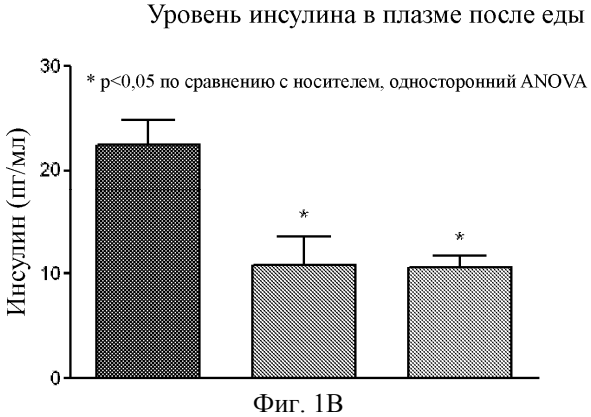
35. Способ по п.34, где указанное метаболическое нарушение представляет собой сахарный диабет типа 2.

36. Способ по п.34, где указанное метаболическое нарушение представляет собой NASH.

37. Способ по п.34, где указанное метаболическое нарушение представляет собой гиперглицемию.

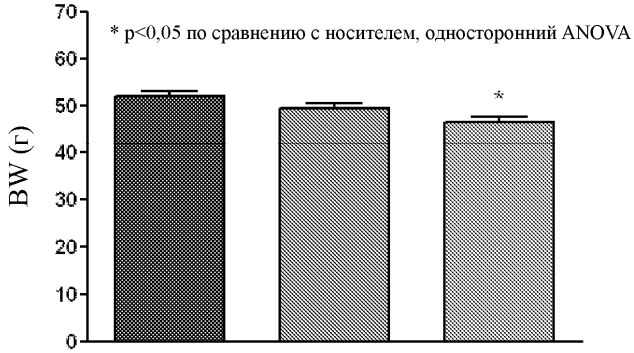


Фиг. 1А



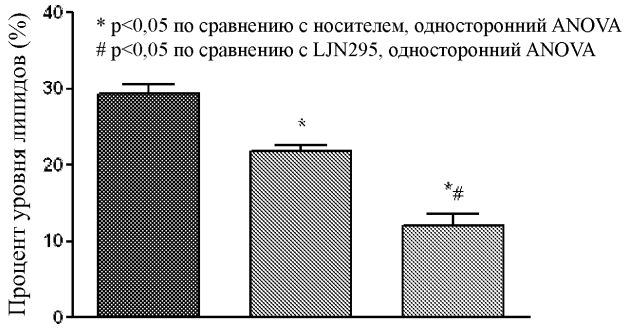
Фиг. 1В

Масса тела



