

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **032727**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.07.31

(21) Номер заявки
201100516

(22) Дата подачи заявки
2009.10.08

(51) Int. Cl. **C07K 14/50** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(54) МУТАНТНЫЙ РЕЗИСТЕНТНЫЙ К ПРОТЕОЛИЗУ ПОЛИПЕПТИД FGF21 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/195,761**

(32) **2008.10.10**

(33) **US**

(43) **2011.10.31**

(86) **PCT/US2009/060045**

(87) **WO 2010/042747 2010.04.15**

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

(72) Изобретатель:
**Уолкер Кеннет В., Джегг Колин В.,
мл., Хейт Рэнди И., Белоуски Эдвард
Дж., Ли Юэ-Шэн, Майклс Марк Л.,
Сюй Цзин, Эллисон Мюриэль М. (US)**

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

(56) **WO-A-2008121563**

WO-A-2006065582

WO-A-2005091944

WO-A-2006050247

MOYERS JULIE S. ET AL.: "Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, JAN 2007, vol. 210, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1-6, XP002560527, the whole document

KHARITONENKOV ALEXEI ET AL.: "THE METABOLIC STATE OF DIABETIC MONKEYS IS REGULATED BY FIBROBLAST GROWTH FACTOR-21", ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 148, no. 2, 1 February 2007 (2007-02-01), pages 774-781, XP009078947, ISSN: 0013-7227, the whole document

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, the whole document

(57) Изобретение относится к мутантным резистентным к протеолизу полипептидам FGF21, в частности конъюгированным с молекулой ПЭГ; кодирующим полипептиды молекулам нуклеиновой кислоты; содержащим нуклеиновые кислоты векторам; включающим векторы клеткам-хозяевам; способу получения полипептидов FGF21; включающим полипептиды FGF21 фармацевтическим композициям и их использованию в способах лечения метаболических расстройств, в частности диабета или ожирения.

B1**032727****032727****B1**

Уровень техники

1. Область техники.

Изобретение касается молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих FGF21 мутантные полипептиды, FGF21 мутантных полипептидов, фармацевтических композиций, включающих FGF21 мутантные полипептиды, и способов лечения метаболических расстройств с использованием таких нуклеиновых кислот, полипептидов или фармацевтических композиций.

2. Уровень техники.

FGF21 является секретированным полипептидом, который принадлежит к подсемейству факторов роста фибробластов (FGFs), включающему FGF19, FGF21 и FGF23 (Itoh et al., 2004, Trend Genet. 20: 563-69). FGF21 является атипичным FGF в том, что он является гепариннезависимым и действует как гормон в регуляции глюкозного, липидного и энергетического метаболизма.

FGF21 был выделен из печеночной кДНК библиотеки как печеночный секретированный фактор. Он сильно экспрессирован в печени и поджелудочной железе и является единственным членом FGF семейства, экспрессированным, главным образом, в печени. Трансгенные мыши, гиперэкспрессирующие FGF21, обнаруживают метаболические фенотипы замедленного роста, низких уровней глюкозы и триглицеридов в плазме и отсутствие возрастного диабета типа 2, островковой гиперплазии и ожирения. Фармакологическое применение рекомбинантного FGF21 протеина в моделях диабетических грызунов дало нормализованные уровни глюкозы в плазме, сниженные уровни триглицеридов и холестерина, и улучшенную толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину. Кроме того, FGF21 снижает вес тела и ожирение путем увеличения расхода энергии, физической активности и интенсивности обмена веществ. Экспериментальные исследования подтверждают фармакологическое применение FGF21 для лечения диабета типа 2, ожирения, дислипидемии и других метаболических состояний или расстройств у людей.

Человеческий FGF21 имеет короткий период полураспада *in vivo*. У мышей и обезьян *synomolgus* эффективный период полураспада человеческого FGF21 составляет от 1 до 2 ч. При разработке FGF21 протеина для использования в качестве терапевтического препарата при лечении диабета типа 2 увеличение периода полураспада было бы желательным. FGF21 протеины с увеличенным периодом полураспада могли бы обеспечить пациентам, которым назначен данный протеин, менее частую дозировку.

Сущность изобретения

В одном варианте настоящее изобретение представляет изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный резистентный к протеолизу полипептид FGF21 с последовательностью SEQ ID NO: 4, содержащий замену на лизиновый остаток в положении 36 и по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (a) лизиновый остаток в одном или нескольких положениях 72, 77, 126 и 175; (b) цистеиновый остаток в одном или нескольких положениях 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179; (c) аргининовый остаток в одном или нескольких положениях 56, 59, 69 и 122; (d) глициновый остаток в положении 171; и комбинации (a)-(e).

Настоящее изобретение представляет также векторы и клетки-хозяева, включающие молекулы нуклеиновой кислоты данного изобретения.

В еще одном варианте настоящее изобретение представляет изолированный мутантный резистентный к протеолизу полипептид FGF21, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, содержащий замену на лизиновый остаток в положении 36 и по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (a) лизиновый остаток в одном или нескольких положениях 72, 77, 126 и 175; (b) цистеиновый остаток в одном или нескольких положениях 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179; (c) аргининовый остаток в одном или нескольких положениях 56, 59, 69 и 122; (d) глициновый остаток в положении 171; и комбинации (a)-(e).

Кроме того, настоящее изобретение представляет композицию, включающую первый полипептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, имеющую замену на лизиновый остаток в положении 36 и по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой: (a) лизиновый остаток в одном или нескольких положениях 72, 77, 126 и 175; (b) цистеиновый остаток в одном или нескольких положениях 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179; (c) аргининовый остаток в одном или нескольких положениях 56, 59, 69 и 122; (d) глициновый остаток в положении 171; и комбинации (a)-(e), соединенный линкером со вторым полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену, представляющую собой: (a) лизиновый остаток в одном или нескольких положениях 36, 72, 77, 126 и 175; (b) цистеиновый остаток в одном или нескольких положениях 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179; (c) аргининовый остаток в одном или нескольких положениях 56, 59, 69, и 122; (d) глициновый остаток в положении 171; и комбинации (a)-(e).

Настоящее изобретение также представляет химически модифицированные формы полипептидов настоящего изобретения. Химически модифицированные формы данных полипептидов включают полимер, присоединенный к N-концу, и/или сайту присоединения природного или не природного полимера. Настоящее изобретение также представляет фармацевтические композиции и способы лечения метабо-

лического расстройства, выбранного из диабета, ожирения, дислипидемии, гипертензии, гепатостеатоза, такого как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), сердечно-сосудистого заболевания, такого как атеросклероз, и старения, включающие введение фармацевтических композиций настоящего изобретения пациенту-человеку, который в этом нуждается.

Частные варианты настоящего изобретения станут очевидными из последующего более детального описания некоторых вариантов и пунктов формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет собой рисунок, изображающий молекулу FGF21 с двумя полимерами (например, молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ)), присоединенными к данной последовательности;

фиг. 2 включает четыре SDS-PAGE (додецилсульфат натрия-полиакриламидный) геля, показывающих степень ПЭГилирования девяти FGF21 мутантов с единственным созданным способами генной инженерии сайтом присоединения полимера, химически модифицированным ПЭГ, а именно, E37C, R77C и H125C (вверху слева), D38C, D46C и D79C (вверху справа), H87C, E91C, G113C (внизу слева) и G120C, R126C, N121C (внизу справа);

фиг. 3 - SDS-PAGE гель, показывающий степень ПЭГилирования трех FGF21 мутантов, имеющих единственный созданный способами генной инженерии сайт присоединения полимера, химически модифицированный молекулой 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты, а именно, K69C, R175C и Y179C;

фиг. 4 - два графика, представляющих результаты ELK-люциферазной пробы, проведенной на FGF21 мутантных полипептидах с единственными созданными способами генной инженерии сайтами присоединения полимера, химически модифицированными путем присоединения молекулы 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты, а именно, E37C, R77C, E91C, FGF21 дикого типа и ПЭГилированного по N-концу FGF21 (верхний график) и G113C, N121C, D46C, FGF21 дикого типа и ПЭГилированного по N-концу FGF21 (нижний график);

фиг. 5 - два графика, представляющих результаты ELK-люциферазной пробы, проведенной на FGF21 мутантных полипептидах с единственными созданными способами генной инженерии сайтами присоединения полимера, химически модифицированными путем присоединения молекулы 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты, а именно, H125C, G120C, R126C, FGF21 дикого типа и ПЭГилированного по N-концу FGF21 (верхний график) и D79C, D38C, FGF21 дикого типа и ПЭГилированного по N-концу FGF21 (нижний график);

фиг. 6 - два графика, представляющих результаты ELK-люциферазной пробы, проведенной на полипептидах FGF21 дикого типа и FGF21 мутантных полипептидах с единственным созданным способами генной инженерии сайтом присоединения полимера, химически модифицированным путем присоединения молекулы 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты, а именно, K69C, D79C, FGF21 дикого типа и ПЭГилированного по N-концу FGF21 (верхний график), и R175C, Y179C, FGF21 дикого типа и ПЭГилированного по N-концу FGF21 (нижний график);

фиг. 7 представляет собой рисунок, изображающий "связанную молекулу" изобретения;

фиг. 8 - график, изображающий процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей во времени (от 0 времени) после единичной инъекции наполнителя (физиологического раствора с фосфатным буфером), FGF21 дикого типа или N-терминально ПЭГилированного FGF21 дикого типа;

фиг. 9 - график, изображающий процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (физиологического раствора с фосфатным буфером), или FGF21 дикого типа, который был N-терминально ПЭГилирован молекулами 20, 30 или 40 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты;

фиг. 10 включает два графика, изображающих процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей на протяжении девятисуточного периода от 0 времени после единичной инъекции физиологического раствора с фосфатным буфером или N-терминально ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих мутации R77C или R126K, которые были дополнительно ПЭГилированы по этим введенным сайтам присоединения полимера молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты, и слияние, включающее Fc молекулу и G170E FGF21 мутантный полипептид (верхний график); или N-терминально ПЭГилированный FGF21 мутантный полипептид, включающий мутации R77C, дополнительно ПЭГилированные по этому введенному сайту присоединения полимера молекулой 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты, и P171G (нижний график);

фиг. 11 представляет собой график, изображающий процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (10 mM фосфата калия, 5% сорбита, pH 8) или FGF21 мутантных полипептидов, которые были дважды ПЭГилированы молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E91C/H125C, E91C/R175C, E37C/G120C, E37C/H125C, и E37C/R175C; было исследовано также слияние, включающее Fc молекулу и P171G FGF21 мутантный полипептид;

фиг. 12 - график, изображающий процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (10 mM фосфата калия, 5% сорбита, pH 8) или FGF21 мутантных полипептидов, которые были дважды ПЭГилированы молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида

малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E91C/H121C, G120C/H125C, или E37C/R77C; исследовано также слияние, включающее Fc молекулу и G170E FGF21 мутантный полипептид;

фиг. 13 - график, изображающий процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (10 mM фосфата калия, 5% сорбита, pH 8) или FGF21 мутантными полипептидами, которые были дважды ПЭГилированы молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E37C/R77C, E91C/R175C, E37C/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R77C/P171G и E37C/R125C/P171G;

фиг. 14 - график, изображающий процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей от 0 времени после введения единичной инъекции наполнителя (10 mM фосфата калия, 5% сорбита, pH 8), FGF21 мутантных полипептидов, которые были дважды ПЭГилированы молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E37C/R77C/P171G и E91C/R125C/P171G, или "связанными молекулами", включающими два идентичных FGF21 мутантных полипептида, имеющих одинаковые введенные мутации, а именно, R77C/P171G (2 ×) и R78C/P172G (2×), которые были соединены через молекулы 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты;

фиг. 15 - график, изображающий процентное изменение уровней глюкозы в крови у мышей в зависимости от дозы от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 8,5), или FGF21 мутантного полипептида, который был дважды ПЭГилирован молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты, а именно, E37C/R77C/P171G, и применялись при дозах 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 или 1 мг/кг;

фиг. 16 - график, изображающий изменение веса тела у мышей от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (10 mM фосфата калия, 5% сорбита, pH 8) или FGF21 мутантных полипептидов, которые были дважды ПЭГилированы молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E37C/R77C, E91C/R175C, E37/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R77C/P171G и E37C/R125C/P171G;

фиг. 17 - график, изображающий изменение веса тела у мышей от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (10 mM фосфата калия, 5% сорбита, pH 8), FGF21 мутантных полипептидов, которые были дважды ПЭГилированы молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E37C/R77C/P171G и E91C/R125C/P171G, или "связанными молекулами", включающими два FGF21 мутантных полипептида, имеющих одинаковые введенные мутации, а именно, R37C/P171G (2×) и R77C/P171G (2×), которые были соединены через молекулу 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты;

фиг. 18 - график, изображающий изменение веса тела у мышей в зависимости от дозы от 0 времени после единичной инъекции наполнителя (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 8,5), или FGF21 мутантного полипептида, который был дважды ПЭГилирован молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E37C/R77C/P171G, и применялся при пяти разных дозах;

фиг. 19A-19F - серию из шести графиков, изображающих изменение веса тела у мышей на протяжении восьминедельных исследований почечных вакуолей при дозировке раз в неделю наполнителя (квадраты), 5 мг/кг (треугольники) и 25 мг/кг (не заштрихованные кружочки) ПЭГилированных FGF21 молекул. Мыши, которым вводили дозы дважды- цистеин ПЭГилированных FGF21 молекул, обнаруживали непрерывную потерю веса, тогда как мыши, которым вводили "связанные молекулы", выявляли, главным образом, временную потерю веса;

фиг. 20 включает две гистограммы, изображающие результаты восьминедельного исследования почечных вакуолей у мышей, которым вводили инъекции наполнителя или FGF21 мутантного полипептида, который был дважды ПЭГилирован молекулами 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты по введенным сайтам присоединения полимера, а именно, E37C/R77C/P171G; E37/H125C/P171G; E91C/H125C/P171G; E37C/P171G; R77C/P171G; и R77C/ P171G; испытывали две разные дозы.

Подробное описание изобретения

Человеческий FGF21 протеин с улучшенными свойствами, такими как увеличенный период полураспада, может быть получен с использованием способов, раскрытых в данной заявке, и стандартных способов молекулярной биологии. Известно, что путем связывания одного или нескольких водорастворимых полимеров, таких как молекулы ПЭГ, с протеином период полураспада данного протеина может быть расширен. Так, в различных вариантах период полураспада природного FGF21 может быть расширен путем введения аминокислотных замен в данный протеин с образованием точек, в которых полимер может быть присоединен к данному FGF21 протеину. На такие модифицированные протеины здесь ссылаются как на FGF21 мутанты, и они составляют варианты настоящего изобретения. Полимеры могут быть также введены в N-конец FGF21 молекулы в сочетании с введением сайта присоединения неприродного полимера.

Использованные здесь способы рекомбинантных нуклеиновых кислот, включая примеры, в целом,

отвечают тем, что представлены в работах Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) или *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994), на которые в данной заявке сделаны ссылки.

1. Общие определения.

Как здесь используется, термин "а" означает один или несколько, если специально не оговорено иное.

Термин "изолированная молекула нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты данного изобретения, которая (1) была отделена от по меньшей мере приблизительно 50% протеинов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми она находится в природе, когда полная нуклеиновая кислота выделяется из клеток-источников, (2) не связана со всем полинуклеотидом или его частью, с которым "изолированная молекула нуклеиновой кислоты" связана в природе, (3) связана действующим образом с полинуклеотидом, с которым она не связана в природе, или (4) не встречается в природе как часть большей полинуклеотидной последовательности. Лучше, когда изолированная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения в значительной мере свободна от молекул любых других загрязняющих нуклеиновых кислот или других загрязнителей, которые находятся в ее природной окружающей среде, которые могут помешать ее использованию в производстве полипептидов или в ее терапевтическом, диагностическом, профилактическом или исследовательском применении.

Термин "изолированный полипептид" касается полипептида настоящего изобретения, который (1) отделен от по меньшей мере приблизительно 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он находится в природе, когда выделяется из клетки-источника, (2) не связан (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) со всем полипептидом или его частью, с которым "изолированный полипептид" связан в природе, (3) связан действующим образом (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или (4) не встречается в природе. Лучше, когда изолированный полипептид настоящего изобретения в значительной мере свободен от любых других загрязняющих полипептидов или других загрязнителей, которые находятся в его природной окружающей среде, которые могут помешать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому или исследовательскому применению.

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

Термин "экспрессирующий вектор" касается вектора, который подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит нуклеиновокислотные последовательности, направляющие и/или контролируемые экспрессию внедренных гетерологических нуклеиновокислотных последовательностей. Экспрессия включает, однако, не ограничиваясь этим, процессы, такие как транскрипция, трансляция и РНК сплайсинг, если присутствуют интроны.

Термин "клетка-хозяин" используется в отношении клетки, которая трансформирована или способна трансформироваться нуклеиновокислотной последовательностью и затем экспрессировать выбранный ген, представляющий интерес. Данный термин включает потомство родительской клетки, независимо от того, является ли данное потомство идентичным по морфологии или генетической конструкции с оригинальным родителем, при условии присутствия данного выбранного гена.

Термин "природный", при использовании в связи с биологическими материалами, такими как молекулы нуклеиновой кислоты, полипептиды, клетки-хозяева и такое подобное, относится к материалам, которые находятся в природе и не поддавались каким-либо манипуляциям, осуществляемым человеком. Подобно этому термин "неприродный", используемый здесь, относится к материалу, который отсутствует в природе или был структурно модифицирован или синтезирован человеком. При использовании в связи с нуклеотидами термин "природный" касается оснований - аденин (А), цитозин (С), гуанин (G), тимин (Т), и урацил (U). При использовании в связи с аминокислотами термин "природный" касается 20 аминокислот - аланин (А), цистеин (С), аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E), фенилаланин (F), глицин (G), гистидин (H), изолейцин (I), лизин (K), лейцин (L), метионин (M), аспарагин (N), пролин (P), глутамин (Q), аргинин (R), серин (S), треонин (T), валин (V), триптофан (W), и тирозин (Y).

Термин "FGF21 полипептид" касается любого природного полипептида дикого типа, экспрессированного в людях. Для целей этой заявки термин "FGF21 полипептид" может использоваться взаимозаменяемо и относиться к FGF21 полипептиду полной длины, который состоит из 209 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 2) и который кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1; и зрелой форме данного полипептида, которая состоит из 181 аминокислотного остатка (SEQ ID NO: 4), которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3, и в которой 28 аминокислотных остатков в аминотерминальном конце FGF21 полипептида полной длины (т.е. которые составляют сигнальный пептид) были удалены. FGF21 полипептид может быть экспрессирован с или без N-концевого метионинового остатка; как здесь отмечалось, N-концевой метиониновый остаток может быть добавлен путем конструирования или как функция бактериальной системы экспрессии.

Термин "биологически активный" применительно к FGF21 полипептиду, включая описанные здесь FGF21 мутантные полипептиды, касается природной активности FGF21 полипептида дикого типа, такой как способность снижать глюкозу в крови, инсулин, триглицерид или холестерин; снижать вес тела; и

улучшать толерантность к глюкозе, расход энергии или чувствительность к инсулину. Что касается FGF21 мутантного полипептида, данный термин не зависит от типа или числа модификаций, введенных в FGF21 мутантный полипептид. Например, некоторые FGF21 мутантные полипептиды обладают несколько сниженным уровнем FGF21 активности по отношению к полипептиду FGF21 дикого типа, но, тем не менее, рассматриваются как биологически активные FGF21 мутантные полипептиды. Различия в активности конкретного мутантного полипептида FGF21 могут наблюдаться между *in vivo* и *in vitro* пробами; любые такие различия связаны с конкретными использованными пробами. Такое наблюдение, однако, не влияет на значение термина "биологически активный" и FGF21 мутантные полипептиды, которые выявляют природную активность полипептида FGF21 дикого типа, такую как способность снижать глюкозу в крови, инсулин, триглицерид или холестерин; снижать вес тела; и улучшать толерантность к глюкозе, расход энергии или чувствительность к инсулину, в любой *in vivo* или *in vitro* пробе являются "биологически активными".

Термины "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" используются взаимозаменяемо и касаются количества FGF21 мутантного полипептида, используемого для поддержания наблюдаемого уровня одной или нескольких биологических активностей полипептида FGF21 дикого типа, такой как способность снижать глюкозу в крови, инсулин, триглицерид или уровень холестерина; снижать вес тела; или улучшать толерантность к глюкозе, расход энергии или чувствительность к инсулину.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "физиологически приемлемый носитель", использующийся здесь, касается одного или нескольких материалов композиции, пригодных для реализации или усиления доставки FGF21 мутантного полипептида. Примеры таких материалов можно найти в работе Remington, *supra*, на которую в данной заявке сделана ссылка.

Термин "связанная молекула" касается конструктора, включающего две или несколько FGF21 молекул, связанных молекулой линкера. "Связанная молекула" включает по меньшей мере два FGF21 полипептида, по меньшей мере один из которых является FGF21 мутантным полипептидом, описанным здесь, но может включать три, четыре или больше FGF21 или FGF21 мутантных полипептидов, соединенных с помощью линкеров. Таким образом, термин "связанная молекула" не ограничивается молекулой, включающей комбинации только одного или двух FGF21 или FGF21 мутантных полипептидов.

Термин "сайт присоединения полимера" касается области главной аминокислотной последовательности полипептида (например, FGF21 полипептида), которая химически адаптируема к ковалентной ассоциации с полимером (например, молекулой ПЭГ всех молекулярных весов, полимерной маннозой, гликанами и т.д.). Сайт присоединения полимера может означать отдельную аминокислоту (например, цистеин, лизин, аргинин или приемлемую неприродную аминокислоту), или данный термин может относиться к двум или большему количеству аминокислот, которые находятся по соседству одна с другой или в последовательности или в пространстве.

Термин "химически модифицированный", используемый в отношении FGF21 дикого типа или FGF21 мутантного полипептида, описанного здесь, касается FGF21 полипептида, который был модифицирован из своего природного состояния путем ковалентного присоединения одной или нескольких гетерологических молекул. Примеры гетерологических молекул включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), монометокси-полиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу, поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, пропиленгликолевые гомополимеры, полипропилен оксид/этилен оксид сополимеры, полиоксиэтилированные полиолы, гидроксилэтил крахмал (ГЭК), и поливиниловый спирт. Примеры химически модифицированных FGF21 полипептидов включают ПЭГилированные FGF21 полипептиды дикого типа и FGF21 мутантные полипептиды.

2. FGF21 мутантные полипептиды.

В различных аспектах настоящее изобретение раскрывает ряд способов для сайт-направленного ПЭГилирования FGF21 и FGF21 мутантных полипептидов, которое может усилить фармакокинетические свойства FGF21 молекулы при минимизации влияния на *in vitro* активность. Усиленный фармакокинетический профиль этих ПЭГилированных FGF21 молекул оказывает воздействие на *in vivo* эффективность данной молекулы путем увеличения экспозиции по отношению к данному терапевтическому агенту. Кроме того, описанные здесь стратегии совместимы с созданием множественных сайтов ПЭГилирования, которые могут дополнительно усилить фармакокинетические свойства данной молекулы и снизить их вакуолеформирующий потенциал. Для реализации этого были применены две главные стратегии, описанные здесь.

В одном аспекте настоящее изобретение касается FGF21 последовательностей, в которые были введены одна или несколько модификаций. Таким образом, термины "FGF21 мутантный полипептид" и "FGF21 мутант" которые могут использоваться взаимозаменяемо, относятся к FGF21 полипептиду, в котором аминокислотная последовательность FGF21 дикого типа (например, SEQ ID номера 2 или 4) была модифицирована. Такие модификации включают, однако, не ограничиваясь этим, одну или несколько аминокислотных замен, включая замены неприродными аминокислотными аналогами, инсерции и процессинг. Так, FGF21 полипептидные мутанты включают, однако, не ограничиваясь этим, сайт-направленные FGF21 мутанты, такие как вводящие сайт присоединения неприродного полимера, или

которые влияют на степень сопротивления протеолизу, как здесь описано. Для идентификации специфических аминокислотных замен FGF21 мутантов настоящего изобретения нумерация усеченных или мутированных остатков отвечает нумерации зрелого 181-остаточного FGF21 полипептида (т.е. N-конец данной последовательности начинается FLIPD, и эти остатки обозначены как остатки 1, 2, 3, 4 и 5, соответственно). N-концевой метиониновый остаток может присутствовать, но в этом нет потребности; этот N-концевой метиониновый остаток не включен в схему нумерации данного протеина.

