



등록특허 10-2692516



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월08일
(11) 등록번호 10-2692516
(24) 등록일자 2024년08월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1825 (2013.01)
A61K 38/1774 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0149338
- (22) 출원일자 2017년11월10일
심사청구일자 2020년11월04일
- (65) 공개번호 10-2018-0052545
- (43) 공개일자 2018년05월18일
- (30) 우선권주장
1020160149866 2016년11월10일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문현

KR1020140069249 A*

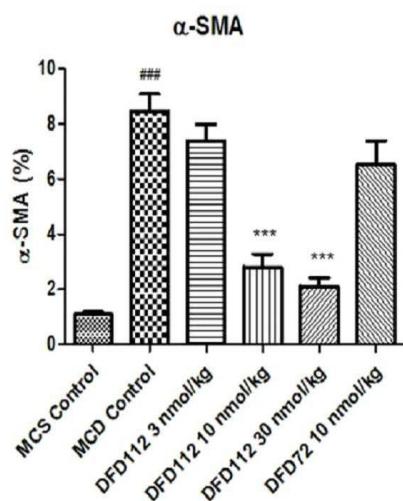
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 **융합 단백질을 포함하는 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물****(57) 요약**

본 발명은 간염증, 간섬유화, 간경화 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는, 생리활성 단백질과 FGF21 변이체 단백질을 포함하는 융합 단백질, 및 이를 포함한 약학적 조성물을 이용하여 간염증, 간섬유화, 간경화 예방 또는 치료에 효과가 우수한 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약학적 조성물은 간의 염증세포와 섬유화세포의 증식을 억제하는 효과가 있다. 따라서, 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도13a

(52) CPC특허분류

A61K 38/225 (2013.01)

A61K 38/26 (2013.01)

A61K 38/28 (2013.01)

Y10S 514/893 (2013.01)

(72) 발명자

최현호

경기도 수원시 영통구 중부대로448번길 28, 210동
2003호(원천동, 수원 원천2단지 주공아파트)

김도훈

경기도 용인시 기흥구 한보라2로14번길 13-8, 203
호(보라동)

김태왕

경기도 용인시 기흥구 한보라1로 144-6(공세동)

오세웅

경기도 수원시 장안구 화산로 85, 120동 1201호(천
천동, 천천 푸르지오)

송무영

경기도 수원시 영통구 권광로260번길 36, 114동
302호(매탄동, 현대힐스테이트아파트)

김종균

경기도 안양시 동안구 포도원로27번길 44, 102동
1302호(호계동, 현대아파트)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170049319 A*

KR1020170049320 A*

US20140243503 A1*

WO2010129503 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

급성바이러스성 간염, 만성 간염, 알코올성 간염, 자가면역성 간염, 전격성 간염, 간섬유화 및 간경화로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 약학적 조성물은 섬유모세포 성장 인자 21(FGF21) 변이체 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역, 및 생리활성 단백질을 포함하는 융합 단백질을 유효성분으로 함유하고,

상기 FGF21 변이체 단백질이 하기 (1) 내지 (3) 및 (5)의 변이들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하며,

- (1) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 98번 내지 101번 아미노산이 EIRP(서열번호: 68)로 치환됨;
- (2) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAV(서열번호: 69)로 치환됨;
- (3) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAN(서열번호: 70)으로 치환됨; 및
- (5) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 174번 아미노산이 N으로 치환됨;

상기 야생형 FGF21 단백질은 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지고,

상기 생리활성 단백질은 GLP-1 및 서열번호: 43 내지 46 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 GLP-1의 변이체에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 FGF21 변이체 단백질의 변이에 의해 도입된 N 잔기가 당화(glycosylation)된, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 FGF21 변이체 단백질이 서열번호: 6 내지 23 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질이 링커를 더 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 링커가 FGF21 변이체 단백질과 상기 면역글로불린의 Fc 영역을 연결하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 링커가 상기 면역글로불린의 Fc 영역의 C-말단 및 상기 FGF21 변이체 단백질의 N-말단에 연결된, 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 링커가 10 내지 30개의 아미노산 잔기로 이루어진 웹타이드인, 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 링커가 서열번호: 2 내지 5 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 면역글로불린의 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgD의 Fc 영역 중 어느 하나 또는 이들의 조합으로 이루어진 하이브리드 Fc인, 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 하이브리드 Fc가 IgG4 영역 및 IgD의 영역을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질이 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 생리활성 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역 및 FGF21 변이체 단백질이 순서대로 연결된, 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 융합 단백질의 면역글로불린의 Fc 영역과 FGF21 변이체 단백질 사이에 링커가 추가로 연결된, 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 링커가 상기 면역글로불린의 Fc 영역의 C-말단 및 상기 FGF21 변이체 단백질의 N-말단에 연결된, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질이 서열번호: 36, 37 및 39에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는 폴리웹타이드를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 융합 단백질이 서열번호: 65, 66 및 67에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열로 표시되는, 약학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FGF21 변이체 단백질이 추가로 하기 (4) 및 (6)의 변이들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는, 약학적 조성물:

(4) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 아미노산이 N으로 치환됨; 및

(6) 상기 (1) 내지 (5)의 변이들 중 하나 이상의 변이와 함께, 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 180번 아미노산이 E로 치환됨.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 생리활성 단백질과 FGF21 변이체 단백질을 포함하는 융합 단백질, 및 이를 포함함으로써 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료에 효과가 우수한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간질환의 원인은 바이러스나 세균에 의한 감염, 술이나 독성물질, 지방이나 중금속 과다 축적, 비정상적인 면역 반응 등 다양하다. 이러한 원인들에 의하여 바이러스간염, 알코올 간질환, 비알코올 지방간질환, 독성 간염, 자가면역 간질환 등이 발생한다. 또한, 간질환은 만성적인 경과를 거쳐 간경화나 간섬유화, 간암 등으로 진행될 수 있다.

[0003] 급성 바이러스간염이나 독성 간염과 같은 급성기의 간질환은 심한 폐로감, 식욕 저하, 황달 등의 증상을 일으키며, 드물게 간기능이 급격히 악화되는 급성 간부전으로 진행되어 간이식을 시행하지 않으면 사망으로 이어질 수도 있다. 반면, 만성 바이러스간염, 지방간과 같이 서서히 진행하는 만성 간질환은 대부분 무증상으로 환자가 일상생활에 큰 불편을 느끼지 못하지만, 자각하지 못하는 동안 점차 간섬유화(hepatic fibrosis)가 진행되면서 간경화와 간암으로까지 진행된다. 우리나라의 간경화 발병 통계를 보면 2012년 성인에서의 간경화 유병률은 0.5%, 65세 이상의 인구에서는 1.0% 정도이며, 이는 의료기관에서 진단을 받은 병력을 설문조사한 결과이므로 간경화의 실제 유병률은 이보다 더 높을 것으로 보인다. 우리나라에서 간경화의 가장 흔한 원인은 바이러스간염이며, 알코올 간질환이 두 번째로 흔한 원인이다. 어떤 원인이든 지속적으로 간 손상이 반복되는 경우 증상의 유무와 상관없이 간경화나 간섬유화, 간암으로 진행할 위험이 크고, 일단 간경화가 발병하면 치료를 받아도 굳어진 간이 원상태로 회복되기 어렵다.

[0004] 한편, 글루카곤 유사 펩타이드-1(glucagon-like peptide-1; GLP-1)은 장관 내 L 세포에서 음식물 등의 자극을 받아 분비되는 31개의 아미노산으로 구성된 인크레틴(incretin) 호르몬이다. 췌장의 베타 세포, 뇌 등의 조직에 발현되어 있는 G단백질 결합 수용체인 GLP-1 수용체를 통하여 세포 내로 신호를 전달하여 활성을 나타낸다. 혈중으로 분비된 GLP-1은 생체 내 반감기가 2분 이내로 아주 짧다. 이는 체내의 디펩티딜 펩ти데이즈-4(dipeptidyl peptidase-4; DPP-4) 효소에 의한 N-말단 아미노산 절단으로 인한 활성 상실에 기인한다. GLP-1은 췌장의 베타 세포에서 혈중 포도당 농도에 따른 인슐린 분비를 촉진시키기 때문에 저혈당을 유발하지 않으면서 강력한 혈당 강하 작용을 보인다. 또한, GLP-1 투여 시 다양한 동물 모델 및 사람에서 체중 감소가 일어나는데, 이는 GLP-1의 식욕 억제 효과로 인한 음식물 섭취 감소에 기인하다고 알려져 있다. GLP-1은 췌장의 베타 세포에 발현되어 있는 GLP-1 수용체를 통하여 당·지질 독성으로 인한 베타 세포의 사멸 억제를 통한 생존력 증

가 및 베타 세포의 증식 촉진을 유도한다. 글루카곤의 과도한 분비는 혈당을 증가시켜 당뇨병 환자에게 나타나는 고혈당 현상의 원인 중 하나로 알려져 있다. 또한, GLP-1은 췌장의 알파 세포에 작용하여 단백질 인산화효소 A(protein kinase A; PKA) 단백질 특이적인 글루카곤 분비 억제를 통하여 공복 혈당 상승을 억제한다고 알려져 있다.

[0005] 임상적으로 중요한 GLP-1 수용체 효능제는 엑센딘-4(exendin-4)이다. 엑센딘-4는 길라 몬스터(Gila Monster) 도마뱀의 타액선에서 생성된 39개 잔기 폴리펩티드이다. 엑센딘-4는 GLP-1과 52% 아미노산 서열 상동성을 공유하고, 포유동물에서 GLP-1 수용체와 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Thorens et al., *Diabetes*, 42:1678-1682, 1993). 시험관 내에서, 엑센딘-4는 인슐린 생성 세포에 의한 인슐린 분비를 촉진하는 것으로 나타났고, 등물량으로 주어진 경우, 인슐린 생성 세포로부터 인슐린 방출을 유도하는데 있어서 GLP-1보다 강력하다. 또한, 엑센딘-4는 설치류 및 인간에서 인슐린 방출을 강력하게 자극하여 혈장 글루코스 수준을 감소시키고, GLP-1보다 오래 작용한다. 하지만, 엑센딘-4는 포유동물에서 자연적으로 발생하지 않기 때문에, 이는 GLP-1이 결핍된 포유동물에서 특정한 잠재적 항원 특성을 갖는다.

[0006] 인간에게 글루코스 조절을 개선하는 GLP-1 및 엑센딘-4 유사체(예를 들어, 리라글루ти드(liraglutide) 및 엑세나타이드(exenatide))의 능력은 임상에서 확인된 바 있다. 또한, GLP-1은 유도된 증식과 아폽토시스의 억제를 통해 베타 세포 질량을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다. 나아가, GLP-1은 식욕을 감소시키는 포만감 신호를 제공하면서 위에서의 산 분비 및 위 배출을 억제하는 장 호르몬으로 작용하는 것이 보고된 바 있다. GLP-1의 이러한 효과는 제2형 당뇨병 환자에게 GLP-1 유사체를 투여하였을 때 관찰된 유익한 체중 감소를 설명할 수 있다. 또한, GLP-1은 허혈 후 설치류 심장에서 심장보호작용을 하는 것으로 나타났다.

[0007] 지속형 GLP-1 유사체를 개발하기 위해서도 다양한 연구가 시도되었다. 임상적으로 확인된 지속형 GLP-1 유사체는 둘라글루티드(WO 2005/000892)와 알비글루티드(WO 2003/059934)가 있다. 둘라글루티드는 Fc 융합 GLP-1 유사체이며, 알비글루티드는 일부민 융합 GLP-1 유사체로, 인간에게 1주에 1회 주사할 수 있는 약물동태 프로필을 나타낸다. 두 약물 모두 주 1회 투여만으로 우수한 혈당 강하 효과와 체중 감소 효과를 나타내며, 엑세나타이드 또는 리라글루ти드에 비해 치료 편의성이 크게 개선되었다.

[0008] 한편, 섬유모세포 성장 인자 21(fibroblast growth factor 21; FGF21)은 간에서 합성되며 글루코스 및 지질 항상성에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려진 호르몬이다. FGF21은 FGF21 특이적 수용체인 FGF 수용체와 베타-클로토(β -klotho) 복합체가 같이 발현되는 간, 지방, 췌장의 베타 세포, 뇌의 시상 하부 및 근육에서 그 약리 작용을 나타낸다. 현재까지 다양한 당뇨병 및 비만 질환 마우스와 원숭이에서 FGF21은 인슐린 비의존적으로 혈중 글루코스 농도를 저하시키고, 체중을 감소시키며, 혈중 트리글리세리드 및 저비중리포단백질(Low-density lipoprotein, LDL)의 농도를 감소시켰다. 또한, 인슐린 감수성 개선 효과도 있어 새로운 항-당뇨병 또는 항-비만 치료제 타깃으로 잠재성이 높은 것으로 알려져 있다(WO 2003/011213).

[0009] 이에 따라 FGF21을 타깃으로 하는 새로운 항 당뇨병 약제 개발을 위해, 야생형 FGF21을 기반으로 일부 아미노산을 치환, 도입, 제거하여 FGF21 돌연변이를 제작함으로서, FGF21의 생물학적 활성 및 생체 내 안정성을 개선한 시도가 있었다(WO 2010/065439). 그러나, FGF21을 생물치료제로서 직접 사용하는 것과 연관된 문제점은 그의 반감기가 매우 짧다는 것이다(Kharitonenkova, A. et al., *Journal of Clinical Investigation*, 115:1627-1635, 2005). FGF21의 생체 내 반감기는 마우스에서 1 내지 2시간, 원숭이에서 2.5 내지 3시간으로 짧기 때문에 FGF21을 당뇨병 치료제로 개발한다면 매일 투여를 해야 하는 단점이 있다.

[0010] 현재까지 FGF21 재조합 단백질의 생체 내 반감기를 증가시키기 위하여 다양한 기술들이 보고되었다. FGF21에 고분자 물질인 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)을 연결하여 분자량을 증가시켜, 신장 배설을 억제함으로써 체내 잔류 시간을 증가시킨 예가 있다(WO 2012/066075). 또한, FGF21 분자에 인간 일부민에 결합하는 지방산을 융합시켜 반감기를 향상시킨 예도 있다(WO 2012/010553). 나아가, 인간 FGF 수용체 단독 또는 베타-클로토와의 복합체에 특이적으로 결합하는 아고니스트 항체를 만들어 FGF21의 작용기전과 동일한 약리학적 활성을 나타내면서 반감기를 증가시킨 예도 있다(WO 2012/170438). 또한, FGF21 분자에 면역글로불린 IgG의 Fc를 연결한 지속형 융합 단백질을 만들어 반감기를 향상시킨 예도 있다(WO 2013/188181).

[0011] 여러 지속형 기술 중 Fc 융합 기술은 체내 반감기가 증가하면서 독성이나 면역반응 유발과 같은 부작용 우려가 적다는 점에서 가장 많이 활용되고 있다. Fc 융합 FGF21 단백질을 지속형 치료용 약물로 개발하기 위해서는 다음과 같은 여러 조건을 충족해야 한다.

[0012] 첫째, 융합에 의한 시험관 내 활성 감소가 적어야 한다. FGF21의 N-말단과 C-말단은 모두 FGF21 활성을 관여한

다. 이에 따라 융합 위치에 따라 FGF21 융합 단백질의 활성이 크게 달라진다고 알려져 있다. 따라서, FGF21에 돌연변이가 도입된 Fc 융합 FGF21 단백질의 활성은 융합 여부 또는 위치에 따라 달라질 수 있다. 둘째, 융합에 의해 체내 반감기가 증가하여, 인간에서 주 1회 간격으로 투여할 수 있는 약물동태 프로필을 나타내야 한다. 셋째, 대부분의 바이오 의약품의 경우 환자에서 면역원성이 발생할 수 있다는 점을 감안하면, 융합 링커 또는 돌연변이에 의한 면역원성 위험성이 적어야 한다. 넷째, 융합 위치나 돌연변이 도입에 의한 안정성 문제가 없어야 한다. 다섯째, 융합한 면역글로불린의 종류(isotype)에 따라 원치 않는 면역 반응을 야기할 수 있기 때문에 이에 대한 대안이 필요하다.

[0013] FGF21 분자에 면역글로불린 IgG의 Fc를 연결하여 지속형 융합 단백질로 개발하려는 시도는 이미 보고된 바 있다 (WO 2013/188181). 야생형 FGF21의 N-말단에 Fc가 융합된 Fc-FGF21 구조의 경우, 시험관 내 활성은 야생형 FGF21 대비 큰 차이가 나지 않는다. 하지만, 생체 내 단백질 분해작용에 의해 반감기가 매우 짧은 것으로 알려져 있다. 이를 개선하기 위해 FGF21의 특정 위치에 단백질 분해작용에 저항성이 있는 여러 개의 돌연변이를 도입해 생체 내 반감기를 개선시킨 사례가 있지만, 다수의 돌연변이 도입으로 인해 면역원성 위험성이 증가할 수 있다. 반면, FGF21 분자의 C-말단에 Fc가 융합된 형태인 FGF21-Fc 구조의 경우, Fc-FGF21 구조에 비해 융합에 의한 활성 감소가 큰 것으로 알려져 있다.

[0014] GLP-1과 FGF21은 그 작용 기전 및 생체 내 작용 조직에 따라 병용 투여 시 단일 효과 대비 상승 작용을 가질 수 있다. 이에 따라 우수한 항 당뇨 효력 및 부가적인 장점이 예상된다. GLP-1과 FGF21 병용 투여 효과 또는 GLP-1/FGF21 융합 단백질의 효과에 대한 연구는 이미 보고된 바 있다(WO 2010/142665 및 WO 2011/020319).

[0015] GLP-1 및 FGF21의 융합 단백질을 개발하기 위해서는 다양한 문제를 해결해야 한다. 야생형 GLP-1과 야생형 FGF21은 생체 내 반감기가 매우 짧아, 의약품으로 개발하더라도 최소 1일 1회 이상의 투여가 필요할 것으로 예상된다. 환자 편의성을 개선시킬 수 있는 지속형 융합 단백질을 개발하기 위해서는 Fc 융합과 같은 지속형 기술이 필요하다. GLP-1과 FGF21 2가지의 각 수용체 모두에 작용하는 이중 작용 약물은 각 약물의 활성을 유지하면서, 생체 내에서 안정하게 유지되기 위한 돌연변이 도입이 필수적이다. 이때, 각 돌연변이에 의한 활성 변화, 구조 또는 안정성에 미치는 영향 등에 대한 문제 해결이 필요하다. GLP-1과 FGF21 2개의 각 수용체에 작용하는 약효의 균형이 적절해야 하며, 이를 위해서는 시험관 내 활성, 약물동태 프로필, 동물모델에서의 약리 효능, 인간에서의 임상 효능 평가까지 고려한 약물 설계가 필요하다. 융합 단백질은 인체 내에서는 존재할 수 없는 구조로서, 단일 타겟의 융합 단백질 대비 구조적으로 복잡하다. 또한, 2개 타겟에 대한 균형을 맞추기 위해 돌연변이 또는 링커에 의한 엔지니어링이 도입되므로, 응집에 의한 복합체를 형성할 가능성이 높아질 수 있어, 이를 고려한 단백질 엔지니어링이 필요하다. 나아가, 신규 돌연변이 서열 또는 복잡한 구조로 인해 면역원성 가능성이 높아질 수 있는데, 이를 예측하거나 회피할 수 있는 연구가 필요하다.