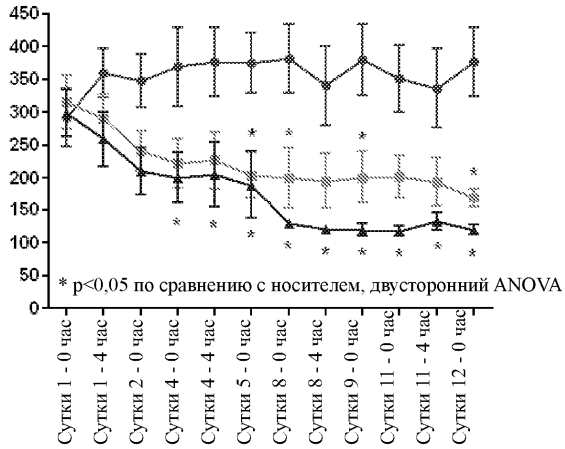
Фиг. 1C

Содержание липидов в печени



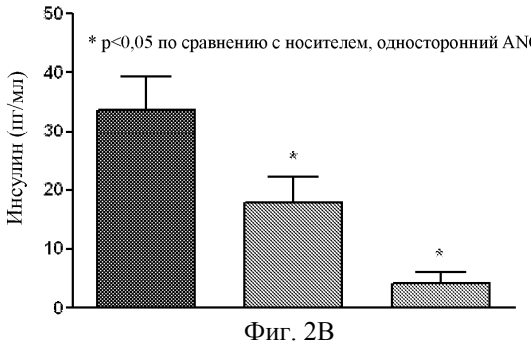
Фиг. 1D

Уровень глюкозы в плазме после еды



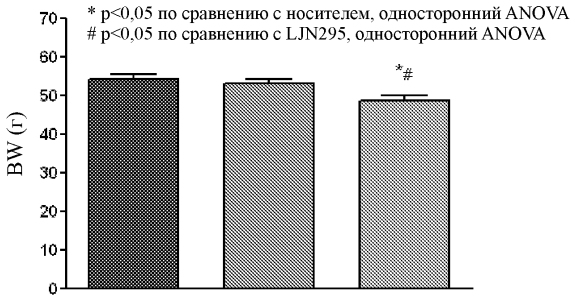
Фиг. 2A

Уровень инсулина в плазме после еды



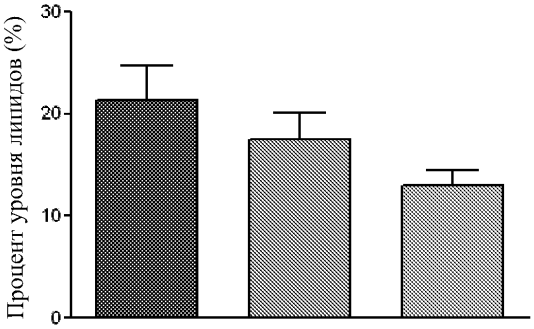
Фиг. 2B

Масса тела



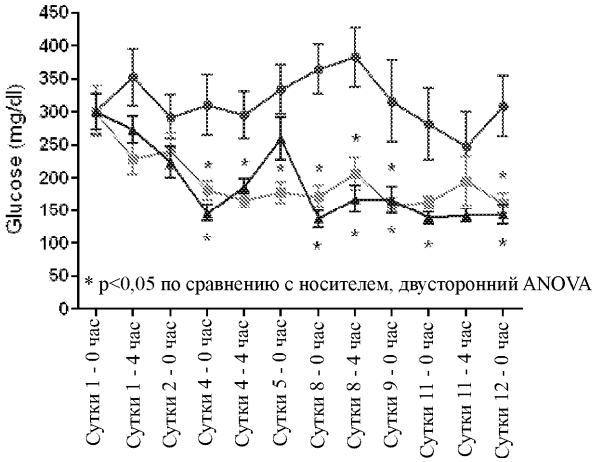
Фиг. 2C

Содержание липидов в печени



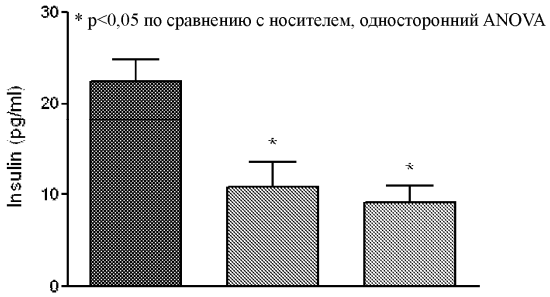
Фиг. 2D

Уровень глюкозы в плазме после еды