Как указывалось, FGF21 мутанты, включая усеченные формы FGF21, включающие одну или несколько замен или инсерций, которые содержат неприродные аминокислоты, составляют вариант данного изобретения. Такие инсерции или замены могут влиять на различные свойства, включая их действие как сайтов для присоединения полимера. В таких случаях неприродные аминокислоты могут быть введены в FGF21 последовательность в дополнение к описанным здесь различным мутациям. Соответственно, FGF21 мутант может включать одну или несколько мутаций, описанных здесь, и может дополнительно включать одну или несколько неприродных аминокислот. Неполный список примеров неприродных аминокислот, которые могут быть внедрены в FGF21 последовательность или могут замещать остаток дикого типа в FGF21 последовательности, включают β -аминокислоты, гомоаминокислоты, циклические аминокислоты и аминокислоты с дериватизированными боковыми цепями. Примеры включают (в L-форме или D-форме; сокращения как в скобках \times): пара-ацетилфенилаланин, пара-азидофенилаланин, пара-бромфенилаланин, пара-йодофенилаланин и пара-этинилфенилаланин (Cit), гомоцитруллин (hCit), N α -метилцитруллин (NMeCit), N α -метилгомоцитруллин (N α -MeHoCit), орнитин (Orn), N α -метилорнитин (N α -MeOrn или NMeOrn), саркозин (Sar), гомолизин (hLys или hK), гомоаргинин (hArg или hR), гомоглутамин (hG), N α -метиларгинин (NMeR), N α -метиллейцин (N α -MeL или NMeL), N-метилгомолизин (NMeHoK), N α -метилглутамин (NMeQ), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), октагидроиндол-2-карбоновая кислота (Oic), 3-(1-нафтил)аланин (1-Nal), 3-(2-нафтил)аланин (2-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (Tic), 2-инданилглицин (Igl), пара-йодофенилаланин (pI-Phe), пара-аминофенилаланин (4AmP или 4-Amino-Phe), 4-гуанидино фенилаланин (Guf), глициллизин (сокращенно "K(N ϵ -glycyl)" или "K(glycyl)" или "K(gly)"), нитрофенилаланин (нитроф), аминофенилаланин (аминоф или Amino-Phe), бензилфенилаланин (бензилфе), γ -карбоксиглутаминовая кислота (γ -карбоксиглу), гидроксипролин (гидроксипро), γ -карбоксилфенилаланин (Cpa), α -аминоадипиновая кислота (Aad), N α -метилвалин (NMeVal), N- α -метиллейцин (NMeLeu), N α -метилнорлейцин (NMeNle), циклопентилглицин (Cpg), циклогексилглицин (Chg), ацетиларгинин (ацетиларг), α , β -диаминопропионовая кислота (Dpr), α , γ -диаминомасляная кислота (Dab), диаминопропионовая кислота (Dap), циклогексилаланин (Cha), 4-метилфенилаланин (MePhe), β , β -дифенилаланин (BiPhA), аминомасляная кислота (Abu), 4-фенилфенилаланин (или бифенилаланин; 4Bir), α -аминоизомасляная кислота (Aib), бета-аланин, бета-аминопропионовая кислота, пиперидиновая кислота, аминокaproновая кислота, аминокептапановая кислота, аминокимелиновая кислота, десмозин, диаминопимелиновая кислота, N-этилглицин, N-этиласпаргин, гидроксизин, алло-гидроксизин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-метилвалин, 4-гидроксипролин (Hyp), γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксизин, ω -метиларгинин, 4-амино-O-фталевая кислота (4APA), и другие подобные аминокислоты, и дериватизированные формы всех конкретно перечисленных соединений.

В других вариантах настоящего изобретения FGF21 мутантный полипептид включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 85% идентична аминокислотной последовательности FGF21 дикого типа (например, SEQ ID NOs: 2 или 4), но где специфические остатки, вводящие сайты присоединения неприродного полимера в FGF21 мутантном полипептиде, не были дополнительно модифицированы. Другими словами, за исключением остатков в FGF21 мутантной последовательности, которые были модифицированы для введения сайта присоединения неприродного полимера, или мутации для повышения резистентности к протеолизу, около 15% всех других аминокислотных остатков в FGF21 мутантной последовательности могут быть модифицированы. Например, в FGF21 мутантном полипептиде G170C, до 15% всех аминокислотных остатков, отличных от глицинового остатка в положении 170, могут быть модифицированы. В еще других вариантах, FGF21 полипептидный мутант включает аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на приблизительно 90% или приблизительно 95, 96, 97, 98, или 99% идентична аминокислотной последовательности FGF21 дикого типа (например, SEQ ID NO: 2, 4, 6 или 8), но где специфические остатки, которые были модифицированы для введения сайта присоединения неприродного полимера или усиления резистентности к протеолизу, дополнительно не модифицировались. Такие FGF21 мутантные полипептиды обладают по меньшей мере одной активностью полипептида FGF21 дикого типа.

FGF21 мутантные полипептиды могут быть генерированы путем введения аминокислотных замен, консервативных или неконсервативных по своей природе, и с использованием природных или неприродных аминокислот, в особых положениях FGF21 полипептида. Такие замены могут быть сделаны в дополнение к заменам, сконструированным (или наблюдаемым) для придания желательного свойства

FGF21 полипептиду. В качестве примера FGF21 мутантный полипептид может включать замену, сконструированную для получения желательного свойства, такого как введение сайта присоединения неприродного полимера или усиления резистентности к протеолизу, и может дополнительно включать одну или несколько консервативных или неконсервативных замен, которые могут, но это не обязательно, поддерживать биологическую активность полипептида FGF21 дикого типа.

FGF21 мутации могут быть консервативными или неконсервативными. "Консервативная аминокислотная замена" может включать замену остатка природной аминокислоты (т.е. остатка, который находится в данном положении полипептидной последовательности FGF21 дикого типа) с неприродным остатком (т.е. остатком, который не находится в данном положении полипептидной последовательности FGF21 дикого типа), таким образом, что это оказывает малое влияние или вообще не оказывает влияния на полярность или заряд аминокислотного остатка в этом положении. Консервативные аминокислотные замены также охватывают остатки неприродных аминокислот, которые обычно вводятся путем химического пептидного синтеза, а не синтезом в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обратные или инвертированные формы аминокислотных составляющих.

Природные остатки могут быть разделены на классы, основываясь на общих свойствах боковых цепей:

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

Консервативные замены могут включать обмен члена одного из этих классов на другой член из того же класса. Неконсервативные замены могут включать обмен члена одного из этих классов на член из другого класса.

Желательные аминокислотные замены (консервативные или неконсервативные) могут быть определены специалистами в данной области в то время, когда они необходимы. Иллюстративный (но не ограничивающий) список аминокислотных замен представлен в табл. 1.

Таблица 1. Аминокислотные замены

Оригинальный остаток	Иллюстративные замены
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

2.A. FGF21 мутантные полипептиды, включающие протеолизрезистентную мутацию.

Было установлено, что зрелая форма FGF21 (т.е. форма с 181 остатком) претерпевает *in vivo* деградацию, что, как было определено, обусловлено протеолитическим воздействием. Было найдено, что *in vivo* деградация зрелого FGF21 приводит к более короткому периоду эффективного полураспада, что может отрицательным образом влиять на терапевтический потенциал данной молекулы. Соответственно, было проведено направленное исследование для идентификации FGF21 мутантов, которые проявляют резистентность к протеолизу. В результате этого исследования сайты в зрелом FGF21 полипептиде, которые, как было найдено, особенно склонны к протеолизу, включают пептидную связь между аминокислотными остатками в положениях 4-5, 20-21, 151-152 и 171-172.

Неограничивающий перечень иллюстративных замен, которые устраняют протеолитический эффект, наблюдавшийся в зрелом FGF21, и не оказывают значительного воздействия на биологическую активность данного протеина, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, представлен в табл. 2. табл. 2 носит лишь иллюстративный характер, и в настоящем изобретении могут быть иденти-

фицированы и применены другие протеолиз-резистентные замены. Эти протеолиз-резистентные замены могут быть сделаны в дополнение к заменам, которые вводят один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров, генерируя тем самым FGF21 мутантный полипептид, проявляющий необходимые свойства, которые вносятся каждым типом мутации.

Таблица 2. Репрезентативные замены, которые обеспечивают резистентность к протеолизу

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

Предпочтительно, но необязательно, когда FGF21 мутантные полипептиды, включающие протеолиз-резистентную мутацию, имеют биологическую активность, существенно такую же, или более высокую, чем активность FGF21 дикого типа. Поэтому другой вариант настоящего изобретения направлен на FGF21 мутантные полипептиды, которые включают один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров и резистентны к протеолизу, и все еще сохраняют биологическую активность, которая отвечает биологической активности или больше, чем таковая у FGF21 дикого типа. Хотя это менее желательно в некоторых случаях, FGF21 мутанты, которые включают один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров и резистентны к протеолизу, но проявляют несколько сниженную биологическую активность, составляют еще один вариант настоящего изобретения. В некоторых случаях может быть желательным сохранять некоторую степень протеолиза, и как следствие, FGF21 мутанты, включающие один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров, и которые резистентны к протеолизу, но все же позволяют осуществлять некоторую степень протеолиза, также составляют еще один вариант настоящего изобретения.

Как и все FGF21 мутантные полипептиды настоящего изобретения, протеолиз-резистентные FGF21 мутантные полипептиды, включающие один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров, могут быть получены как здесь описано. Обычные специалисты в данной области, например знакомые со стандартными способами молекулярной биологии, могут применить эти знания, совместно с настоящей заявкой, для получения и использования протеолиз-резистентных FGF21 мутантов, включающих один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров настоящего изобретения. Стандартные способы могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). См., например, работу Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, на которую в данной заявке сделана ссылка. Ферментативные реакции и способы очистки могут быть реализованы в соответствии со спецификациями производителя, как обычно делается в данной области, или как описано в данной заявке. Если не сделаны специальные оговорки, номенклатура, использованная в связи с лабораторными процедурами и способами аналитической химии, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, описанными здесь, хорошо известна и обычно применяется в данной области. Стандартные способы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтических препаратов и их составления, и доставки; и лечения пациентов.

Протеолиз-резистентные FGF21 мутанты, включающие один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров, которые резистентны к протеолизу, могут быть химически модифицированы с использованием способов, известных в данной области и описанных здесь. Химическое модифицирование (например, ПЭГилирование) протеолиз-резистентного FGF21 мутантного полипептида, включающего один или несколько сайтов присоединения неприродного полимера, может сгенерировать молекулы, которые проявляют как резистентность к протеолизу так и необходимые фармакокинетические и фармакодинамические свойства.

2.B. FGF21 мутантные полипептиды, включающие сайт присоединения неприродного полимера.

В различных аспектах настоящего изобретения раскрыты FGF21 мутантные полипептиды. В другом аспекте, FGF21 мутантные полипептиды настоящего изобретения включают FGF21 полипептиды, в которые введен сайт(ы) присоединения неприродного полимера (например, ПЭГилирование). В еще одном аспекте настоящего изобретения раскрыты усеченные формы FGF21 мутантных полипептидов, в которые введен сайт(ы) присоединения неприродного полимера (например, ПЭГ). FGF21 мутантные полипептиды, включающие сайт присоединения неприродного полимера и одну или несколько консервативных или неконсервативных замен, которые могут, но необязательно, поддерживать биологическую ак-

тивность FGF21 дикого типа, составляют еще один аспект данного изобретения. Различные FGF21 полипептидные мутанты настоящего изобретения могут быть приготовлены как описано здесь и как описано в работах, на которые в настоящей заявке сделаны ссылки.

В одном варианте FGF21 полипептидные мутанты настоящего изобретения модифицированы путем введения сайта присоединения неприродного полимера. Действительно, в одном аспекте это является целью FGF21 мутантов настоящего изобретения, а именно, введение одного или нескольких сайтов присоединения неприродных полимеров, такое что полимеры с расширенным периодом полураспада могут быть присоединены к FGF21 полипептидному мутанту в необходимых положениях. Выбранный полимер является, обычно, но не обязательно, водорастворимым, так что протеин, к которому он присоединен, не осаждается в водной среде, такой как физиологическая среда. В объем приемлемых полимеров включена смесь полимеров. Лучше, когда для терапевтического использования конечного препарата данный полимер является фармацевтически приемлемым, такой как ПЭГ приемлемого молекулярного веса. Полимеры, которые не являются водорастворимыми, такие как блоксополимеры ПЭГ и жирной кислоты, также могут быть конъюгированы с FGF21 полипептидными мутантами настоящего изобретения и составляют отдельный аспект данного изобретения.

Активность FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения может быть проанализирована разнообразными способами, например с использованием *in vitro* ELK-люциферазного анализа, как описано в примере 10.

Активность FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения может также быть оценена *in vivo* пробе, такой как на ob/ob мышах, как показано в примере 12. В общем, оценить *in vivo* активность одного или нескольких из этих полипептидов можно, введя интраперитонеально данный полипептид тестовому животному. Через некоторый желательный период времени или несколько таких периодов может быть взята проба крови, и могут быть измерены уровни глюкозы в крови.

Как и для всех FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения, эти полипептиды могут, при необходимости, включать аминоконцевой метиониновый остаток, который может быть введен путем направленной мутации или как результат бактериального экспрессионного процесса.

FGF21 мутантные полипептиды настоящего изобретения могут быть получены, как описано в примере 7. Обычные специалисты в данной области, например знакомые со стандартными способами молекулярной биологии, могут применить эти знания, совместно с настоящей заявкой, для получения и использования FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения. Стандартные способы могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). См., например, работы Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, на которую в данной заявке сделана ссылка. Ферментативные реакции и способы очистки могут быть реализованы в соответствии со спецификациями производителя, как обычно делается в данной области, или как описано в данной заявке. Если не сделаны специальные оговорки, номенклатура, использованная в связи с лабораторными процедурами и способами аналитической химии, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, описанными здесь, хорошо известна и обычно применяется в данной области. Стандартные способы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтических препаратов и их составления, и доставки; и лечения пациентов.

После получения FGF21 мутантного полипептида он может быть химически модифицирован путем присоединения полимера, как описано в примере 9 данной заявки.

3. Усеченные FGF21 мутантные полипептиды, включающие сайт присоединения неприродного полимера.

Один вариант настоящего изобретения направлен на усеченные формы мутантного FGF21 полипептида, включающего один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров. Такие усеченные мутантные полипептиды могут, но не обязательно, быть химически модифицированными.

Используемый здесь термин "усеченный FGF21 мутантный полипептид" касается FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида, в котором один или несколько аминокислотных остатков удалены из аминоконцевого терминального (или N-терминального) конца данного FGF21 полипептида, один или несколько аминокислотных остатков удалены из карбоксил-терминального (или C-терминального) конца данного FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 полипептида, или один или несколько аминокислотных остатков удалены из как N-терминального так и C-терминального концов FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 полипептида.

Активность N-терминально усеченного мутанта FGF21, C-терминально усеченного мутанта FGF21 и молекул мутанта FGF21, усеченного как по N- так и по C-терминальным концам данной молекулы, также как и химически модифицированных форм этих мутантов, может быть проанализирована разнообразными способами, например с использованием *in vitro* ELK-люциферазной пробы, описанного здесь в примере 10.

Активность усеченных мутантных FGF21 полипептидов и химически модифицированных усеченных мутантных FGF21 полипептидов настоящего изобретения может быть также оценена с помощью *in*

vivo пробы, такой как на ob/ob мышах, как показано в примере 12. В общем, оценить *in vivo* активность одного или нескольких из этих полипептидов можно, введя интраперитонеально данный полипептид тестовому животному. Через некоторый желательный период времени или несколько таких периодов может быть взята проба крови, и могут быть измерены уровни глюкозы в крови.

Как и для всех FGF21 мутантов настоящего изобретения, усеченные мутантные FGF21 и химически модифицированные усеченные мутантные FGF21 полипептиды могут, при необходимости, включать аминоконцевой метиониновый остаток, который может быть введен путем направленной мутации или как результат бактериального экспрессионного процесса.

Усеченные мутантные FGF21 полипептиды настоящего изобретения могут быть получены, как описано в примере 7. Обычные специалисты в данной области, например знакомые со стандартными способами молекулярной биологии, могут применить эти знания, совместно с настоящей заявкой, для получения и использования усеченных мутантных FGF21 полипептидов настоящего изобретения. Стандартные способы могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). См., например, работу Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, на которую в данной заявке сделана ссылка. Ферментативные реакции и способы очистки могут быть реализованы в соответствии со спецификациями производителя, как обычно делается в данной области, или как описано в данной заявке. Если не сделаны специальные оговорки, номенклатура, использованная в связи с лабораторными процедурами и способами аналитической химии, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, описанными здесь, хорошо известна и обычно применяется в данной области. Стандартные способы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтических препаратов и их составления и доставки; и лечения пациентов.

После получения усеченного мутантного FGF21 полипептида он может быть химически модифицирован путем присоединения полимера, как описано в примере 9 данной заявки.

4. Кэпированные и С-концевые FGF21 мутантные полипептиды.

В другом варианте настоящее изобретение направлено на мутантные FGF21 полипептиды, включающие один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров, которые были кэпированы путем добавления другого одного или нескольких остатков к С-концу данного полипептида, расширяя данную аминокислотную последовательность за пределы протеина дикого типа. В еще одном варианте настоящее изобретение направлено на FGF21 мутантные полипептиды, включающие один или несколько сайтов присоединения неприродных полимеров, которые дополнительно включают одну или несколько С-концевых мутаций. Такие кэпированные и С-терминально мутированные FGF21 мутантные полипептиды могут, но это необязательно, быть химически модифицированы.

Используемый здесь термин "кэпированный FGF21 мутантный полипептид" касается FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида, в котором один или несколько аминокислотных остатков были добавлены к С-концу FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида. Любая природная или неприродная аминокислота может быть использована для кэпирования FGF21 мутантного полипептида, включая один или несколько пролиновых остатков и один или несколько глициновых остатков. Хотя последовательность FGF21 дикого типа имеет длину лишь в 181 остаток, кэпированный FGF21 мутантный полипептид увеличивает длину данного полипептида на один остаток для каждого добавленного кэпирующего остатка; в соответствии со схемой нумерации настоящей заявки кэпирующие остатки нумеруются, начиная со 182. Так, один пролиновый кэпирующий остаток обозначается как P182. Возможны более длинные "шапочки" и они нумеруются соответственно (например, X182, Y183, Z184, где X, Y и Z отвечают любой природной или неприродной аминокислоте). Кэпирующие остатки могут быть добавлены к мутантному FGF21 полипептиду с использованием любого удобного способа, такого как химический, в котором ковалентное присоединение аминокислоты к С-концу данного полипептида осуществляется с помощью химической реакции. Как альтернатива, кодон, кодирующий кэпирующий остаток, может быть добавлен к кодирующей последовательности FGF21 мутантного полипептида с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Любой из описанных здесь мутантных FGF21 полипептидов может быть, при необходимости, кэпирован одним или несколькими остатками.

С-концевые мутации составляют еще один аспект настоящего изобретения. Используемый здесь термин "С-концевая мутация" касается одной или нескольких альтераций в области остатков 91-181 (или дальше, если данный полипептид кэпирован) мутантного FGF21 полипептида. С-концевая мутация, введенная в FGF21 мутантную полипептидную последовательность, будет служить дополнением к одной или нескольким мутациям, которые вводят сайт присоединения неприродного полимера. Хотя С-концевые мутации могут быть введены в любую точку в области 91-181 FGF21 мутантной полипептидной последовательности, иллюстративные положения для С-концевых мутаций включают положения 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180 и 181. С-концевые мутации могут быть введены с использованием стандартных способов молекулярной биологии, таких как описанные в данной заявке. Любой из описанных здесь мутантных FGF21 полипептидов может включать С-концевую мутацию.

Примеры положений и идентичностей для кэпированных и/или С-концевых мутаций приведены в

табл. 3.

Таблица 3. Примеры положений для кэппирования и/или С-концевых мутаций

E37C, R77C, P171G, P182
P171G, S181P, P182
P171G, S181P
P171G, S181T
P171G, S181G
P171G, S181A
P171G, S181L
P171G, A180P
P171G, A180G
P171G, A180S
P171G, Y179P
P171G, Y179G
P171G, Y179S
P171G, Y179A
P171G, L182
P171G, G182
P171G, P182
P171G, G182, G183
P171G, G182, G183, G184, G185, G186

Активность кэппированных и/или С-терминально мутированных FGF21 мутантных полипептидов, также как и химически модифицированных форм этих мутантов, может быть проанализирована разнообразными способами, например, с использованием *in vitro* ELK-люциферазной пробы, как описано в примере 10 данной заявки.

Активность кэппированных и/или С-терминально мутированных FGF21 мутантных полипептидов и химически модифицированных кэппированных и/или С-терминально мутированных FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения может быть также оценена *in vivo* пробе, такой как на ob/ob мышцах, как показано в примере 12. В общем, оценить *in vivo* активность одного или нескольких из этих полипептидов можно, введя интраперитонеально данный полипептид тестовому животному. Через некоторый желательный период времени или несколько таких периодов может быть взята проба крови, и могут быть измерены уровни глюкозы в крови.

Как и для всех FGF21 мутантов настоящего изобретения, кэппированные и/или С-терминально мутированные FGF21 мутантные полипептиды и химически модифицированные кэппированные и/или С-терминально мутированные FGF21 мутантные полипептиды могут, при необходимости, включать аминоконцевой метиониновый остаток, который может быть введен путем направленной мутации или как результат бактериального экспрессионного процесса.

Кэппированные и/или С-терминально мутированные FGF21 мутантные полипептиды настоящего изобретения могут быть получены, как описано в примере 7. Обычные специалисты в данной области, например, знакомые со стандартными способами молекулярной биологии, могут применить эти знания, совместно с настоящей заявкой, для получения и использования кэппированных и/или С-терминально мутированных FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения. Стандартные способы могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). См., например, работы Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, на которую в данной заявке сделана ссылка. Ферментативные реакции и способы очистки могут быть реализованы в соответствии со спецификациями производителя, как обычно делается в данной области, или как описано в данной заявке. Если не сделаны специальные оговорки, номенклатура, использованная в связи с лабораторными процедурами и способами аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанными здесь, хорошо известна и обычно применяется в данной области. Стандартные способы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтических препаратов и их составления, и доставки; и лечения пациентов.

После получения кэппированного и/или С-терминально мутированного FGF21 мутантного полипептида он может быть химически модифицирован путем присоединения полимера, как это описано в данной заявке в примере 9.

5. FGF21 мутантные полипептиды, содержащие неприродные цистеиновые остатки.

В еще одном аспекте настоящего изобретения могут быть получены FGF21 мутантные полипептиды, в которых оба цистеиновых остатка в полипептидной последовательности FGF21 дикого типа заменены остатками, которые не образуют дисульфидных связей и не служат сайтами присоединения полимера, такими как аланин или серии. Затем могут быть сделаны замены в FGF21 мутантной полипептидной последовательности, которые вводят сайты присоединения неприродных полимеров, в форме тиолсодержащих остатков (например, цистеиновых остатков или неприродных аминокислот, имеющих тиоловые группы) или свободных аминогрупп (например, лизиновых или аргининовых остатков, или неприродных аминогрупп, имеющих свободные аминогруппы). Полимеры, в которых для присоединения ис-

пользуются тиоловые группы или свободные аминогруппы, такие как ПЭГ, затем могут быть нацелены на цистеиновый, лизиновый или аргининовый остатки, которые были введены в FGF21 мутантную полипептидную последовательность в известных положениях. Эта стратегия может облегчить более эффективное и контролируемое размещение полимера.

В одном подходе два природных цистеиновых остатка в полипептиде FGF21 дикого типа, которые расположены в положениях 75 и 93, могут быть замещены остатками, не содержащими тиол. Затем цистеиновый остаток может быть введен в известное местоположение. FGF21 мутантный полипептид может также включать другие мутации, которые могут вводить еще больше сайтов присоединения полимеров (например, цистеиновые остатки) или могут быть сконструированы для получения некоторого другого необходимого свойства. Примеры таких FGF21 мутантных полипептидов включают C75A/E91C/C93A/H125C/P171G и C75S/E91C/C93S/H125C/P171G. В этих примерах природные цистеины в положениях 75 и 93 были мутированы в аланиновый или сериновый остатки, сайты присоединения полимера были введены в положения 91 и 125 (в этом случае для тиол-реакционного полимера, такого как ПЭГ), и дополнительная мутация была сделана в положении 171, т.е. замена пролина 171 глициновым остатком.