[0016] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 노력한 결과, 간염증, 간섬유화 및 간경화 치료에 효과적인 융합 단백질을 연구 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0017] (특허문헌 0001) 국제공개특허 WO 제2005-000892호
- (특허문헌 0002) 국제공개특허 WO 제2003-059934호
- (특허문헌 0003) 국제공개특허 WO 제2003-011213호
- (특허문헌 0004) 국제공개특허 WO 제2010-065439호
- (특허문헌 0005) 국제공개특허 WO 제2012-066075호
- (특허문헌 0006) 국제공개특허 WO 제2012-010553호
- (특허문헌 0007) 국제공개특허 WO 제2012-170438호
- (특허문헌 0008) 국제공개특허 WO 제2013-188181호
- (특허문헌 0009) 국제공개특허 WO 제2010-142665호

(특허문현 0010) 국제공개특허 WO 제2011-020319호

비특허문현

- [0018] (비)특허문현 0001) Thorens et al., Diabetes, 42:1678-1682, 1993
- (비)특허문현 0002) Kharitonenkov, A. et al., Journal of Clinical Investigation, 115:1627-1635, 2005

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0019] 본 발명의 목적은 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 섬유모세포 성장 인자 21(FGF21) 변이체 단백질; 및 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질로서,
- [0021] 상기 FGF21 변이체 단백질이 하기 (1) 내지 (7)의 변이들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는, 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:
 - (1) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 98번 내지 101번 아미노산이 EIRP(서열번호: 68)로 치환됨;
 - (2) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAV(서열번호: 69)로 치환됨;
 - (3) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAN(서열번호: 70)으로 치환됨;
 - (4) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - (5) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 174번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - (6) 상기 (1) 내지 (5)의 변이들 중 하나 이상의 변이와 함께, 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 180번 아미노산이 E로 치환됨; 및
 - (7) 야생형 FGF21 단백질의 면역원성 감소를 위한 1 내지 10개의 아미노산 변이를 포함함.
- [0029] 나아가, 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여 상기 융합 단백질이 생리활성 단백질, 이의 변이체 또는 이의 단편을 더 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 구체적으로, 섬유모세포 성장 인자 21(FGF21) 변이체 단백질; 생리활성 단백질, 이의 변이체 또는 이의 단편; 및 면역글로불린의 Fc 영역을 더 포함하는 융합 단백질로서,
- [0030] 상기 FGF21 변이체 단백질이 하기 (1) 내지 (7)의 변이들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는, 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:
 - (1) 야생형 FGF21 단백질의 N 말단으로부터 98번 내지 101번 아미노산이 EIRP(서열번호: 68)로 치환됨;
 - (2) 야생형 FGF21 단백질의 N 말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAV(서열번호: 69)로 치환됨;
 - (3) 야생형 FGF21 단백질의 N 말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAN(서열번호: 70)으로 치환됨;
 - (4) 야생형 FGF21 단백질의 N 말단으로부터 170번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - (5) 야생형 FGF21 단백질의 N 말단으로부터 174번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - (6) 상기 (1) 내지 (5)의 변이들 중 하나 이상의 변이와 함께, 야생형 FGF21 단백질의 N 말단으로부터 180번 아미노산이 E로 치환됨; 및
 - (7) 야생형 FGF21 단백질의 면역원성 감소를 위한 1 내지 10개의 아미노산 변이를 포함함.

[0038]

또한, 본 발명은 본 발명의 융합 단백질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간염증, 간섬유화 및 간경화의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0039]

본 발명의 섬유모세포 성장 인자 21(FGF21) 변이체 단백질 및 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 간의 염증세포와 섬유화세포의 증식을 억제하는 효과가 있다. 따라서, 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040]

도 1a는 인간 베타-클로토가 과발현된 HEK293 세포주를 사용하여, FGF21 변이체 단백질을 포함하는 융합 단백질(이하, "FGF21 변이체 융합 단백질"로 기재)인 DFD4, DFD5, DFD6, DFD7, DFD9, 및 DFD13의 시험관 내 활성을 측정한 그래프이다. 돌연변이 도입에 의해 큰 폭의 활성 감소가 나타난 FGF21 변이체 융합 단백질은 없었다.

도 1b는 인간 베타-클로토가 과발현된 HEK293 세포주를 사용하여, FGF21 변이체 융합 단백질인 DFD6, DFD13, DFD18, DFD72, DFD73, 및 DFD74의 시험관 내 활성을 측정한 그래프이다. 돌연변이 도입에 의해 큰 폭의 활성 감소가 나타난 FGF21 변이체 융합 단백질은 없었다.

도 1c는 인간 베타-클로토가 과발현된 HEK293 세포주를 사용하여, FGF21 변이체 융합 단백질인 DFD6 및 DFD6(E.coli)의 시험관 내 활성을 측정한 그래프이다. 돌연변이 도입에 의해 큰 폭의 활성 감소가 나타난 FGF21 변이체 융합 단백질은 없었다.

2a는 인간 베타-클로토가 과발현된 HEK293 세포주를 사용하여, FGF21의 N-말단과 Fc를 연결하는 링커가 도입된 FGF21 변이체 융합 단백질인 DFD3 및 DFD4의 시험관 내 활성을 측정한 그래프이다. 링커 서열에 따라 약간의 활성 차이를 나타내지만 큰 폭의 활성 감소가 나타난 FGF21 변이체 융합 단백질은 없었다.

도 2b는 인간 베타-클로토가 과발현된 HEK293 세포주를 사용하여, FGF21의 N-말단과 Fc를 연결하는 링커가 도입된 FGF21 변이체 융합 단백질인 DFD1 및 DFD13의 시험관 내 활성을 측정한 그래프이다. 링커 서열에 따라 약간의 활성 차이를 나타내지만 큰 폭의 활성 감소가 나타난 FGF21 변이체 융합 단백질은 없었다.

도 3은 인간 베타-클로토가 과발현된 HEK293 세포주를 사용하여 RGE(Amgen), Fc-FGF21(Lilly) 및 DFD1의 시험관 내 활성을 측정한 그래프이다. DFD1과 RGE(Amgen)은 유사한 수준의 활성을 나타냈고, Fc-FGF21(Lilly)은 다른 물질 대비 2배 정도의 시험관 내 활성을 나타내었다.

도 4a는 FGF21 변이체 융합 단백질인 DFD4의 크기 배제 크로마토그래피 분석결과이다.

도 4b는 FGF21의 EIRP가 돌연변이된 FGF21 변이체 융합 단백질인 DFD13의 크기 배제 크로마토그래피 분석결과이다.

도 4c는 FGF21의 EIRP 돌연변이가 융합 단백질의 안정성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 DFD4와 DFD13의 고분자량 음집체 함량%(HMW%) 제안을 비교한 그래프이다. DFD13은 DFD4 대비 초기 시점 2주 경과 시점까지 고분자량 음집체 비율(HMW%)이 낮은 것으로 확인되었다. 이는 EIRP 돌연변이가 도입됨에 따라 FGF21 변이체 융합 단백질의 안정성이 개선되어 HMW%가 큰 폭으로 감소함을 나타낸다.

도 5는 FGF21 변이체 융합 단백질의 피하 투여 후 96시간 동안의 시간에 따른 혈중 약물 농도 그래프이다. 데이터는 평균값들과 표준편차로 표기되었다.

도 6a는 식이 유도 비만 마우스 모델에서 DFD18을 단회 투여한 후, 투여 시점부터 14일차까지 측정된 체중 변화를 g 단위로 나타낸 그래프이다. DFD18은 뛰어난 체중감소 효과를 나타냈다. 데이터는 평균값들과 평균의 표준오차로 표기되었다.

도 6b는 식이 유도 비만 마우스 모델에서 DFD18을 단회 투여한 후, 투여 시점부터 14일차까지 측정된 체중 변화를 % 단위로 나타낸 그래프이다. DFD18은 뛰어난 체중감소 효과를 나타냈다. 데이터는 평균값들과 평균의 표준오차로 표기되었다.

도 7은 인간 GLP-1 수용체가 과발현된 CHO 세포주를 사용하여, GLP-1변이체 및 GLP-1의 C말단과 Fc를 연결하는 힌지 유무에 따른 융합 단백질의 시험관 내 GLP-1 활성을 측정한 그래프이다. 종합적으로, GLP-1(A2G) 서열을

포함하는 융합 단백질(DFD23)의 경우 다른 GLP-1 변이체 서열을 포함하는 융합 단백질 대비 2 내지 3배 정도 낮은 활성을 보였다. GLP-1(A2G) 이외의 변이체 서열을 포함하는 융합 단백질에 대한 GLP-1 활성은 큰 차이를 보이지 않았다.

도 8a는 DFD59, DFD69, DFD112, 및 DFD114의 GLP-1 활성을 나타낸 그래프이다. 인간 GLP-1 수용체가 과발현된 CHO 세포주를 사용하여, 융합 단백질 3종 (DFD69, DFD112 및 DFD114)과 FGF21을 포함하지 않는 Fc 융합 GLP-1 변이체(DFD59)에 대한 시험관 내 GLP-1 활성을 측정하였다. 3종의 융합 단백질은 유사한 EC₅₀ 값을 나타내었으며, Fc 융합 GLP-1 변이체(DFD59)는 융합 단백질 대비 약 2배 정도의 활성을 나타내었다.

도 8b는 DFD69, DFD112, 및 DFD114의 FGF21 활성을 나타낸 그래프이다. 인간 베타-클로토가 과발현된 HEK293 세포주를 사용하여, 융합 단백질에 있어 FGF21 변이체에 따른 시험관 내 활성을 측정하였다. 3종 융합 단백질의 FGF21 부분의 시험관 내 활성을 유사한 것으로 확인되었다.

도 9a는 융합 단백질인 DFD69, DFD112, 및 DFD114의 FGF21 부분에 대한 피하 투여 후 시간경과에 따른 혈중 약물 농도를 나타낸 그래프이다. 데이터는 평균값들과 표준편차로 표기되었다.

도 9b는 융합 단백질인 DFD59, DFD69, DFD112, 및 DFD114의 GLP-1 부분에 대한 피하 투여 후 시간경과에 따른 혈중 약물 농도를 나타낸 그래프이다. 데이터는 평균값들과 표준편차로 표기되었다

도 10a는 식이 유도 비만 마우스 모델에서 DFD114, DFD112, DFD74 또는 DFD72를 2주간 4일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈청 중 중성지방(Triglyceride, TG)의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 및 FGF21 변이체 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈청 내 지질 감소 효과를 나타내었다. 데이터는 평균값들과 평균의 표준오차 (standard error of the mean, S.E.M.)로 표기되었으며, 통계는 One way ANOVA 후 Dunnet's multiple comparison test로 분석하였다 (**: P<0.001 vs. vehicle control)

도 10b는 식이 유도 비만 마우스 모델에서 DFD114, DFD112, DFD74 또는 DFD72를 2주간 4일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈청 중 총 콜레스테롤(Total Cholesterol, TC)의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 및 FGF21 변이체 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈청 내 지질 감소 효과를 나타내었다(**: P<0.001 vs. vehicle control).

도 10c는 식이 유도 비만 마우스 모델에서 DFD114, DFD112, DFD74 또는 DFD72를 2주간 4일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 간 조직 내 중성지방(Triglyceride, TG)의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 및 FGF21 변이체 융합 단백질 투여시 대조군 대비 간 조직 내 지질 감소 효과를 나타내었다(*: P<0.05, **: P<0.001 vs. vehicle control).

도 11은 식이 유도 비만 마우스 모델에서 DFD114 또는 DFD112를 2주간 4일 간격으로 반복 피하 투여한 간의 조직병리사진을 나타낸 것이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 간 조직의 지방증 감소 효과를 나타냈다.

도 12a는 메치오닌 콜린 결핍 (methionine choline deficient, MCD) 식이유발 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112 및 DFD72를 4주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, ALT 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여군에서 대조군 대비 ALT 수치가 용량의존적으로 감소하였으며, FGF21 변이체 융합 단백질 투여군에서도 ALT 수치 감소가 관찰되었다. 데이터는 평균값들과 평균의 표준오차(S.E.M.)로 표기되었으며, 통계는 One way ANOVA 후 Dunnet's multiple comparison test로 분석하였다 (###: P<0.001 vs. MCS control, **: P<0.01, **: P<0.01 vs. MCD control).

도 12b는 메치오닌 콜린 결핍(MCD) 식이유발 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112 및 DFD72를 4주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, AST 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여군에서 대조군 대비 AST 수치가 용량의존적으로 감소하였으며, FGF21 변이체 융합 단백질 투여군에서도 AST 수치 감소가 관찰되었다 (###: P<0.001 vs. MCS control, **: P<0.01 vs. MCD control).

도 12c는 메치오닌 콜린 결핍 식이유발 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112 및 DFD72를 4주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 염증 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여군에서 대조군 대비 염증 수치가 용량의존적으로 감소하였으며, FGF21 변이체 융합 단백질 투여군에서도 염증 수치 감소가 관찰되었다 (###: P<0.001 vs. MCS control, **: P<0.001 vs. MCD control).

도 13a는 MCD 식이유발 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112 및 DFD72를 4주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 간에서 섬유화 관련 지표인 알파 평활근 액틴(alpha smooth muscle actin, α -SMA)의 변화를 나타낸

그래프이다. MCD 대조군은 MCS 대조군 대비 α -SMA의 발현이 증가되었다. 반면, 융합 단백질 투여군 및 FGF21 변이체 융합 단백질 투여군에서 대조군 대비 α -SMA 수치가 감소하였다. 데이터는 평균값들과 평균의 표준오차로 표기되었으며, 통계는 One way ANOVA 후 Dunnet's multiple comparison test로 분석하였다 (###: P<0.001 vs. MCS control, ***: P<0.001 vs. MCD control).

도 13b는 MCD 식이유발 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112 및 DFD72를 4주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 간에서 섬유화 관련 지표인 형질전환 성장인자 베타(transforming growth factor-beta, TGF- β)의 변화를 나타낸 그래프이다. MCD 대조군은 MCS 대조군 대비 TGF- β 의 발현이 증가되었다. 반면, 융합 단백질 투여군 및 FGF21 변이체 융합 단백질 투여군에서 대조군 대비 TGF- β 수치가 감소하였다(###: P>0.001 vs. MCS control, ***: P<0.001 vs. MCD control).

도 13c는 MCD 식이유발 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112 및 DFD72를 4주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 간에서 섬유화 관련 지표인 Picrosirius Red 염색 결과를 나타낸 그래프이다. MCD 대조군은 MCS 대조군 대비 콜라겐 양이 증가되었다. 반면, 융합 단백질 투여군 및 FGF21 변이체 융합 단백질 투여군에서 대조군 대비 피크로시리우스 레드(Picrosirius Red) 수치가 감소하였다(###: P<0.001 vs. MCS control, **: P<0.01 vs. MCD control).

도 14는 간의 조직병리사진을 나타낸 도면이다. 간 조직 내 지방이 현저히 감소하였다.

도 15a는 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈액생화학 지표인 ALT 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시, 대조군 대비 혈장 내 ALT 감소 효과가 관찰되었다. 데이터는 평균값들과 평균의 표준오차로 표기되었으며, 통계는 One way ANOVA 후 Dunnet's multiple comparison test로 분석하였다 (**: P<0.001).

도 15b는 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈장 내 AST 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈장 내 AST 감소 효과가 관찰되었다(**: P<0.001).

도 15c는 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈장 내 TG의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈장 내 TG 감소 효과가 관찰되었다(*: P<0.05, **: P<0.001).

도 15d는 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈장 내 TC의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈장 내 TC 감소 효과가 관찰되었다(**: P<0.001).

도 16a는 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 간에서 투여 전후 비알콜성지방간 병리활성 점수(NAFLD activity score: NAS)의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 투여 전 대비 투여 후 비알콜성지방간 병리활성 점수가 감소하였다.

도 16b는 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 간에서 투여 전후 간섬유화 점수의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 투여 전 대비 투여 후 간섬유화 점수가 감소하였다.

도 17a는 티오아세트아미드(thioacetamide, TAA) 유도 간섬유화 랫트 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈액생화학 지표인 ALP 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈청 내 ALP 수치의 감소 효과가 관찰되었다. 데이터는 평균값들과 평균의 표준오차로 표기되었다. 통계는 One way ANOVA 후 Dunnet's multiple comparison test로 분석하였다(###: P<0.001 vs. Normal control, **: P<0.01 vs. TAA control).

도 17b는 티오아세트아미드(TAA) 유도 간섬유화 랫트 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈액생화학 지표인 GGT 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈청 내 GGT 수치의 감소 효과가 관찰되었다(###: P<0.001 vs. Normal control, *: P<0.05 vs. TAA control).

도 17c는 티오아세트아미드(TAA) 유도 간섬유화 랫트 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 피하 투여한 후, 혈액생화학 지표인 T-BIL 수치의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈청 내 T-BIL 수치의 감소 효과가 관찰되었다(##: P<0.01 vs. Normal control, *: P<0.05 vs. TAA control).

도 17d는 티오아세트아미드(TAA) 유도 간섬유화 랫트 모델에서 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 투여한 후, 간에서 섬유화 면적의 변화를 나타낸 그래프이다. 융합 단백질 투여시 대조군 대비 혈청 내 섬유화 면적의 감소 효과가 관찰되었다(##: P<0.001 vs. Normal control, ***: P<0.001 vs. TAA control).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0042] 본 발명의 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 조성물에
- [0043] 유효성분으로 포함되는 융합 단백질은 섬유모세포 성장 인자 21(FGF21) 변이체 단백질; 이의 변이체 또는 이의 단편; 및 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하고, 상기 FGF21 변이체 단백질이 하기 (1) 내지 (7)의 변이들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함한다:
- [0044] (1) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 98번 내지 101번 아미노산이 EIRP(서열번호: 68)로 치환됨(이하 "EIRP"로 기재);
 - [0045] (2) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAV(서열번호: 69)로 치환됨(이하 "TGLEAV"로 기재);
 - [0046] (3) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAN(서열번호: 70)으로 치환됨(이하 "TGLEAN"으로 기재);
 - [0047] (4) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - [0048] (5) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 174번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - [0049] (6) 상기 (1) 내지 (5)의 변이들 중 하나 이상의 변이와 함께, 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 180번 아미노산이 E로 치환됨; 및
 - [0050] (7) 야생형 FGF21 단백질의 면역원성 감소를 위한 1 내지 10개의 아미노산 변이를 포함함.
- [0051] 상기 융합 단백질은 생리활성 단백질, 이의 변이체 또는 이의 단편을 더 포함할 수 있다.
- [0052] 구체적으로, 본 발명의 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 조성물에
- [0053] 유효성분으로 포함되는 융합 단백질은 섬유모세포 성장 인자 21(FGF21) 변이체 단백질; 생리활성 단백질, 이의 변이체 또는 이의 단편; 및 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하고, 상기 FGF21 변이체 단백질이 하기 (1) 내지 (7)의 변이들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함한다:
- [0054] (1) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 98번 내지 101번 아미노산이 EIRP(서열번호: 68)로 치환됨(이하 "EIRP"로 기재);
 - [0055] (2) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAV(서열번호: 69)로 치환됨(이하 "TGLEAV"로 기재);
 - [0056] (3) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산이 TGLEAN(서열번호: 70)으로 치환됨(이하 "TGLEAN"으로 기재);
 - [0057] (4) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - [0058] (5) 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 174번 아미노산이 N으로 치환됨;
 - [0059] (6) 상기 (1) 내지 (5)의 변이들 중 하나 이상의 변이와 함께, 야생형 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 180번 아미노산이 E로 치환됨; 및
 - [0060] (7) 야생형 FGF21 단백질의 면역원성 감소를 위한 1 내지 10개의 아미노산 변이를 포함함.
- [0061] 상기 야생형 FGF21 단백질은 글루코스 및 지질 항상성에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려진 호르몬이다. 상기 단백질은 인간, 마우스, 돼지, 원숭이 등의 포유류에서 유래된 것일 수 있다. 구체적으로는, 인간 유래의 FGF21 단백질일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 야생형 FGF21 단백질은 서열번호: 1로 표시되는 인간 야생형 FGF21 단백질일 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 FGF21 변이체 단백질에 포함된 변이는, EIRP, TGLEAV, TGLEAN, G170N 및 G174N 중 어느 하나;

TGLEAV, TGLEAN, G170N 및 G174N 중 어느 하나와 EIRP의 조합; EIRP, TGLEAV, TGLEAN, G170N 및 G174N 중 어느 하나와 A180E의 조합; 또는 TGLEAV, TGLEAN, G170N 및 G174N 중 어느 하나, EIRP 및 A180E의 조합일 수 있다. 아울러, 상기 FGF21 변이체 단백질은 야생형 FGF21 단백질에 비해 N-말단 또는 C-말단의 1 내지 10개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다. 구체적으로, 상기 FGF21 변이체 단백질이 서열번호: 6 내지 23의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 FGF21 변이체 단백질이 서열번호: 6 내지 23의 아미노산 서열 중 어느 하나로 표시되면서, 야생형 FGF21 단백질에 비해 N-말단 또는 C-말단의 1 내지 10개의 아미노산이 결실된 형태일 수 있다.