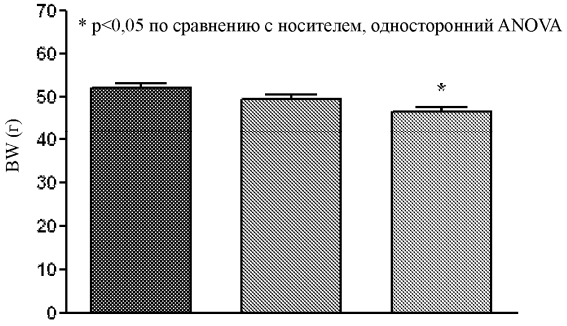
Фиг. 3A

Уровень инсулина в плазме после еды



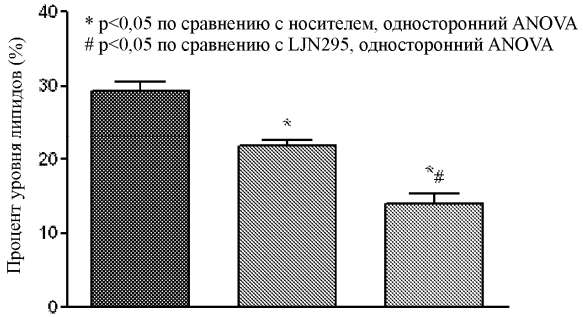
Фиг. 3B

Масса тела

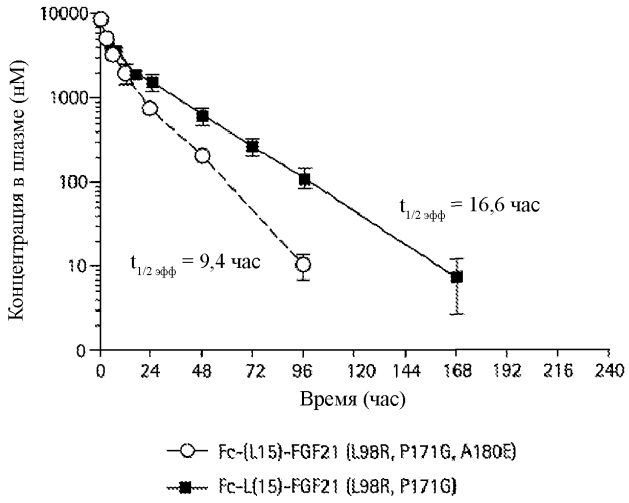


Фиг. 3C

Содержание липидов в печени

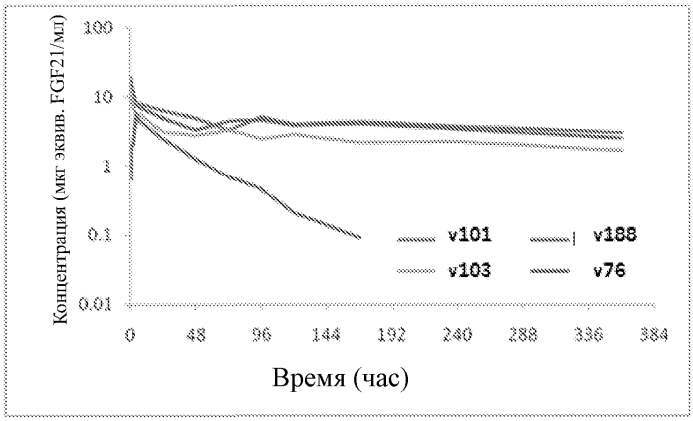


Фиг. 3D

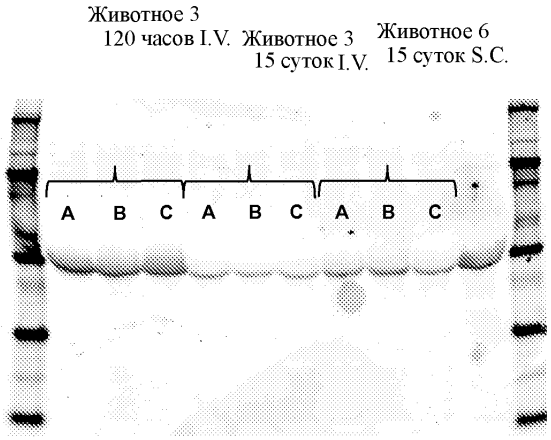


Фиг. 4A

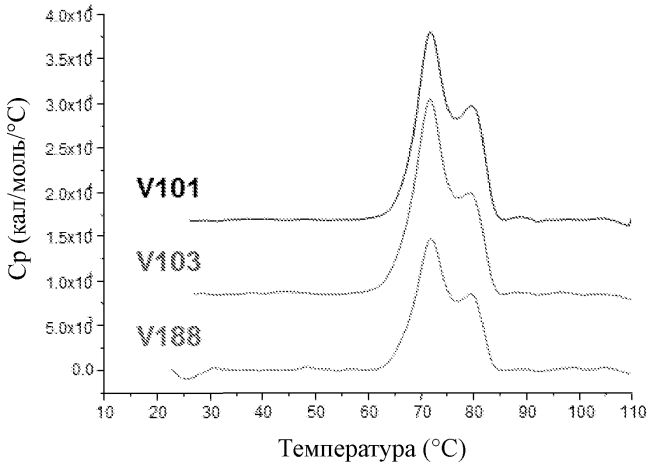
PK однократной IV дозы 1 мг/кг у мышей



Фиг. 4B



Фиг. 4C



Фиг. 4D