Подобно всем FGF21 мутантным полипептидам, которые здесь раскрыты, активность FGF21 мутантных полипептидов, которые не содержат цистеинов, находящихся в полипептидной последовательности FGF21 дикого типа, но вместо этого включают сайт присоединения полимера и, при необходимости, одну или несколько дополнительных мутаций, также как химически модифицированные формы этих мутантов, может быть проанализирована разнообразными способами, например, с использованием *in vitro* ELK-люциферазной пробы, как описано в примере 10. *In vivo* активность этих полипептидов может быть оценена *in vivo* пробе, такой как на ob/ob мышах, как показано в примере 12 и описанной здесь.

Как и для всех FGF21 мутантов изобретения, активность FGF21 мутантных полипептидов, которые не содержат цистеинов, находящихся в полипептидной последовательности FGF21 дикого типа, но вместо этого включают сайт присоединения полимера и, при необходимости, одну или несколько дополнительных мутаций, также как химически модифицированные формы этих FGF21 мутантных полипептидов, может, при необходимости, включать аминоконцевой метиониновый остаток, который может быть введен путем направленной мутации или как результат бактериального экспрессионного процесса.

FGF21 мутантные полипептиды, которые не содержат цистеинов, находящихся в полипептидной последовательности FGF21 дикого типа, но вместо этого включают введенный сайт присоединения полимера и, при необходимости, одну или несколько дополнительных мутаций, могут быть получены как описано здесь, например, в примере 7. Обычные специалисты в данной области, например, знакомые со стандартными способами молекулярной биологии, могут применить эти знания, совместно с настоящей заявкой, для получения и использования этих FGF21 мутантных полипептидов. Стандартные способы могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). См., например, работу Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, на которую в данной заявке сделана ссылка. Ферментативные реакции и способы очистки могут быть реализованы в соответствии со спецификациями производителя, как обычно делается в данной области, или как описано в данной заявке. Если не сделаны специальные оговорки, номенклатура, использованная в связи с лабораторными процедурами и способами аналитической химии, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, описанными здесь, хорошо известна и обычно применяется в данной области. Стандартные способы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтических препаратов и их составления, и доставки; и лечения пациентов.

После получения FGF21 мутантных полипептидов, которые не содержат цистеинов, находящихся в полипептидной последовательности FGF21 дикого типа, но вместо этого включают введенный сайт присоединения полимера и, при необходимости, одну или несколько дополнительных мутаций, они могут быть химически модифицированы путем присоединения полимера, как описано в примере 9 данной заявки.

6. "Связанные молекулы".

В еще одном аспекте настоящего изобретения "связанная молекула" может быть получена, как здесь описано. "Связанная молекула" представляет собой молекулу, включающую два FGF21 полипептида, связанных линкерной молекулой. Путем соединения двух FGF21 полипептидов эффективный период полураспада и активность "связанной молекулы" могут быть расширены за рамки периода полураспада и активности отдельного FGF21 полипептида.

"Связанная молекула" настоящего изобретения включает линкер и два FGF21 полипептида, которые могут представлять собой два природных FGF21 полипептида, в которые мутации не вводились, два FGF21 мутантных полипептида, имеющих сайт присоединения линкера, введенный в FGF21 полипептиды, или комбинация одного природного FGF21 полипептида и одного FGF21 мутантного полипептида. Предусмотрены также "связанные молекулы", включающие по меньшей мере один FGF21 полипептид, имеющий сайт присоединения неприродного линкера и одну или несколько дополнительных мутаций, что составляет еще один аспект данного изобретения. Таким образом, такие "связанные молекулы" могут

включать мутацию, которая образует сайт для присоединения молекулы линкера, также как и еще одну мутацию для придания еще одного желательного свойства указанной "связанной молекуле".

Используемый здесь термин "сайт присоединения линкера" означает природную или неприродную аминокислоту, имеющую функциональную группу, с которой может быть ассоциирован линкер. В одном примере сайт присоединения линкера представляет собой остаток, содержащий тиоловую группу, которая может быть ассоциирована с молекулой ПЭГ.

6.A. FGF21 полипептиды в "связанной молекуле".

Когда "связанная молекула" включает два FGF21 мутантных полипептида, данные FGF21 мутантные полипептиды могут включать один или несколько мутантов, введенных в эту последовательность, но нет необходимости в том, чтобы эти мутации находились в том же самом аминокислотном положении в каждом из FGF21 мутантных полипептидов. Например, если "связанная молекула" включает два FGF21 мутантных полипептида, один FGF21 мутантный полипептид может содержать H125C мутацию, которая может образовывать точку присоединения для молекулы линкера. Напротив, другой FGF21 мутантный полипептид может содержать мутацию в положении, отличном от H125, что может служить точкой присоединения для линкера, связывающего вместе данные два FGF21 мутантных полипептида. Даже если используются один или два FGF21 мутантных полипептида, линкер может быть присоединен к N-терминальному концу FGF21 мутантного полипептида; необязательно, чтобы использовались введенные точки присоединения.

Когда "связанная молекула" включает один или два природных FGF21 полипептида, линкер может быть присоединен в точке FGF21 полипептида, которая отвечает химии присоединения. Например, природные дисульфидные связи могут быть восстановлены, и цистеиновые остатки могут служить точками присоединения для линкера, такого как ПЭГ. В другом варианте линкер может быть присоединен к FGF21 полипептиду в N-конце или на лизиновых боковых цепях.

Один или оба FGF21 мутантных полипептида "связанной молекулы" могут включать усеченный FGF21 мутантный полипептид. Как описано здесь, усеченный FGF21 мутантный полипептид может быть получен путем удаления любого количества остатков как на N-конце, C-конце, так и на обоих N- и C-концах.

"Связанные молекулы" могут также включать один или оба FGF21 полипептида, которые содержат мутацию в полипептидной последовательности, которая может и не быть предпочтительной как сайт присоединения линкера, но вместо этого может придавать некоторое другое желательное свойство данной "связанной молекуле". Таким образом, "связанные молекулы", включающие один или несколько FGF21 мутантных полипептидов с мутацией, придающей необходимое свойство "связанной молекуле", составляют еще один аспект настоящего изобретения.

Активность "связанных молекул" может быть проанализирована различными способами, например с использованием *in vitro* ELK-люциферазной пробы, как описано здесь в примере 10.

Активность "связанных молекул" настоящего изобретения может быть также оценена *in vivo* пробе, такой как на ob/ob мышах, как показано в примере 12. В общем, оценить *in vivo* активность одного или нескольких из этих полипептидов можно, введя интраперитонеально данный полипептид тестовому животному. Через некоторый желательный период времени или несколько таких периодов может быть взята проба крови, и могут быть измерены уровни глюкозы в крови.

Как и для всех FGF21 мутантов настоящего изобретения, FGF21 полипептиды, включающие "связанную молекулу", которые могут быть FGF21 мутантными полипептидами, FGF21 полипептидами дикого типа или комбинацией того и другого, могут, при необходимости, включать amino-концевой метионинный остаток, который может быть введен путем направленной мутации или как результат бактериального экспрессионного процесса.

Обычные специалисты в данной области, например знакомые со стандартными способами молекулярной биологии, могут применить эти знания, совместно с настоящей заявкой, для получения и использования "связанных молекул" настоящего изобретения. Стандартные способы могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, олигонуклеотидного синтеза, культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). См., например, работу Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, на которую в данной заявке сделана ссылка. Ферментативные реакции и способы очистки могут быть реализованы в соответствии со спецификациями производителя, как обычно делается в данной области, или как описано в данной заявке. Процессы для связывания линкеров с FGF21 полипептидами будут зависеть от природы данного линкера, но они известны специалистам в данной области. Примеры химии присоединения линкеров описаны в данной заявке. Руководство относительно получения "связанной молекулы" изобретения приведено в настоящей заявке, например, в примере 9.

Если не сделаны специальные оговорки, номенклатура, использованная в связи с лабораторными процедурами и способами аналитической химии, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, описанными здесь, хорошо известна и обычно применяется в данной области. Стандартные способы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтических препаратов и их составления, и доставки; и лечения пациентов.

6.B. Линкеры в "связанных молекулах".

Любой линкер может быть использован в "связанной молекуле" для связывания вместе двух FGF21 мутантных полипептидов. Молекулы линкера могут быть разветвленными или неразветвленными и могут быть присоединены к FGF21 мутантному полипептиду с использованием различных известных химических способов, таких как описанные здесь. Химическая структура линкера не является критической, поскольку он служит, главным образом, спейсером. Данный линкер может быть, независимо, таким же самым или отличным от любого другого линкера или линкеров, которые могут присутствовать в "связанной молекуле" (например, "связанная молекула", включающая три или более FGF21 мутантов полипептидов дикого типа). В одном варианте линкер может состоять из аминокислот, сцепленных между собой пептидными связями. Некоторые из этих аминокислот могут быть гликозилированными, как это хорошо известно специалистам в данной области. Например, полезной линкерной последовательностью, составляющей сайт сialiрирования, является $X_1X_2NX_4X_5G$ (SEQ ID NO: 5), где X_1 , X_2 , X_4 и X_5 представляют собой, независимо, любой аминокислотный остаток. В другом варианте молекула линкера может быть молекулой ПЭГ любого размера, такого как 20, 30 или 40 кДа.

В вариантах, в которых присутствует пептидиловый линкер (т.е. образованный из аминокислот, связанных пептидными связями), его длина составляет, преимущественно, от 1 до приблизительно 40 аминокислотных остатков, лучше от 1 до приблизительно 20 аминокислотных остатков и лучше всего от 1 до приблизительно 10 аминокислотных остатков. В одном варианте аминокислотные остатки в линкере выбираются из любой из двадцати канонических аминокислот. В другом варианте аминокислотные остатки в линкере выбираются из цистеина, глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина, и/или серина. В еще одном варианте пептидиловый линкер сформирован из большинства аминокислот, которые являются стерически неограниченными, таких как глицин, серин и аланин, сцепленные пептидной связью. Часто бывает необходимым, чтобы пептидиловый линкер, если он присутствует, выбирался бы таким образом, чтобы избежать быстрого протеолитического оборота при циркуляции *in vivo*. Так, предпочтительные пептидиловые линкеры включают полиглицины, в частности $(Gly)_4$ (SEQ ID NO: 6); $(Gly)_5$ (SEQ ID NO: 7); поли(Gly-Ala); и полиаланины. Другие предпочтительные пептидиловые линкеры включают GGGGS (SEQ ID NO: 8); GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9); GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10) и любые линкеры, использованные в представленных здесь примерах. Однако описанные здесь линкеры являются иллюстративными; линкеры, которые входят в объем данного изобретения, могут быть гораздо длиннее и могут включать другие остатки.

В вариантах "связанной молекулы", включающих пептидную линкерную составляющую, кислотные остатки, например глутаминовый или аспаратовый остатки, помещены в аминокислотную последовательность линкерной составляющей. Примеры включают следующие пептидные линкерные последовательности:

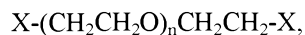
GGEGGG (SEQ ID NO: 11);
 GGEEEGGG (SEQ ID NO: 12);
 GEEEG (SEQ ID NO: 13);
 GEEE (SEQ ID NO: 14);
 GGDGGG (SEQ ID NO: 15);
 GGDDDG (SEQ ID NO: 16);
 GDDDG (SEQ ID NO: 17);
 GDDD (SEQ ID NO: 18);
 GGGGSDSDSGDGEDGGGG (SEQ ID NO: 19);
 WEWEW (SEQ ID NO: 20);
 FEFEF (SEQ ID NO: 21);
 EEEWW (SEQ ID NO: 22);
 EEEFF (SEQ ID NO: 23);
 WEEEW (SEQ ID NO: 24); или
 FEEEFF (SEQ ID NO: 25).

В других вариантах пептидный линкер образует сайт фосфорилирования, например, $X_1X_2YX_3X_4G$ (SEQ ID NO: 26), где X_1 , X_2 , X_3 и X_4 представляют собой, каждый независимо, любой аминокислотный остаток; $X_1X_2SX_3X_4G$ (SEQ ID NO: 27), где X_1 , X_2 , X_3 и X_4 представляют собой, каждый независимо, любой аминокислотный остаток; или $X_1X_2TX_3X_4G$ (SEQ ID NO: 28), где X_1 , X_2 , X_3 и X_4 представляют собой, каждый независимо, любой аминокислотный остаток.

В "связанной молекуле" могут также использоваться непептидные линкеры. Например, алкильные линкеры, такие как $-NH-(CH_2)_s-C(O)-$, где может использоваться $s = 2 - 20$. Эти алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены любой пространственно неограничивающей группой, такой как низший алкил (например, C_1-C_6), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH_2 , фенил и т.д.

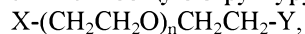
Любой подходящий линкер может быть применен в настоящем изобретении для формирования

"связанных молекул". В одном примере линкер, использованный для формирования "связанных молекул", описанных здесь, представляет гомобифункциональные бис-малеинимидные ПЭГ молекулы общей структуры



где X представляет собой группу имида малеиновой кислоты. В других вариантах X может представлять собой ортопиридил-дисульфид, йодоацетамид, винилсульфон или любую другую реакционную составляющую, которая, как известно в данной области, специфична для тиоловых групп. В еще одном варианте X может представлять собой аминоспецифическую реакционную составляющую, используемую для связывания двух мутантных полипептидов через N-конец или созданную способами генной инженерии лизильную группу. (См., например, Pasut and Veronese, 2006, "PEGylation of Proteins as Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates," Adv. Polym. Sci. 192:95-134).

В еще одном варианте линкер может иметь общую структуру:



где X и Y представляют собой различные реакционные составляющие, выбранные из вышеуказанных групп. Такой линкер обеспечит конъюгацию различных мутантных полипептидов с генерацией связанных гетеро-димеров или гетеро-олигомеров.

В еще одном варианте линкер может представлять собой ПЭГ молекулу, которая может иметь молекулярный вес от 1 до 100 кДа, предпочтительно от 10 до 50 кДа (например, 10, 20, 30 или 40 кДа) и еще более предпочтительно 20 кДа. Пептидные линкеры могут быть изменены с образованием производных тем же способом, что описан выше.

Другие примеры полезных линкеров включают аминоксипирролидон-ацетильные линкеры, как описано в международной публикации No. WO 2006/042151, на которую в данной заявке сделана полная ссылка.

При формировании "связанной молекулы" настоящего изобретения могут быть применены стандартные химические способы для связывания линкера с FGF21 молекулой дикого типа или мутантной молекулой. Конкретный способ связывания будет зависеть от сайта присоединения (например, аминокислотных боковых цепей) и природы данного линкера. Когда линкер является ПЭГ молекулой, присоединение может быть достигнуто путем применения стандартных химических способов и свободной сульфгидрильной или аминогруппы, такой как найденные на цистеиновых остатках (которые могут быть введены в FGF21 полипептидную последовательность с помощью мутации или могут быть природными) или на лизиновой группе (которая может быть введена в FGF21 полипептидную последовательность с помощью мутации или может быть природной), или N-концевой аминогруппе.

7. Химическая модификация FGF21 мутантов.

В одном из аспектов настоящего изобретения FGF21 мутантные полипептиды являются химически модифицированными. Термин "химически модифицированный" касается полипептида (например, FGF21 мутантный полипептид), который был модифицирован путем добавления полимера в один или несколько сайтов на этом полипептиде. Примеры химически модифицированных форм FGF21 мутантного полипептида включают ПЭГилированные и гликозилированные формы FGF21 мутантного полипептида.

Химически модифицированные FGF21 мутантные полипептиды настоящего изобретения могут содержать любой тип полимера, включая водорастворимые полимеры, такие как ПЭГ. Каждый из иллюстративных полимеров может быть полимером любого молекулярного веса и может быть разветвленным или неразветвленным. Каждый тип полимера имеет обычно средний молекулярный вес от приблизительно 2 кДа до приблизительно 100 кДа (термин "приблизительно" указывает, что в препаратах водорастворимого полимера некоторые молекулы имеют больший вес и некоторые меньший вес, чем указанный молекулярный вес). Средний молекулярный вес каждого полимера лежит, предпочтительно, в области приблизительно от 5 до 50 кДа, более предпочтительно приблизительно от 10 до 40 кДа и наиболее предпочтительно приблизительно от 10 до 20 кДа.

Подходящие водорастворимые полимеры или их смеси включают, однако не ограничиваясь этим, углеводы, полиэтиленгликоль (ПЭГ) (включая формы ПЭГ, которые были использованы для дериватизации протеинов, включая моно(C₁-C₁₀), алкокси-, или аоилоксиполиэтиленгликоль), монометокси-полиэтиленгликоль, декстран (такой как декстран низкого молекулярного веса, например около 6 кДа), целлюлозу, или другие полимеры на основе углеводов, поли(N-винилпирролидон) полиэтиленигликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропилен оксид/этилен оксида, полиоксипирролированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт. Также охвачены настоящим изобретением бифункциональные структурированные молекулы, которые могут использоваться для получения ковалентно присоединенных FGF21 полипептидных мутантных мультимеров. Также охвачены настоящим изобретением FGF21 мутанты, ковалентно присоединенные к полисиаловой кислоте.

В некоторых вариантах настоящего изобретения FGF21 мутантный полипептид ковалентно модифицирован и содержит один или несколько водорастворимых полимеров, включая, но не ограничиваясь этим, полиэтиленигликоль (ПЭГ), полиоксипирролированные полиолы, или полипропиленгликоль. См., например, патенты США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192; и 4179337. В некоторых вариантах настоящего изобретения FGF21 мутант содержит один или несколько полимеров, включая, но не ограничи-

ваясь этим, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу, другой полимер на основе углевода, поли(N-винилпирролидон)/полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропилен оксид/этилен оксида, полиоксипропилированные полиолы, например глицерин), поливиниловый спирт, или смеси таких полимеров.

В еще одних вариантах настоящего изобретения пептид или протеин могут быть конъюгированы с FGF21 сайт-направленным способом, через вышеупомянутые остатки, полученные способами генной инженерии, с целью придать подходящие свойства FGF21 (например, активность, устойчивость, селективность). Таким образом, настоящее изобретение охватывает FGF21 мутантные полипептиды, конъюгированные с гетеропротеином или гетеропептидом на введенном сайте присоединения полимера. Примеры подходящих протеинов включают ЧСА (человеческий сывороточный альбумин) и антитела, которые не связываются с FGF21.

7.A. ПЭГилированные FGF21 мутантные полипептиды.

В некоторых вариантах настоящего изобретения FGF21 мутантный полипептид ковалентно-модифицирован ПЭГ субъединицами. В некоторых вариантах один или несколько водорастворимых полимеров присоединены в одном или нескольких специфических положениях (например, в N-конце) FGF21 мутанта. В некоторых вариантах один или несколько водорастворимых полимеров присоединены к одной или нескольким боковым цепям FGF21 мутанта; эти боковые цепи могут быть природными или могут образовывать компонент сайта присоединения полимера, сформированного способами генной инженерии. В некоторых вариантах ПЭГ использован для улучшения терапевтической активности FGF21 мутантного полипептида. Некоторые такие способы обсуждены, например, в патенте США № 6133426, на который в настоящей заявке сделана ссылка.

В вариантах настоящего изобретения, где данный полимер является ПЭГ, ПЭГ группа может иметь любой удобный молекулярный вес и может быть линейной или разветвленной. Средний молекулярный вес данной ПЭГ группы варьируется, предпочтительно приблизительно от 2 до 100 кДа и более предпочтительно приблизительно от 5 до 50 кДа, например 10, 20, 30, 40 или 50 кДа. ПЭГ группы обычно присоединены к FGF21 мутанту посредством ацилирования или восстановительного алкилирования через реакционную группу на ПЭГ составляющей (например, альдегид, NHS, или имид малеиновой кислоты, винилсульфон, алкилгалогенид) к реакционной группе на FGF21 мутанте (например, amino или тиоловой группе).

Когда полимер(ы), присоединенные к FGF21 мутантному полипептиду, представляют собой ПЭГ, ПЭГилирование FGF21 мутантного полипептида настоящего изобретения может быть проведено с использованием любой из реакций ПЭГилирования, известных в данной области. Такие реакции описаны, например, в следующих работах:

Zalipsky, 1995, *Functionalized Poly(ethylene glycol) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates*, *Bioconjugate Chemistry* 6:150-165; Francis et al., 1992, *Focus on Growth Factors* 3: 4-10; Европейские патенты № 0154316 и 0401384; и патенте США № 4179337. Например, когда остаток-мишень является лизинным остатком (т.е. остатком с реакционной аминогруппой), ПЭГилирование может быть проведено посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с amino-реакционной молекулой полиэтиленгликоля (или аналогичным реакционным водорастворимым полимером), как описано здесь. Для реакций ацилирования выбранный полимер может иметь одну реакционную эфирную группу. Для восстановительного алкилирования выбранный полимер может иметь отдельную реакционную альдегидную группу. Реакционным альдегидом является, например, полиэтиленгликоль пропиональдегид, который устойчив в воде, или его моно C₁-C₁₀ алкокси или арилокси производные (см. патент США № 5252714). Различные реакционные ПЭГ полимеры, активированные различными amino-специфическими составляющими, также известны обычным специалистам в данной области и могут также быть применены как это диктуют обстоятельства.

В другом примере, когда остатком-мишенью является цистеиновый остаток (т.е. остаток с реакционной сульфгидрильной группой), ПЭГилирование может быть осуществлено посредством стандартной химии имида малеиновой кислоты. Для этой реакции выбранный полимер может содержать одну или несколько реакционных малеинимидных групп или другую тиол-реакционную составляющую, такую как винилсульфон, ортопиридил-дисульфид или йодоацетамид. См., например, работы Pasut & Veronese, 2006, "PEGylation of Proteins as Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates", *Adv. Polym. Sci.* 192:95-134; Zalipsky, 1995, "Functionalized Poly(ethylene glycol) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates," *Bioconjugate Chemistry* 6:150-165, и Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd Ed., Academic Press, 2008, на каждую из которых в данной заявке сделана ссылка.

В некоторых вариантах настоящего изобретения полезная стратегия для присоединения ПЭГ группы к FGF21 мутанту включает объединение посредством образования конъюгатной связи в растворе FGF21 мутанта и ПЭГ составляющей, каждый несет специальную функциональную группу, которая реакционна по отношению к другой. FGF21 мутант является "предварительно активированным" соответствующей функциональной группой на специфическом сайте. Предшественники поддаются очистке и полностью характеризуются перед реагированием с ПЭГ составляющей. Сшивание FGF21 мутанта и ПЭГ обычно имеет место в водной фазе и может легко контролироваться способом SDS-PAGE (см. выше) или

аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой. Подробный анализ может быть проведен способом пептидного картирования на основе жидкостной хроматографии-масс-спектрологии.

7.B. Полисахаридные FGF21 мутантные полипептиды.

Полисахаридные полимеры представляют собой другой тип водорастворимого полимера, который может быть использован для модификации протеина. Таким образом, FGF21 мутантные полипептиды настоящего изобретения могут быть присоединены к полисахаридному полимеру, и это составляет варианты данного изобретения. Так, созданный способами генной инженерии сайт присоединения неприродного полимера в FGF21 мутантном полипептиде может включать остаток, к которому присоединен полисахарид. Декстраны представляют собой полисахаридные полимеры, состоящие из отдельных субъединиц глюкозы, которые связаны, преимущественно, альфа 1-6 связями. Сам декстран имеет различные молекулярные веса в широкой области и легко доступен в виде вещества с молекулярным весом приблизительно от 1 до 70 кДа. Декстран является подходящим водорастворимым полимером для использования в качестве наполнителя как самого по себе или в комбинации с другим наполнителем (например, Fc). См., например, международную публикацию № WO 96/11953. Сообщается об использовании декстрана, конъюгированного с терапевтическими или диагностическими иммуноглобулинами. См., например, европейскую патентную публикацию № 0315456, на которую здесь сделана ссылка. Настоящее изобретение также охватывает использование декстрана с молекулярными весами в области от приблизительно 1 кДа до приблизительно 20 кДа.

7.C. Способы химического модифицирования FGF21 мутантного полипептида.

В общем, химическая модификация (например, ПЭГилирование или гликозилирование) может быть осуществлена при любом подходящем условии, которое используется при реакции протеина с активированной полимерной молекулой. Способы получения химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов обычно включают стадии: (а) реакции данного полипептида с активированной полимерной молекулой (такой как реакционный эфир, имид малеиновой кислоты или альдегидная производная данной полимерной молекулы) при условиях, при которых FGF21 мутантный полипептид становится присоединенным к одной или нескольким молекулам полимера, и (б) получения продуктов реакции. Оптимальные условия реакции будут определяться, исходя из известных параметров и необходимого результата. Например, чем больше отношение молекул полимера к протеину, тем больше процент присоединенных молекул полимера. В одном варианте настоящего изобретения химически модифицированные FGF21 мутантные полипептиды могут иметь единственную полимерную молекулу в amino-конце, тогда как в других вариантах FGF21 мутантный полипептид может иметь два или несколько полимеров, ассоциированных с главной последовательностью, например, один полимер в N-конце данного полипептида и второй в другом остатке полипептида. Как альтернатива, FGF21 мутант может иметь два или более полимера, ассоциированных в двух разных остатках в главной последовательности, но не в N-конце.