- [0063] 상기 융합 단백질은 FGF21 변이체 단백질의 면이에 의해 도입된 아스파라긴(N) 잔기가 당화(glycosylation)된 것일 수 있다.
- [0064] 상기 생리활성 단백질은 인슐린(insulin), C-펩타이드(C-peptide), 렙틴(leptin), 글루카곤(glucagon), 가스트린(gastrin), 가스트린억제폴리펩타이드(gastric inhibitory polypeptide; GIP), 아밀린(amylin), 칼시토닌(calcitonin), 콜레시스토ки닌(cholecystokinin), 펩타이드 YY(peptide YY), 뉴로펩타이드 Y(neuropeptide Y), 뼈형성단백질 6(bone morphogenetic protein 6; BMP-6), 뼈형성단백질 9(bone morphogenetic protein 9; BMP-9), 옥신토모듈린(oxyntomodulin), 옥시토신(oxytocin), 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2), 이리신(irisin), FNDC5(fibronectin type III domain-containing protein 5), 아펠린(apelin), 아디포넥틴(adiponectin), CTRP 패밀리(C1q and tumor necrosis factor related protein), 레지스틴(resistin), 비스파틴(visfatin), 오멘틴(omentin), 레티놀 결합 단백질-4(RBP4), 글리세틴(glicentin), 양기 오포이에틴(angiopoietin), 인터루킨-22(IL-22), 엑센딘-4(exendin-4) 및 성장 호르몬(growth hormone)으로 이루어진 군에서 선택된 1종일 수 있다. 구체적으로, 상기 생리활성 단백질은 GLP-1, 이의 변이체 및 엑센딘-4 중 선택된 1종일 수 있다. 구체적으로, 상기 융합 단백질은 GLP-1의 효과와 FGF21 단백질의 효과를 동시에 나타낼 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 사용하는 용어 "인슐린"이란, 이자(췌장)의 β 세포에서 합성 및 분비되는 단백질로 혈액 속의 포도당의 양을 일정하게 유지시키는 역할을 하는 호르몬을 의미한다. 상기 인슐린은 혈당량이 높아지면 분비되어 혈액 내의 포도당을 세포로 유입시켜 글리코겐의 형태로 저장시키도록 하며 간세포의 글루코스를 억제한다. 또한, 지방조직에서 포도당의 산화 및 지방산으로의 전환을 돋는다. 근육에서는 단백질을 합성하기 위한 아미노산의 흡수를 촉진시킨다. 에피네프린과 글루카곤은 혈당량을 증가시키는 작용을 함으로써 인슐린과 길항작용을 한다.
- [0066] 본 발명에서 사용하는 용어 "C-펩타이드"란, 프로인슐린의 A 및 B 사슬을 연결하는 펩타이드를 의미한다. 상기 C-펩타이드는 췌장세포 분비과립에서 인슐린과 함께 분비되지만 혈중에 분해되지 않기 때문에 췌장의 인슐린 분비 기능의 지표로 사용된다.
- [0067] 본 발명에서 사용하는 용어 "렙틴"이란, 지방조직에서 분비하는 체지방을 일정하게 유지하는 호르몬을 의미한다. 상기 렙틴은 지방 조직에서 분비된 후에 뇌에 작용하여 식욕을 억제하고 체내 대사를 활발하게 함으로써, 체중을 감소시킨다.
- [0068] 본 발명에서 사용하는 용어 "글루카곤"이란, 이자에서 합성 및 분비되는 단백질로 혈당량이 낮아지면 그것을 신호로 분비되어 혈당량을 높이는 역할을 하는 호르몬을 의미한다. 상기 글루카곤은 랑게르한스섬의 α 세포로부터 분비되는 29개의 아미노산잔기로 이루어져 있다.
- [0069] 본 발명에서 사용하는 용어 "가스트린"이란, 위의 말단에서 분비되며, 위산 분비 및 이자액 생산을 유도하고 위, 소장, 대장의 움직임을 촉진시키는 호르몬을 의미한다.
- [0070] 본 발명에서 사용하는 용어 "가스트린억제폴리펩타이드"란, 모든 위 분비액을 억제하는 선형의 폴리펩타이드를 의미한다.
- [0071] 본 발명에서 사용하는 용어 "아밀린"이란, 이자의 β 세포에서 합성 및 분비되며, 인슐린과 같은 당대사를 조절하는 호르몬을 의미한다.
- [0072] 본 발명에서 사용하는 용어 "칼시토닌"이란, 혈액 속의 칼슘량을 조절하는 갑상선 호르몬을 의미한다. 상기 칼시토닌은 갑상선 C세포에서 분비되는 32개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드이다.
- [0073] 본 발명에서 사용하는 용어 "콜레시스토키닌"이란, 십이지장의 I 세포와 공장에서 생산되는 33개의 아미노산으로 된 호르몬을 의미한다. 상기 콜레시스토키닌은 지라 수축 촉진 작용과 이자 효소 분비 촉진 작용이 있으며, 위산 분비를 억제한다.

- [0074] 본 발명에서 사용하는 용어 "펩타이드 YY"란, peptide tyrosine tyrosine의 약어로서, 식이에 반응하여 대장 및 회장의 세포가 분비하는 36개의 아미노산으로 된 폴리펩타이드를 의미한다.
- [0075] 본 발명에서 사용하는 용어 "뉴로펩타이드 Y"란, 카르복시말단이 아미노화된 36개의 아미노산으로 구성된 생리 활성펩타이드를 의미한다. 상기 뉴로펩타이드 Y는 척추동물의 중추 및 말초신경계에 널리 분포하고, 교감신경계에서는 혈압 조절, 척추동물의 중추신경계에서는 내분비나 자율신경 제어, 섭식행동이나 기억, 개일리듬에 관여 한다.
- [0076] 본 발명에서 사용하는 용어 "뼈형성단백질 6"이란, BMP-6으로도 불리며, 뼈형성에 직접적으로 관여하는 단백질을 의미한다.
- [0077] 본 발명에서 사용하는 용어 "뼈형성단백질 9"란, BMP-9로도 불리며, 뼈형성에 직접적으로 관여하는 단백질을 의미한다.
- [0078] 본 발명에서 사용하는 용어 "옥신토모듈린" 점막의 벽세포에서 분비되는 37개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 옥신토모듈린은 강한 식욕억제 효과가 있다.
- [0079] 본 발명에서 사용하는 용어 "옥시토신"이란, 출산시 자궁 수축을 촉진하여 수유할 때 젖의 분비를 돋는 9개의 아미노산으로 이루어진 호르몬을 의미한다.
- [0080] 본 발명에서 사용하는 용어 "GLP-1"이란, 장관 내 L 세포에서 음식물 등의 자극을 받아 분비되는 31개의 아미노산으로 구성된 인크레틴 (incretin) 호르몬을 의미한다. 예를 들면, 상기 GLP-1 단백질은 서열번호: 42의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0081] 상기 GLP-1의 변이체는, 예를 들면, 서열번호: 43 내지 46 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0082] 본 발명에서 사용하는 용어 "이리신"이란, 운동시 근육에서 분비되며, 혈액을 타고 지방세포에 도달하여 백색지방세포를 갈색지방세포와 같이 지방을 분해하는 호르몬을 의미한다. 상기 이리신은 112개의 아미노산으로 구성되며, FNDC5라는 막단백질이 잘린 조각이다.
- [0083] 본 발명에서 사용하는 용어 "FNDC5"란, Fibronectin type III domain-containing protein 5의 약어로, 이리신의 전구체 물질을 의미한다.
- [0084] 본 발명에서 사용하는 용어 "아펠린"이란, APLN 유전자에 암호화되어 있는 펩타이드를 의미한다. 상기 아펠린은 지방 조직에서 합성 및 분비되며 상기 인슐린과 같은 기능을 가진다.
- [0085] 본 발명에서 사용하는 용어 "아디포넥틴"이란, 지방 세포에서 분비되며, 인슐린 저항성을 개선시키는 단백질을 의미한다.
- [0086] 본 발명에서 사용하는 용어 "CTRP 패밀리"란 C1q and tumor necrosis factor related protein의 약어로, 아디포카인 패밀리 중 하나이며 주로 간이나 근육조직에 작용하여 포도당과 지질대사 등의 조절을 하는 단백질을 의미한다.
- [0087] 본 발명에서 사용하는 용어 "레지스틴"이란, 최근에 발견된 지방 세포에서 분비되는 아디포카인으로 지방 분화 과정에서 증가되고 지방 세포의 분화를 억제하는 인자로 알려진 108개의 아미노산으로 구성되는 단백질을 의미한다.
- [0088] 본 발명에서 사용하는 용어 "비스파틴"이란, 지방 조직으로부터 생성, 분비되는 아디포카인중의 하나이며 52 kDa의 단백질을 의미한다.
- [0089] 본 발명에서 사용하는 용어 "오멘틴"이란, 지방 조직으로부터 생성, 분비되는 아디포카인중의 하나이며 항염증 작용을 가진 단백질을 의미한다.
- [0090] 본 발명에서 사용하는 용어 "레티놀 결합 단백질-4"란, 지방 세포에서 분비되며, 인슐린 저항성을 개선시키는 비타민 A를 운반하는 단백질을 의미한다.
- [0091] 본 발명에서 사용하는 용어 "글리세틴"이란, 소화관내의 주요 엔테로글루카곤이며, 69 개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 33 내지 66 번째 아미노산 사이에 글루카곤의 29 개 아미노산을 모두 포함하고 있는 단백질을 의미한다.
- [0092] 본 발명에서 사용하는 용어 “앙기오포이에틴” 이란, ANG로도 불리며, 혈관 또는 혈관 내피 세포가 성장하거나

신체의 상처가 아물 때 작용하는 단백질을 의미한다.

[0093] 본 발명에서 사용하는 용어 "IL-22"란, IL-TIF라고도 불리며, IL-22 유전자에 암호화된 단백질을 의미한다. 상기 IL-22는 상피세포의 박테리아 항원에 반응하여 활성화된 자연살해세포 또는 T세포에서 분비된다.

[0094] 본원에서 사용된 용어 "Fc 영역", "Fc 단편" 또는 "Fc"란, 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 1(CH1), 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CL1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 또한, 본원에서 사용된 용어 "Fc 영역 변이체"는 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것을 의미한다.

[0095] 상기 면역글로불린의 Fc 영역은 항체를 구성하는 Fc 영역 전체 또는 이의 단편, 또는 Fc 영역 변이체일 수 있다. 또한, 상기 Fc 영역은 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함하며, 중쇄 불변 영역의 힌지 영역을 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 Fc 영역 변이체는 힌지 부위에서 절단되는 것을 예방하기 위해 변형될 수 있다. 상기 Fc의 힌지 서열은 항체 의존 세포 매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC)이나 보체 의존 세포독성(complement-dependent cytotoxicity; CDC)을 줄이기 위해 아미노산 서열 일부가 치환될 수 있다. 또한, 상기 Fc의 힌지 서열은 Fab 영역의 재배열을 억제하기 위해 아미노산 서열 일부가 치환될 수 있다. 나아가, Fc C-말단의 라이신(K)은 제거될 수 있다.

[0096] 상기 면역글로불린의 Fc 영역은, 구체적으로, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgD의 Fc 영역 중 어느 하나; 또는 이들의 조합으로 이루어진 하이브리드 Fc일 수 있다. 또한, 상기 하이브리드 Fc는, 구체적으로, IgG4 영역 및 IgD의 영역을 포함할 수 있다. 나아가, 상기 IgD Fc의 힌지 서열 일부와 CH2, 및 IgG4 Fc의 CH2와 CH3 서열을 포함할 수 있다.

[0097] 또한, 본 발명의 Fc 단편은 야생형 당쇄, 야생형에 비해 증가된 당쇄, 야생형에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 상기 당쇄의 증가, 감소 또는 제거는 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.

[0098] 상기 면역글로불린의 Fc 영역은, 구체적으로, 서열번호: 24 내지 26, 47 및 48 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0099] 상기 융합 단백질은 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 생리활성 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역 및 FGF21 변이체 단백질이 순서대로 연결될 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질은 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 FGF21 변이체 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역 및 생리활성 단백질이 순서대로 연결될 수 있다. 구체적으로, 상기 융합 단백질은 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 생리활성 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역 및 FGF21 변이체 단백질이 순서대로 연결될 수 있다.

[0100] 또한, 상기 융합 단백질은 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 GLP-1 변이체 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역 및 FGF21 변이체 단백질이 순서대로 연결될 수 있다. 나아가, 상기 융합 단백질은 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 FGF21 변이체 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역 및 GLP-1 변이체 단백질이 순서대로 연결될 수 있다. 구체적으로, 상기 융합 단백질은 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 GLP-1 변이체 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역 및 FGF21 변이체 단백질이 순서대로 연결될 수 있다.

[0101] 또한, 상기 융합 단백질은 링커를 더 포함할 수 있다.

[0102] 상기 융합 단백질은 FGF21 변이체 단백질이 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단에 직접 연결된 형태일 수 있으나, 상기 FGF21 변이체 단백질이 링커를 통해 면역글로불린의 Fc 영역에 연결된 형태일 수도 있다.

[0103] 이때, 상기 링커는 Fc 단편의 N-말단, C-말단 또는 유리기(free radical)에 연결될 수 있고, FGF21 변이체 단백질의 N-말단, C-말단 또는 유리기에 연결될 수 있다. 링커가 펩타이드 링커인 경우, 연결은 임의의 부위에서 일어날 수 있다. 예를 들면, 상기 링커가 상기 면역글로불린의 Fc 영역의 C-말단 및 상기 FGF21 변이체 단백질의 N-말단에 연결되어, 면역글로불린의 Fc 영역과 FGF21 변이체 단백질의 융합 단백질을 형성할 수 있다.

[0104] 또한, 본 발명의 융합 단백질은 상기 융합 단백질의 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단에 생리활성 단백질이 결합된 형태일 수 있다.

[0105] 링커 및 Fc가 별개로 발현된 후에 서로 결합될 때, 링커는 당업계에 알려진 가교제일 수 있다. 상기 가교제는, 예를 들어, 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄(1,1-bis (diazoacetyl)-2-phenylethane), 글루타르알데하이드(glutaraldehyde), 4-아지도살리실릭산(4-azidosalicylic acid)과 같은 N-하이드로옥시석신이미드 에스테르(N-

hydroxysuccinimide ester), 3,3'-디사이오비스(석신이미딜프로피오네이트)(3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate))와 같은 디석신이미딜에스테르(disuccinimidyl esters)를 포함하는 이미도에스테르(imidoesters), 및 비스-N-말레이미도-1,8-옥테인과 같은 이중 기능적 말레이미드(bifunctional maleimides)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0106] 또한, 상기 링커는 펩타이드일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 10 내지 30개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드일 수 있다.

[0107] 나아가, 상기 링커는 말단에 알라닌이 추가적으로 결합된 링커일 수 있다. 상기 링커는, 구체적으로, 서열번호: 2 내지 5 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드일 수 있다.

[0108] 상기 융합 단백질은 하나 이상의 FGF21 변이체 단백질이 결합한 형태인 이량체 또는 다량체 FGF21 변이체 단백질이 면역글로불린의 Fc 영역에 결합한 형태일 수 있다. 또한, FGF21 변이체 단백질이 결합된 면역글로불린의 Fc 영역이 두 개 이상 결합된 이량체 또는 다량체 형태일 수 있다.

[0109] 또한, 상기 융합 단백질은, 구체적으로, 서열번호: 36 내지 39 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시될 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호: 36, 37 또는 39의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0110] 나아가, 상기 융합 단백질은, 구체적으로, 서열번호: 58 내지 67 중 어느 하나의 아미노산 서열로 표시될 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호: 65, 66 또는 67의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0111] 상기 FGF21 변이체 단백질은 면역원성 감소 최소화를 위한 1 내지 10개의 아미노산 변이를 추가로 포함할 수 있다. 상기 면역원성은 공지된 통상의 방법으로 예측할 수 있다. 예를 들면, iTope™과 TCED™ 방법을 이용하여 단백질의 잠재적인 면역원성을 스크리닝할 수 있다.

[0112] 또한, 상기 면역원성 감소 최소화를 위한 변이는 공지된 통상의 방법으로 설계할 수 있다. 예를 들면, EpiScreen™ 분석을 수행하여 면역원성 가능성을 평가한 후 면역원성이 관찰될 경우, T-cell 항원결정부 지도작성(epitope mapping)을 통해 면역원성을 유발하는 아미노산 서열을 확인할 수 있으며, 인실리코 예측을 통해 면역원성이 최소화된 변이체를 설계할 수 있다.

[0113] 상기 융합 단백질은 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

[0114] 구체적으로, 상기 간염증은 급성바이러스성 간염, 만성 간염, 알코올성 간염, 자가면역성 간염, 전격성 간염, 비알콜성 지방간염(NASH)일 수 있다. 구체적으로, 간경화는 알코올성 간경변증, 원발성 담관성 간경변증 질환일 수 있다.

[0115] 또한, 상기 약학적 조성물은 약학적 담체를 더 포함할 수 있다. 약학적 담체는 환자에게 항체를 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 중류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성 고체가 담체로 포함될 수 있다. 약학적으로 허용되는 애쥬번트(완충제, 분산제) 또한 약학적 조성물에 포함될 수 있다. 이러한 제형에 있어서 융합 단백질의 농도는 매우 다양할 수 있다.

[0116] 구체적으로, 상기 약학적 조성물은, 조성물의 pH, 오스몰 농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균성, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 흡착, 또는 투과를 변형하거나, 유지하거나 또는 보존하기 위한 제제화 물질을 함유할 수 있다. 적합하게 제제화하기 위해서 아미노산(예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신), 항미생물제, 항산화제(예컨대 아스코르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨), 완충제(예컨대 보레이트, 비카르보네이트, 트리스-HCl, 시트레이트, 포스페이트 또는 다른 유기산), 벌킹제(예컨대 만니톨 또는 글리신), 킬레이트화제(예컨대 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)), 착화제(예컨대 카페인, 폴리비닐파롤리돈, 베타-시클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린), 충전제, 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물(예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린), 단백질(예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린), 착색제, 항미제 및 희석제, 유화제, 친수성 중합체(예컨대 폴리비닐파롤리돈), 저분자량 폴리펩타이드, 염-형성 반대이온(예컨대 나트륨), 보존제(예컨대 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸알콜, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소), 용매(예컨대 글리세린, 프로필렌글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜), 당 알콜(예컨대 만니톨 또는 소르비톨), 혼탁화제, 계면활성제 또는 습윤제(예컨대 플루로닉스; PEG; 소르비탄 에스테르; 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80; 트리톤; 트로메타민; 레시틴; 콜레스테롤 또는 텔록사팔), 안정성 증진제(예컨대 수크로스 또는 소르비톨), 장성 증진제(예컨대 알칼리 금속 할라이드; 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨; 또는 만니톨 소르비톨), 전달 비히클, 희석제, 부형제 및/또는 제약 아주반트를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0117] 또한, 본 발명은 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간염증, 간섬유화 및 간경화의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0118] 구체적으로, 본 발명은 상기 융합 단백질을 치료가 필요한 개체에 투여하는 것을 포함하는, 간염증, 간섬유화 및 간경화를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 상기 간염증인 급성바이러스성 간염, 만성 간염, 알코올성 간염, 자가면역성 간염, 전격성 간염, 비알콜성 지방간염(NASH)을 포함할 수 있다. 또한, 간경화인 알코올성 간경변증, 원발성 담관성 간경변증 및 간섬유화 질환의 증상을 가진 포유류에게 본 발명의 융합 단백질의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.
- [0119] 본원의 약학적 조성물은 어떠한 경로로도 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 직접적으로(예, 조직 부위에 주입, 이식 또는 국부적으로 투여함으로써, 국소적으로) 또는 시스템적으로(예, 비경구 또는 경구로) 임의의 적절한 수단에 의하여 동물에게 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물이 정맥 내, 피하, 눈(ophthalmic), 복강 내, 근육 내, 구강, 직장, 안와 내(intraorbital), 뇌 내(intracerebral), 두개 내(intracranial), 척추 내(intraspinal), 뇌실 내(intraventricular), 수막강 내(intrathecal), 조내(intracisternal), 캡슐 내(intracapsular), 비 내(intranasal) 또는 에어로졸 투여와 같이 비경구적으로 제공되는 경우, 조성물은 예를 들면, 수성(aqueous)하거나 생리학적으로 적용가능한 체액 혼탁액 또는 용액의 부분을 포함할 수 있다. 이에 따라, 담체 또는 운반체(vehicle)가 생리학적으로 허용가능하므로 조성물에 첨가하여 환자에게 전달될 수 있다. 따라서, 제제를 위한 체액과 같은 담체로 일반적으로 생리식염수를 포함할 수 있다.
- [0120] 또한, 투여 빈도는 사용되는 제제 내의 융합 단백질의 약동학적 파라미터에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 임상의는 목적 효과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 조성물을 투여할 것이다. 따라서, 조성물은 단일 용량으로서, 시간 간격을 둔 2회 이상의 용량(동일한 양의 목적 융합 단백질을 함유하거나 함유하지 않을 수 있음)으로서, 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가의 정밀화는 당업자에 의해 일상적으로 이루어지고, 그들에 의해 일상적으로 수행되는 업무 영역 내에 해당한다.
- [0121] 또한, 융합 단백질의 단위 투여량은 인간에 있어서 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 $100 \text{ mg}/\text{kg}$ 이며, 구체적으로, $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 $10 \text{ mg}/\text{kg}$ 이다. 상기 함량이 최적량이긴 하나, 치료대상 질환 및 부작용의 유무에 따라 달라질 수 있으며, 최적의 투여량은 통상적인 실험을 이용하여 결정될 수 있다. 융합 단백질의 투여는 주기적인 급속 주입(periodic bolus injections)에 의하거나, 외측 공급원(external reservoir) (예, 정맥주사 보유주머니(intravenous bag)) 또는 내측(예, 생체부식성 임플란트(bioerodable implant))으로부터의 지속적인 정맥 내, 피하, 또는 복막 내 투여에 의할 수 있다.
- [0122] 또한, 본 발명의 융합 단백질은 다른 생물학적 활성 분자와 함께 대상 수용체에 투여될 수 있다. 그러나 융합 단백질 및 다른 분자의 최적의 조합, 투여 형태, 정량은 당업계에서 잘 알려진 통상적인 실험을 통하여 결정될 수 있다.
- [0123] 본 발명은 간염증, 간섬유화 및 간경화를 예방 또는 치료하기 위한 본 발명의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0124] 본 발명은 간염증, 간섬유화 및 간경화 예방 또는 치료용 조성물을 제조하기 위한 본 발명의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0125] 본 발명의 또 다른 측면으로, 본 발명은 상기 융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산분자를 제공한다. 상기 단리된 핵산분자는 DNA, RNA, 및 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 구체적으로는 DNA일 수 있다.
- [0126] 이때, 상기 융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산분자는 코돈의 중복(redundancy)으로 인해 서로 상이한 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 단리된 핵산분자는 상기 융합 단백질을 생산할 수 있는 한 목적에 따라 적절히 변형되거나, N-말단 또는 C-말단에 뉴클레오티드가 첨가될 수 있다.
- [0127] 상기 단리된 핵산분자는, 예를 들어, 서열번호 71 내지 80 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0128] 본 발명의 또 다른 측면으로, 본 발명은 상기 단리된 핵산분자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [0129] 용어 "발현벡터"는 숙주 세포의 형질전환에 적합하고 삽입된 이종 핵산 서열의 발현을 지시하거나 제어하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 의미한다. 상기 벡터는 선형(linear) 핵산, 플라스미드, 파지미드(phagemids), 코스미드(cosmids), RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 상기 바이러스 벡터의 예로는 레트로바

이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 및 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0130] 본원에서 사용된 용어, 목적 단백질의 "이종 핵산 서열의 발현" 또는 "발현"은, 삽입된 DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역, 및 Fc 융합 단백질 생산물 또는 항체 또는 항체 단편의 생산을 의미한다.

[0131] 유용한 발현벡터는 RcCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다. 유용한 발현벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 인간 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 및 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 우태 성장 인자(bovine growth hormone) 폴리아데닐레이션 신호 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구체예로 발현벡터는, RcCMV의 변형 벡터인 pAD15일 수 있다.

[0132] 본 발명의 또 다른 측면으로, 본 발명은 상기 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0133] 본원에서 사용된 용어 "숙주세포"는 재조합 발현벡터가 도입될 수 있는 원핵 및 진핵 세포를 의미한다. 본원에서 사용된 용어, "형질전환된" 및 "형질감염된"은 당업계에 공지된 많은 기술에 의한 세포 내로의 핵산(예를 들어, 벡터)을 도입하는 것을 의미한다.

[0134] 상기 숙주세포는 본 발명의 DNA 서열로 형질전환되거나 형질감염시킬 수 있으며, 목적 단백질의 발현 및/또는 분비에 이용될 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주 세포는 불사의 하이브리도마 세포(imortal hybridoma cells), NS/0 골수종 세포(NS/0 myeloma cells), 293 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO cell), HeLa 세포, CAP 세포 (인간 양수 유래 세포), 또는 COS 세포를 포함할 수 있다.

[0135] 이하, 본 발명의 이해를 돋기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다.

제조예 1. FGF21 변이체 단백질을 포함한 융합 단백질의 제조 및 정제

제조예 1-1. FGF21 변이체 단백질의 발현을 위한 발현벡터의 제조

[0138] Fc-FGF21 구조에서 FGF21의 안정성, 활성 및 약물동태 프로필을 개선시키기 위해 FGF21에 대한 돌연변이 연구를 수행하였다.

[0139] 구체적으로, FGF21 단백질의 3차원 구조 분석을 통해 단백질 활성에 영향이 클 것으로 예측되는 LLLE(서열번호 1의 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 98번 내지 101번 아미노산) 부위와, GPSQG(서열번호 1의 FGF21 단백질의 N-말단으로부터 170번 내지 174번 아미노산) 부위, A180 부위에 대한 변이체 단백질을 고안하였다.

[0140] 하기 표 1에 FGF21에 도입된 돌연변이의 위치, 서열정보, 목적 및 각 돌연변이의 기대효과를 정리하였다. 표 1에서 N은 당화(glycosylation)된 아스파라긴(N)을 나타낸다.

표 1

서열 기호	위치	기존 서열	돌연변이 서열	목적	기대 효과
EIRP	98-101	LLLE	EIRP	FGF19 서열로 교체	안정성, 약물동태 개선
TGLEAV	170-174	GPSQG	TGLEAV	FGF19 서열로 교체	약물동태 개선
TGLEAN	170-174	GPSQG	TGLEAN	FGF19 서열로 교체, N-glycosylation 추가	약물동태 개선
G170N	170	G	<u>N</u>	점 돌연변이, N-glycosylation 추가	약물동태 개선
G174N	174	G	<u>N</u>	점 돌연변이, N-glycosylation 추가	약물동태 개선
A180E	180	A	E	점 돌연변이	약물동태 개선

[0142] 또한, 하기 표 2에는 표 1에 기술된 돌연변이를 포함하는 FGF21 변이체 단백질을 나타내었다.

표 2

서열번호	FGF21 변이체 단백질 서열
서열번호: 6	FGF21(EIRP)

서열번호: 7	FGF21(TGLEAV)
서열번호: 8	FGF21(TLEAN)
서열번호: 9	FGF21(G170N)
서열번호: 10	FGF21(G174N)
서열번호: 11	FGF21(EIRP, TGLEAV)
서열번호: 12	FGF21(EIRP, TLEAN)
서열번호: 13	FGF21(EIRP, G170N)
서열번호: 14	FGF21(EIRP, G174N)
서열번호: 15	FGF21(EIRP, A180E)
서열번호: 16	FGF21(TGLEAV, A180E)
서열번호: 17	FGF21(TLEAN, A180E)
서열번호: 18	FGF21(G170N, A180E)
서열번호: 19	FGF21(G174N, A180E)
서열번호: 20	FGF21(EIRP, TGLEAV, A180E)
서열번호: 21	FGF21(EIRP, TLEAN, A180E)
서열번호: 22	FGF21(EIRP, G170N, A180E)
서열번호: 23	FGF21(EIRP, G174N, A180E)

[0144]

세 가지 구성요소는 N-말단으로부터 C-말단으로 융합 캐리어, 링커 및 FGF21 변이체의 순서로 발현되도록 발현벡터에 아미노산을 코딩하는 뉴클레오타이드를 발현벡터에 적재하였다. 하기 표 3에 FGF21 변이체 융합 단백질의 기호, FGF21에 도입된 돌연변이 서열, 융합 캐리어 서열, 링커 서열을 정리하였다. 표 3에서 N은 당화(glycosylation)된 아스파라긴(N)을 나타낸다.

표 3

[0145]

서열번호	물질 코드	FGF21 돌연변이 서열	융합 캐리어	링커 서열
서열번호: 27	DFD1	EIRP, TGLEAV	hyFc (서열번호: 26)	C (서열번호: 2)
서열번호: 28	DFD3	TGLEAV	hyFc (서열번호: 26)	AKA (서열번호: 3)
서열번호: 29	DFD4	TGLEAV	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 30	DFD5	TLEAN	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 31	DFD6	G170N	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 32	DFD6(E.coli)	G170N	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 33	DFD7	G174N	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 34	DFD9	없음	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 35	DFD13	EIRP, TGLEAV	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 36	DFD18	EIRP, TGLEAV, A180E	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 37	DFD72	EIRP, TLEAN, A180E	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 38	DFD73	EIRP, G170N	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 39	DFD74	EIRP, G170N, A180E	hyFc (서열번호: 26)	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 40	RGE(Amgen)	L98R, P171G, A180E	IgG1Fc 변이체	GS3 (서열번호: 4)
서열번호: 41	Fc-FGF21 (Lilly)	서열번호 X	IgG4Fc 변이체 (서열번호: 25)	GS3A (서열번호: 5)

[0146]

상기 FGF21 변이체 융합 단백질을 생산하기 위하여, 각 FGF21 변이체 융합 단백질의 아미노산 서열을 기초로 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 (주)바이오니아사(한국)에 의뢰하여 합성하였다. 각 FGF21 변이체 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단과 3' 말단에 각각 *NheI* 과 *NotI* 제한효소 서열을 첨가하였다. 5' 말단의 제한효소 서열 뒤에 단백질 번역을 위한 시작 코돈과 발현된 단백질을 세포 밖으로 분비하게 하는 유도서열(MDAMRLGLCCVLLCGAVFVSPSHA)을 삽입하였다. 각 FGF21 변이체 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 뒤에는 종결코돈을 삽입하였다. *NheI*과 *NotI* 두 제한효소 서열을 이용하여 각 FGF21 변이체 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 pTrans-empty 발현벡터에 클로닝하였다. 상기 pTrans-empty 발현벡터는 독일의 CEVEC사에서 입수하였으며, CMV 프로모터, pUC 유래 복제기원, SV40 유래 복제기원, 암페실린 내성 유전자를 가지는 간단한 구조의 발현벡터이다.

[0147]

한편, DFD6(*E.coli* 발현), 암젠사의 Fc-FGF21 융합단백질인 RGE(Amgen)의 경우, 대장균 발현을 위해 pET30a 발

현벡터에 각 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오파이드 서열을 삽입하였다.

[0148] 제조예 1-2. FGF21 변이체 융합 단백질의 발현을 위한 플라스미드 DNA의 제작

상기 제조예 1-1에서 제작한 각 발현벡터를 대장균에 형질전환하여 발현에 쓰일 다양한의 플라스미드 DNA를 얻었다. 각 발현벡터는 세포벽이 약화된 대장균 내에 열쇼크를 통해 형질도입하였으며, LB 플레이트에 도말하여 콜로니를 확보하였다. 확보된 콜로니를 LB 배지에 접종한 후 37°C에서 16시간 배양하여 각 발현벡터를 세포 내에 가지는 대장균을 각각 100 mL씩 확보하였다. 확보된 대장균은 원심분리를 통해 배양배지를 제거한 후 P1, P2, P3 용액(QIAGEN사, cat. no.:12963)을 첨가하여 세포벽을 깨고 단백질과 DNA를 분리한 DNA 혼탁액을 확보하였다. Qiagen DNA 정제 칼럼을 이용해 확보한 DNA 혼탁액으로부터 플라스미드 DNA를 정제하였다. 용출된 플라스미드 DNA는 아가로즈 겔 전기영동을 통해 확인하였으며, 나노드롭 기기(Thermo scientific사, Nanodrop Lite)를 이용하여 농도와 순도를 측정한 후 발현에 사용하였다.

[0150] 제조예 1-3. CAP-T 세포에서 융합 단백질의 발현

상기 제조예 1-2에서 분리한 각 플라스미드 DNA로 인간세포주를 형질전환하였다. PEM 배지(Life technologies)에서 배양 중인 CAP-T 세포(CEVEC사)에 PEI 용액(Polyplus사, cat. no.:101-10N)을 이용하여 각 플라스미드 DNA를 형질도입하였다. DNA와 PEI 용액의 혼합액을 인비트로젠사의 Freestyle293 발현 배지를 이용하여 혼탁한 세포에 섞고 37°C에서 5시간 배양 후 PEM 배지를 첨가하였다. 37°C에서 5 내지 7일간 배양 후 원심분리를 통해 세포를 제거하여 FGF21 변이체 융합 단백질이 포함된 상등액을 확보하였다.

[0152] 제조예 1-4. 대장균에서 FGF21 변이체 융합 단백질의 발현

DFD6(*E.coli*)와 RGE(Amgen)를 발현하는 플라스미드 DNA를 대장균 BL21(DE3) 균주에 형질전환시켜, 재조합 대장균을 제조하였다. 융합 단백질을 발현하는 재조합 대장균을 LB 배지 20 mL에 접종하여 37°C에서 15시간 동안 진탕 배양한 후, 이들 배양액 일부를 다시 LB 배지 100 mL에 접종한 후 37°C에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. 배양이 종료된 후 원심분리하여 대장균 펠렛을 확보한 후, 고압력세포파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하여 봉입체(inclusion body)를 회수하였다.

회수된 봉입체는 세척(washing)과 용출(elution), 단백질 재접힘(refolding) 과정을 통하여 정제하였다. 구체적으로, 상기에서 얻어진 봉입체를 0.5% 트리톤(Triton) X-100, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 8.0 베퍼로 2 내지 3회 세척하여 세균 단백질(bacterial protein)을 제거한 후 8 M 우레아 완충액(urea buffer; 8 M urea, 50 mM Tris, 1 mM DTT)으로 재현탁하였다. 8 M 우레아에 들어있는 단백질은 완전히 변성(denatured)되어 있는 상태이므로 하기와 같이 단백질 재접힘(refolding) 과정을 수행하였다.

먼저, 8 M 우레아 완충액으로부터 20 mM 글리신, pH 9.0 완충액을 이용하여 단계별로 희석시켜 우레아를 제거하였다. 2 M 우레아에서부터는 단백질의 안정적 구조회복(folding)을 유도하기 위하여 80 μM 농도가 되도록 황산구리(CuSO₄)를 첨가하였다. 재접힘 과정이 끝난 단백질은 pH 7.4의 PBS로 완충액을 교환해 주고 0.22 μm 필터를 이용하여 불순물을 제거한 후 Protein A 친화크로마토그래피 칼럼에 로딩하였다. 1X PBS(pH 7.4) 완충액으로 칼럼을 세척한 후 100 mM 글리신(pH 3.0) 완충액으로 단백질을 용출하여 DFD6(*E.coli*)융합 단백질을 제조하였다.

RGE(Amgen) 융합 단백질의 경우, 재접힘 과정이 끝난 단백질을 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액으로 교환해 주고 0.22 μm 필터를 이용하여 불순물을 제거한 후, 음이온교환수지(POROS® HQ 50 μm, Thermo Fisher Scientific) 칼럼에 로딩하였다. 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액으로 칼럼을 세척한 후, 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액을 농도 구배로 흘려준 후 RGE(Amgen) 융합 단백질을 용출하였다.

음이온교환수지를 통해 얻은 RGE(Amgen) 융합 단백질에 황산암모늄(Ammonium sulfate)을 1 M이 되도록 첨가한 후, 소수성 반응 크로마토그래피 (Phenyl sepharose FF, GE Healthcare) 칼럼을 이용해 정제하였다. 구체적으로, 1 M 황산암모늄이 첨가된 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액으로 칼럼을 세척한 후, 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액을 농도 구배로 흘려준 후 용출된 분획을 10% Tris-glycine 겔에 전기영동 하였다. 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루 R(coomassie brilliant blue R)로 가볍게 진탕하면서 염색하였다. 그 후, 고순도의 FGF21 변이체 융합 단백질이 존재하는 부분을 모아 최종 완충액 1X PBS, 1 mM EDTA, pH 7.4로 4°C에서 밤새 투석하였다. 투석 후 얻어진 단백질 원액을 30,000 분자량 컷오프 원심분리 필터를 사용하여, 3000 rpm, 4°C에서 농축하였다. FGF21 변이체 융합 단백질의 농도는 BCA 정량분석으로 측정하였다.

[0158] 제조예 1-5. FGF21 변이체 융합 단백질의 정제

- [0159] Protein A 친화크로마토그래피 칼럼(GE Healthcare)을 1X PBS(pH 7.4) 완충액으로 평형화하였다. 제조예 1-3에서 제조한 각 FGF21 변이체 융합 단백질을 포함하는 배양 상등액을 $0.2 \mu\text{m}$ 필터로 여과한 후, Protein A 친화크로마토그래피 칼럼에 로딩하였다. 1X PBS(pH 7.4) 완충액으로 칼럼을 세척한 후 100 mM 글리신(pH 3.0) 완충액으로 FGF21 변이체 융합 단백질을 용출하였다. 친화크로마토그래피를 통해 얻은 FGF21 변이체 융합 단백질을 음이온교환수지(POROS® HQ 50 μm , Thermo Fisher Scientific) 칼럼을 이용해 정제하였다.
- [0160] 음이온교환수지 칼럼을 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액으로 평형화한 후, 친화크로마토그래피에서 용출된 FGF21 변이체 융합 단백질을 로딩하였다. 구체적으로, 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액으로 칼럼을 세척한 후, 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액을 농도 구배로 흘려준 후 용출된 분획을 분석하였다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC) 실험법을 이용하여 각 분획을 분석하여 고순도의 FGF21 변이체 융합 단백질이 존재하는 부분을 모은 다음, 제조예 1-4와 동일한 방법으로 농축 및 정량분석을 완료하였다.
- [0161] **실험예 1. 융합 단백질의 시험관 내 활성 측정 결과**
- [0162] **실험예 1-1. FGF21 변이 서열에 따른 활성 측정 결과**
- [0163] 위 제조예 1에서 제조된 융합 단백질인, DFD4, DFD5, DFD6, DFD6(*E.coli*), DFD7, DFD9, DFD13, DFD18, DFD72, DFD73 및 DFD74의 시험관 내 활성을 측정하였다.
- [0164] 구체적으로, 융합 단백질의 시험관 내 활성을 평가하기 위해, FGF21의 보조수용체인 베타-클로토를 과발현하도록 제작된 HEK293 세포주((주)유한양행)를 이용하였다. 활성 평가를 위해, 제조예 1-4 및 1-5에서 얻어진 융합 단백질이 포함된 농축물을 $3 \mu\text{m}$ 농도에서 3배 계열 회석하여, 5시간의 혈청 결핍상태로 배양한 인간 베타-클로토 과발현 HEK293 세포주에 20분간 처리한 후 세포를 세포용해 버퍼(Cisbio/cat# 64ERKPEG)를 첨가한 후 실온에서 60 rpm으로 30분간 교반하여 용해시켰다. 용해된 세포액을 세포외 신호조절 인산화효소(extracellular signal-regulated kinase; ERK)와 인산화된 ERK를 검출할 수 있는 항체(Cisbio/cat# 64ERKPEG)와 섞은 후 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 형광검출기 (TECAN/ GENiosPro)를 이용하여 형광검출반응을 탐지하였다. 활성은 EC₅₀값을 구하여 비교하였다. 그 결과를 도 1a 내지 1c에 나타냈다.
- [0165] 도 1a 내지 1c에서 보는 바와 같이, 야생형 FGF21 단백질에 돌연변이 서열을 도입하더라도 시험관 내 활성 저해가 없는 것을 확인할 수 있었으며, 각 융합 단백질의 FGF21의 활성 정도는 유사한 것을 확인하였다. 또한 대장균에서 발현한 시료 DFD6(*E.coli*)와 동물세포에서 발현한 시료 DFD6을 통해 야생형 FGF21 단백질에 N-당화 돌연변이를 도입하더라도 시험관 내 활성 저해가 없음을 확인하였다.
- [0166] **실험예 1-2. 링커 서열에 따른 활성 측정 결과**
- [0167] 위 제조예 1에서 제조된 융합 단백질인, DFD1, DFD3, DFD4, DFD13의 시험관 내 활성을 측정하였다.
- [0168] 구체적으로, 제조예 1-5에서 얻어진 단백질이 포함된 농축물을 이용하여 실험예 1-1과 동일한 방법으로 융합 단백질의 FGF21 활성을 측정하였다. 그 결과는 도 2a 및 2b에 나타냈다.
- [0169] 그 결과, 도 2a 및 2b에서 보는 바와 같이, 링커 서열에 따라 약간의 활성 차이를 나타내지만 큰 폭의 활성 감소는 없음을 확인하였다.
- [0170] **실험예 1-3. DFD1, RGE(Amgen), Fc-FGF21(Lilly)의 실험 결과**
- [0171] 위 제조예 1에서 제조된 융합 단백질인 DFD1와 대조 물질로 RGE(Amgen) 및 Fc-FGF21(Lilly)의 시험관 내 활성을 측정하였다.
- [0172] 구체적으로, 제조예 1-5에서 얻어진 단백질이 포함된 농축물과 상기 대조 물질인 단백질을 이용하여 실험예 1-1과 동일한 방법으로 융합 단백질의 FGF 21 활성을 측정하였다. 그 결과는 도 3에 나타냈다.
- [0173] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, DFD1과 RGE(Amgen)은 유사한 수준의 시험관 내 활성을 나타냈고, Fc-FGF21(Lilly)은 다른 물질 대비 약 2배 정도 우수한 시험관 내 활성을 확인하였다.
- [0174] **실험예 2. 융합 단백질의 안정성 평가**
- [0175] **실험예 2-1. 안정성 평가 실험 방법**
- [0176] 샘플의 초기 상태에서의 단백질 응집체의 양을 측정하기 위하여, 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC) 방법을 이용하여 고분자량 응집체의 함량(%) (HMW%)를 측정하였다. 그 결과는 도 4a 내지 4c에 나타냈다.