В общем, условия, которые могут быть смягчены или модулированы путем применения химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения, включают описанные здесь для природного FGF21 полипептида. Однако химически модифицированные FGF21 мутантные полипептиды, раскрытые здесь, могут иметь дополнительные активности, такие как увеличенный период полураспада, в сравнении с FGF21 дикого типа и FGF21 мутантами.

8. Терапевтические композиции FGF21 мутантов их использование.

Терапевтические композиции, включающие FGF21 мутантные полипептиды, подпадают под рамки настоящего изобретения и специально предусмотрены в свете идентификации "связанных молекул", FGF21 мутантных полипептидов и химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, которые проявляют улучшенные свойства. Такие терапевтические композиции из "связанных молекул", FGF21 мутантных полипептидов и химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов могут включать терапевтически эффективное количество "связанных молекул", FGF21 мутантных полипептидов или химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, которые могут быть химически модифицированы, в смеси с фармацевтически или физиологически приемлемым композиционным агентом, выбранным для соответствия со способом использования.

Приемлемые композиционные материалы являются, предпочтительно, нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях.

Данная фармацевтическая композиция может содержать композиционные материалы для модифицирования, поддержания или сохранения, например pH, осмотического давления, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или выделения, абсорбции или проникновения данной композиции. Подходящие композиционные материалы включают, но не ограничиваясь этим, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин), противомикробные вещества, антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или бисульфит натрия), буферы (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты), наполнители (такие как маннит или глицин), хелатообразующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), комплексообразователи (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин, моносахариды, дисахариды и дру-

гие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины), протеины (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины), красители, ароматизаторы и разбавители, эмульсификаторы, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидин), полипептиды низкого молекулярного веса, солеобразующие противоионы (такие как натрий), консерванты (такие как бензалконий хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода), растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль), сахарные спирты (такие как маннит или сорбит), суспендирующие агенты, поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как плуроники; ПЭГ; сорбитановые эфиры; полисорбаты, такие как полисорбат 20 или полисорбат 80; тритон; трометамин; лецитин; холестерин или тилоксапал), агенты, усиливающие стабильность (такие как сахароза или сорбит), агенты-усилители тонуса (такие как галогениды щелочных металлов - предпочтительно натрий или калий хлорид - или маннит сорбит), носители, разбавители, наполнители и/или фармацевтические адъюванты (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), и последующие издания этой книги, на которые в данной заявке сделана ссылка).

Оптимальная фармацевтическая композиция будет определяться опытным специалистом в зависимости от, например, предполагаемой схемы использования, формата доставки и необходимой дозы (см., например, работу Remington's Pharmaceutical Science). Такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* выделения и скорость *in vivo* клиренса "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида (который может быть усеченным, кэпированным или C-терминально мутированным) или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида.

Основной носитель в фармацевтической композиции может быть водным или неводным по своей природе. Например, подходящим носителем для инъекции может быть вода, физиологический солевой раствор или искусственная цереброспинальная жидкость, дополненная, возможно, другими материалами, обычными в композициях для парентерального использования. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, служат дополнительными иллюстративными носителями. Другие иллюстративные фармацевтические композиции включают Tris буфер с pH приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер с величиной pH около 4,0-5,5, который дополнительно может содержать сорбит или подходящий заместитель. В одном варианте настоящего изобретения композиции с применением "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида и химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида могут быть приготовлены для хранения путем смешения выбранной композиции, которая имеет требуемую степень чистоты, с дополнительными композиционными агентами (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) в форме лиофилизованной лепешки или водного раствора. Кроме того, "связанная молекула", FGF21 мутантный полипептид и химически модифицированный FGF21 мутантный полипептидный продукт могут быть составлены в виде лиофилизата с использованием соответствующих наполнителей, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть выбраны для парентеральной доставки. Как альтернатива, данные композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например перорально. Приготовление таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах навыков специалистов в данной области.

Компоненты композиций присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для локального использования. Например, буферы используются для поддержания данной композиции при физиологическом уровне pH или при несколько более низком pH, обычно, в области pH приблизительно от 5 до 8.

Когда предусмотрено парентеральное использование, данные терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении могут быть в форме апиrogenного, парентерально приемлемого, водного раствора, включающего необходимые "связанную молекулу", FGF21 мутантный полипептид или химически модифицированный FGF21 мутантный полипептид в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно приемлемым носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой "связанная молекула", FGF21 мутантный полипептид или химически модифицированный FGF21 мутантный полипептид образуют стерильный, изотонический раствор, сохраняемый соответствующим образом. Еще один препарат может включать композицию необходимой молекулы с агентом, таким как инъектируемые микросферы, подверженные биодegradации частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), бусинки или липосомы, которые вводятся для контролируемого и пролонгированного выделения данного продукта, который может быть затем доставлен посредством депо инъекции. Гиалуроновая кислота также может быть использована, и это может иметь эффект промотирования замедленного выделения в кровотоки. Другие подходящие средства для введения необходимой молекулы включают имплантируемые устройства для доставки лекарств.

В одном варианте фармацевтическая композиция может быть составлена для ингаляции. Например, "связанная молекула", FGF21 мутантный полипептид или химически модифицированный FGF21 мутантный полипептид могут быть составлены в виде сухого порошка для ингаляции. Ингаляционные растворы могут быть составлены с пропеллантом для аэрозольной доставки препарата. В еще одном варианте растворы могут быть подвержены распылению. Пульмонарное использование описано более подробно в международной публикации № WO 94/20069, которая описывает пульмонарную доставку химически

модифицированных протеинов.

Также предусмотрено, что некоторые композиции могут использоваться перорально. В одном варианте настоящего изобретения "связанная молекула", FGF21 мутантный полипептид (который может быть усеченным, кэпированным или С-терминально мутированным) или химически модифицированный FGF21 мутантный полипептид, которые используются по указанной схеме, могут быть составлены с или без тех носителей, которые обычно используются в компаундировании твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. Например, может быть сконструирована капсула для выделения активной части данной композиции в данной точке желудочно-кишечного тракта, когда биодоступность максимизирована, а предсистемная деградация минимизирована. Дополнительные агенты могут быть включены для облегчения абсорбции "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида (который может быть усеченным, кэпированным или С-терминально мутированным) или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида. Могут также применяться разбавители, ароматизаторы, воски с низкой температурой плавления, растительные масла, смазочные вещества, суспендирующие агенты, таблеточные дезинтеграторы и связующие вещества.

Еще одна фармацевтическая композиция может включать терапевтически эффективное количество "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида (который может быть усеченным, кэпированным или С-терминально мутированным) или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида в смеси с нетоксичными наполнителями, которые подходят для производства таблеток. Путем растворения таблеток в стерильной воде или другом подходящем носителе могут быть приготовлены растворы в однократной форме. Пригодные наполнители включают, однако, не ограничиваясь этим, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связывающие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик; или смазочные агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции с использованием "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида будут очевидны специалистам в данной области, включая композиции, содержащие "связанную молекулу", FGF21 мутантный полипептид или химически модифицированный FGF21 мутантный полипептид, в препаратах с замедленной или контролируемой доставкой. Способы для создания различных других средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биodeградируемые микро-частицы или пористые бусинки и депо инъекции, также известны специалистам в данной области (см., например, международную публикацию № WO 93/15722, которая описывает контролируемое выделение пористых полимерных микро-частиц для доставки фармацевтических композиций).

Дополнительные примеры препаратов с пролонгированным выделением включают полупроницаемые полимерные матрицы в форме фасонных изделий, например пленок или микрокапсул. Матрицы с пролонгированным выделением могут включать полиэферы, гидрогели, полилактиды (патент США № 3773919 и европейский патент № 0058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамата (Sidman et al, 1983, Biopolymers 22: 547-56), поли(2-гидроксипропилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 and Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), этиленвинил ацетат (Langer et al., supra) или поли-D(-)-3-оксимасляная кислота (европейский патент № 0133988). Композиции пролонгированного выделения могут также включать липосомы, которые могут быть получены с использованием любого из нескольких известных в данной области способов. См., например, Epstein et al., 1985, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-92; и европейские патенты № 0036676, 0088046 и 0143949.

Фармацевтическая композиция с применением "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида, которую предполагается использовать для *in vivo* применения, обычно должна быть стерильной. Это может быть достигнуто путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. В том случае, где данная композиция лиофилизирована, стерилизация с использованием этого способа может проводиться или до или после лиофилизации и воссоздания. Композиция для парентерального использования может сохраняться в лиофилизированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции, в общем, помещаются в контейнер, снабженный стерильным портом доступа, например контейнер для внутривенного раствора или флакон, имеющие пробку, которая прокалывается иглой для подкожных инъекций.

Когда данная фармацевтическая композиция составлена, она может храниться в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или как обезвоженный или лиофилизированный порошок. Такие композиции могут сохраняться или в готовой к применению форме или в форме (например, лиофилизированной), требующей воссоздания перед использованием.

В специфическом варианте настоящее изобретение направлено на наборы для приготовления однократной единицы использования. Каждый из таких наборов может содержать как первый контейнер, имеющий сухой протеин, так и второй контейнер, имеющий водный препарат. Кроме того, в объем данного изобретения входят наборы, содержащие одноразовые и многокамерные предварительно наполненные шприцы (например, жидкостные шприцы и лиошприцы).

Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции с использованием "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида (который может быть усеченным, кэпированным

или С-терминально мутированным) или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида, которую предполагается использовать в терапевтических целях, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалисту в данной области понятно, что соответствующие уровни дозировки для лечения будут варьировать частично в зависимости от показаний доставляемой молекулы, по которым используется "связанная молекула", FGF21 мутантный полипептид или химически модифицированный FGF21 мутантный полипептид, схемы использования и размеров (веса тела, поверхности тела или размера органа) и состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. Соответственно, клиницист может изменить дозировку и модифицировать схему использования для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная дозировка может варьировать приблизительно от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. В других вариантах дозировка может варьировать от 0,01 до приблизительно 10 мг/кг, например 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг.

Частота дозировки будет зависеть от фармакокинетических параметров "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида в используемой композиции. Обычно клиницист назначает данную композицию до тех пор, пока не достигается доза, дающая желательный эффект. Поэтому данная композиция может назначаться в виде единичной дозы, в виде двух или больше доз (которые могут или могут не содержать одинаковое количество необходимой молекулы) в течение определенного периода времени, или как непрерывная инфузия через имплантированное устройство или катетер. Дополнительное уточнение соответствующей дозировки делается обычно рядовыми специалистами в данной области и входит в круг их обязанностей. Подходящие дозы могут быть установлены на основании соответствующих данных относительно реакции пациента на использованные дозы.

Схема использования данной фармацевтической композиции согласуется с известными способами, например перорально; путем инъекции по внутривенной, интраперитонеальной, интрацеребральной (интрапаренхимальной), интрацеребровентрикулярной, внутримышечной, внутриглазной, внутриартериальной, интрапортальной или интралезиональной схемам; с помощью систем пролонгированного выделения; или с помощью имплантированных устройств. При необходимости, данные композиции могут использоваться с применением болюсной инъекции или непрерывной инфузии, или имплантированного устройства.

Как альтернатива или дополнение, данная композиция может применяться локально путем имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором необходимая молекула была абсорбирована или инкапсулирована. Когда применяется имплантированное устройство, оно может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка необходимой молекулы может осуществляться путем диффузии, болюсом с заданным временем выделения или путем непрерывного введения.

10. Терапевтические применения FGF21 полипептидных мутантов.

"Связанные молекулы", FGF21 мутантные полипептиды (которые могут быть усеченными, кэппированными или С-терминально мутированными) и химически модифицированные FGF21 мутантные полипептиды настоящего изобретения могут быть использованы для лечения, диагностирования, ослабления или предупреждения ряда болезней, расстройств или состояний, включая, но не ограничиваясь этим, метаболические расстройства. В одном варианте метаболическое расстройство, которое предполагается лечить, представляет собой диабет. В другом варианте данное метаболическое расстройство является ожирением. Другие варианты включают метаболические состояния или расстройства, такие как дислипидемия; гипертензия; гепатостеатоз, такой как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ); сердечно-сосудистое заболевание, такое как атеросклероз; и старение.

Что касается применения, расстройство или состояние, такое как диабет или ожирение, могут лечиться путем назначения "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида, описанных здесь, пациенту, который нуждается в этом, в количестве эффективной терапевтической дозы. Использование может осуществляться, как описано здесь, например, с помощью внутривенной инъекции, или перорально, в форме таблетки или жидкого препарата. В большинстве ситуаций необходимая доза может быть определена клиницистом, как описано здесь, и может представлять терапевтически эффективную дозу "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида. Специалистам в данной области очевидно, что терапевтически эффективная доза "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида будет зависеть, *inter alia*, от схемы использования, единичной дозы назначенного антигена, того, использовалась ли молекула нуклеиновой кислоты или полипептида в комбинации с другими терапевтическими агентами, иммунологического статуса и здоровья реципиента. Термин "терапевтически эффективная доза" используемый здесь, означает то количество "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида, которое вызывает данную биологическую или медицинскую реакцию в тканевой системе, животном или человеке, которую ожидает исследователь, медицинский доктор или другой клиницист, которая включает ослабление симптомов болезни

или расстройства, которые поддаются лечению.

11. Антитела.

Антитела и фрагменты антител, которые специфическим образом связываются со "связанной молекулой", FGF21 мутантным полипептидом или химически модифицированными FGF21 мутантными полипептидами настоящего изобретения, но не связываются специфически с полипептидами FGF21 дикого типа, предусмотрены в настоящем изобретении. Антитела могут быть поликлональными, включая моноспецифические поликлональные; моноклональными (MAT); рекомбинантными; химерными; гуманизированными, такими как привитые к гипервариабельному участку ((CDR)-grafted); человеческими; одноцепочечными; и/или биспецифическими; также как и фрагменты; варианты; или их химически модифицированные молекулы. Фрагменты антител включают те участки данного антитела, которые специфически связаны с эпитопом на FGF21 мутантном полипептиде. Примеры таких фрагментов включают Fab и F(ab') фрагменты, сгенерированные путем ферментативного расщепления антител полной длины. Другие связывающие фрагменты включают те, что сгенерированы способами рекомбинантной ДНК, такими как экспрессия рекомбинантных плазмид, которые содержат нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие вариабельные участки антитела.

Поликлональные антитела, направленные на "связанную молекулу", FGF21 мутантный полипептид или химически модифицированный FGF21 мутантный полипептид, вырабатываются, в общем, в животных (например, кроликах или мышах) посредством множественных подкожных или интраперитонеальных инъекций FGF21 мутантного полипептида и адьюванта. Может быть полезным конъюгировать FGF21 мутантный полипептид с протеином-носителем, иммуногенным в видах, которые предстоит иммунизировать, таким как гемоцианин кольцевой структуры в виде замочной скважины, сыворотка, альбумин, бычий тироглобулин или соевый трипсиновый ингибитор. Кроме того, используются агрегирующие агенты, такие как квасцы, для усиления иммунной реакции. После иммунизации животным делают кровопускание, и сыворотка анализируется на титр антитела против "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида.

Моноклональные антитела, направленные на "связанную молекулу", FGF21 мутантные полипептиды или химически модифицированные FGF21 мутантные полипептиды, могут быть получены с использованием любого способа, который предусматривает выработку молекул антитела с помощью непрерывных клеточных линий в культуре. Примеры приемлемых способов для приготовления моноклональных антител включают гибридомные способы Kohler et al., 1975, Nature 256: 495-97 и способ В-клеточной гибридомы человека (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133: 3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)). Также настоящее изобретение представляет линии клеточной гибридомы, которые вырабатывают моноклональные антитела, реактивные со "связанной молекулой", FGF21 мутантными полипептидами или химически модифицированными FGF21 мутантными полипептидами.

Анти-FGF21 мутантные антитела данного изобретения могут использоваться в любом известном способе анализа, таком как конкурентно-связывающие анализы, прямой и непрямой сэндвичевые анализы и иммунопреципитационные анализы (см., например, работу Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987), на которую в данной заявке сделана полная ссылка) для обнаружения и количественного определения FGF21 мутантных полипептидов. Данные антитела будут связывать FGF21 мутантные полипептиды со средством, подходящим для применения данного способа анализа.

Для диагностических приложений в некоторых вариантах антитела против "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида могут быть мечены обнаружимой составляющей. Обнаружимая составляющая может быть любой составляющей, которая способна давать, прямо или косвенно, обнаружимый сигнал. Например, обнаружимая составляющая может быть радиоизотопом, таким как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , или ^{67}Ga ; флуоресцентным или хемилюминесцентным соединением, таким как флуоресцеин изотиоцианат, родамин или люцифераза; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза или пероксидаза хрена обыкновенного (Bayer et al., 1990, Meth. Enz. 184: 138-63).

Конкурентно-связывающие анализы основаны на способности меченого эталона (например, FGF21 мутантного полипептида или его иммунологически реакционной части) конкурировать с испытываемой пробой анализируемого вещества (например, "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида) на связывание с ограниченным количеством антитела против "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида, в зависимости от анализируемого вещества. Количество "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида в испытываемой пробе обратно пропорционально количеству эталона, который становится связанным с данными антителами. Для облегчения определения количества эталона, который становится связанным, данные антитела обычно инсолюбилизируются перед или после конкурентной борьбы, так что эталон и анализируемое вещество, которые связаны с антителами, могут легко быть отделены от эталона и анализируемого вещества, которые остались несвязанными.

Сэндвичевые анализы обычно включают использование двух антител, каждое способно связываться с отдельной иммуногенной частью или эпитопом протеина, который предполагается обнаружить и/или подвергнуть количественному анализу. В сэндвичевом анализе испытываемая проба анализируемого вещества обычно связывается первым антителом, которое иммобилизовано на твердой подложке, и после этого второе антитело связывается с анализируемым веществом, образуя, таким образом, нерастворимый трехчастичный комплекс. См., например, патент США № 4376110. Второе антитело само может быть мечено обнаружимой составляющей (прямой сэндвичевый анализ) или может определяться с использованием антитела к иммуноглобулину, меченого обнаружимой составляющей (косвенный сэндвичевый анализ). Например, одним типом сэндвичевого анализа является иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA), в котором обнаружимой составляющей является фермент.

Антитела против "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида настоящего изобретения также полезны для *in vivo* визуализации. Антитело, меченное обнаружимой составляющей, может вводиться животному, предпочтительно в кровоток, и присутствие и месторасположение меченого антитела в хозяине анализируется. Данное антитело может метиться любой составляющей, которая обнаружима в животном, либо способом ядерного магнитного резонанса, радиологическим способом или другими средствами обнаружения, которые известны в данной области.

Данное изобретение также относится к набору, включающему "связанные молекулы", FGF21 мутантные полипептиды или химически модифицированные FGF21 мутантные полипептидные антитела и другие реагенты, полезные для обнаружения уровней "связанной молекулы", FGF21 мутантного полипептида или химически модифицированного FGF21 мутантного полипептида в биологических пробах. Такие реагенты могут включать обнаружимую метку, блокирующую сыворотку, положительную и отрицательную контрольные пробы и реактивы для обнаружения.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют специфические варианты данного изобретения и их разнообразные применения. Они представлены только с целью объяснения и не должны рассматриваться как ограничивающие в той или иной мере объем данного изобретения.

Пример 1. Получение FGF21 полипептидных экспрессирующих конструкторов.

Нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая зрелый FGF21 полипептид, была получена способом ПЦР (полимеразная цепная реакция) амплификации с использованием праймеров, имеющих нуклеотидные последовательности, соответствующие 5' и 3' концам зрелой FGF21 последовательности. В табл. 4 перечислены праймеры, которые были использованы для амплификации зрелой FGF21 последовательности.

Таблица 4. ПЦР праймеры для получения FGF21 конструктора

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
Смысл.	5' -AGGAGGAATAACATATGCATCCAATTCCAGATTCTTCTCC-3'	33
Антисмысл.	5' -TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	34

Праймеры, использованные для приготовления FGF21 экспрессирующего конструктора, включали рестрикционные эндонуклеазные сайты для направленного клонирования данной последовательности в подходящий экспрессирующий вектор (например, pET30 (Novagen/EMD Biosciences; San Diego, CA) или pAMG33 (Amgen; Thousand Oaks, CA)). Экспрессирующий вектор pAMG33 содержит малокопийный (low-copy) R-100 репликатор, модифицированный *lac* промотор и канамицин-резистентный ген. Экспрессирующий вектор pET30 содержит полученный из pBR322 репликатор, индуцированный T7 промотор и канамицин-резистентный ген. Хотя экспрессия от pAMG33, как было найдено, была выше, pET30, как было установлено, является более надежным клонирующим вектором. Таким образом, большинство конструкторов, описанных в данной заявке, сначала генерировалось в pET30 и потом подвергалось скринингу, в отношении эффективности. Выбранные последовательности затем переносились в pAMG33 для дальнейшей амплификации.

FGF21 последовательность была амплифицирована в реакционной смеси, содержащей 40,65 мкл dH₂O, 5 мкл PfuUltra II реакционного буфера (10×), 1,25 мкл dNTP Mix (40 mM - 4 × 10 mM), 0,1 мкл Template (100 нг/мл), 1 мкл Primer1 (10 мкМ), 1 мкл Primer2 (10 мкМ) и 1 мкл PfuUltra II fusion HS ДНК полимеразы (Stratagene; La Jolla, CA). Реакции амплификации проводились путем нагревания в течение двух минут при 95°C; затем десятью циклами при 95°C в течение 20 с, 60°C в течение 20 с (при дополнительном вычитании 1°C на цикл), и 72°C в течение 15 с/килобазу (тысяча гетероциклических оснований нуклеиновой кислоты) необходимого продукта; с последующими 20 циклами при 94°C в течение 20 с, 55°C в течение 20 с, и 72°C в течение 15 с/килобазу необходимого продукта; затем при 72°C в течение трех минут. Продукты амплификации расщеплялись рестрикционными эндонуклеазами NdeI и EcoRI; вшивались в подходящий вектор и потом трансформировались в компетентные клетки.

Как результат использования бактериальной экспрессирующей системы, экспрессированный зрелый FGF21 полипептид включал N-концевой метиониновый остаток или переменный метиониновый остаток, такой как fMet или глюконилированный Met.

Пример 2. Очистка FGF21 полипептидов дикого типа от бактерий.

В последующих примерах полипептиды FGF21 дикого типа были экспрессированы в бактериальной экспрессирующей системе. После экспрессирования, описанного ниже, полипептиды FGF21 дикого типа были подвергнуты очистке, как описано в этом примере, если не указано другое.

Для очистки полипептида FGF21 дикого типа от бактериальных включений дважды промытые включения (DWIBs) были солубилизованы в солубилизационном буфере, содержащем гуанидина гидрохлорид и дитиотреитол (DTT) в Tris буфере при pH 8,5, и потом смешивались в течение одного часа при комнатной температуре, и данная солубилизационная смесь добавлялась к восстановленному буферу, содержащему мочевины, аргинин, цистеин и цистамин гидрохлорид при pH 9,5, и смешивалась в течение 24 ч при 5°C (см., например, работы Clarke, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157-63; Mannall et al., 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1523-34; Rudolph et al., 1997, "Folding proteins," in *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton, ed., New York, IRL Press), pp 57-99; and Ishibashi et al., 2005, *Protein Expr. Purif.* 42: 1-6).

После солубилизации и рефолдинга данную смесь фильтровали через 0,45-микронный фильтр. Данный пул затем концентрировали приблизительно 10-кратно с помощью кассеты Pall Omega с граничным молекулярным весом 10 кДа при трансмембранном давлении (ТМД) 20 фунтов/кв.дюйм, подвергали диалитическому фильтрованию 3 колонковыми объемами 20 mM Tris, pH 8,0 при ТМД 20 фунтов/кв.дюйм.

Осветленный образец затем подвергался анионообменной хроматографии (АОХ) с использованием Q Sepharose HP смолы. Была проведена серия опытов с использованием линейного солевого градиента от 0 до 250 mM NaCl в 20 mM Tris при pH 8,0 и 5°C. Пиковые фракции анализировались способом SDS-PAGE и собирались.

Затем АОХ элюатный пул подвергался гидрофобной хроматографии (ГХ) с использованием Phenyl Sepharose HP смолы. Протеин элюировали с использованием уменьшающегося линейного градиента от 0,7 до 0M сульфата аммония при pH 8,0 и комнатной температуре. Пиковые фракции анализировались способом SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85) и собирались.