[0177] 구체적으로, SEC-HPLC 방법은 토소하스(TosoHaas) 모델 TSK-GEL G3000SW_{XL} 칼럼을 사용하였다. 완충액 1X PBS, 1 mM EDTA, pH 7.4를 칼럼에 1 mL/min의 유속으로 흘려주어 평형화시켰다. 제조예 1-5에서 얻어진 DFD4와 DFD13 단백질 원액을 30,000 분자량 컷오프 원심분리 필터를 사용하여, 3000 rpm, 4°C에서 20 mg/mL 이상의 표적 농도로 농축하였다. BCA 정량분석으로 각 샘플의 농도를 측정한 후, 완충액 1X PBS, 1 mM EDTA, pH 7.4로 희석하여 최종 20 mg/mL이 되도록 하였다. DFD4와 DFD13의 초기 HMW%를 측정하기 위해, 20 mg/mL의 샘플을 1X PBS, 1 mM EDTA, pH 7.4로 희석하여 1 mg/mL 농도가 되도록 하였다. 그 후, 상기 희석한 샘플을 SEC-HPLC 칼럼에 100 μL씩을 주입하여 분석하였다.

[0178] 또한, 각 샘플의 안정성을 평가하기 위해, 5°C, 25°C 및 37°C에서 2주 동안 보관하면서 4일, 8일, 14일에 SEC-HPLC 방법을 이용하여, HMW%를 측정하였다.

[0179] 그 결과, 도 4a 내지 4c에서 보는 바와 같이, DFD13은 DFD4 대비 초기 시점 및 2주 경과 시점까지 HMW%가 낮은 것으로 확인되었고, 이는 EIRP 돌연변이가 도입됨에 따라 FGF21 변이체 융합 단백질의 안정성이 개선되어 HMW%가 큰 폭으로 감소하였다.

실험 예 2-2. 안정성 평가 결과

[0181] FGF21의 LLLE(98-101)에 도입된 EIRP 돌연변이가 안정성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, DFD4(서열번호: 29) 및 DFD13(서열번호: 35)에 대하여 상기 실험 예 1-1의 방법과 같이 안정성을 측정하였다. DFD4와 DFD13의 0시간 샘플(초기; 0일)과 4일, 8일 및 14일 동안 보관하면서 분석한 결과를 하기 표 4에 요약하였다(표 4의 N.D.는 검출되지 않음(Not detected)을 의미한다).

표 4

[0182] 20 mg/mL 농도에서 DFD4와 DFD13의 2주간 안정성 (HMW%)

Day	DFD4			DFD13		
	5°C	25°C	37°C	5°C	25°C	37°C
0일	0.91				0.56	
4일	4.25	11.64	5.12	0.36	0.34	0.84
8일	6.16	9.99	4.87	N.D.	N.D.	N.D.
14일	8.15	8.83	4.71	N.D.	N.D.	0.32

[0183] 표 4에서 보는 바와 같이, 보관 초기(보관 0일)에서의 HMW% 양은 DFD4의 경우 0.91%, DFD13의 경우 0.56%로 나타났다. 보관 2주 경과 시점, 25°C 조건에서 HMW% 양은 DFD4의 경우 8.83%까지 증가하였다. 반면, DFD13의 경우 HMW%가 관찰되지 않았다. DFD13은 DFD4 대비 초기 시점 및 2주 경과 시점까지 HMW% 비율이 낮은 것으로 확인됐다. 이는 EIRP 돌연변이가 도입됨에 따라, FGF21 변이체 융합 단백질의 HMW% 비율이 큰 폭으로 감소함을 확인하였다.

실험 예 3. 융합 단백질의 약동학 측정

실험 예 3-1. 약동학 측정 실험 방법

[0186] (주)오리엔트 바이오(Orient BIO, Korea)에서 구입한 6주령의 수컷 ICR 마우스를 약물 처리일 전날에 체중의 평균 값이 유사하도록 군분리(채혈 시간당 n=3)하였다. 그 후, 시험물질을 각각 1 mg/kg (RGE의 경우 2 mg/kg) 용량을 단회 피하 투여하였다. 혈액 샘플은 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72 및 96시간 차에 수집하였다. 온전한(intact) 전체 길이 FGF21 단백질의 혈중 농도를 측정하기 위해, 본 시험에서는 N-말단 및 C-말단 FGF21 단백질에 대해 면역 반응성을 갖는 Intact human FGF21 ELISA Kit(F1231-K01, Eagle Biosciences, USA)를 사용하였다. 마우스에 각 융합 단백질을 피하 주사한 후 96시간까지의 혈액 샘플 내 혈중 농도를 측정하여 각 물질별 약물 동태 파라미터를 산출하였다.

실험 예 3-2. 약동학 활성 측정 결과

[0188] 마우스에서 융합 단백질들의 피하 투여 후 시간에 따른 혈중 농도 그래프(도 5)를 바탕으로 약물 동태 파라미터를 산출하여 하기 표 5에 나타냈다.

표 5

Parameters	DFD4	DFD5	DFD6	DFD7	DFD9	DFD13	DFD18	DFD72	DFD73	DFD74	DFD6 (<i>E. coli</i>)	RGE*
T _{max} (Hour)	12	12	12	4	4	12	12	8	8	8	8	12
C _{max} (ng/ml)	1288	1732	2868	696	384	1070	3428	2962	3296	3996	1399	9921
AUC _{last} (ng · hr/ml)	25856	40706	100107	14118	4656	28785	104230	115977	123511	206634	37269	325747
Half-life (Hour)	5.5	8.0	14.9	19.7	17.4	7.1	11.0	14.4	16.6	26.0	9.1	12.9

[0190] 약물의 노출 정도를 나타내는 AUC(Area Under the Curve)를 기준으로 각 용합 단백질들의 약동학 프로파일을 비교 평가하였다.

[0191] 표 5에서 보는 바와 같이, DFD4와 DFD13 및 DFD6과 DFD73을 서로 비교하여 판단해 볼 때, EIRP 서열 도입에 의해 대략적으로 10 내지 20% 정도 AUC가 증가하였다. 또한, DFD9와 DFD4를 비교해 볼 때, TGLEAV 도입에 의해 약 6배 정도 AUC가 증가하였다.

[0192] 또한, TGLEAN, G170N, G174N 변이체들은 FGF21의 C말단에서 생체 내에서 단백질 분해(proteolysis) 된다고 알려진 FGF21의 C-말단 부분에 N-당화를 통한 지속성 향상을 목표로 고안되었다. 각각의 대조 물질 대비 N-당화에 의한 AUC 증가를 확인하였다. 실제로 N-당화에 의한 AUC 개선 효과를 확인하기 위하여, 당화가 일어나지 않는 대장균에서 생산한 물질인 DFD6(*E. coli*)과 비교하였다. 이때, 인간 세포주에서 생산된 DFD6가 대장균 생산 DFD6(*E. coli*) 대비 3배 이상 우수한 AUC 수치를 보임으로서, 당화에 의한 약물 동태 프로파일의 개선이 일어남을 입증하였다.

[0193] A180E는 기존 암절다의 특허에 공개되어 있는 돌연변이로서(WO 2009/149171) TGLEAV 또는 G170N이 도입된 변이체들(DFD13, DFD73)에 A180E를 도입(DFD18, DFD74)하였다. 이때, 약 2 내지 3배 정도 추가적인 AUC 증가가 나타남을 확인하였다.

[0194] 상기 결과들을 정리해 보면 다양한 변이체들의 도입 및 이들의 조합을 통하여, 야생형 FGF21 용합 단백질인 DFD9 대비 우수한 약물 동태 파라미터의 개선을 확인할 수 있었다. 가장 우수한 AUC 수치를 보여주는 용합 단백질은 EIRP, G170N 및 A180E가 도입된 DFD74로서 DFD9 대비 약 45배 뛰어난 AUC 개선 효과를 보였다. 또한, 암절다의 RGE 물질과 비교할 경우, RGE의 투여 용량인 2 mg/kg을 고려할 때 DFD74의 경우 RGE 대비 더 우수한 약물 노출 정도를 보인다고 할 수 있다. 전체적인 변이 서열에 의한 약동학 개선 효과는 표 6에 요약하였다.

표 6

변이 서열 기호	변이 위치	대조물질 vs 개선물질	약동학 파라미터 측정 결과
EIRP	98-101	DFD4 vs DFD13	AUC 개선
		DFD6 vs DFD73	
TGLEAV	170-174	DFD9 vs DFD4	AUC 개선
TGLEAN	170-174	DFD9 vs DFD5	AUC 개선
G170N	170	DFD9 vs DFD6	AUC 개선
		DFD6(<i>E. coli</i>) vs DFD6	AUC 개선
G174N	174	DFD9 vs DFD7	AUC 개선
A180E	180	DFD13 vs DFD18	AUC 개선
		DFD73 vs DFD74	AUC 개선

[0196] 실험예 4. 식이 유도 비만 마우스에서 용합 단백질의 활성 평가

[0197] 실험예 4-1. 식이 유도 비만 마우스에서 활성 평가 실험 방법

[0198] FGF21 변이체 용합 단백질인 DFD18의 체중 감소 효과를 식이 유도 비만 마우스에서 평가하였다. 식이 유도된 비만을 유발하기 위하여, C57BL/6J 마우스들을 [\(주\)중앙실험동물](#)로부터 구입하였다. 구입한 C57BL/6J 마우스들을 60 kcal% 지방을 함유하는 고지방 식이(Research diet) 상에서 8 내지 12주 정도 사육하여 비만 마우스 모델을 제

작하였다. 약물 처리일(0일) 전날에 체중의 평균값이 유사하도록 군분리(군당 n=8)하였다. 그 후, 30 nmol/kg의 용량으로 단회 투여 후 용매인 인산완충식염수(PBS) 대비 체중 변화를 관찰하였다.

[0199] **실험 예 4-2. 식이 유도 비만 마우스에서 활성 평가 결과**

[0200] 식이 유도 비만 마우스에 30 nmol/kg의 DFD18을 단회 투여한 후, 시간에 따른 체중 변화를 관찰하였다. 이때, 투여 후 10일 차까지 계속적인 체중 감소가 일어났다. 또한, 투여 후 11일 차에서 최대 체중 감소(~18%) 후 14일 차까지 유지됨을 확인하였다(도 6a 내지 6b).

[0201] **제조 예 2. 융합 단백질의 제조 및 정제**

[0202] **제조 예 2-1. 융합 단백질의 발현을 위한 발현벡터의 제조**

[0203] Fc 융합 GLP-1 변이체 구조에서, GLP-1 변이체 단백질 서열 또는 이에 융합되는 Fc 헌지 서열이 시험관 내 활성, 약물동태 프로필 및 약리 효능에 미치는 영향을 확인하고자, 다양한 서열의 Fc 융합 GLP-1 변이체 단백질을 고안하였다. 하기 표 7에 GLP-1 변이체 단백질 서열을 기술하였다.

표 7

서열번호	GLP-1 변이체 단백질 서열
서열번호: 43	GLP-1(A2G)
서열번호: 44	GLP-1(GE)
서열번호: 45	GLP-1(GG)
서열번호: 46	GLP-1(GEG)

[0205] 또한, 표 8에 Fc 융합 GLP-1 변이체 단백질 서열을 기술하였다.

표 8

서열번호	Fc 융합 GLP-1 변이체 단백질
서열번호: 49	DFD52: GLP1(A2G)-HyFc5
서열번호: 50	DFD53: GLP1(A2G)-HyFc40
서열번호: 51	DFD54: GLP1(GE)-HyFc5
서열번호: 52	DFD55: GLP1(GE)-HyFc40
서열번호: 53	DFD56: GLP1(GG)-HyFc5
서열번호: 54	DFD57: GLP1(GG)-HyFc40
서열번호: 55	DFD58: GLP1(GEG)-HyFc5
서열번호: 56	DFD59: GLP1(GEG)-HyFc40

[0207] 표 8에서 HyFc5는 서열번호: 47을, HyFc40은 서열번호: 48을 각각 나타낸다. 한편, 융합 단백질 구조에서, GLP-1 변이체 단백질 서열, FGF21 변이체 단백질 서열, GLP-1 변이체에 융합되는 Fc 헌지 서열, 또는 FGF21 변이체 단백질과 Fc 사이에 연결되는 링커 서열이 시험관 내 활성, 약물동태 프로필, 및 약리 효능에 미치는 영향을 확인하고자 다양한 서열의 융합 단백질을 고안하였다. 하기 표 9에 GLP-1 변이체 단백질 및 FGF21 변이체 단백질을 포함하는 융합 단백질 서열을 나타내었다. 각 융합 단백질은 N-말단으로부터 C-말단으로 GPL-1 변이체 단백질, 면역글로불린의 Fc 영역, 링커, FGF21 변이체 단백질 순서로 연결되어있다.

표 9

서열번호	물질 기호	GLP-1 변이체 단백 질 서열	융합 캐리어	링커 서열	FGF21 서열변화
서열번호: 58	DFD23	GLP-1(A2G)	hyFc40 (서열번호: 48)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV)
서열번호: 59	DFD24	GLP-1(GE)	hyFc5 (서열번호: 47)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV)
서열번호: 60	DFD25	GLP-1(GE)	hyFc40 (서열번호: 48)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV)

서열번호: 61	DFD26	GLP-1(GG)	hyFc5 (서열번호: 47)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV)
서열번호: 62	DFD27	GLP-1(GG)	hyFc40 (서열번호: 48)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV)
서열번호: 63	DFD28	GLP-1(GEG)	hyFc5 (서열번호: 47)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV)
서열번호: 64	DFD29	GLP-1(GEG)	hyFc40 (서열번호: 48)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV)
서열번호: 65	DFD69	GLP-1(GEG)	hyFc40 (서열번호: 48)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAV, A180E)
서열번호: 66	DFD112	GLP-1(GEG)	hyFc40 (서열번호: 48)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, TGLEAN, A180E)
서열번호: 67	DFD114	GLP-1(GEG)	hyFc40 (서열번호: 48)	GS3 (서열번호: 4)	FGF21(EIRP, G170N, A180E)

[0209] 구체적으로, 각 융합 단백질의 아미노산 서열을 기초로 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 (주)바이오니아사에 의뢰하여 합성하였다. 각 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단과 3' 말단에 각각 *NheI*과 *NotI* 제한효소 서열을 첨가하였다. 5' 말단의 제한효소 서열 뒤에 단백질 번역을 위한 시작 코돈과 발현된 단백질을 세포 밖으로 분비하게 하는 유도서열(MDAMRLGLCCVLLCGAVFVSPSHA)을 삽입하였다. 각 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 뒤에는 종결코돈을 삽입하였다. *NheI*과 *NotI* 두 제한효소 서열을 이용하여 각 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 pTrans-empty 발현벡터에 클로닝하였다. pTrans-empty 발현벡터는 독일의 CEVEC사에서 입수 하였으며, CMV 프로모터, pUC 유래 복제기원, SV40 유래 복제기원, 암피실린 내성 유전자를 가지는 간단한 구조의 발현벡터이다.

[0210] 제조예 2-2. Fc 융합 GLP-1 변이체 및 융합 단백질의 발현을 위한 플라스미드 DNA의 제작

[0211] 상기 제조예 2-1에서 제작한 각각의 발현벡터를 대장균에 형질전환하여 발현에 쓰일 다량의 플라스미드 DNA를 얻었다. 각각의 발현벡터는 세포벽이 약화된 대장균내에 열쇼크를 통해 형질도입한 후, LB 플레이트에 도말하여 콜로니를 확보하였다. 확보된 콜로니를 LB배지에 접종한 후 37°C에서 16시간 배양하여 각 발현벡터를 세포내에 가지는 대장균을 각 100 mL씩 확보하였다. 확보된 대장균은 원심분리를 통해 배양배지를 제거하였다. 그 후, P1, P2, P3 용액(QIAGEN사, cat. no.:12963)을 첨가하여 세포벽을 깬 뒤, 단백질과 DNA를 분리한 DNA 혼탁액을 확보하였다. Qiagen DNA 정제 칼럼을 이용해 확보한 용액으로부터 플라스미드 DNA를 정제하였다. 용출된 DNA는 아가로즈 겔 전기영동을 통해 확인하였으며, 나노드롭 기기(Thermo scientific사, Nanodrop Lite)를 이용하여 농도와 순도를 측정한 후 발현에 사용하였다.

[0212] 제조예 2-3. CAP-T 세포에서 Fc 융합 GLP-1 변이체 및 융합 단백질의 발현

[0213] 상기 제조예 2-2에서 분리한 각 플라스미드 DNA로 인간세포주를 형질전환하였다. PEM 배지(Life technologies)에서 배양 중인 CAP-T 세포(CEVEC사)에 PEI 용액(Polyplus사, cat. no.:101-10N)을 이용하여 각 플라스미드 DNA를 형질도입하였다. DNA와 PEI 용액의 혼합액을 인비트로젠사의 Freestyle293 발현 배지를 이용하여 혼탁한 세포에 섞고 37°C에서 5시간 배양 후 PEM 배지를 첨가하였다. 37°C에서 5내지 7일간 배양 후 원심분리를 통해 세포를 제거하여 각 단백질이 포함된 상등액을 확보하였다.

[0214] 제조예 2-4. Fc 융합 GLP-1 변이체 및 융합 단백질의 정제

[0215] Protein A 친화크로마토그래피 칼럼(GE Healthcare)을 1X PBS(pH 7.4) 완충액으로 평형화하였다. 제조예 2-3에서 제조한 각 Fc 융합 GLP-1 변이체 및 융합 단백질을 포함하는 배양 상등액을 0.2 μm 필터로 여과하였다. 그 후, Protein A 친화크로마토그래피 칼럼에 로딩하였다. 1X PBS(pH 7.4) 완충액으로 칼럼을 세척한 후 100 mM 글리신(pH 3.0) 완충액으로 각 단백질을 용출하였다. 친화크로마토그래피를 통해 얻은 단백질은 음이온교환수지(POROS® HQ 50 μm, Thermo Fisher Scientific) 칼럼을 이용해 정제하였다. 음이온교환수지 칼럼을 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액으로 평형화한 후, 친화크로마토그래피에서 용출한 단백질을 로딩하였다.

[0216] 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액으로 칼럼을 세척한 후, 50 mM Tris(pH 8.0) 완충액을 농도 구배로 흘려준 후 용출된 분획을 분석하였다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC) 실험법을 이용하여 각 분획을 분석하였다. 고순도의 Fc 융합 GLP-1 변이체 및 융합 단백질이 존재하는 부분을 모아 최종 완충액 1X PBS, 1 mM EDTA, pH 7.4로 4

℃에서 밤새 투석하였다. 투석이 끝난 후 얻어진 단백질 원액을 30,000 MW 컷오프 원심분리 필터를 사용하여, 3000 rpm, 4℃에서 농축하였다. 각 단백질의 농도는 BCA 정량분석으로 측정하였다.

[0217] 실험예 5. 융합 단백질의 시험관 내 활성 측정 결과

[0218] 실험예 5-1. DFD23, 24, 25, 26, 27, 28 및 29의 실험 결과

융합 단백질인 DFD23, DFD24, DFD25, DFD26, DFD27, DFD28, 및 DFD29의 시험관 내 GLP-1 활성을 측정하였다. 구체적으로, 융합 단백질의 GLP-1 활성을 평가하기 위해 인간 GLP-1 수용체가 과발현된 CHO 세포주(Eurofins, HTS163C2)를 구입하여 사용하였다. 활성 평가를 위해 융합 단백질이 포함된 샘플(이하, "샘플"로 기재, 제조예 2-4의 단백질 원액)을 25 nM 농도에서 4배 계열 희석하여 인간 GLP-1 수용체 과발현 CHO 세포주에 30분간 처리한 후 생성된 세포 내 cAMP을 측정하였다(Cisbio, 62AM4PEB). 각 물질 간의 활성 비교는 EC₅₀ 값을 구하여 평가하였다.

[0220] 도 7에서 보는 바와 같이, GLP-1(A2G) 서열을 포함하는 융합 단백질의 경우 다른 GLP-1 변이체 서열을 포함하는 융합 단백질 대비 2 내지 3배 정도 낮은 활성을 보였다. GLP-1(A2G) 이외의 돌연변이 서열을 포함하는 융합 단백질에 대한 GLP-1 활성은 큰 차이를 보이지 않았다.

[0221] 실험예 5-2. DFD59, 69, 112 및 114의 실험 결과

[0222] 상기 제조예 2에서 제조된 융합 단백질 DFD69, DFD112, 및 DFD114와 Fc 융합 GLP-1 변이체인 DFD59의 시험관 내 GLP-1 활성을 측정하였다. 구체적으로, 각 단백질의 GLP-1 활성을 평가하기 위해 인간 GLP-1 수용체가 과발현된 CHO 세포주(Eurofins, HTS163C2)를 구입하여 사용하였다. 활성 평가를 위해 각 단백질이 포함된 샘플을 25 nM 농도에서 4배 계열로 순차적으로 희석하여 인간 GLP-1 수용체 과발현 CHO 세포주에 30분간 처리한 후 생성된 세포 내 cAMP을 측정하였다 (Cisbio, 62AM4PEB).

[0223] 도 8a 내지 8b에서 보는 바와 같이, 각 물질 간의 활성 비교는 EC₅₀ 값을 구하여 평가하였다. 3종의 융합 단백질은 유사한 EC₅₀ 값을 나타내었으며, FGF21 변이체를 포함하지 않는 DFD59는 융합 단백질 대비 약 2배의 활성을 나타내었다.

[0224] DFD69, DFD112, 및 DFD114의 FGF21 부분의 시험관 내 활성을 측정하였다. 구체적으로, 융합 단백질의 FGF21 부분의 시험관 내 활성을 평가하기 위해 FGF21의 보조 수용체인 베타-클로토가 과발현하도록 제작된 HEK293 세포주를 이용하였다. 활성 평가를 위해 융합 단백질이 포함된 샘플을 3 μM 농도에서 3배 계열로 순차적으로 희석하여 5시간의 혈청 결핍 상태로 배양한 인간 베타-클로토 과발현 HEK293 세포주에 20분간 처리한 후 세포용해 버페(Cisbio/cat# 64ERKPEG)를 첨가한 후 실온에서 60 rpm으로 30분간 교반하여 세포를 용해시켰다. 용해된 세포액은 ERK와 인산화된 ERK를 검출할 수 있는 항체와 섞은 후 2시간 상온에서 반응시킨 후 형광검출기(TECAN/GENiosPro)를 이용하여 형광검출반응을 탐지하였다. 활성은 EC₅₀ 값을 구하여 비교하였다.

[0225] 그 결과, 도 8a 내지 8b에서 보는 바와 같이, 3종의 융합 단백질 DFD69, DFD112, 및 DFD114의 FGF21 부분의 시험관 내 활성은 모두 유사함을 확인하였다.

[0226] 실험예 6. 융합 단백질의 약동학 측정

[0227] 실험예 6-1. 약동학 측정 실험 방법

[0228] (주)오리엔트 바이오(Orient BIO, Korea)에서 구입한 6주령의 수컷 ICR 마우스를 약물 처리일 전날에 체중의 평균 값이 유사하도록 군분리(채혈 시간당 n=3)하였다. 그 후, 샘플을 각각 1 mg/kg 용량을 단회 피하 투여하였으며, 혈액 샘플은 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192 및 240 시간차에 수집하였다. 각 융합 단백질의 혈중 농도 정량은 각각의 활성 단백질 부분인 FGF21 부분과 GLP1-Fc 부분으로 나누어서 정량하였다. 융합 단백질 내 온전한(intact) 전체 길이 FGF21 부분의 혈중 농도를 측정하기 위해, N-말단 및 C-말단 FGF21에 대해 면역 반응성을 갖는 Intact human FGF21 ELISA Kit(F1231-K01, Eagle Biosciences, USA)를 사용하였다. 또한 융합 단백질 내 active GLP1-Fc 부분의 혈중 농도를 측정하기 위해, 내부에서 개발된 GLP-1의 N말단 및 Fc에 면역 반응성을 갖는 항체를 이용하여 ELISA 분석하였다. 마우스에 각 단백질을 단회 피하 주사 후 240시간 까지의 혈액 샘플 내 각 물질별 FGF21과 GLP1-Fc 부분의 혈중 농도를 측정하여 각각의 약물 동태 파라미터를 산출하였다.

[0229] 실험예 6-2. 약동학 활성 측정 결과

[0230] 마우스에 각 단백질들의 단회 피하 투여 후 시간에 따른 활성 물질 별 혈중 농도(도 9a 내지 9b)를 바탕으로 융

합 단백질의 FGF21 부분과 GLP1-Fc 부분에 대한 약물 동태 파라미터를 산출하여 하기 표 10에 나타냈다.

표 10

Parameters	FGF21 detection			GLP1-Fc detection			
	DFD69	DFD112	DFD114	DFD59	DFD69	DFD112	DFD114
T _{max} (Hour)	8	8	24	4	4	8	4
C _{max} (ng/ml)	2715	3619	3711	5202.1	3234	4454	3616
AUC _{last} (ng · hr/ml)	100907	144395	222504	182852	149083	189338	171687
Half-life (Hour)	13.4	14.2	39.9	20.7	23.3	24.7	27.2

[0231] 약물의 노출 정도를 나타내는 AUC(Area Under the Curve)를 기준으로 각 융합 단백질들의 약동학 프로파일을 비교 평가하였다

[0232] 표 10에서 보는 바와 같이, FGF21 부분의 약물 동태 파라미터는 DFD114가 가장 우수한 약물 노출 정도 (AUC) 및 반감기를 보였으며 DFD112, DFD69 순으로 높은 AUC수치를 나타내었다. DFD114의 경우 DFD69 대비 약 2배 이상 증가한 AUC 수치를 나타내었다. 반면 동일한 GLP-1 변이체 서열을 포함하는 4개 물질(DFD59, DFD69, DFD112 및 DFD114)에 대한 GLP1-Fc 부분에 대한 약물 동태는 모두 유사한 AUC 값을 나타냈다.

[0233] 실험예 7. 식이유도 비만 마우스에서 융합 단백질의 비알콜성 간 지방증에 대한 활성 평가

[0234] 실험예 7-1. 식이유도 비만 마우스에서 비알콜성 간 지방증에 대한 활성 평가 방법

[0235] 융합 단백질 DFD114 및 DFD112와 FGF21 변이체 융합 단백질 DFD74 및 DFD72의 간 지방증 및 지질 개선 효과를 식이 유도 비만 마우스 모델에서 평가하였다. 식이 유도된 비만을 유발하기 위하여, C57BL/6J 마우스를 60 kcal% 지방을 함유하는 고지방 식이(Research diet)를 급이하면서 약 37주 동안 사육하여 간 지방증을 가지는 비만 마우스 모델을 제작하였다. 약물 처리일 전날에 체중의 평균값이 유사하도록 군분리(군당 n=6)하였다. 그 후, DFD114, DFD112, DFD74 및 DFD72를 3 또는 10 nmol/kg의 용량으로 2주 동안 4일 간격으로 총 3회 반복투여 하였다.

[0236] 대조군에는 시험물질 제조에 사용한 용매 (둘베코스 포스페이트 완충 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS, Gibco, USA)를 같은 방법으로 피하 주사하였다. 마지막 투여 4일 후, 하룻밤 동안 절식한 동물에서 흡입 마취 후 개복하여 후대정맥에서 채혈하고, 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액에서 혈청을 분리한 후 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 또한, 고정된 간 조직은 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작하였다. 그 후, 제작된 검체를 해마톡실린-에오신 (Hematoxylin & Eosin, H&E) 염색 후, 광학현미경 (Olympus, ECLIPSE E600)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

[0237] 실험예 7-2. 식이유도 비만 마우스에서 비알콜성 간 지방증에 대한 활성 평가 결과

[0238] 융합 단백질 및 FGF21 변이체 융합 단백질의 비알콜성 간 지방증 및 지질 개선에 대한 효과를 평가하기 위해, 식이 유도 비만 마우스 모델에서 DFD114, DFD112, DFD74 및 DFD72를 3 또는 10 nmol/kg의 용량으로 2주간 4일 간격으로 반복 투여하였다. 그 후, 혈청 및 간조직내 지질 변화를 분석하고, 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

[0239] 도 10a 내지 10c에서 보는 바와 같이, 융합 단백질 DFD114 및 DFD112와 FGF21 변이체 융합 단백질 DFD74 및 DFD72를 반복 피하 투여 후 혈청 중 중성지방 (triglyceride, TG) 및 총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC) 을 측정하였다. 그 결과, 대조군 대비 혈액 내 중성지방 및 총 콜레스테롤 수치가 감소하였으며, 간 조직 내 중성지방의 수치 또한 감소하는 것으로 나타났다.

[0240] 도 11에서 보는 바와 같이, 융합 단백질 DFD114 및 DFD112를 반복 피하 투여 후 조직병리학적 검사 결과, 대조군 대비 간 조직 내 지방이 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

[0241] 실험예 8. MCD 유발 비알콜성지방간염 마우스에서 융합 단백질의 활성 평가

[0242] 실험예 8-1. MCD 유발 비알콜성지방간염 마우스에서 활성 평가 방법

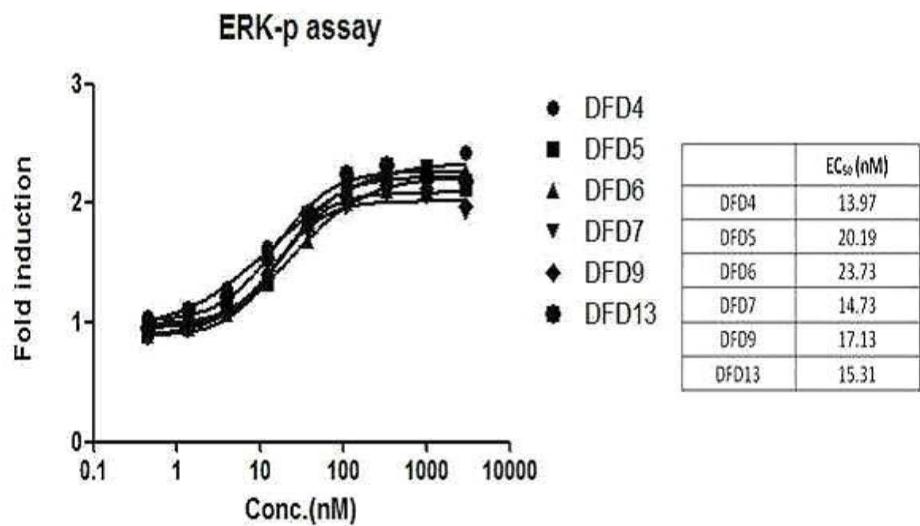
[0243] 융합 단백질 및 FGF21 변이체 융합 단백질에 대한 비알콜성지방간염 모델에서 염증 및 섬유화 감소에 대한 효과를 평가하기 위해, MCD 모델에서 DFD112 및 DFD72의 효과를 평가하였다.

- [0245] 메치오닌콜린결핍(methionine choline deficient, MCD) 사료로 유도된 비알콜성지방간 동물 모델은 비알콜성지방간염 평가에 널리 사용되는 모델 중 하나이다. 베타-산화(beta-oxidation)와 초저비중지질단백(very low density lipoprotein, VLDL) 합성에 중요한 역할을 하는 메치오닌(methionine)과 콜린(choline)이 결여된 사료를 급이함으로써 간 섬유화를 동반하는 지방간염을 유발하였다. 이는 인체의 지방간염의 병태 모델과 유사한 것으로 알려져 있다. 지방간염모델을 유도하기 위하여 C57BL/6에 MCD 사료를 10일간 공급하고 이후 4일간은 정상사료(methionine choline standard, MCS) 사료를 공급하는 방식으로 17주 동안 MCD 사료 및 정상사료를 번갈아 가며 자유롭게 섭취하도록 하였다.
- [0246] 시험물질 투여 전 동물들의 체중을 측정하고 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하여 군을 배정하였다. 군당 10마리씩 배정한 후, 3, 10 및 30 nmol/kg의 DFD112와 10 nmol/kg의 DFD72를 4주간 2일 간격으로 피하 주사하였다. MCS 대조군 및 MCD 사료 대조군에는 시험물질 조제에 사용한 용매(둘베코스 포스페이트 완충 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS, Gibco, USA)를 같은 방법으로 4주간 2일 간격으로 피하 주사하였다.
- [0247] 4주간 시험물질 반복 투여 후, 하룻밤 동안 절식한 다음 동물을 흡입 마취 후 개복하여 후대정맥에서 채혈하고, 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액에서 혈청을 분리한 후 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 고정된 간 조직은 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작하였다. 그 후, 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin & Eosin, H&E) 및 면역조직화학염색을 실시하였고, 광학현미경(Olympus, BX53)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다.
- [0248] **실험예 8-2. MCD 유발 비알콜성지방간염 마우스에서 활성 평가 결과**
- [0249] MCD 유발 비알콜성지방간염 마우스에 3, 10 및 30 nmol/kg의 융합 단백질 DFD112과 10 nmol/kg의 FGF21 변이체 융합단백질 DFD72를 4주간 2일 간격으로 반복 투여하였다. 그 후, 혈액생화학적 검사와 조직병리학적 검사를 통하여 비알콜성지방간염에 대한 효과를 평가하였다.
- [0250] 도 12a 내지 12c에서 보는 바와 같이, 비알콜성지방간염을 유발한 MCD 대조군은 정상사료를 급이한 MCS 대조군 대비 간손상 지표인 알라닌 아미노전이효소(alanine transaminase, ALT) 및 아스파테이트 아미노전이효소(aspartate transaminase, AST)가 유의하게 높은 것으로 관찰되었다($p<0.001$). DFD112 투여군은 MCD 대조군 대비 용량의존적으로 혈중 AST 및 ALT 수치가 감소하였다. 또한, 조직병리학적 검사 결과, MCD 대조군은 MCS 대조군 대비 염증 수준이 유의하게 높은 것으로 관찰되었다($p<0.01$). DFD112 투여시 MCD 대조군 대비 용량의존적으로 염증 정도가 감소하였다.
- [0251] 도 13a 내지 13c 및 도 14에서 보는 바와 같이, 융합 단백질이 간 섬유화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 면역조직화학염색법을 이용하여 간 섬유화 지표인 간 조직내 알파 평활근 액틴(alpha-smooth muscle actin, α -SMA) 및 형질전환 성장인자 베타(transforming growth factor-beta, TGF- β)를 염색한 후 이미지 분석방법으로 정량하였다. MCD 대조군은 MCS 대조군 대비 α -SMA 및 TGF- β 의 발현이 증가되었다($p<0.001$). DFD112 및 DFD72 투여시 MCD 대조군 대비 α -SMA 및 TGF- β 의 발현이 감소하였다. 또한, 피크로시리우스레드(picro-sirius red) 염색을 이용하여 간 조직내 콜라겐을 염색한 후 이미지 분석방법으로 정량하였다. 그 결과, MCD 대조군은 MCS 대조군 대비 콜라겐 양이 증가되어있으며($p<0.001$), DFD112 및 DFD72 투여시 MCD 대조군 대비 간 조직내 콜라겐의 감소경향이 관찰되었다.
- [0252] **실험예 9. 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스에서 융합 단백질의 활성 평가**
- [0253] **실험예 9-1. 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스에서 융합 단백질의 활성 평가 방법**
- [0254] 융합 단백질에 대한 비알콜성지방간염 모델에서 염증 및 섬유화 감소에 대한 효과를 평가하기 위하여 식이로 비만 및 비알콜성지방간염을 유발한 마우스 모델에서 DFD112의 효과를 평가하였다.
- [0255] C57BL/6 마우스에 40% 지방, 40% 탄수화물 및 2% 콜레스테롤을 함유하는 고지방 식이(Research diet)를 약 30주간 급이하여 비만 및 비알콜성지방간염을 가지는 마우스 모델을 제작하였다. 약물 처리 약 3주 전 간 조직을 생검 후 조직병리학적 검사를 진행하고 투여 전 혈중 ALT, AST 농도 및 체중을 측정하였다. 비알콜성지방간염 유발 정도 및 체중이 균일하게 분포하도록 실험동물을 선별하고 군분리를 진행하였다. 마우스를 군당 12마리씩 배정하고, DFD112를 3 또는 10 nmol/kg의 용량으로 8주 동안 2일 간격으로 피하로 반복투여 하였다. 대조군에는 시험물질 제조에 사용한 용매(둘베코스 포스페이트 완충 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS, Gibco, USA)를 같은 방법으로 주사하였다.