ГХ пул концентрировался с помощью 0,2 м² кассеты Pall Omega с граничным молекулярным весом 10 кДа до 7 мг/мл при трансмембранном давлении (ТМД) 20 фунтов/кв.дюйм. Концентрат подвергался диалитическому фильтрованию 5 объемами 10 mM KPO₄, 5% сорбита, pH 8,0 при ТМД 20 фунтов/кв.дюйм, и восстановленный концентрат разбавлялся до 5 мг/мл. В завершение, раствор фильтровали через мембрану Pall mini-Kleenpac 0,2 мкМ Posidyne.

Пример 3. Идентификация FGF21 мутантов.

FGF21 дикого типа имеет относительно короткий период полураспада, и в некоторых случаях это может быть нежелательным для применения FGF21 дикого типа как терапевтического средства. Кроме того, традиционные способы расширения периода полураспада, такие как ПЭГилирование данного полипептида, ограничены числом и расположением приемлемых сайтов ПЭГилирования в FGF21 последовательности. В полипептидной последовательности FGF21 дикого типа имеется семь природных сайтов ПЭГилирования, а именно, альфа аминокислота, четыре лизиновых остатка и два цистеиновых остатка. Эти сайты не являются идеальными для ПЭГилирования, поскольку молекула ПЭГ может негативно влиять на способность FGF21 приобретать свою природную структуру или может негативно влиять на взаимодействие между FGF21 и своим рецептором или бета-клото (klotho). Кроме того, за исключением альфа аминокислоты, эти реактивные остатки не учитывают сайт-специфическое ПЭГилирование в единственном целенаправленном положении. Соответственно, было предпринято направленное и специальное исследование для идентификации остатков в полипептиде FGF21 дикого типа, которые могли бы мутировать в остаток, подходящий для химической модификации. Соображения в данном исследовании касались расположения остатка в FGF21 последовательности, также как и его расположения на протеиновой поверхности.

В попытке идентифицировать отдельные остатки в полипептиде FGF21 дикого типа, которые подходили бы для мутации в остаток, пригодный для химической модификации, использовались описанные здесь две разные стратегии.

Пример 3.А. Кандидатуры на мутирование, идентифицированные с использованием гомологической модели.

В первой стратегии была применена гомологическая модель в систематическом рациональном протеиновом инжиниринговом подходе к идентификации остатков, имеющих с высокой вероятностью выступающие на поверхность боковые цепи, которые, вероятно, могут выдержать ПЭГилирование без ущерба для FGF21 активности. Поскольку опубликованные рентгеновские или ЯМР структуры FGF21, которые могли бы быть использованы для идентификации таких остатков, отсутствуют, была использована рентгеновская кристаллическая структура FGF19 (1PWA) высокого разрешения (1,3 Å), полученная из банка данных по протеинам Protein Databank (PDB), для создания трехмерной гомологической модели FGF21 с использованием программного обеспечения для моделирования MOE (Molecular Operating Environment; Chemical Computing Group; Montreal, Quebec, Canada). FGF19 был выбран как матрица, поскольку среди протеинов, депонированных в указанном банке данных по протеинам, FGF19 является самым

близким протеином к FGF21 в рамках гомологии аминокислотной последовательности.

Затем FGF21 гомологическая модель была расширена до представления связи FGF-21 с FGF рецептором. Эта модель была использована для идентификации остатков, которые, вероятно, выступают на поверхность молекулы FGF21 и доступны для реакции с активированной полимерной (например, ПЭГ) составляющей, избегая при этом тех остатков, которые могут помешать взаимодействию FGF21 с рецептором. Принимались во внимание также соображения в отношении сохранения остатков в данной последовательности между видами, также как и биохимические свойства природной боковой цепи. Остатки, идентифицированные как хорошие кандидатуры с помощью этого скрининга, ранжировались в соответствии с оцененной вероятностью успешного ПЭГилирования этого сайта при минимальном нарушении активности. Остатки в группе А отражают наилучшие кандидатуры, и остатки в группе D отражают жизнеспособные, но менее предпочтительные кандидатуры. Группа А включает N121, H125, H112, R77, H87, E37 и K69. Группа В включает R126, G113, D79, E91, D38, D46 и G120. Группа С включает S71, D89, L86, T70, G39, T40, R36, P49, S48, S123, K122, A81, A111, E110 и R96. Наконец, группа D включает Q18, R19, A26, Q28, E34, A44, A45, E50, L52, Q54, L55, K59, G61, L66, V68, R72, P78, G80, Y83, S85, F88, P90, A92, S94, L98, E101, D102, Q108, L114, H117, P119, P124, D127, P128, A129, P130, R131 и P140.

Кроме того, были идентифицированы сайты ПЭГилирования внутри amino- и карбокси-концевых сегментов данной молекулы, исходя из выпрямления последовательности и биохимических свойств боковых цепей, поскольку для этих частей молекулы трехмерные структурные данные отсутствуют. Остатки, которые, как полагали, наиболее подходили для мутации, были идентифицированы и затем сгруппированы в соответствии с тем, насколько хорошо они отвечают ряду выбранных критериев. Остатки 1-13 были оценены в отношении N-конца FGF21 полипептидной последовательности, и D5 был определен как наилучшая кандидатура для мутации, а остатки H1, P2, I3, P4 и S6 были также определены как жизнеспособные. В отношении C-конца FGF21 полипептидной последовательности были оценены остатки I41-181 и остатки Y179, и R175 были определены как наилучшие кандидатуры для мутации, а остатки P143, P171, S172, Q173, G174, S176, P177, S178, A180 и S181 образовали вторую группу кандидатов, и остатки P144, A145, P147, E148, P149, P150, I152, A154, Q156 и G170 образовали третью группу кандидатов для мутации.

Пример 3.В. FGF21 мутанты, генерированные путем удаления нежелательных сайтов присоединения природных полимеров.

Вторая стратегия использовала аминокислотную химию конъюгации для сопряжения ПЭГ и FGF21. Сайт-селективное двойное ПЭГилирование потенциально вакуолегенных конъюгатов может значительно снизить их вакуолегенный потенциал (см., например, патент США № 6420339). Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения сайт-селективное двойное ПЭГилирование осуществляется путем мутирования данного протеина, так что только две первичных аминокислоты остаются для ПЭГилирования.

FGF21 протеин содержит четыре лизиновых и десять аргининовых остатков, как выделено жирным шрифтом (R и K остатки), и подчеркиванием (K остатки) последовательности FGF21 дикого типа (SEQ ID NO:4). Два природных цистеиновых остатка выделены жирным шрифтом и курсивом

NPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGVGAADQSPESLLQL
KALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGYSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
 AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPPPDVGSSDPL
 SMVGPSQGRSPSYAS SEQ ID NO:4

Четыре природных лизина были сначала мутированы в аргинины для создания родительской молекулы, содержащей только одну первичную аминокислотную группу как α-аминогруппу в N-конце. Она тестировалась на *in vitro* активность, и, как было найдено, была полностью активной. Затем селективные аргинины были пошагово заменены лизином для создания до десяти аналогов, содержащих вторую первичную аминокислотную группу для ПЭГилирования в различных положениях на FGF21 молекуле. Изучение гомологической модели FGF21, связанного со своим рецептором (как описано в примере 3А), позволило провести ранжирование предлагаемых сайтов конъюгации в зависимости от их близости к предполагаемому интерфейсу рецептора. Сайты, которые предполагались скрытыми, не рассматривались.

Различные положения ранжировались и характеризовались следующим образом: (а) сайты, доступные растворителю и удаленные от интерфейса рецептора: R36, R77, K122 & R126; (б) сайты, доступные растворителю и близкие к интерфейсу рецептора: K56, K59, K69, R72 & R175; и (в) сайты, которые скрыты: R17, R19, R131 & R135.

Концевые конструкторы, каждый из которых содержит единственную α-амино и ε-аминогруппу, очищали и испытывали на активность перед и после конъюгации с ПЭГ, как описано в примере 9 (конъюгация) и 10 (*in vitro* проба на активность).

Пример 4. Идентификация FGF21 мутантов, включающих единичную мутацию.

Сводка FGF21 мутантов, включающих единственную мутацию, которые генерировались с помощью рационального протеинового инжинирингового подхода, описанных выше в примере 3.А и 3.В, дана в табл. 3. Эти отдельные мутанты вводят и включают сайт присоединения неприродного полимера, в

особенности цистеиновый или лизиновый остаток. Боковые цепи этих остатков особенно подходят для химической модификации путем присоединения полимера, такого как молекулы ПЭГ. Было признано, что в дополнение к введенному сайту присоединения неприродного полимера, полимер может быть присоединен, при необходимости, к N-концу данного протеина, если в этом есть потребность.

Поскольку введенные остатки были сконструированы с целью поддерживать уровни биологической активности FGF21 дикого типа, эти FGF21 мутантные полипептиды, как ожидается, поддерживают FGF21 биологическую активность и все еще вводят один или несколько сайтов присоединения неприродного полимера. После химической модификации (например, ПЭГилирования) эти мутанты, как ожидается, имеют более продолжительный *in vivo* период полураспада, чем FGF21 дикого типа, сохраняя в то же время значительные *in vivo* уровни биологической активности дикого типа.

Номера положений, заданные для мутагенеза, приведены в табл. 5 и отвечают положению остатка в зрелом FGF21 протеине, который состоит из 181 аминокислотного остатка. Нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие FGF21 мутантные полипептиды, перечисленные в табл. 5 ниже, были приготовлены с использованием описанных ниже способов.

Таблица 5. FGF21 мутантные полипептиды, включающие единичную мутацию

Номер остатка	Дикий тип	Мутация	
36	R	K	R36K
37	E	C	E37C
38	D	C	D38C
46	D	C	D46C
56	K	R	K56R
60	K	R	K60R
91	E	C	E91C
69	K	C	K69C
69	K	R	K69R
72	R	K	R72K
77	R	C	R77C
77	R	K	R77K
79	D	C	D79C
86	H	C	H86C
91	E	C	E91C
112	H	C	H112C
113	G	C	G113C
120	G	C	G120C
121	N	C	N121C
122	K	R	K122R
125	H	C	H125C
126	R	C	R126C
126	R	K	R126K
171	P	G	P171G
175	R	C	R175C
175	R	K	R175K
170	G	C	G170C
179	Y	C	Y179C

Пример 5. Идентификация FGF21 мутантов, включающих две мутации.

Дополнительный анализ гомологической модели и данных, полученных от отдельных цистеиновых мутантов, был проведен с целью идентифицировать комбинации мутантов, которые могли бы ввести два сайта присоединения неприродного полимера. После химической модификации эти FGF21 мутанты имеют два полимера (например, молекулы ПЭГ), присоединенных к данному полипептиду в необходимых положениях. Как и для всех FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения, полимер может также быть присоединен к N-концу данного полипептида в зависимости от природы самого этого полимера. Рисунок, изображающий дважды ПЭГилированный FGF21 мутант, представлен на фиг. 1.

Сводка FGF21 мутантов, включающих две мутации, которые были генерированы с помощью рационального протеинового инжинирингового подхода, представлена в табл. 6. Эти двойные мутанты включают сайт присоединения неприродного полимера, в особенности цистеина. Боковые цепи этих остатков особенно подходят для химической модификации путем присоединения полимера, такого как молекула ПЭГ. Было признано, что в дополнение к введенному сайту присоединения неприродного полимера, полимер может быть, при необходимости, присоединен к N-концу данного протеина, если в этом есть потребность.

Поскольку введенные остатки были сконструированы для поддержания биологической активности FGF21, эти FGF21 мутанты, как предполагается, сохраняют биологическую активность FGF21 и еще вводят один или несколько сайтов присоединения неприродного полимера. После химического модифицирования (например, ПЭГилирования) эти мутанты, как предполагается, имеют более продолжительный период полураспада, чем FGF21 дикого типа, и в то же время поддерживают значительную *in vivo* активность.

Номера положений, приведенные в табл. 6, соответствуют положению остатка в зрелом FGF21 протеине, который состоит из 181 аминокислотного остатка. Нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие FGF21 мутантные полипептиды, перечисленные в табл. 6 ниже, были приготовлены с использованием способов, описанных ниже.

Таблица 6. FGF21 мутантные полипептиды, включающие две мутации

Остаток 1	Дик. тип	Мутация	Остаток 2	Дик.тип	Мутация	
37	E	C	77	R	C	E37C,R77C
120	G	C	125	H	C	G120C, H125C
77	R	C	91	E	C	R77C, E91C
77	R	C	125	H	C	R77C, H125C
91	E	C	125	H	C	E91C, H125C
77	R	C	120	G	C	R77C, G120C
37	E	C	91	E	C	E37C, E91C
91	E	C	175	R	C	E91C, R175C
37	E	C	175	R	C	E37C, R175C
91	E	C	120	G	C	E91C, G120C
37	E	C	120	G	C	E37C, G120C
77	R	C	175	R	C	R77C, R175C
37	E	C	125	H	C	E37C, H125C
37	E	C	69	K	C	E37C, K69C
69	K	C	91	E	C	K69C, E91C
120	G	C	175	R	C	G120C, R175C
69	K	C	120	G	C	K69C, G120C
69	K	C	125	H	C	K69C, H125C
69	K	C	77	R	C	K69C, R77C
125	H	C	175	R	C	H125C, R175C
69	K	C	175	R	C	K69C, R175C
37	E	C	170	G	C	E37C, G170C

Пример 6. Идентификация FGF21 мутантов, включающих три мутации.

Как описано выше, сайты присоединения неприродного полимера могут быть введены в полипептидную последовательность FGF21 дикого типа. Это предоставляет возможность для сайт-селективной химической модификации в желательных положениях в данном полипептиде. Кроме того, ранее было определено, что остаток P171 в последовательности FGF21 дикого типа подвержен протеолитической деградации. Соответственно, путем введения комбинаций вышеуказанных модификаций, плюс мутации в положении P171, могут быть сгенерированы FGF21 молекулы, имеющие как повышенную протеолитическую устойчивость, так и сайты присоединения сайт-специфического полимера.

Дополнительный анализ данной гомологической модели был проведен с целью идентификации комбинаций мутантов, которые могут ввести два сайта присоединения неприродных полимеров. После химической модификации эти мутанты будут иметь два полимера (например, молекулы ПЭГ), присоединенные к данному полипептиду в желательных местах. Как и для всех FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения, полимер может также быть присоединен к N-концу данного полипептида в зависимости от природы самого данного полимера. Анализ включал оценку мутации в положении P171, в дополнение к двум введенным сайтам присоединения полимера, что было сделано для повышения протеолитической стабильности FGF21 мутантного полипептида и введения селективных сайтов присоединения полимера и повышенной протеолитической стабильности, при сохранении или усилении в то же время *in vivo* биологической активности FGF21 дикого типа.

В параллельном исследовании выбранное подмножество отдельных мутаций из табл. 5, представленных в примере 4, комбинировалось с мутацией P171, повышающей стабильность, с целью селективного ПЭГилирования сайта как в α -амино N-конце так и во введенной цистеиновой мутации, с использованием сайт-селективных смешанных химических способов, описанного ранее (см. патент США №

6420339, на который здесь сделана ссылка). Эти двойные мутации были обозначены как R77C/P171G и H125C/P171G и являются примером любых других комбинаций, которые могут быть предусмотрены с использованием мутаций, раскрытых в табл. 5 примера 4.

Сводка FGF21 мутантов, включающих две мутации, в дополнение к мутации на сайте P171, которые генерировались с помощью указанного рационального протеинового инжинирингового подхода, представлена в табл. 7. Эти мутанты включают два сайта присоединения неприродных полимеров, конкретно, цистеин. Боковые цепи этих остатков особенно подходят для химической модификации путем присоединения полимера, такого как ПЭГ молекула. Было признано, что в дополнение к введенному сайту присоединения неприродного полимера, полимер мог бы быть присоединен, при необходимости, к N-концу данного протеина. Тройные описанные FGF21 мутанты включают не только введенные сайты присоединения полимера, описанные выше, но также и мутацию в положение 171, индуцирующую протеолитическую стабильность. После химической модификации FGF21 тройного мутанта эта комбинация мутаций служит функцией увеличения периода полураспада FGF21 через ассоциацию двух полимеров (например, молекул ПЭГ) с полипептидной последовательностью, также как и увеличения периода полураспада через элиминацию сайта протеолитического расщепления.

Поскольку введенные остатки были сконструированы для поддержания *in vivo* уровней биологической активности FGF21 дикого типа, эти FGF21 мутанты, как предполагается, поддерживают биологическую активность FGF21 и вводят также уникальные сайты присоединения неприродного полимера. После химической модификации (например, ПЭГилирования) эти мутанты, как ожидается, имеют больший период полураспада, чем FGF21 дикого типа, сохраняя при этом существенные *in vivo* уровни биологической активности дикого типа.

Номера положений, приведенные в табл. 7, соответствуют положению остатка в зрелом FGF21 протеине, который состоит из 181 аминокислотного остатка. Нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие FGF21 мутантные полипептиды, перечисленные в табл. 7, были получены с использованием описанных здесь способов.

Таблица 7. FGF21 мутантные полипептиды, включающие три мутации

Оста- ток 1	Дик. тип	Мута- ция	Оста- ток 2	Дик. тип	Мута- ция	Оста- ток 3	Дик. тип	Мута- ция	
37	E	C	77	R	C	171	P	G	E37C, R77C, P171G
91	E	C	125	H	C	171	P	G	E91C, H125C, P171G
77	R	C	120	G	C	171	P	G	R77C, G120C, P171G
37	E	C	91	E	C	171	P	G	E37C, E91C, P171G
91	E	C	175	R	C	171	P	G	E91C, R175C, P171G
37	E	C	175	R	C	171	P	G	E37C, R175C, P171G
91	E	C	120	G	C	171	P	G	E91C, G120C, P171G
37	E	C	120	G	C	171	P	G	E37C, G120C, P171G

77	R	C	175	R	C	171	P	G	R77C, R175C, P171G
37	E	C	125	H	C	171	P	G	E37C, H125C, P171G

Пример 7. Получение и экспрессия FGF21 мутантных полипептидов.

Конструкты, кодирующие FGF21 мутанты, перечисленные в табл. 3 (отдельные мутанты), 4 (двойные мутанты) и 5 (тройные мутанты, т.е. двойные мутации + P171G), в целом, "FGF21 мутанты" в этом примере, были получены посредством ПЦР амплификации экспрессирующего вектора FGF21 дикого типа, как описано ниже (конструкция экспрессирующего вектора FGF21 дикого типа описана в примере 1). Целью этих экспериментов было сгенерировать FGF21 мутанты, которые включают один или несколько сайтов присоединения неприродного полимера и в некоторых случаях резистентны к протеолизу. Химически модифицированные формы этих FGF21 мутантов, как предполагается, будут проявлять более длительные периоды полураспада и в некоторых случаях также будут резистентны к протеолизу.

FGF21 мутантные конструкты были приготовлены с использованием праймеров, имеющих последовательности, которые являются гомологами участков вверх и вниз от кодона (или кодонов), который предполагается мутировать. Праймеры, использованные в таких реакциях амплификации, также дали приблизительно 15 нуклеотидов перекрывающейся последовательности для учета рециркуляризации амплифицированного продукта, т.е. всего вектора, обладающего теперь нужным мутантом.

Иллюстративный FGF21 мутантный конструкт, кодирующий FGF21 мутант, имеющий остаток глутаминовой кислоты в положении 170 вместо природного глицинового остатка (т.е. G170E FGF21 мутантный полипептид), был приготовлен с использованием праймеров, показанных в табл. 8.

Таблица 8. ПЦР праймеры для получения иллюстративного FGF21 мутанта

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
Смысл.	5' -ATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGC-3'	29
	CTCCTCGGACCCCTCTGAGCATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA	30
	GAGGAGCCTGGGAGACTCGTACCACCTTGGGAAGGGTCCCGGCTTCGGGGT	31
Антисмысл.	5' -GGAAGGTTCCACCATGCTCAGAGGGTCCGA-3'	32

Праймеры, показанные в табл. 6, учитывают замещение глицинового остатка остатком глутаминовой кислоты, как показано ниже, где верхняя последовательность является смысловым праймером (SEQ ID NO: 29), вторая и третья последовательности (SEQ ID NOs: 30 и 31) являются частями FGF21 экспрессирующего конструкта, и четвертая последовательность является антисмысловым праймером (SEQ ID NO: 32)

5' -ATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGC
CTCCTCGGACCCCTCTGAGCATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA
GAGGAGCCTGGGAGACTCGTACCACCTTGGGAAGGGTCCCGGCTTCGGGGT
AGCCTGGGAGACTCGTACCACCTTGGGAAGG-5'

FGF21 мутантные конструкты были получены с использованием, по сути, ПЦР условий, описанных в примере 1. Продукты амплификации расщеплялись рестрикционной эндонуклеазой DpnI и затем трансформировались в компетентные клетки. Результирующие клоны были секвенированы для подтверждения отсутствия генерированных полимеразой ошибок.

FGF21 мутанты были экспрессированы путем трансформирования компетентных BL21 (DE3) или BL21 Star (Invitrogen; Carlsbad, CA) клеток конструктом, кодирующим отдельный мутант. Трансформанты выращивались в течение ночи при ограниченной аэрации в ТВ среде, дополненной 40 мкг/мл канамицина, подвергались аэрации на следующее утро и после короткого периода восстановления индуцировались в 0,4 mM IPTG. FGF21 мутантные полипептиды собирались путем центрифугирования через 18-20 ч после индукции.

В результате использования бактериальной экспрессирующей системы FGF21 мутантные полипептиды были экспрессированы с N-концевым метиониновым остатком.

Пример 8. Очистка FGF21 и FGF21 мутантных полипептидов от бактерий.

В последующих примерах FGF21 мутантные полипептиды были экспрессированы в бактериальной экспрессирующей системе. После экспрессии, которая описана в примере 7, FGF21 мутантные полипептиды очищались, как описано в этом примере, если не указано иное.

Для очистки FGF21 мутантного полипептида от внутриклеточных бактериальных включений дважды промытые внутриклеточные включения (DWIBs) были солюбилизованы в солюбилизационном буфере, содержащем гуанидина гидрохлорид и дитиотреитол DTT in Tris буфере при pH 8,5, и затем смешивались в течение одного часа при комнатной температуре, и данная солюбилизационная смесь до-

бавлялась к восстановленному буферу, содержащему мочевины, аргинин, цистеин и цистамин гидрохлорид при pH 9,5, и смешивалась в течение 24 ч при 5°C (см., например, работы Clarke, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157-63; Mannall et al., 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1523-34; Rudolph et al., 1997, "Folding proteins," in *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton, ed., New York, IRL Press), pp. 57-99; and Ishibashi et al., 2005, *Protein Expr. Purif.* 42: 1-6).

После солюбилизации и рефолдинга данную смесь фильтровали через 0,45-микронный фильтр. Данный пул затем концентрировали приблизительно 10-кратно с помощью кассеты Pall Omega с граничным молекулярным весом 10 кДа при трансмембранном давлении (ТМД) 20 фунтов/кв.дюйм, подвергали диалитическому фильтрованию 3 колонковыми объемами 20 mM Tris, pH 8,0 при ТМД 20 фунтов/кв.дюйм.

Осветленный образец затем подвергался анионообменной хроматографии (АОХ) с использованием Q Sepharose HP смолы. Была проведена серия опытов с использованием линейного солевого градиента от 0 до 250 mM NaCl в 20 mM Tris при pH 8,0 и 5°C. Пиковые фракции анализировались способом SDS-PAGE и собирались.

Затем АОХ элюатный пул подвергался гидрофобной хроматографии (ГХ) с использованием Phenyl Sepharose HP смолы. Протеин элюировали с использованием уменьшающегося линейного градиента от 0,6 до 0M сульфата аммония при 20 mM TRIS pH 8,0 и комнатной температуре. Пиковые фракции анализировались способом SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85) и собирались.

ГХ пул концентрировался с помощью 0,2 м² кассеты Pall Omega с граничным молекулярным весом 5 кДа до 7 мг/мл при трансмембранном давлении (ТМД) 20 фунтов/кв.дюйм. Концентрат подвергался диалитическому фильтрованию 5 объемами 20 mM TRIS, pH 8,0 при ТМД 20 фунтов/кв.дюйм, и восстановленный концентрат разбавлялся до 5 мг/мл. В завершение, раствор фильтровали через 0,22 мкм целлюлозно-ацетатный фильтр.

Пример 9. Химическая модификация FGF21 мутантов.