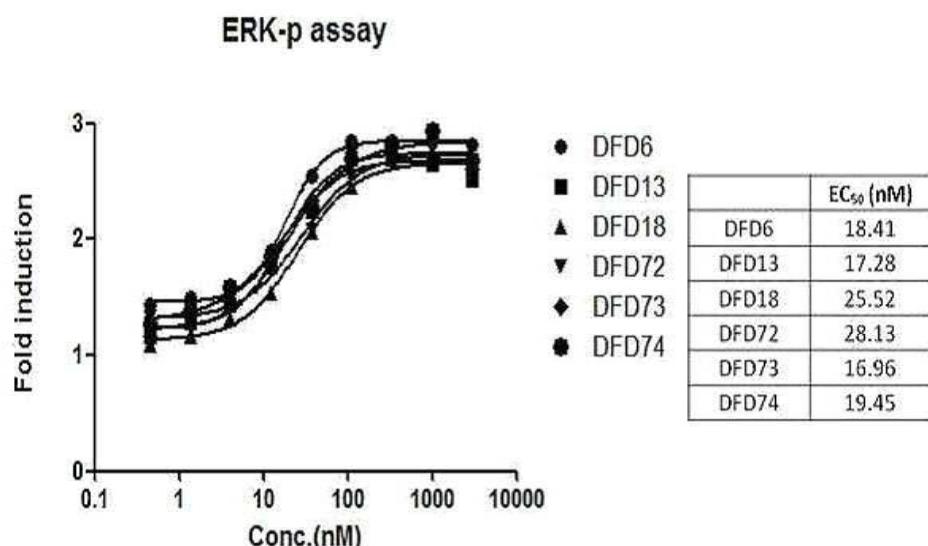
- [0256] 투여 종료 후, 하룻밤 동안 절식한 동물에서 흡입 마취 후 개복하여 후대정맥에서 채혈하고, 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액에서 혈청을 분리한 후 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 고정된 간 조직은 검체 제작 후, 헤마토실린-에오신 (Hematoxylin & Eosin H&E) 또는 피크로시리우스 레드로 염색하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다.
- [0257] **실험 예 9-2. 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스에서 융합 단백질의 활성 평가 결과**
- [0258] 식이유도 비만 및 비알콜성지방간염 마우스에 3 및 10 nmol/kg의 융합 단백질 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 투여 후, 혈액생화학적 검사와 조직병리학적 검사를 통하여 비알콜성지방간염에 대한 효과를 평가하였다.
- [0259] 도 15a 내지 15d에서 보는 바와 같이, DFD112 투여군은 간손상 지표인 혈중 ALT 및 AST 수치를 정상수준으로 감소시켰고 ($p<0.001$), 혈중 중성지방 (TG) 및 총콜레스테롤 (TC) 수치도 대조군 대비 유의하게 감소시켰다 ($p<0.05$ 또는 $p<0.001$).
- [0260] 도 16a 내지 16b에서 보는 바와 같이 투여 전후 조직병리학적 검사 결과, 대조군의 경우 8주간의 반복 투여 시, 비알콜성지방간염의 등급을 분류하는 지표인 비알콜성지방간염 병리활성점수 (NAFLD activity score; NAS)가 투여 전과 대비 증가하거나 유지되었다. 반면, DFD112 투여군에서는 모든 개체에서 비알콜성지방간염 병리활성점수가 투여 전 대비 유의하게 감소하는 것이 관찰되었다. 또한, 섬유화 정도에 대한 평가 결과, 대조군의 경우 투여 전 대비 섬유화 정도가 유지되거나 악화되는 반면, DFD112 투여군에서는 유의하게 개선되는 효과가 관찰되었다 ($p<0.05$).
- [0261] **실험 예 10. TAA 유도 간섬유화 랫트에서 융합 단백질의 활성 평가**
- [0262] **실험 예 10-1. TAA 유도 간섬유화 랫트에서 융합 단백질의 활성 평가 방법**
- [0263] 융합 단백질에 대한 간섬유화 감소 효과를 평가하기 위하여 음수로 간섬유화를 유발한 랫트 모델에서 DFD112의 효과를 평가하였다.
- [0264] 위스타(Wistar) 랫트에 티오아세트아미드 (thioacetamide, TAA)를 함유한 음수를 약 14주간 급이하여 간섬유화 모델을 제작하였다. 시험물질 투여 전 동물들의 체중을 측정하고 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하여 군을 배정하였다. 군당 8마리씩 배정한 후, 30 nmol/kg의 DFD112를 8주 동안 2일 간격으로 피하로 반복투여 하였다. 투여 종료시까지 TAA 음수를 지속해서 급이하였다. 정상 대조군에는 시험개시부터 투여종료시점까지 일반 음수를 급이하였고, TAA 대조군에는 시험개시부터 투여종료시점까지 TAA 음수를 급이하였다.
- [0265] 투여 종료 후, 하룻밤 동안 절식한 동물에서 흡입 마취 후 개복하여 후대정맥에서 채혈하고, 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액에서 혈청을 분리한 후 혈액생화학적 검사를 실시하였고, 고정된 간 조직은 검체 제작 후, 간 실질의 섬유화 정도를 비교하기 위하여 피크로시리우스 레드로 염색하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다.
- [0266] **실험 예 10-2. TAA 유도 간섬유화 랫트에서 융합 단백질의 활성 평가 방법**
- [0267] TAA 유발 간섬유화 랫트에 30 nmol/kg의 융합 단백질 DFD112를 8주간 2일 간격으로 반복 투여 후, 혈액생화학적 검사와 조직병리학적 검사를 통하여 간섬유화에 대한 효과를 평가하였다.
- [0268] 도 17a 내지 17d에서 보는 바와 같이, 간섬유화를 유발한 TAA 대조군은 정상 음수를 급이한 대조군 대비 간손상 지표인 알칼리인산분해효소 (alkaline phosphatase, ALP), 감마글루타밀 전이효소(gamma-glutamyl transferase, GGT) 및 총빌리루빈 (total bilirubin, T-bil) 수치가 유의하게 높은 것으로 관찰되었다($p<0.01$ 또는 $p<0.001$). DFD112 투여시 ALT, GGT 및 T-bil 수치가 TAA 대조군 대비 유의하게 감소하는 것이 관찰되었다. 또한, 조직병리학적 검사 결과, TAA 대조군에서 정상 대조군 대비 피크로시리우스 레드 염색시 양성으로 염색된 간섬유화 면적의 비율이 유의하게 증가하였다. 또한, DFD112 투여시 TAA 대조군 대비 간섬유화 면적의 비율이 유의하게 감소하는 것을 관찰하였다($p<0.001$).