Варианты FGF21, имеющие цистеин, замещенный в выбранных положениях, что представлено в табл. 3-5, были получены, как описано в примере 7, и потом данные молекулы подвергались реакции ПЭГилирования 20 кДа метокси-ПЭГ-имидом малеиновой кислоты. Если не указано иное, все ПЭГилированные FGF21 полипептиды дикого типа и мутантные полипептиды, раскрытые здесь, включают один или несколько 20 кДа метокси ПЭГ малеинимидных полимеров.

Затем частично очищенные FGF21 молекулы восстанавливались с использованием 5 молярных эквивалентов TCEP в течение 30 мин при 25°C. Восстановленный FGF21 затем подвергался буферному обмену на 10 mM имидазола, pH 7,5 с использованием колонки GE Healthcare Sephadex G25M. Подвергнутый буферному обмену FGF21 затем реагировал с 5 молярными эквивалентами 20 кДа метокси-ПЭГ-малеинимида в течение 30 мин при 25°C. Результирующая реакционная смесь затем подвергалась ионообменной хроматографии для отделения моно-ПЭГилированных частиц от мульти-ПЭГилированных и не-ПЭГилированных молекул. Большинство FGF21 мутантных полипептидов хорошо реагировало с метокси-ПЭГ-малеинимидом и давало, главным образом, моно-ПЭГилированные продукты с высоким выходом (фиг. 2 и 3).

Для получения "связанных молекул" частично очищенные FGF21 молекулы восстанавливались с использованием 5 молярных эквивалентов TCEP в течение 30 мин при 25°C. Восстановленный FGF21 затем подвергался буферному обмену на 10 mM имидазола, pH 7,5 с использованием колонки GE Healthcare Sephadex G25M. Подвергнутый буферному обмену FGF21 затем реагировал с 0,45 молярного эквивалента 20 кДа ПЭГ бис-малеинимида в течение 60 мин при 4°C. Результирующая реакционная смесь затем подвергалась ионообменной хроматографии для отделения "связанной молекулы" от других нежелательных продуктов реакции. Часто требовалась дополнительная стадия ионообменной очистки, которая проводилась путем разбавления первого ионообменного пула в приблизительно 4 об. воды и повторного введения в ионообменную колонку.

Как альтернатива, аминоксепифическое сопряжение с N-концом достигалось путем восстановительного алкилирования с использованием метокси-ПЭГ-пропиональдегида, как описано ранее (см. патент США № 5824784). Вкратце, мутантный FGF21 приблизительно при 2 мг/мл реагировал в течение ночи при 4°C, с 5-кратным молярным избытком 20 кДа мПЭГ-пропиональдегида в ацетатном буфере, pH 5,5, и 10 mM цианоборогидрида натрия. N-концевое ПЭГилирование любых молекул FGF21 дикого типа и мутантных молекул, описанное здесь, может быть достигнуто с использованием этой стратегии.

Когда аминоксепифическое двойное ПЭГилирование требовалось как в N-конце так и мутантном лизине, использовался метоксиПЭГ-NHS (N-гидроксисукцинимидиловый эфир). Вкратце, мутантный FGF21 приблизительно при 2 мг/мл реагировал примерно в течение 2 ч при 4°C с 5-кратным молярным избытком (ПЭГ:аминогруппа) 20 кДа мПЭГ-NHS в бисиновом буфере, pH 7,5.

При применении смешанно-химического подхода к двойному ПЭГилированию FGF21 мутантов как в N-конце так и мутантном Cys положении последовательно использовались как метокси-ПЭГ-пропиональдегид так и метокси-ПЭГ-малеинимид, как описывалось ранее (см. патент США № 6420339). Вкратце, мутантный FGF21 приблизительно при 2 мг/мл реагировал приблизительно в течение 2 ч с 1,5-кратным молярным избытком 20 кДа мПЭГ-малеинимида в фосфатном буфере при pH 6,5 и 4°C, затем

величину pH устанавливали на уровне около 5 и добавляли 5-кратный избыток 20 кДа мПЭГ-пропиональдегида с 10 mM цианоборогидрида натрия. Конечная реакция продолжалась при 4°C на протяжении ночи.

Очистка всех различных реакционных смесей проводилась способом анионообменной хроматографии в Tris буфере при pH 8, как описано ранее.

Пример 10. *In vitro* активность FGF21 мутантных полипептидов и химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов.

ПЭГилированные FGF21 мутантные полипептиды подвергались затем *in vitro* анализу для оценки их активности, в сравнении с не-ПЭГилированной формой FGF21 мутантного полипептида и N-терминально ПЭГилированного FGF21.

Одной из целей этих экспериментов было идентифицировать FGF21 мутантные полипептиды и химически модифицированные FGF21 мутантные полипептиды, которые сохраняют FGF21 активность в ELK-люциферазной *in vitro* пробе. ELK-люциферазные пробы проводились с использованием рекомбинантной человеческой 293 T почечной клеточной системы, в которой 293 T клетки гиперэкспрессируют бета-клото и люциферазные репортерные конструкции. Бета-клото является ко-рецептором, который необходим FGF21 для активации его FGF рецепторов. FGF рецепторы, использованные в этой пробе, представляют собой эндогенные уровни FGF рецепторов, экспрессированных в почечной клетке 293T. Люциферазные репортерные конструкции содержат последовательности, кодирующие GAL4-ELK1, и люциферазный репортер, управляемый промотором, который содержит пять tandemных копий Gal4 связывающего сайта (5xUAS-Luc). Активность люциферазы регулируется уровнем фосфорилированного Erk/ELK1 и используется для косвенного мониторинга и количественного определения FGF21 активности.

ELK-люциферазные пробы проводились путем культивирования 293T клеток в присутствии различных концентраций FGF21 дикого типа или FGF21 мутантного полипептида в течение 6 ч и последующего анализа клеточных лизатов на активность люциферазы. Фиг. 4-6 и табл. 3-5 дают сводку *in vitro* результатов, полученных для нескольких иллюстративных FGF21 мутантных полипептидов, включая и те, которые имеют одну, две или три мутации.

Пример 10.A. EC50 значения для ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих одну мутацию.

В табл. 9 ниже дана сводка EC50 значений разных FGF21 мутантных полипептидов, включающих две мутации, которые вводят один сайт присоединения неприродного полимера в специфическом, известном положении.

Были генерированы различные FGF21 мутантные полипептиды, и их активность определялась в *in vitro* ELK-люциферазной пробе, описанной в данной заявке. В табл. 9 дана сводка полученных данных.

Таблица 9. Сводка данных по EC50 для ПЭГилированных FGF21

мутантных полипептидов, включающих одну мутацию

Мутация	EC50 (нМ)	Дик.тип EC50 (нМ)	N-PEG20 EC50 (нМ)
H125C	4.5	2.8	36.7
R77C	4.9	3.9	43.3
K69C	5.3	2.8	36.7
G120C	6.0	2.8	36.7
E37C	6.9	3.9	43.3
R175C	7.9	0.9	21.5
E91C	8.3	3.9	43.3
N121C	9.2	3.9	43.3
R126C	10.0	2.8	36.7
G113C	12.0	3.9	43.3
D38C	13.1	2.8	36.7
D79C	20.4	3.4	40.0
D46C	27.8	3.9	43.3
Y179C	287. 1	1.1	21.5

В табл. 9 дана сводка по влиянию ПЭГилирования на *in vitro* активность некоторых из различных FGF21 мутантных полипептидов настоящего изобретения.

Фиг. 4-6 графически изображают результаты и значения EC50 для нескольких ПЭГилированных FGF21 мутантов, включающих одноточечную мутацию. Фиг.4 и 5 содержат данные по нескольким из

FGF21 мутантов, для которых данные представлены в табл. 9. Более конкретно, верхний график фиг. 4 показывает результаты ERK-люциферазной пробы, выполненной на ПЭГилированных E37C, R77C, E91C мутантах и N-терминально ПЭГилированном FGF21 дикого типа, также как и не-ПЭГилированном FGF21. В нижней части графика на фиг. 4 представлены данные по ПЭГилированным G113C, N121C, D46C мутантам и N-терминально- ПЭГилированному FGF21 дикого типа, также как и по не-ПЭГилированному FGF21 дикого типа.

Что касается фиг. 5, на верхнем графике представлены данные для H125C, G120C, R126C мутантов и N-терминально ПЭГилированного FGF21 дикого типа, также как и не-ПЭГилированного FGF21 дикого типа. На нижнем графике представлены данные для D79C, D38C мутантов и N-терминально ПЭГилированного FGF21 дикого типа, также как и не-ПЭГилированного FGF21 дикого типа.

В продолжение верхнего графика на фиг. 6 графические данные представлены для ПЭГилированных K69C и D79C мутантов, также как и N-терминально ПЭГилированного FGF21 дикого типа, и для не-ПЭГилированного FGF21 дикого типа. На нижнем графике фиг. 6 представлены данные для ПЭГилированных R175C и Y179C мутантов и N-терминально ПЭГилированного FGF21 дикого типа, также как и не-ПЭГилированного FGF21 дикого типа. Удивительно, но многие из этих молекул имеют *in vitro* активность, близкую к таковой для не-ПЭГилированной молекулы.

Пример 10.B. EC50 значения для выбранных Arg/Lys FGF21 мутантов.

Как описано в примере 3, был генерирован ряд FGF21 мутантных полипептидов, в которых сайты присоединения природного полимера (например, сайты ПЭГилирования) были удалены путем мутагенеза. В этих FGF21 мутантах реактивные Lys группы были сначала мутированы в аргинин, оставляя в наличии лишь N-концевую α -аминогруппу для ПЭГилирования. Затем выбранные аргининовые остатки, как природные так и мутантные, были конвертированы один за другим в лизин, вводя тем самым вторичный сайт ПЭГилирования в определенных положениях на поверхности FGF21. Одной из целей этой стратегии было сгенерировать FGF21 мутантные полипептиды, в которых полимер (например, молекула ПЭГ) был бы конъюгирован в одном или нескольких специфических, известных местоположениях.

Были генерированы различные аргинин/лизиновые FGF21 мутантные полипептиды, и активность определялась в *in vitro* ELK-люциферазной пробе, описанной в настоящей заявке. В табл. 10 представлена сводка полученных данных:

Таблица 10. Сводка данных по EC50 для ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих лизин/аргининовые мутации

Конструкт	Тип ПЭГ	<i>In Vitro</i> активность EC ₅₀ (нМ)
Природный FGF21	ПЭГ отсутств.	3
Природный FGF21 (N-конец)	1 x 20k	43.3
Природный FGF21 (произвольн.)	2 x 20k	200
FGF21(все K ко всем R)	1 x 20k	Nd
FGF21(все K ко всем R, R36K)	2 x 20k	73
FGF21(все K ко всем R, R77K)	2 x 20k	175
FGF21(K56/59/69R)	2 x 20k	500
FGF21(K все R, R126K)	2 x 20k	38
FGF21(K59R/K69R/K122R)	2 x 20k	499
FGF21(K56R/K69R/K122R)	2 x 20k	215
FGF21(K56R/K59R/K122R)	2 x 20k	531
FGF21(все K ко всем R, R72K)	2 x 20k	>1000
FGF21(все K ко всем R, R175K)	2 x 20k	>1000

Пример 10.C. EC50 значения для выбранных ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих две мутации.

Активность ряда FGF21 мутантных полипептидов, включающих две мутации, также изучалась в

ERK-люциферазной пробе, описанной здесь. Эти мутанты были созданы способами генной инженерии для введения двух сайтов присоединения неприродных полимеров (в форме цистеинового остатка) и мутации, дающей повышенную протеолитическую стабильность (P171G) в FGF21 последовательности дикого типа.

Были генерированы различные FGF21 мутантные полипептиды, и активность определялась в *in vitro* ELK-люциферазной пробе, описанной здесь. EC50 значения из этих экспериментов приведены ниже в табл. 11.

Таблица 11. EC50 значения для выбранных химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих две мутации

Мутации	EC50 (нМ)
Природный FGF21	3
N-конц. PEG20K	37
E37C, R77C	21
G120C, H125C	23
R77C, E91C	26
R77C, H125C	30
E91, H125C	32
R77C, G120C	34
E37C, E91C	36
E91C, R175C	46
E37C, R175C	50
E91C, G120C	54
E37C, G120C	55
R77C, R175C	62
E37C, H125C	64
E37C, K69C	67
K69C, E91C	69
G120C, R175C	118
K69C, G120C	119
K69C, H125C	164
K69C, R77C	180
H125C, R175C	200
K69C, R175C	318
E37C, G170C	163

Параллельно были приготовлены дважды-ПЭГилированные FGF21 мутанты с использованием отдельных цистеиновых мутантов, полученных в примере 10А, но несущие также усиливающую стабильность P171G мутацию. Эти мутанты были сайт-селективно ПЭГилированы как в N-конце так и полученном способом генной инженерии цистеине с использованием смешанных химических способов ПЭГилирования, как описано ранее (см. патент США № 6420339). Поскольку смешанная химия ПЭГилирования позволяет делать различие между N-концом и цистеиновыми сайтами конъюгации, возможно также сайт-селективным образом присоединить разные полимеры к разным сайтам. В этом случае был приготовлен ряд конъюгатов, где комбинации 5, 10 и 20 кДа полимеров были сопряжены с N-концом, и 20 кДа полимер был согласованным образом сопряжен с цистеиновым мутантом. Это позволило оценить влияние N-концевого ПЭГилирования на FGF21 *in vitro* активность. Все эти конъюгаты испытывались в *in vitro* ELK-люциферазной пробе, описанной в настоящей заявке. Результаты представлены в табл. 12.

Таблица 12. EC50 значения для выбранных химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих цистеиновую мутацию и мутацию P171G

Мутация	Тип ПЭГ	EC50 (нМ)
R77C, P171G	2 x 20k	64
H125C, P171G	2 x 20k	152
H125C, P171G	1 x 10k, 1 x 20k	65
H125C, P171G	1 x 5k, 1 x 20k	30

Пример 10.D. EC50 значения для выбранных химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих три мутации.

Активность ряда FGF21 мутантных полипептидов, включающих три мутации, также изучалась в ERK-люциферазной пробе, описанной в данной заявке. Эти мутанты были получены способами генной инженерии для введения двух сайтов присоединения неприродных полимеров (в форме цистеинового остатка) и мутации, дающей усиленную протеолитическую стабильность (P171G) в FGF21 последовательности дикого типа.

Были генерированы различные FGF21 мутантные полипептиды, и активность определялась в *in vitro* ELK-люциферазной пробе, описанной здесь. Сводка полученных данных приведена в табл. 13.

Таблица 13. EC50 значения для выбранных химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих три мутации

Мутации	Тип ПЭГ	EC50 (нМ)
E37C, R77C, P171G	2X 20 кДа	27
E91, H125C, P171G	2X 20 кДа	37
R77C, G120C, P171G	2X 20 кДа	35
E37C, E91C, P171G	2X 20 кДа	30
E91C, R175C, P171G	2X 20 кДа	155
E37C, R175C, P171G	2X 20 кДа	162
E91C, G120C, P171G	2X 20 кДа	34
E37C, G120C, P171G	2X 20 кДа	35
R77C, R175C, P171G	2X 20 кДа	ND
E37C, H125C, P171G	2X 20 кДа	37

Удивительно, но полученные данные указывают, что большинство этих дважды ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов имеют активность, превышающую таковую у N-терминально моно-ПЭГилированной молекулы.

Пример 11. EC50 значения для выбранных FGF21 "связанных молекул".

"Связанные молекулы" настоящего изобретения включают две FGF21 полипептидных последовательности, связанные вместе молекулой линкера. Фиг. 7 графически изображает пример "связанной молекулы". Как описано здесь, предполагалось, что эти "связанные молекулы" дадут более продолжительные периоды полураспада, сохраняя в то же время желательный уровень биологической активности.

Были генерированы различные "связанные молекулы", и активность определялась в *in vitro* ELK-люциферазной пробе, описанной в настоящей заявке. Данные генерированные "связанные молекулы" включают FGF21 мутанты, в которых данная мутация вводит сайт присоединения линкера. Несколько FGF21 мутантов были двойными мутантами, и они включают P171G мутацию для повышения протеолитической стабильности. Условия и процедуры для этого *in vitro* исследования были такими же, как и в примере 10. Полученные данные приведены в табл. 14.

Таблица 14. EC50 значения для выбранных FGF21 "связанных молекул"

Мутации	Линкер	EC50 (нМ)
H125C, P171G	20 кДа ПЭГ	0.21
R77C, P171G	20 кДа ПЭГ	0.25
G120C, P171G	20 кДа ПЭГ	0.51
E37C, P171G	20 кДа ПЭГ	0.36
R175C, P171G	20 кДа ПЭГ	0.36
E91C, P171G	20 кДа ПЭГ	0.20
G170C	20 кДа ПЭГ	0.47
P171C	20 кДа ПЭГ	0.21

Из данных табл. 14 видно, что указанные "связанные молекулы" обладают удивительно высокой *in vitro* активностью, равной или превышающей таковую для не-ПЭГилированной молекулы, которая, для ссылки, была найдена равной 0,63.

Пример 12. *In vivo* активность химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов.

FGF21 обладает рядом биологических активностей, включая способность снижать уровни глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови; уменьшать вес тела; или увеличивать толерантность к глюкозе, расход энергии или чувствительность к инсулину. После первоначальной *in vitro* оценки, описанной в примере 10, ПЭГилированные FGF21 мутантные полипептиды были дополнительно проанализированы на *in vivo* FGF21 активность. ПЭГилированные FGF21 полипептиды вводились инсулинрезистентным *ob/ob* мышам, и измерялась способность конкретного ПЭГилированного FGF21 полипептида снижать уровень глюкозы в крови. Процедура для *in vivo* исследования была следующей.

Испытываемый ПЭГилированный FGF21 полипептид вводили в виде инъекции интраперитонеально 8 недельным *ob/ob* мышам (лаборатория Jackson), и пробы крови отбирались в разные моменты времени после единичной инъекции например, 0, 6, 24, 72, 120 и 168 ч после инъекции. Уровни глюкозы в крови измерялись с помощью глюкометра OneTouch (LifeScan, Inc. Milpitas, CA), и результаты выражались как процентное изменение уровня глюкозы в крови относительно базового уровня (т.е. в 0 момент времени).

FGF21 мутанты генерировались, как здесь описано, и химически модифицировались путем добавления двух 20 кДа метокси ПЭГ малеинимидных молекул, по одной в каждый из введенных сайтов присоединения полимера, которые обычно были цистеиновыми остатками. Данные мутации были выбраны, чтобы ввести дискретные, известные точки присоединения для двух молекул ПЭГ. ПЭГилирование FGF21 мутантов достигалось с использованием описанных здесь способов.

Пример 12.A. *In vivo* активность N-терминально ПЭГилированных FGF21 дикого типа.

FGF21 дикого типа, который был химически модифицирован путем ПЭГилирования в N-конце данного полипептида, изучался на модели *ob/ob* мыши. Не-ПЭГилированный FGF21 дикого типа также изучался в том же эксперименте, и в качестве контроля использовался фосфатно-солевой буферный раствор. Для N-терминального ПЭГилирования FGF21A дикого типа использовалась единичная молекула 20 кДа метокси ПЭГ имида малеиновой кислоты. Фиг. 8 демонстрирует результаты этого эксперимента.

Как природный так и N-терминально ПЭГилированный FGF21 дикого типа снижал уровни глюкозы в крови на 30-40% после единичной инъекции. Однако уровни глюкозы в крови возвращались на базисный уровень через 24 ч после инъекции природного FGF21 дикого типа. В противоположность этому N-терминально ПЭГилированный FGF21 дикого типа поддерживал снижающую уровень глюкозы в крови активность на протяжении по меньшей мере 72 ч. Результаты этого исследования указывают, что ПЭГилирование FGF21 дикого типа пролонгирует фармакодинамические эффекты природной молекулы.

Что касается фиг. 9, исследование типа доза-реакция было проведено на модели *ob/ob* мыши с использованием FGF21 дикого типа, который был ПЭГилирован в N-конце 20, 30 или 40 кДа ПЭГ молекулой. Фиг. 9 демонстрирует, что молекулы 30 и 40 кДа ПЭГ имеют большую и более длительную снижающую глюкозу активность, чем ПЭГ молекула 20 кДа, что предполагает, что размер молекулы ПЭГ положительно коррелирует с *in vivo* фармакодинамическими эффектами.

Пример 12.A.1. *In Vivo* активность выбранных химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, конъюгированных как в N-конце так и во введенном сайте присоединения полимера.

Несколько химически модифицированных мутантов FGF21, которые были сайт-селективно ПЭГилированы как в N-конце так и во втором сайте, созданном способами генной инженерии, изучались на модели *ob/ob* мыши. Эти дважды-ПЭГилированные FGF21 конструкторы были все ПЭГилированы в N-конце и во втором сайте, включающем либо созданный способами генной инженерии лизин, как описано в примере 4, или созданный способами генной инженерии цистеин, как описано в примере 6.

Подобный эксперимент был проведен с использованием другой группы ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов. Фиг. 10 включает два графика, показывающих процентное изменение уровней

глюкозы в крови у мышей, которым путем инъекции вводили наполнитель (фосфатно-солевой буферный раствор), или ПЭГилированные формы FGF21 мутантов, включающие мутации присоединения полимеров, т.е. FGF21 R77C, который также был N-терминально ПЭГилирован, и FGF21 R126K, который также был N-терминально ПЭГилирован (верхний график), и N-терминально ПЭГилированный F77/P171G (нижний график), которые также были ПЭГилированы на введенных сайтах присоединения полимера. Были использованы 20 кДа молекулы метокси ПЭГ малеинимида. Результаты этого эксперимента вновь подтверждают, что дважды ПЭГилированные FGF21 мутанты демонстрируют усиленную фармакодинамику относительно протеина FGF21 дикого типа при сохранении снижения глюкозы в течение по меньшей мере 120 ч.

Пример 12.B. In vivo активность выбранных химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов, включающих две или три мутации.

Ряд химически модифицированных FGF21 мутантных полипептидов изучался на модели ob/ob мышей. Эти мутанты были химически модифицированы путем добавления двух 20 кДа метокси ПЭГ малеинимидных молекул, по одной в каждый из введенных цистеиновых остатков, и в случае FGF21 мутантных полипептидов, включающих отдельную мутацию, в N конце данного полипептида. Данные мутации выбирались таким образом, чтобы ввести дискретные, известные точки присоединения для одной или нескольких молекул ПЭГ. Некоторые FGF21 мутанты также включали P171G мутацию для усиления протеолитической резистентности. ПЭГилированные FGF21 мутантные полипептиды вводились путем инъекции мышам, и мышам делали кровопускание через некоторые интервалы времени на протяжении 9-суточного исследования.

Пример 12.B.1. Влияние на уровни глюкозы.

Был проведен эксперимент с использованием еще одной группы ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов. Фиг. 11 представляет собой график, показывающий процентное изменение уровней глюкозы в крови мышей, которым делались инъекции наполнителя (фосфатно-солевой буферный раствор), или дважды ПЭГилированных форм FGF21 мутантов, включающих мутации, а именно, E91/H125C, E91C/R175C, E37C/G120C, E37C/H125C, E37C/R175C; изучался также не-ПЭГилированный Fc-G170E FGF21. Использовали 20 кДа молекулы метокси ПЭГ малеинимида. Результаты этого эксперимента вновь подтверждают, что дважды ПЭГилированные мутанты демонстрируют усиленную фармакодинамику относительно протеина FGF21 дикого типа.

Схожий эксперимент был проведен с использованием еще одной группы ПЭГилированных FGF21 мутантных полипептидов. Фиг. 12 представляет собой график, показывающий процентное изменение уровней глюкозы в крови мышей, которым делались инъекции наполнителя (фосфатно-солевой буферный раствор), или дважды ПЭГилированных форм FGF21 мутантов, включающих мутации, а именно, N-терминально ПЭГилированного R77C, который также был ПЭГилирован во введенном полимеризационном сайте, N-терминально ПЭГилированного R126K, который также был ПЭГилирован на введенном полимеризационном сайте, E91/G120C, G120C/H125C и E37C/R77C; также исследовался не-ПЭГилированный Fc-G170E FGF21. Были использованы молекулы 20 кДа метокси ПЭГ малеинимида. Результаты этого эксперимента подтверждают, что дважды ПЭГилированные FGF21 мутанты демонстрируют усиленную фармакодинамику относительно FGF21 протеина дикого типа.

В другом эксперименте фиг. 13 показывает влияние ПЭГилированных FGF21 мутантов на уровни глюкозы в крови мышей в течение 9-суточного исследования. Эти данные демонстрируют, что ПЭГилированные молекулы имеют увеличенную in vivo активность, по сравнению с таковой для природной молекулы. На фиг. 13 результаты были получены с ПЭГилированными E37C/R77C, E91C/R175C, E37C/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R175C/P171G и E37C/H125C/P171G FGF21 мутантами, которые были дважды ПЭГилированы на введенных сайтах присоединения полимеров. FGF21 мутанты были модифицированы двумя молекулами 20 кДа метокси ПЭГ малеинимида в этом исследовании, и использованный наполнитель представлял 10 mM фосфат калия, 5% сорбит, pH 8.

Как показано на фиг. 13, данные три двойные мутантные дважды ПЭГилированные молекулы E37C/R77C, E91C/R175C, E37C/H125C уменьшали уровни глюкозы в крови, и данные эффекты сохранялись в течение 72 ч после единичной инъекции. Интересно, что введение P171G мутации дополнительно пролонгировало эти in vivo действия, и максимальные снижающие глюкозу действия сохранялись в течение еще 2 суток при полной продолжительности действия 120 ч.

Кроме того, параллельно с несколькими "связанными молекулами" изучалась способность к снижению глюкозы нескольких FGF21 полипептидов, включающих три мутации. Тройными использованными мутантами были E37C/R77C/P171G и E91C/H125C/P171G; указанные "связанные молекулы" включали два идентичных FGF21 мутантных полипептида, включающих две мутации, а именно, E37C/P171G и R77C/P171G. 20 кДа метокси ПЭГ малеинимидные молекулы использовались для дважды ПЭГилированных форм FGF21, также как и для молекулы линкера в "связанной молекуле". Результаты этого эксперимента приведены на фиг. 14. По сравнению со "связанными" FGF21 мутантами, дважды ПЭГилированные мутанты имели дополнительно усиленную фармакодинамику. Снижающая глюкозу активность дважды ПЭГилированных мутантов сохранялась в течение, по меньшей мере, 168 ч, по сравнению со 120 часами для "связанных" FGF21 мутантов.

Фиг. 15 представляет собой график процентного изменения глюкозы в крови в зависимости от дозы в ob/ob мышцах, которым вводились инъекции наполнителя (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 8,5) или различные дозы дважды ПЭГилированного E37C/R77C/P171G FGF21 мутантного полипептида в течение девятисуточного периода. Результаты этого эксперимента демонстрируют, что дважды ПЭГилированный тройной мутант E37C/R77C/P171G снижал уровни глюкозы в крови в ob/ob мышцах в зависимости от дозы. Уровень дозы 0,3 мг/кг давал почти максимальную снижающую глюкозу активность, и эти эффекты сохранялись в течение по меньшей мере 5 суток. Дальнейшее повышение *in vivo* активности и продолжительности действия наблюдались, когда уровень дозы повышался до 1 мг/кг.

Пример 12.В.2. Влияние на вес тела.

Диабет 2 типа часто сопровождается повышенным ожирением и избыточным весом тела. Поэтому лучше, когда терапевтическая молекула дает желательный эффект по снижению веса тела, также как и желательный эффект в отношении снижения уровней глюкозы в крови. Соответственно, многие из описанных здесь ПЭГилированных FGF21 мутантов оценивались в отношении их влияния на вес тела мышей.

Для изучения влияния различных FGF21 мутантных полипептидов на вес тела ПЭГилированные дикого типа и FGF21 мутантные полипептиды вводились путем интраперитонеальной инъекции 8-недельным ob/ob мышам (лаборатория Jackson), и вес тела контролировался в разные моменты времени после однократной инъекции, например 0, 24, 72, 120 и 168 ч после инъекции.

Фиг. 16 показывает влияние ПЭГилированных FGF21 мутантов на вес мышей на протяжении периода исследования. Результаты были получены с использованием дважды ПЭГилированных E37C/R77C, E91C/R175C, E37C/H125C, E37C/R77C/P171G, E91C/R175C/P171G и E37C/H125C/P171G FGF21 мутантных полипептидов. FGF21 мутанты были модифицированы в этом исследовании молекулами 20 кДа метокси ПЭГ малеинимида. Эти FGF21 мутанты также изучались в отношении изменений уровней глюкозы, и эти результаты представлены на фиг. 13. Совместно эти данные демонстрируют, что мыши, получающие ПЭГилированные FGF21 мутанты, набирали меньший вес относительно контрольного наполнителя и что FGF21 мутантные полипептиды, включающие резистентную к протеолизу мутацию P171G, более эффективны, чем их P171 двойники дикого типа.

Фиг. 17 представляет собой график, показывающий изменение веса тела мышей, инъектированных носителем или дважды ПЭГилированными формами FGF21 мутанта, включающего мутации, а именно, E37C/R77C/P171G; E91C/H125C/P171G; R77C/P171G; и "связанными молекулами", включающими в одном случае два E37C/P171G FGF21 мутантных полипептида, и в другом случае два R77C/P171G FGF21 мутантных полипептида. В ПЭГилированных формах FGF21 использовались 20 кДа метокси ПЭГ малеинимидные молекулы, тогда как для "связанных молекул" использовались 20 кДа ПЭГ бисмалеинимидные молекулы. Эти FGF21 мутанты также изучались в отношении изменений уровней глюкозы, и результаты приведены на фиг. 14. Совместно эти данные демонстрируют, что мыши, получающие ПЭГилированные FGF21 мутанты, набирали меньший вес, по сравнению с контрольным наполнителем. Наблюдалось также, что дважды ПЭГилированные FGF21 мутантные полипептиды были более эффективными в снижении веса тела, чем изученные "связанные молекулы".

Влияние дважды ПЭГилированного FGF21 мутантного полипептида на вес тела также изучалось в многодозовом исследовании. Фиг. 18 представляет собой график, показывающий изменение веса тела в зависимости от дозы в ob/ob мышцах, инъектированных наполнителем или разными дозами дважды ПЭГилированного E37C/R77C/P171G на протяжении девятисуточного периода. Этот FGF21 мутант изучался также в отношении изменений уровней глюкозы, и результаты представлены на фиг. 15. Совместно, эти данные демонстрируют, что дозовый уровень 0,3 мг/кг достаточен для снижения веса тела ob/ob мышей после единичной инъекции.

Пример 13. Исследование почечных вакуолей мышей.

Одним соображением в плане использования ПЭГ и других полимеров для расширения периода полураспада терапевтического протеина является возможность того, что ПЭГилированная молекула будет образовывать почечные вакуоли. Это свойство ПЭГ хорошо документировано (см., например, работы Bendele et al., 1998, "Short Communication: Renal Tubular Vacuolation in Animals Treated with Polyethylene-glycol-conjugated Proteins", *Toxicological Sciences*, 42:152-157 и Conover et al., 1996, "Transitional Vacuole Formation Following a Bolus Infusion of PEG-hemoglobin in the Rat", *Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech.* 24:599-611) и может быть непредсказуемым. ПЭГилированная молекула, которая индуцирует образование почечных вакуолей, обычно, но не обязательно, делает данную молекулу менее желательной в качестве терапевтического протеина. При некоторых обстоятельствах вакуолизация почек вызывает меньшее беспокойство и с ней можно мириться. Соответственно, на мышах было проведено продолжительное исследование почечных вакуолей.

FGF21 мутантные полипептиды были генерированы, как описано здесь. Одно исследование было спланировано и проведено следующим образом. Множественно ПЭГилированные FGF21 молекулы вводились один раз в день на протяжении 7 последовательных дней посредством подкожной инъекции самкам C57BL/6 мышей (3/группу) при дозе 10 мг/кг; таким же способом вводились контрольный наполнитель (10 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 8) и 2 позитивных контроля. Перед введением каждой дозы все

животные подвергались детальным клиническим наблюдениям и спустя 1-2 ч после введения дозы на 1, 3 и 6 сутки; наблюдения извне клетки собирались спустя 1-2 ч после введения дозы во все другие дни дозирования. Данные по весу тела собирались перед каждым введением дозы и при аутопсии. Почки и печень отбирались у всех животных для гистологического анализа. Сводка результатов данного исследования представлена в табл. 15.

Таблица 15. Сводка данных по исследованию почечных вакуолей

Молекула	Почка	Печень
Носитель	0.0	0.0
Позитивный контроль	3.7	0.0
FGF21-1X-NT(ПЭГ20К)	2.0	0.0
H126C 1X-ПЭГ20К	2.3	0.0
R78C 1X-ПЭГ20К	2.3	0.0
K70C 1X-ПЭГ20К	2.0	0.0
G121C 1X-ПЭГ20К	2.0	0.0
E38C 1X-ПЭГ20К	2.0	0.0
R176C 1X-ПЭГ20К	3.0	0.0
E92C 1X-ПЭГ20К	2.7	0.0
N122C 1X-ПЭГ20К	2.0	0.0
R127C 1X-ПЭГ20К	3.0	0.0
G114C 1X-ПЭГ20К	2.7	0.0
D80C 1X-ПЭГ20К	2.0	0.0
D47C 1X-ПЭГ20К	3.0	0.0
H112C 1X-ПЭГ20К	2.6	0.0
K56R, K59R, K69R, K122R, R175K 2X-ПЭГ20К	0.0	0.0
K56R, K59R, K69R, K122R, R77K 2X-ПЭГ20К	0.0	0.0
K56R, K59R, K69R, K122R, R72K 2X-ПЭГ20К	0.0	0.0

Табл. 15 демонстрирует результаты 7-суточного исследования мышинных вакуолей, проведенного с использованием наполнителя (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,5), N-терминально ПЭГилированной формы FGF21, также как и ПЭГилированных форм FGF21 мутантов, включающих мутации H125C, R77C, K69C, G120C, E37C, R175, E91C, N121C, R126C, G113C, D79C, D46C и H112C. Как указано в таблице, использовалась либо одна, либо две 20 кДа метокси ПЭГ малеинимидные молекулы. Вакуольные показатели находятся в пределах от 0, отвечающего отсутствию наблюдаемых изменений в вакуолях относительно контроля, до 4, что отвечает интенсивному образованию вакуолей. Как очевидно из табл. 15, все моно-ПЭГилированные FGF21 мутанты индуцировали образование почечных вакуолей. Однако ни один из дважды-ПЭГилированных FGF21 мутантов не индуцировал образования вакуолей. Отмечалось также, что в печени мышей вакуолизация не наблюдалась.

После однедельного исследования было предпринято 8 недельное хроническое исследование. В этом исследовании различные ПЭГилированные FGF21 молекулы вводились один раз в неделю путем подкожной инъекции на протяжении 8 недель самкам C57BL/6 мышей (5/группу) при дозах либо 5 либо 25 мг/кг; таким же способом вводился контрольный наполнитель (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,5). Все животные наблюдались в отношении клинических признаков раз в день перед введением дозы и спустя 1-2 ч после введения дозы в дни дозирования. Данные по весу тела собирались перед каждым введением дозы, начиная с дня 1 и затем на третий день после каждой дозы, и при аутопсии. Почки, печень и селезенку отбирали у всех животных (умирающих и подвергнутых конечной эвтаназии) для проведения гистологической оценки.

Фиг. 19A-19F представляют собой ряд графиков, где приведены результаты изменения веса тела, наблюдаемого в процессе восьминедельного исследования вакуолей, с использованием наполнителя (квадраты) и двух доз дважды ПЭГилированных FGF21 мутантов, а именно, 5 мг/кг (треугольники) и 25 мг/кг (незаштрихованные кружки). Изученные FGF21 мутанты включали R77C, P171G (фиг. 19A); E37C, R77C, P171G (фиг. 19B); E37C, H125C, P171G (фиг. 19C); E91C, H125C, P171G (фиг. 19D); E37C, P171G (фиг. 19E) и R77C, P171G (фиг. 19F). На фиг. 19A был использован подход смешанных химических способов, ведущий к N-концевому ПЭГилированию FGF21 мутанта, также как и ПЭГилированию на введенном сайте присоединения полимера, неприродного цистеина в положении 77. На фиг. 19B-19D был

использован подход одного химического способа, ведущий к ПЭГилированию на введенных сайтах присоединения полимера, неприродных цистеиновых остатков (цистеины в положениях 37 и 77 на фиг. 19B, положениях 37 и 125 на фиг. 19C, и положениях 91 и 125 на фиг. 19D). Наконец, на фиг. 19D и 19E была использована одна бис малеинимидная ПЭГ молекула для соединения двух FGF21 мутантов на неприродных цистеиновых остатках (цистеин в положении 37 на фиг. 21E и положении 77 на фиг. 19F).

Фиг. 20 включает две гистограммы, изображающие средний показатель почечных вакуолей, наблюдаемых в процессе восьминедельного исследования почечных вакуолей для двух доз, 5 и 25 мг/кг, шести однократно или дважды ПЭГилированных FGF21 мутантов. Показатель 0 указывает, что образования новых вакуолей, помимо тех, что были найдены в контрольных животных, не наблюдалось, тогда как показатель 4 указывает на интенсивное образование вакуолей относительно контроля. FGF21 мутанты были теми самими, что описаны на фиг. 19A-19E. Таким образом, для одного конструкта был использован подход смешанных химических способов, ведущий к N-концевому ПЭГилированию FGF21 мутанта, также как и ПЭГилированию на введенном сайте присоединения полимера, неприродного цистеина в положении 77. Для трех других конструктов был использован подход одного химического способа, ведущий к ПЭГилированию на введенных сайтах присоединения полимера, неприродных цистеиновых остатков (цистеины в положениях 37 и 77 в одном конструкте, положениях 37 и 125 во втором конструкте или положениях 91 и 125 в третьем конструкте). Наконец, была использована одна бис малеинимидная ПЭГ молекула для соединения двух FGF21 мутантов на неприродных цистеиновых остатках (цистеин в положении 37 или положении 77). P171G мутация вводилась в каждый из шести конструктов.

Хотя изобретение описано в рамках разных вариантов, для специалистов в данной области понятна возможность и других вариаций и модификаций. Поэтому предполагается, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные вариации, которые, как заявлено, входят в объем изобретения. Кроме того, использованные здесь заголовки разделов предназначены лишь для организационных целей, и их не следует рассматривать как ограничивающие предмет описанного изобретения.

На все цитируемые в этой заявке работы сделаны четкие ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> УОЛКЕР, Кеннет В.
ДЖЕГГ, Колин, В., Мл.
ХЕЙТ, Рэнди И.
БЕЛОУСКИ, Эдвард Дж.
ЛИ, Юэ-Шэн
МАЙКЛС, Марк Л.
СЮЙ, Цзин
ЭЛЛИСОН, Мюриэль М.
- <120> МУТАНТНЫЙ РЕЗИСТЕНТНЫЙ К ПРОТЕОЛИЗУ ПОЛИПЕПТИД FGF21 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
- <130> A-1451-US-PSP
- <140> 61/195761
- <141> 2008-10-10
- <160> 34
- <170> Патентная версия 3.3
- <210> 1
- <211> 630
- <212> ДНК
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- | | |
|--|-----|
| atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt | 60 |
| cttctgctgg gagcctgccca ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc | 120 |
| gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac | 180 |

ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc 240
 ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg 300
 ttctgtgcc agcgggcaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc 360
 tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac 420
 ggctcccgc tgcacctgcc agggaacaag tccccacacc gggaccctgc accccgagga 480
 ccagctcgct tctgccact accaggcctg cccccgcac ccccgagacc acccggaatc 540
 ctggccccc agcccccgga tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggg gggaccttcc 600
 cagggccgaa gcccagcta cgttctctga 630

<210> 2
 <211> 209
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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 Pro 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

<210> 3
 <211> 546
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 caccccatcc ctgactccag tctctctctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcgggtac 60
 ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcaggga ggatgggacg 120
 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctctctgc agctgaaagc cttgaagccg 180
 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg 240
 gccctgtatg gatcgctcca ctttgacct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt 300
 gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacaggcc tcccgtgca cctgccaggg 360
 aacaagtccc cacaccggga cctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca 420
 ggctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480
 ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540
 tctga 546

<210> 4
 <211> 181
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 4

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 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 Pro 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

<210> 5
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<220>
 <221> Другой признак
 <222> (1)..(2)
 <223> X является независимо любым аминокислотным остатком

<220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (4)..(5)
 <223> X является независимо любым аминокислотным остатком

<400> 5

Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Gly
 1 5

<210> 6
 <211> 4

<212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 6

Gly Gly Gly Gly
 1

<210> 7
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 10
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 11
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 11

Gly Gly Glu Gly Gly Gly
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 12

Gly Gly Glu Glu Glu Gly Gly Gly
 1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 13

Gly Glu Glu Glu Gly
 1 5

<210> 14
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 14

Gly Glu Glu Glu
 1

<210> 15
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 15

Gly Gly Asp Gly Gly Gly
 1 5

<210> 16
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 16

Gly Gly Asp Asp Asp Gly Gly
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 17

Gly Asp Asp Asp Gly
 1 5

<210> 18
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Линкерная последовательность

<400> 18

Gly Asp Asp Asp
 1

<210> 19
 <211> 21
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<400> 19

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Asp	Ser	Asp	Glu	Gly	Ser	Asp	Gly	Glu	Asp
1				5					10					15	

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				20

<210> 20

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<400> 20

Trp	Glu	Trp	Glu	Trp
1				5

<210> 21

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<400> 21

Phe	Glu	Phe	Glu	Phe
1				5

<210> 22

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<400> 22

Glu	Glu	Glu	Trp	Trp	Trp
1				5	

<210> 23

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<400> 23

Glu Glu Glu Phe Phe Phe
1 5

<210> 24

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<400> 24

Trp Trp Glu Glu Glu Trp Trp
1 5

<210> 25

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<400> 25

Phe Phe Glu Glu Glu Phe Phe
1 5

<210> 26

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<220>

<221> Другой признак

<222> (1) .. (2)

<223> X ЯВЛЯЕТСЯ НЕЗАВИСИМО ЛЮБЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ ОСТАТКОМ

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (4) .. (5)

<223> X ЯВЛЯЕТСЯ НЕЗАВИСИМО ЛЮБЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ ОСТАТКОМ

<400> 26

Хаа Хаа Tyr Хаа Хаа Gly
1 5

<210> 27

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (1)..(2)

<223> X ЯВЛЯЕТСЯ НЕЗАВИСИМО ЛЮБЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ ОСТАТКОМ

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (4)..(5)

<223> X ЯВЛЯЕТСЯ НЕЗАВИСИМО ЛЮБЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ ОСТАТКОМ

<400> 27

Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Линкерная последовательность

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (1)..(2)

<223> X ЯВЛЯЕТСЯ НЕЗАВИСИМО ЛЮБЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ ОСТАТКОМ

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (4)..(5)

<223> X ЯВЛЯЕТСЯ НЕЗАВИСИМО ЛЮБЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ ОСТАТКОМ

<400> 28

Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Gly

1 5

<210> 29

<211> 27

<212> ДНК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> Первичная последовательность

<400> 29

atggtggaac cttcccaggg ccgaagc

27

<210> 30

<211> 50

<212> ДНК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Первичная последовательность

<400> 30
 ctctctcggaс сctctgagca tgggtgggacc ttcccagggc cgaagcccca 50

<210> 31
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Первичная последовательность

<400> 31
 gaggagcctg ggagactcgt accaccctgg aagggtcccc gcttcggggt 50

<210> 32
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Первичная последовательность

<400> 32
 ggaaggttcc accatgctca gaggggtccga 30

<210> 33
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Первичная последовательность

<400> 33
 aggaggaata acatatgcat ccaattccag attcttctcc 40

<210> 34
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> ИСККУСТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Первичная последовательность

<400> 34
 tagtgagctc gaattcttag gaagcgtagc tgg 33

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный резистентный к протеолизу полипептид FGF21 с последовательностью SEQ ID NO: 4, содержащий замену на лизиновый остаток в положении 36 и по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой:

- (a) лизиновый остаток в одном или нескольких из положений 72, 77, 126 и 175;
- (b) цистеиновый остаток в одном или нескольких из положений 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179;
- (c) аргининовый остаток в одном или нескольких из положений 56, 59, 69 и 122;
- (d) глициновый остаток в положении 171.

2. Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

3. Клетка-хозяин, включающая вектор по п.2.

4. Клетка-хозяин по п.3, являющаяся эукариотической клеткой.

5. Способ получения полипептида, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты по п.1, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор по п.2, в условиях, обеспечивающих экспрессию указанной молекулы нуклеиновой кислоты, и выделение полипептида.

6. Изолированный мутантный резистентный к протеолизу полипептид FGF21 с последовательностью SEQ ID NO: 4, содержащий замену на лизиновый остаток в положении 36 и по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой:

- (a) лизиновый остаток в одном или нескольких из положений 72, 77, 126 и 175;
- (b) цистеиновый остаток в одном или нескольких из положений 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179;
- (c) аргининовый остаток в одном или нескольких из положений 56, 59, 69 и 122;
- (d) глициновый остаток в положении 171.

7. Изолированный полипептид по п.6, отличающийся тем, что с его С-концом ковалентно связан пролиновый или глициновый остаток.

8. Изолированный полипептид по п.6, отличающийся тем, что с его N-концом ковалентно связан ПЭГ-фрагмент.

9. Изолированный полипептид по п.7, ковалентно связанный с одним полимером, двумя полимерами или несколькими полимерами.

10. Изолированный полипептид по п.9, отличающийся тем, что один или два полимера являются водорастворимыми полимерами.

11. Изолированный полипептид по п.10, отличающийся тем, что водорастворимый полимер является полиэтиленгликолем (ПЭГ), монометокси-полиэтиленгликолем, декстраном, целлюлозой, поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликолем, пропиленгликолевым гомополимером, сополимером пропилен оксид/этилен оксида, полиоксиэтилированным полиолом или поливиниловым спиртом.

12. Изолированный полипептид по п.11, отличающийся тем, что водорастворимый полимер является ПЭГ.

13. Изолированный полипептид по п.9, отличающийся тем, что один или два полимера являются разветвленными полимерами.

14. Фармацевтическая композиция для лечения метаболического расстройства, выбранного из диабета, ожирения, дислипидемии, гипертензии, гепатостеатоза, такого как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), сердечно-сосудистого заболевания, такого как атеросклероз, и метаболического расстройства или состояния связанного со старением, включающая изолированный полипептид по п.6 и фармацевтически приемлемый агент.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый композиционный агент является носителем, адъювантом, солубилизатором, стабилизатором или антиоксидантом.

16. Способ лечения у человека метаболического расстройства, выбранного из диабета, ожирения, дислипидемии, гипертензии, гепатостеатоза, такого как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), сердечно-сосудистого заболевания, такого как атеросклероз, и метаболического расстройства или состояния, связанного со старением, включающий введение фармацевтической композиции по п.14.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что метаболическое расстройство представляет собой диабет или ожирение.

18. Фармацевтическая композиция для лечения метаболического расстройства, выбранного из диабета, ожирения, дислипидемии, гипертензии, гепатостеатоза, такого как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), сердечно-сосудистого заболевания, такого как атеросклероз, и метаболического расстройства или состояния связанного со старением, включающая первый мутантный резистентный к протеолизу полипептид FGF21 с последовательностью SEQ ID NO: 4, содержащий замену на лизиновый остаток в положении 36 и по меньшей мере одну аминокислотную замену, которая представляет собой:

- (а) лизиновый остаток в одном или нескольких из положений 72, 77, 126 и 175;
- (б) цистеиновый остаток в одном или нескольких из положений 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179;
- (с) аргининовый остаток в одном или нескольких из положений 56, 59, 69 и 122;
- (д) глициновый остаток в положении 171;

причем указанный первый полипептид соединен линкером со вторым полипептидом с последовательностью SEQ ID NO: 4 и содержащим по меньшей мере одну аминокислотную замену, представляющую собой:

- (а) лизиновый остаток в одном или нескольких из положений 36, 72, 77, 126 и 175;
 - (б) цистеиновый остаток в одном или нескольких из положений 37, 38, 46, 91, 69, 77, 79, 87, 91, 112, 113, 120, 121, 125, 126, 175, 170 и 179;
 - (с) аргининовый остаток в одном или нескольких из положений 56, 59, 69 и 122;
 - (д) глициновый остаток в положении 171;
- и фармацевтически или физиологически приемлемый агент.

19. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что с С-концами первого, второго или обоих полипептидов ковалентно связан пролиновый или глициновый остаток.

20. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что линкер представляет собой пептид или водонерастворимый полимер.

21. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что первый, второй или оба полипептида дополнительно ковалентно связаны с одним или двумя полимерами.

22. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что один или два полимера являются водорастворимыми полимерами.

23. Композиция по п.22, отличающаяся тем, что водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу, поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, пропиленгликолевый гомополимер, сополимер пропилен оксид/этилен оксида, полиоксиэтилированный полиол или поливиниловый спирт.

24. Композиция по п.23, отличающаяся тем, что водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

25. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что один или два полимера являются разветвленными.

26. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что с N-концами первого, второго или обоих полипептидов ковалентно связан ПЭГ-фрагмент.

27. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый агент является носителем, адъювантом, солюбилизатором, стабилизатором или антиоксидантом.

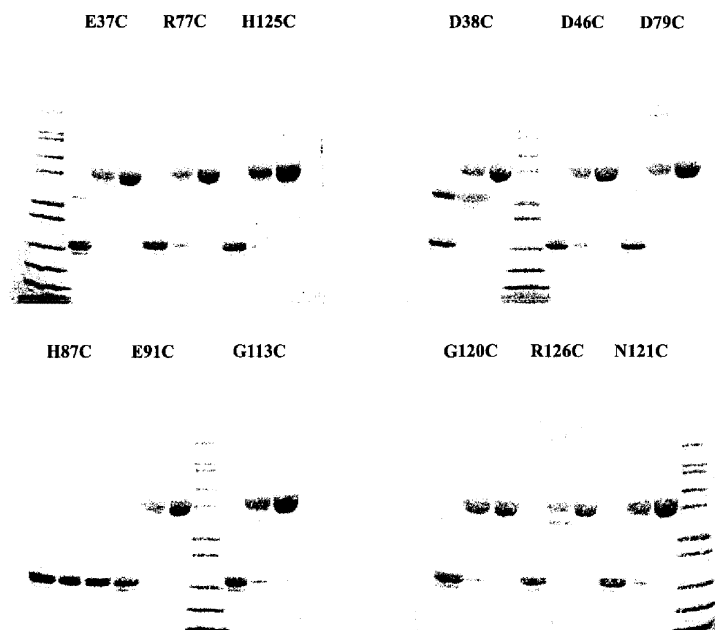
28. Способ лечения у человека метаболического расстройства, выбранного из диабета, ожирения, дислипидемии, гипертензии, гепатостеатоза, такого как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ); сердечно-сосудистого заболевания, такого как атеросклероз, и метаболического расстройства или состояния, связанного со старением, включающий введение композиции по п.19.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что метаболическое расстройство представляет собой диабет или ожирение.

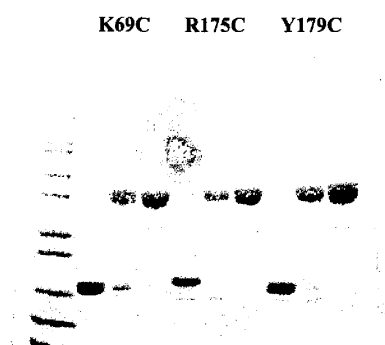
30. Способ по п.28, отличающийся тем, что метаболическое расстройство представляет собой гепатостеатоз, такой как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).



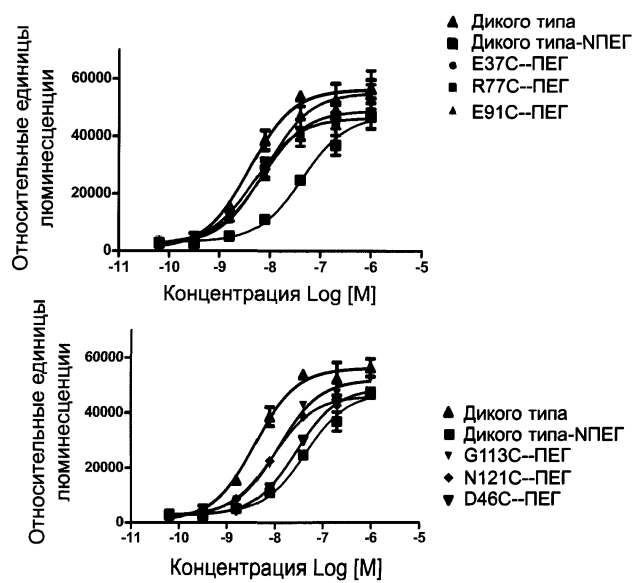
Фиг. 1



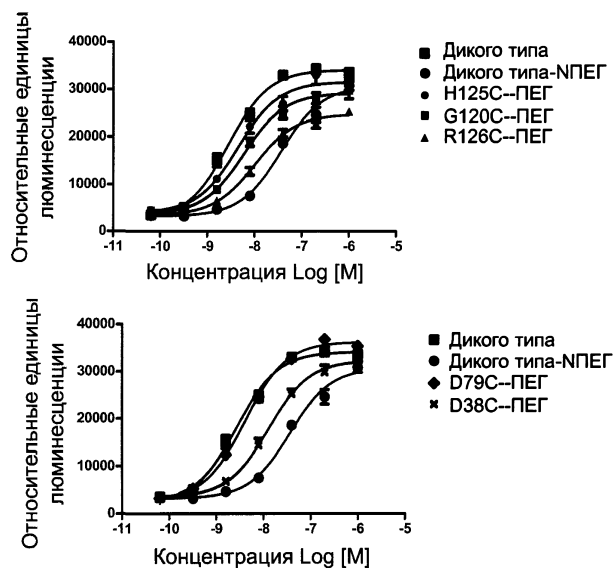
Фиг. 2



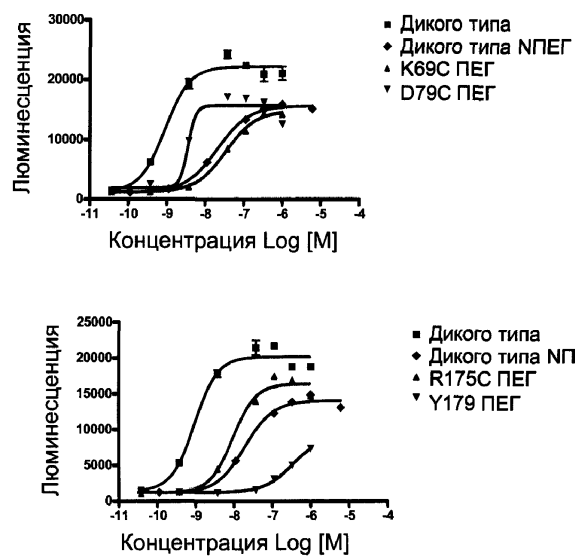
Фиг. 3



Фиг. 4



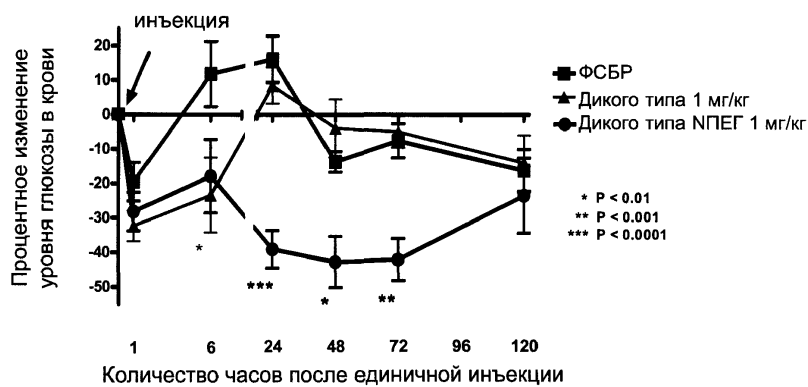
Фиг. 5



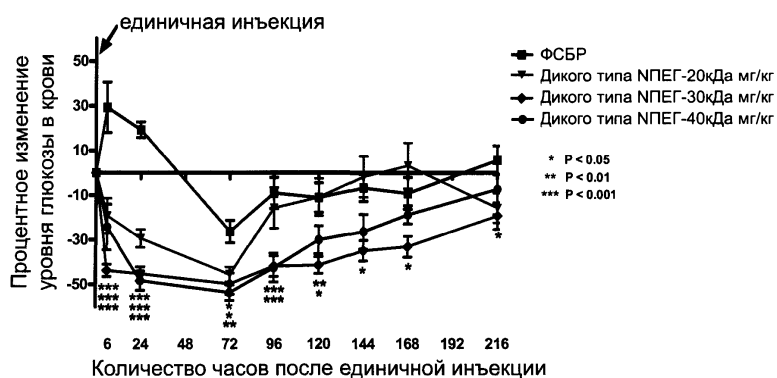
Фиг. 6



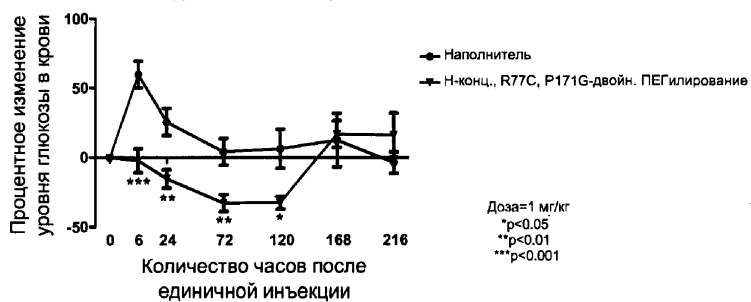
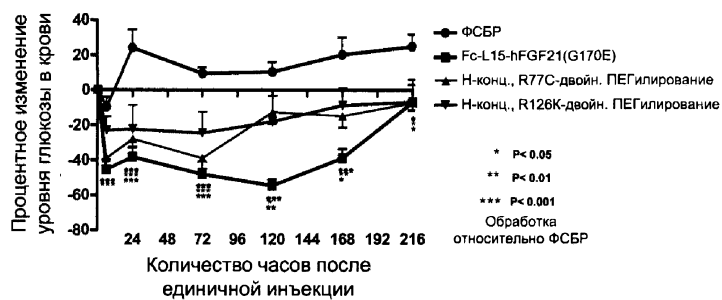
Фиг. 7



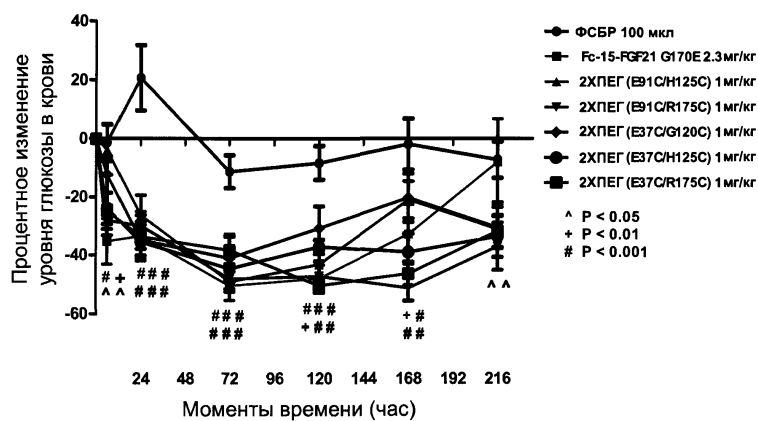
Фиг. 8



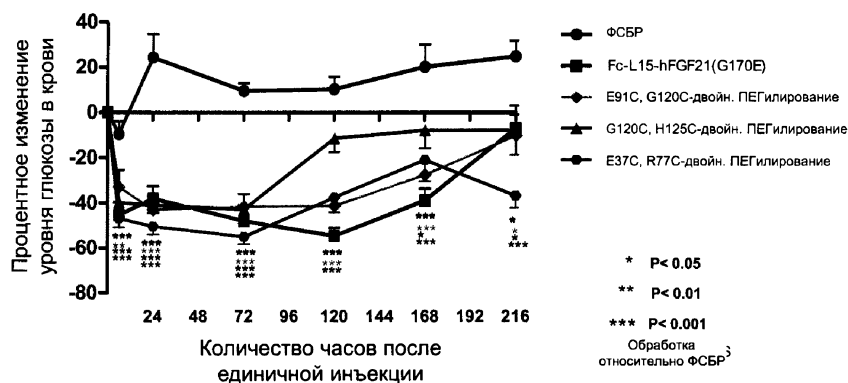
Фиг. 9



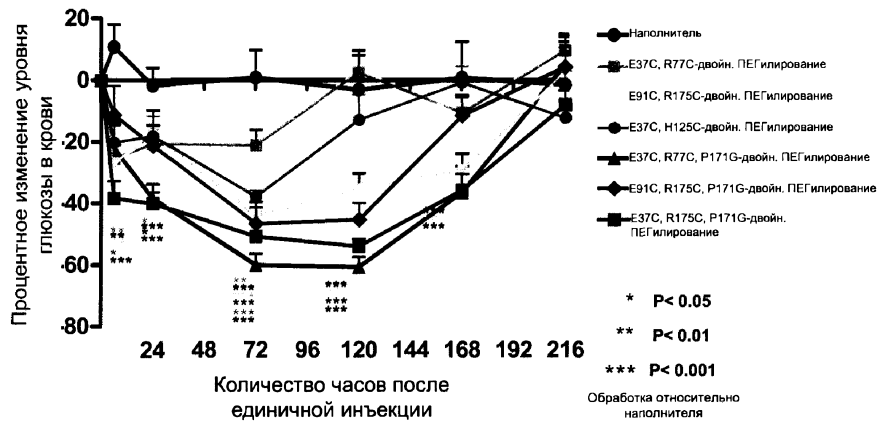
Фиг. 10



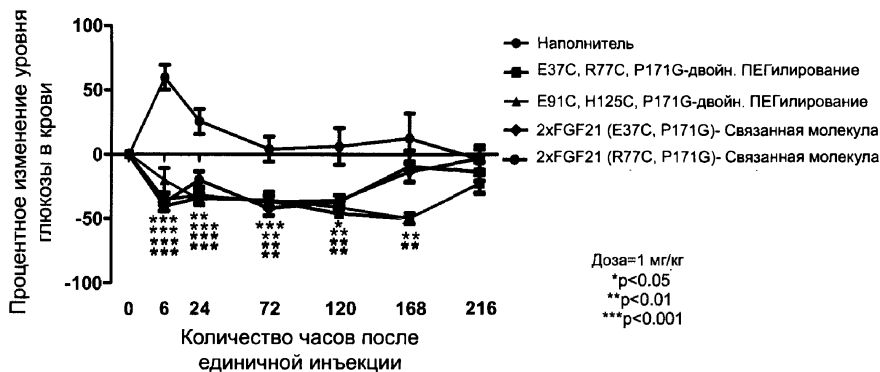
Фиг. 11



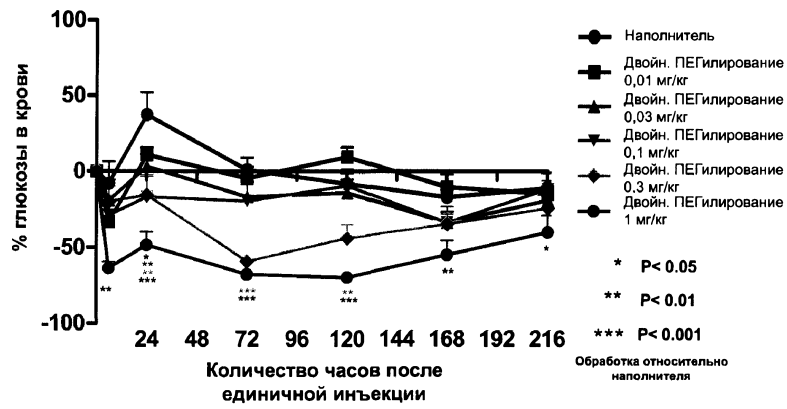
Фиг. 12



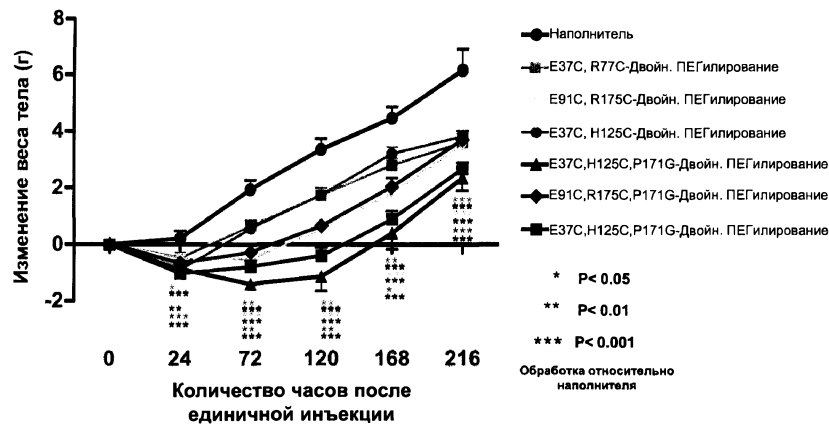
Фиг. 13



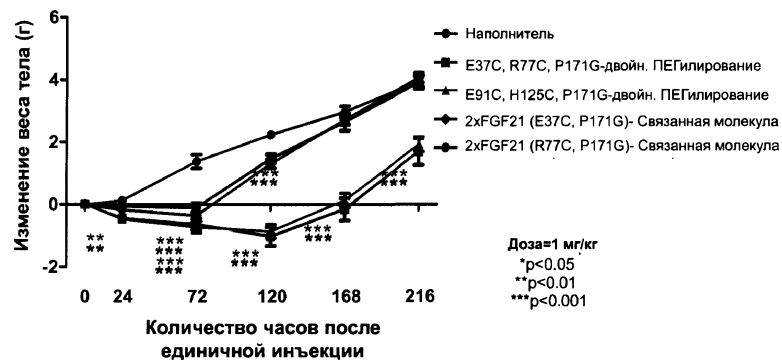
Фиг. 14



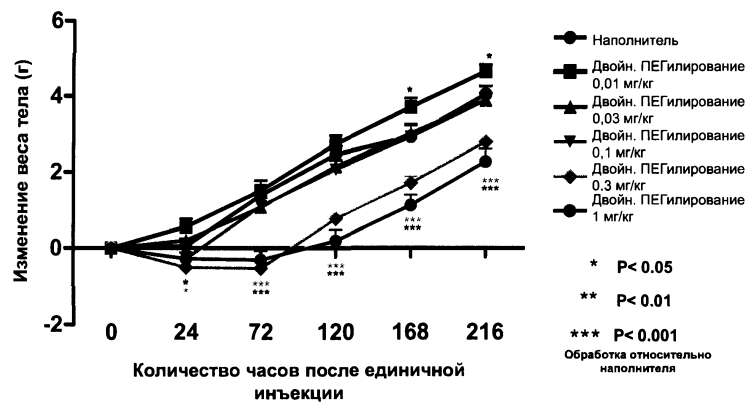
Фиг. 15



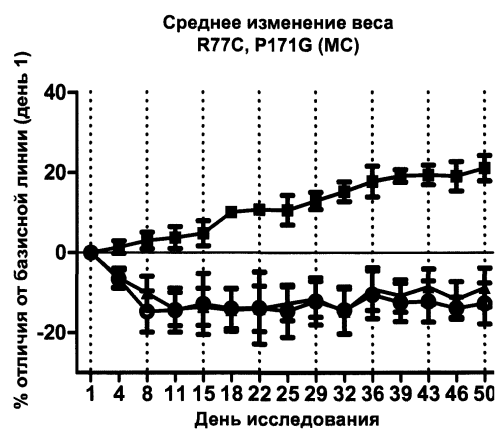
Фиг. 16



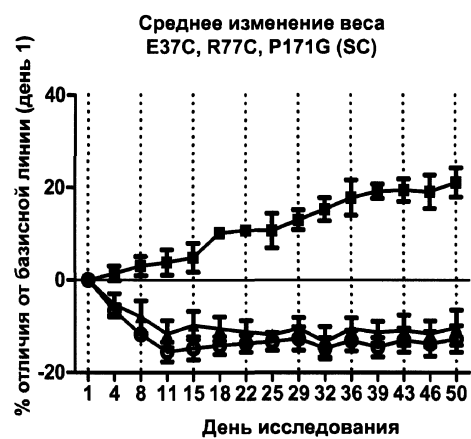
Фиг. 17



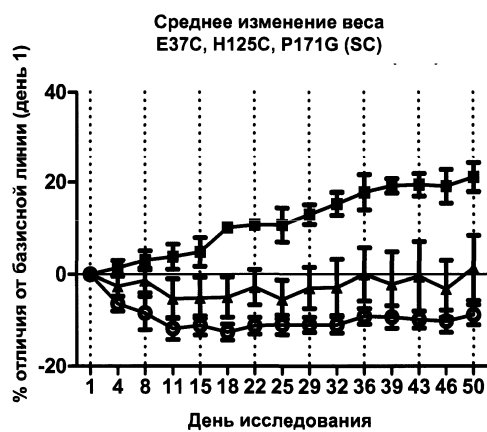
Фиг. 18



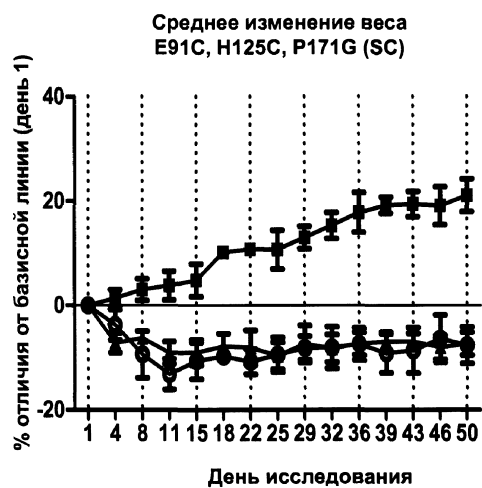
Фиг. 19А



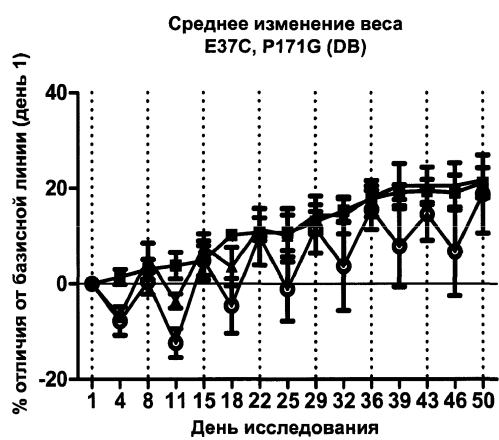
Фиг. 19В



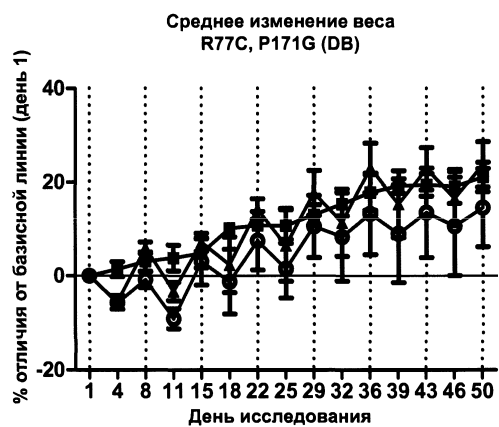
Фиг. 19С



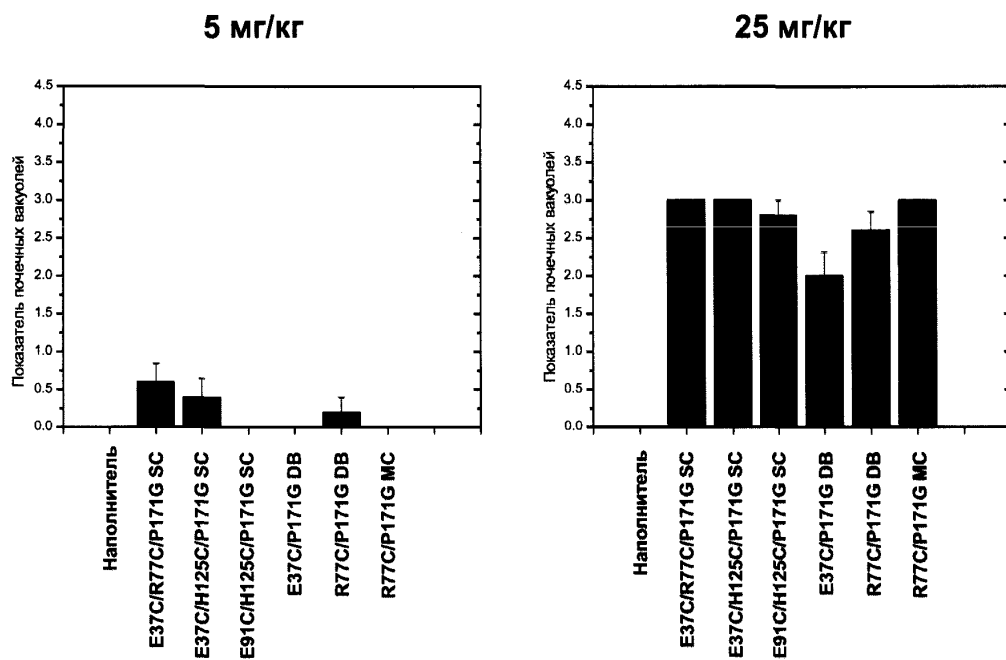
Фиг. 19D



Фиг. 19E



Фиг. 19F



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2