도면

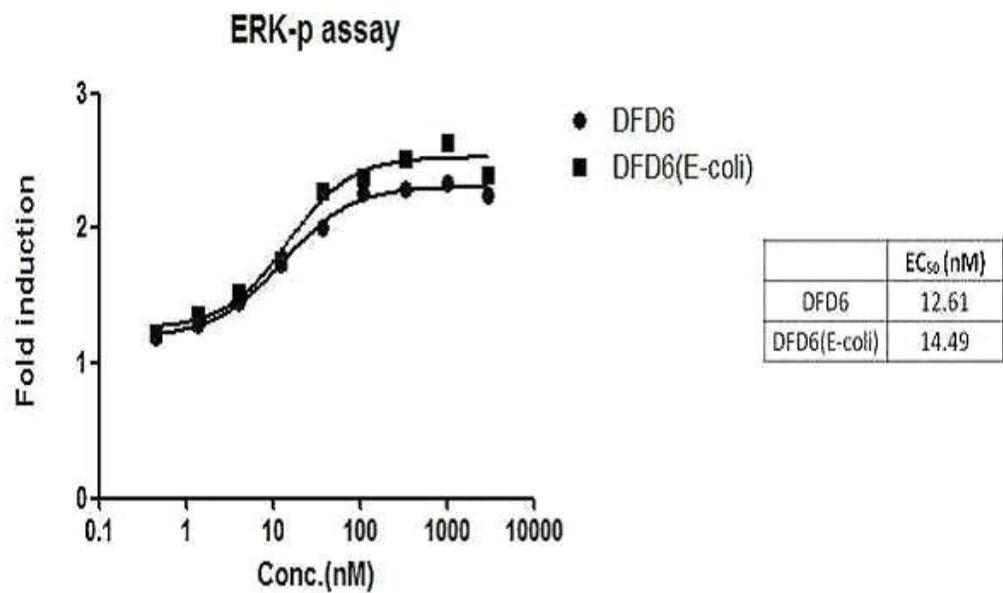
도면 1a



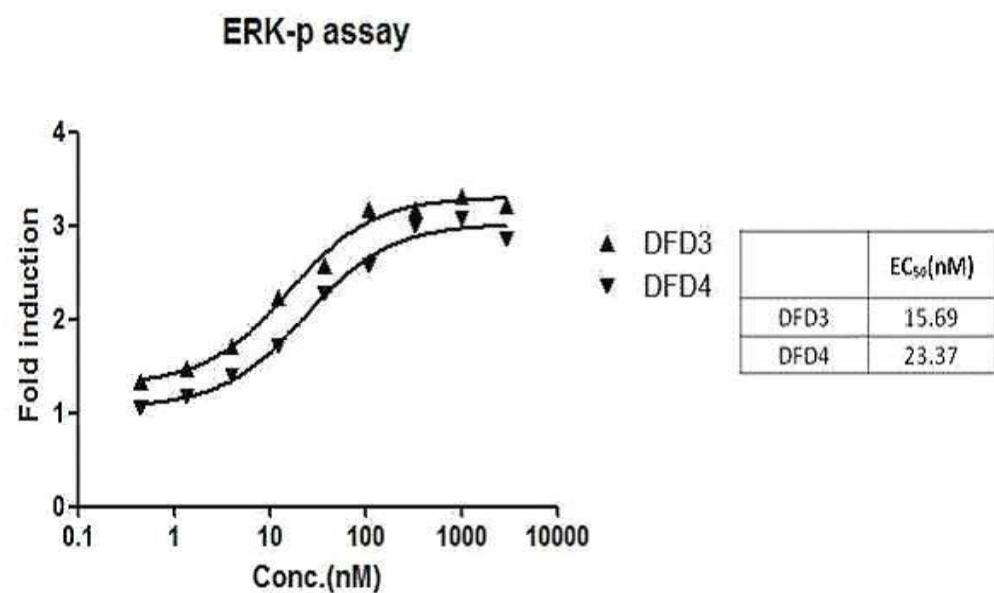
도면 1b



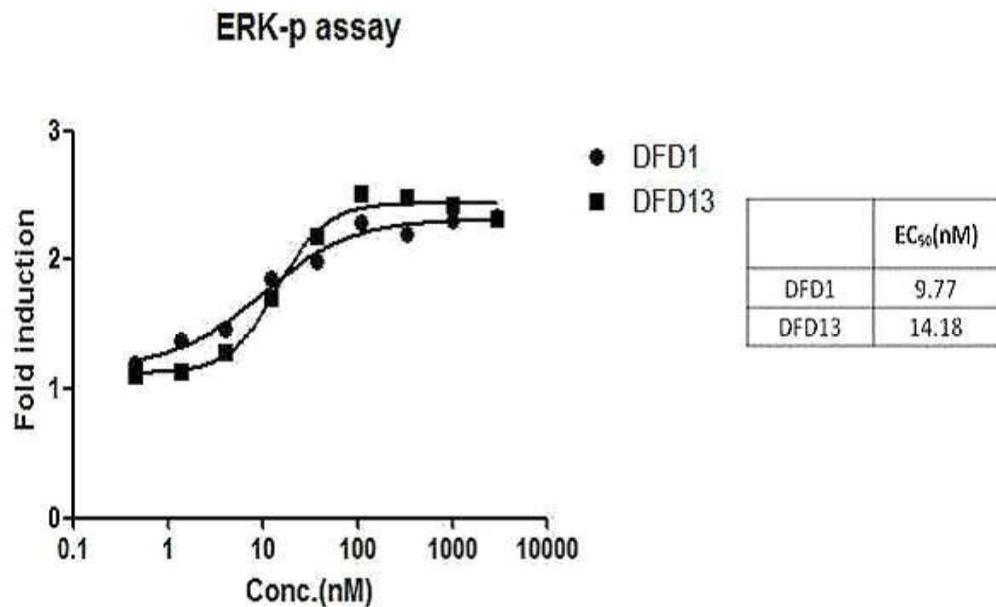
도면1c



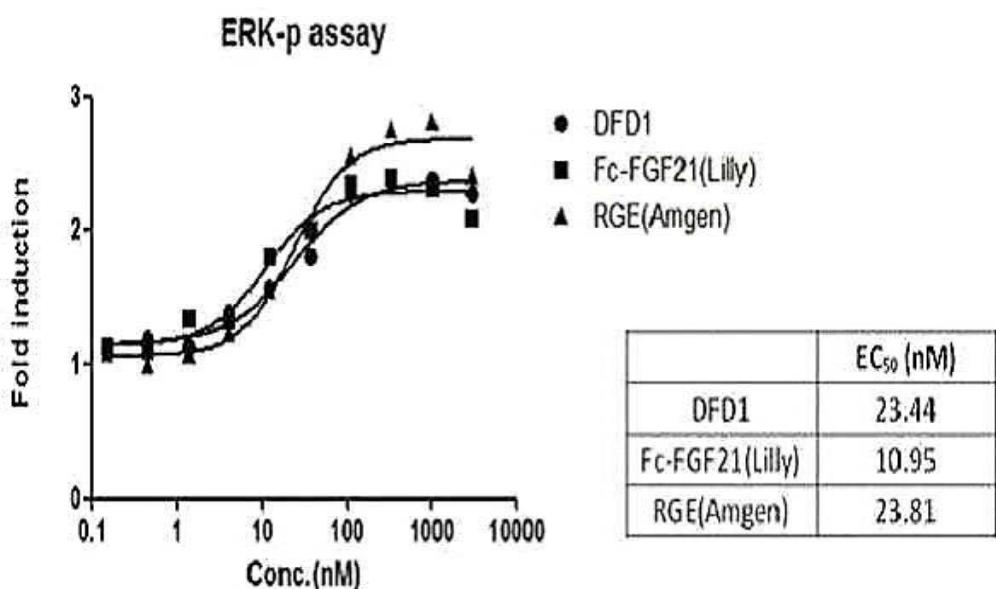
도면2a



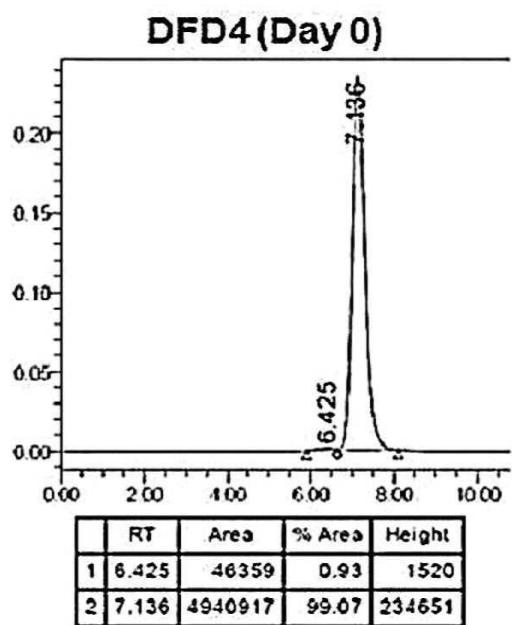
도면2b



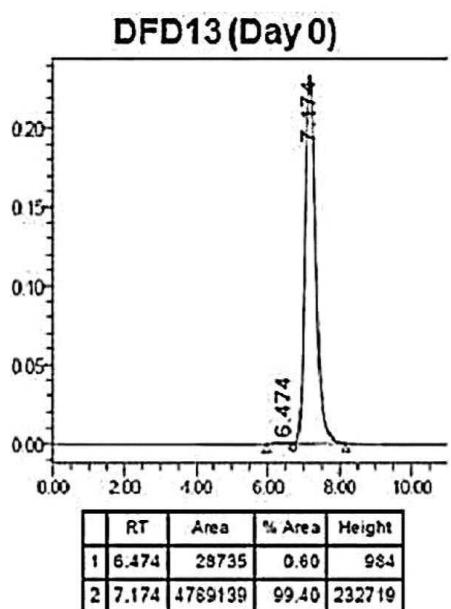
도면3



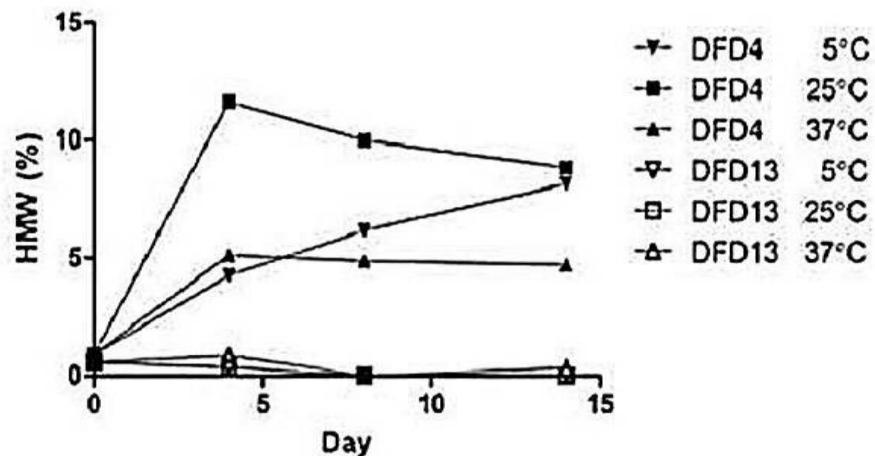
도면4a



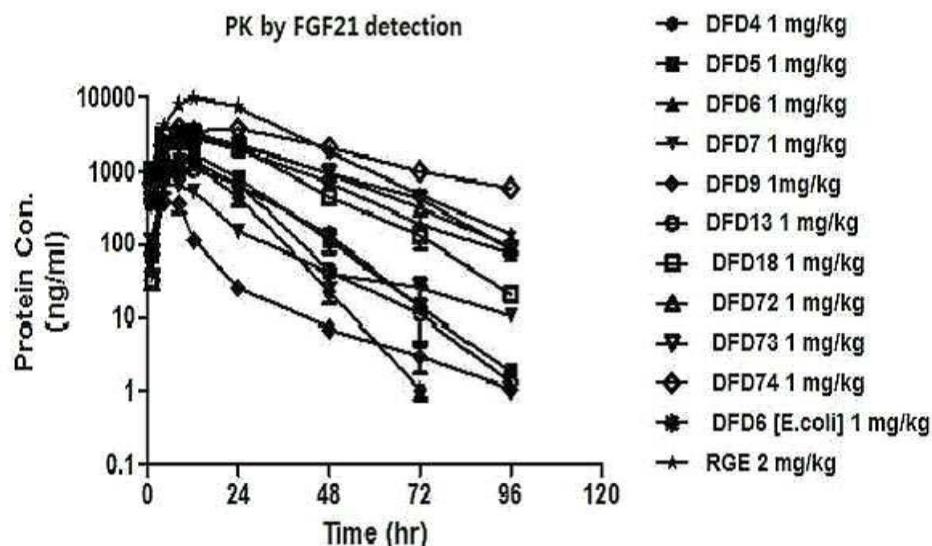
도면4b



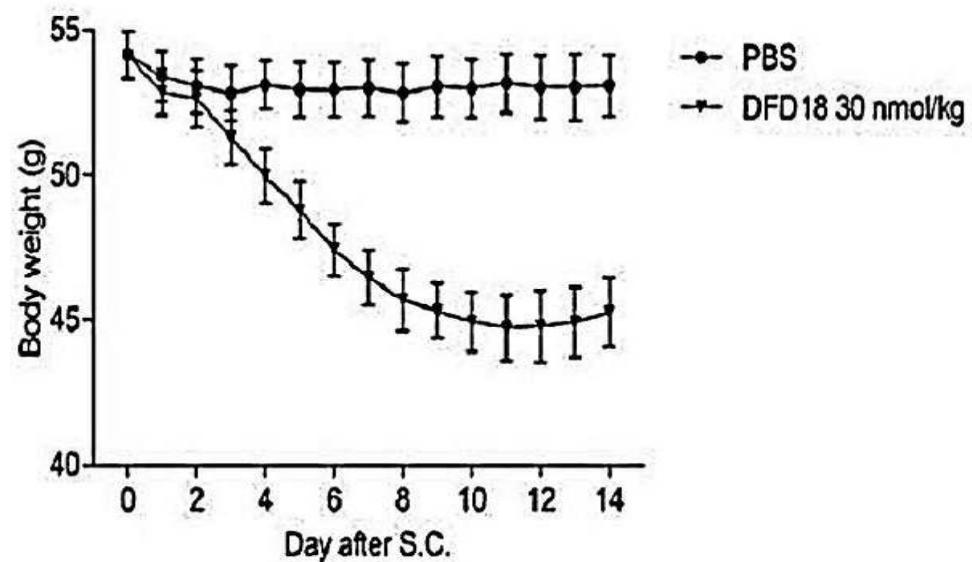
도면4c



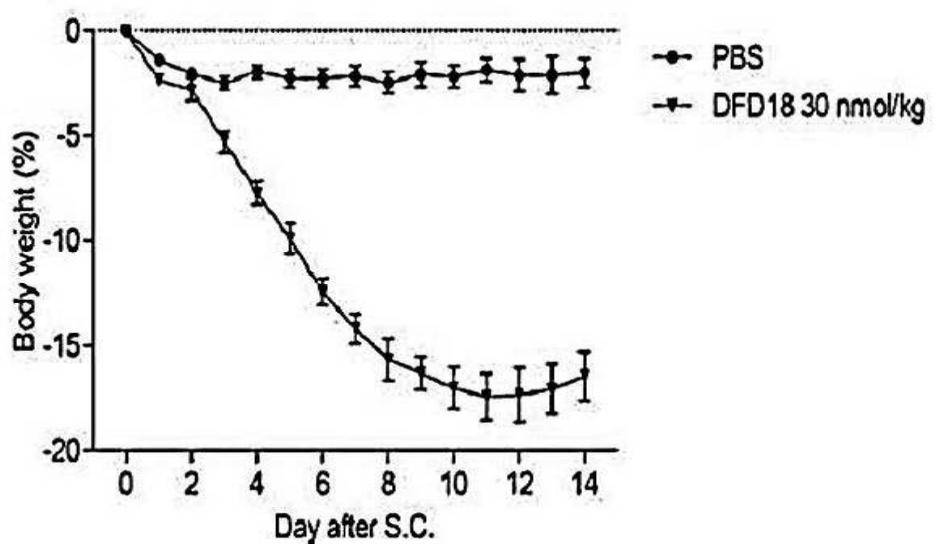
도면5



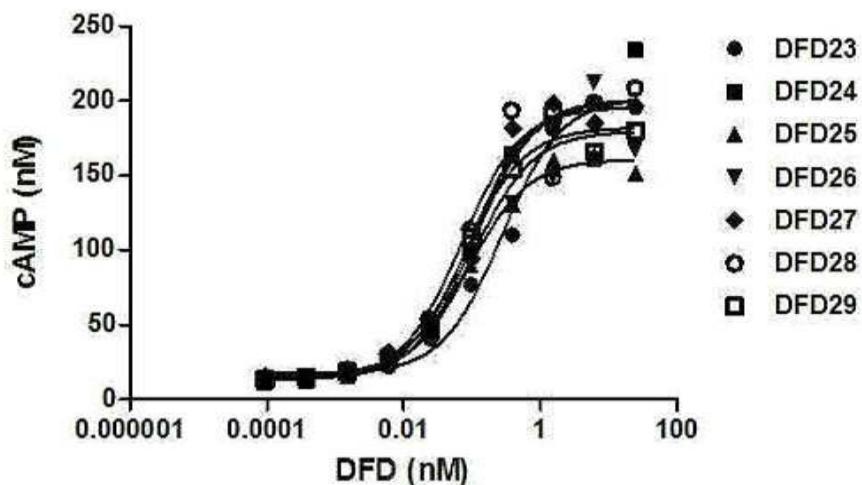
도면6a



도면6b

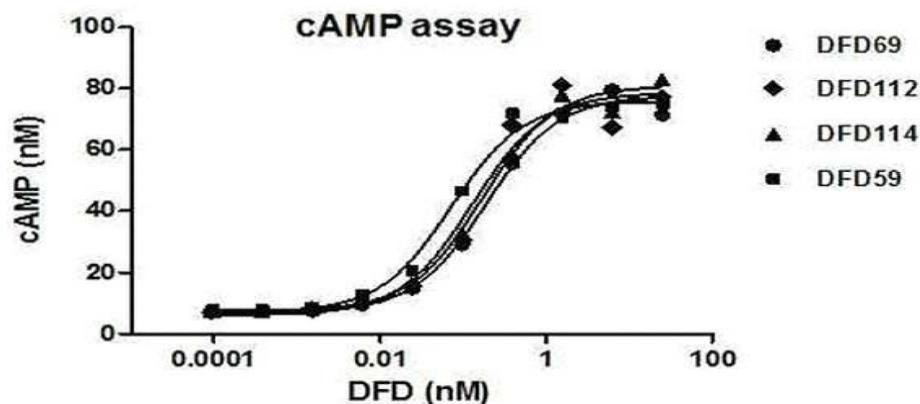


도면7



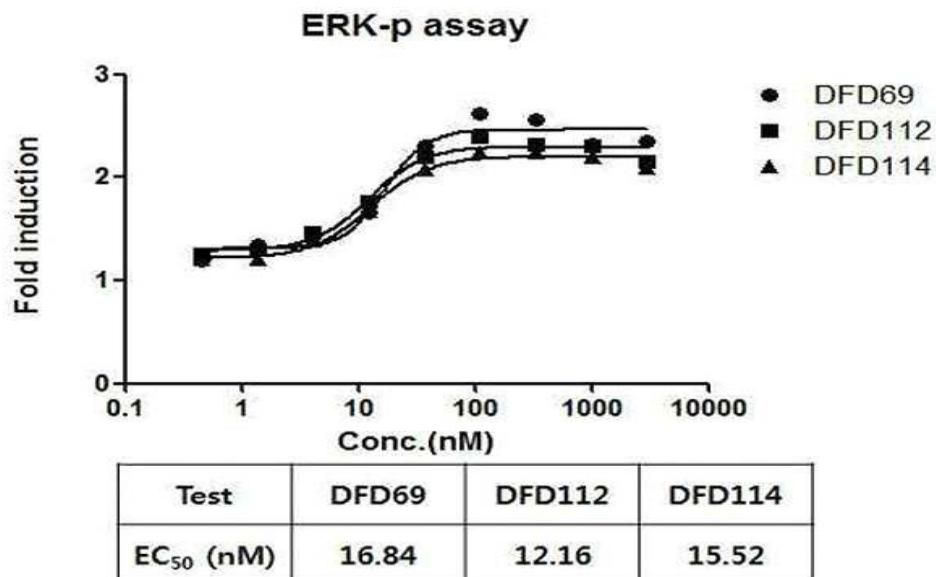
Test	DFD23	DFD24	DFD25	DFD26	DFD27	DFD28	DFD29
EC ₅₀ (pM)	272.8	107.4	88.6	104.9	99.0	69.7	78.6

도면8a

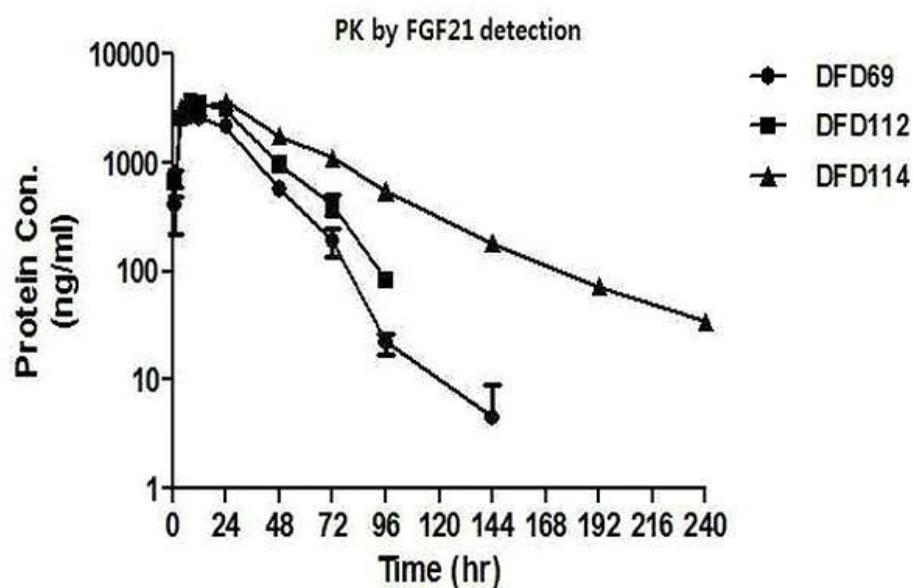


Test	DFD69	DFD112	DFD114	DFD59
EC ₅₀ (pM)	187.5	129.5	168.8	72.1

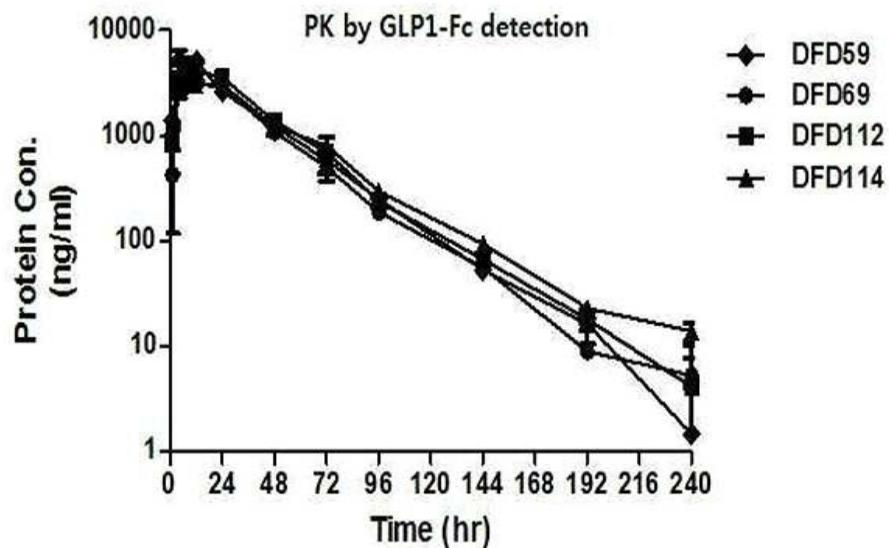
도면8b



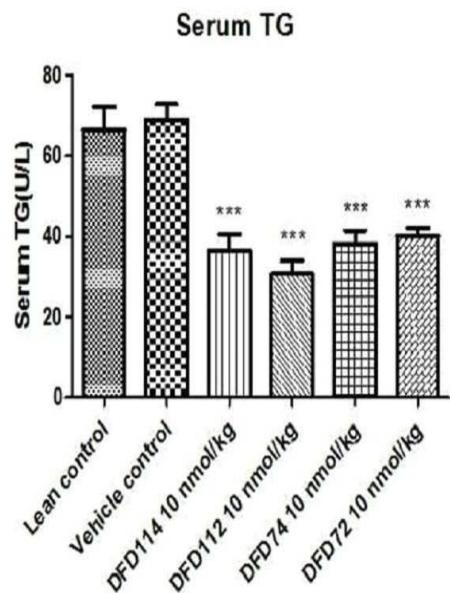
도면9a



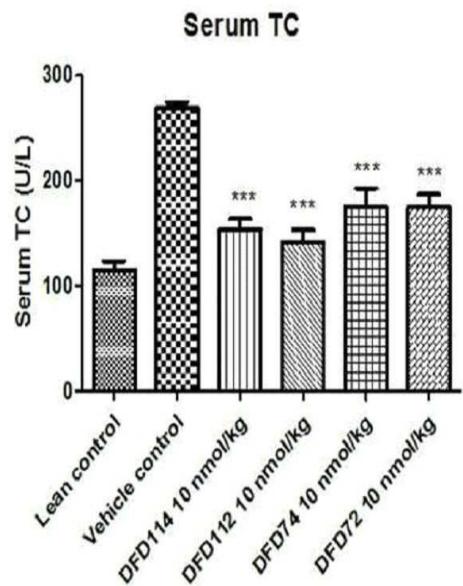
도면9b



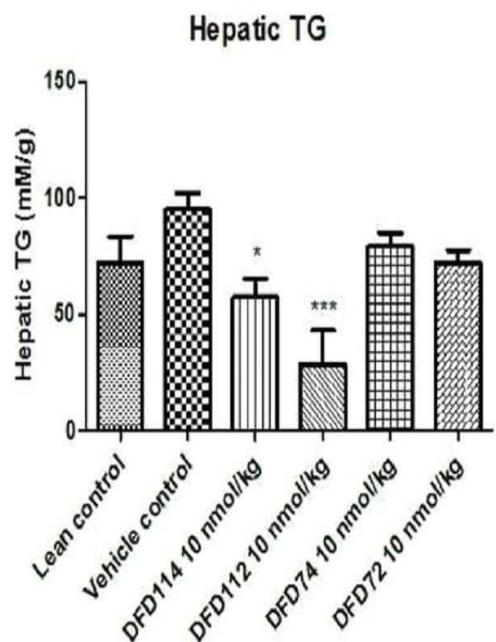
도면10a



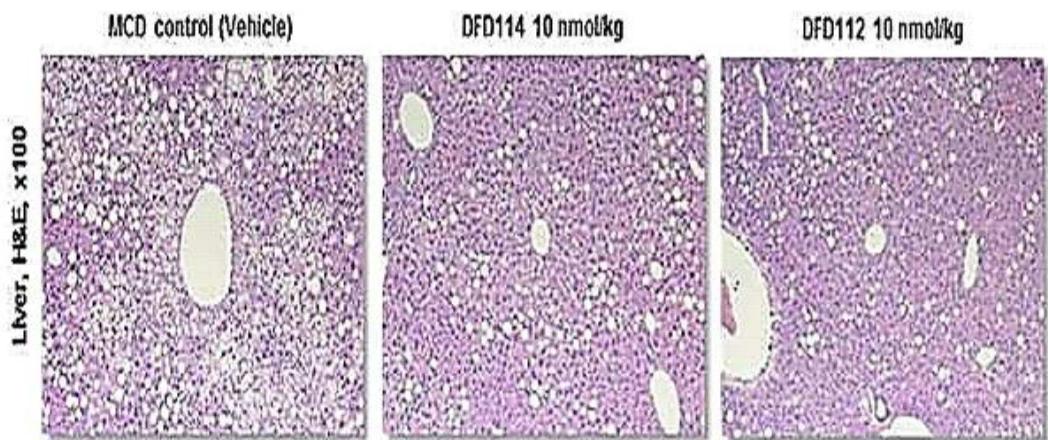
도면10b



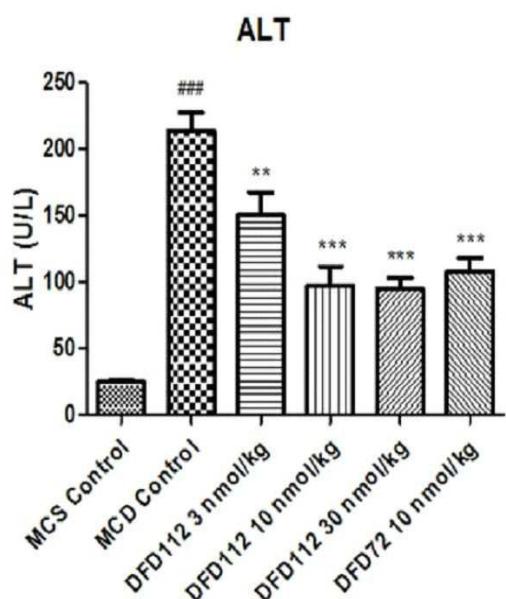
도면10c



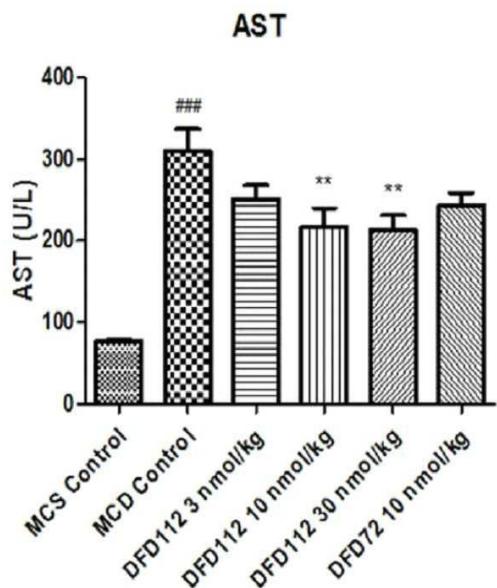
도면11



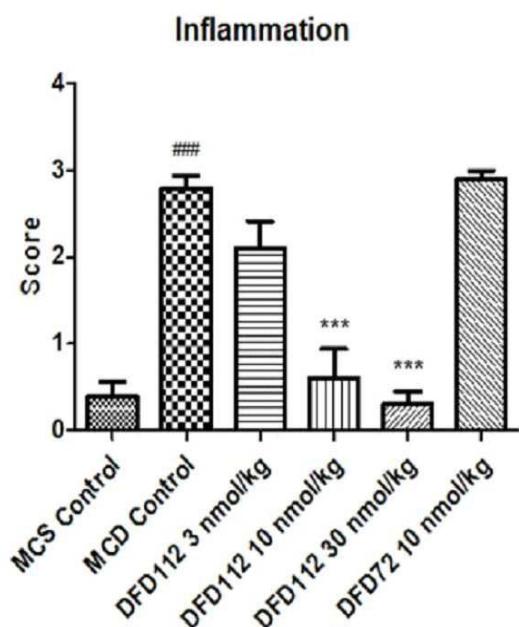
도면12a



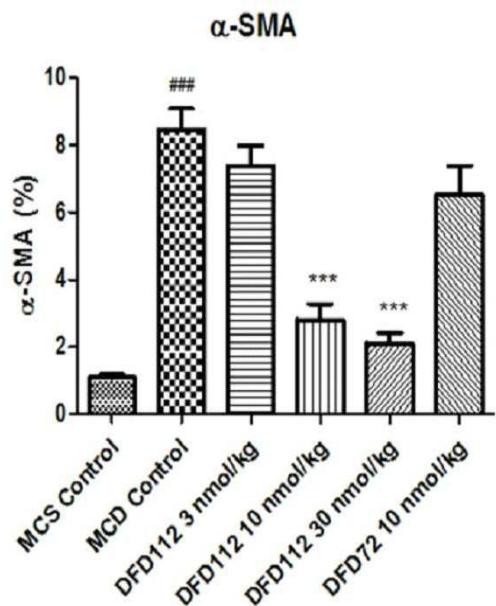
도면 12b



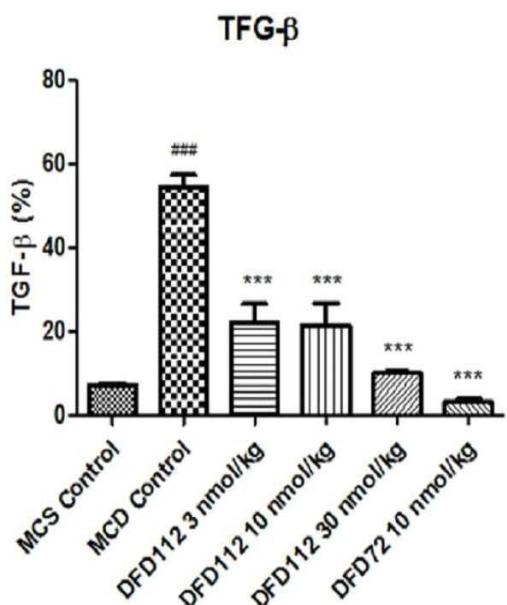
도면 12c



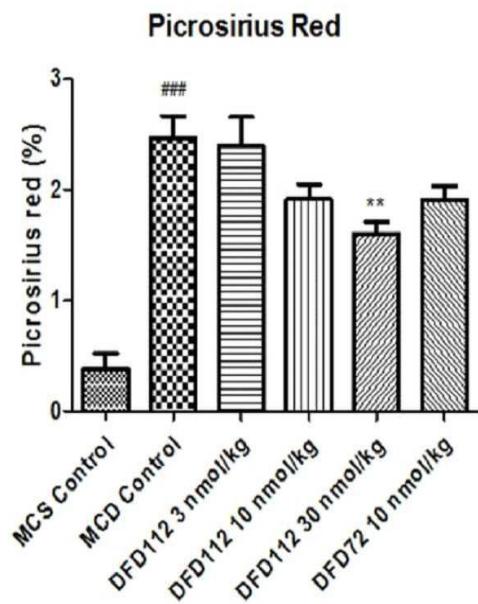
도면 13a



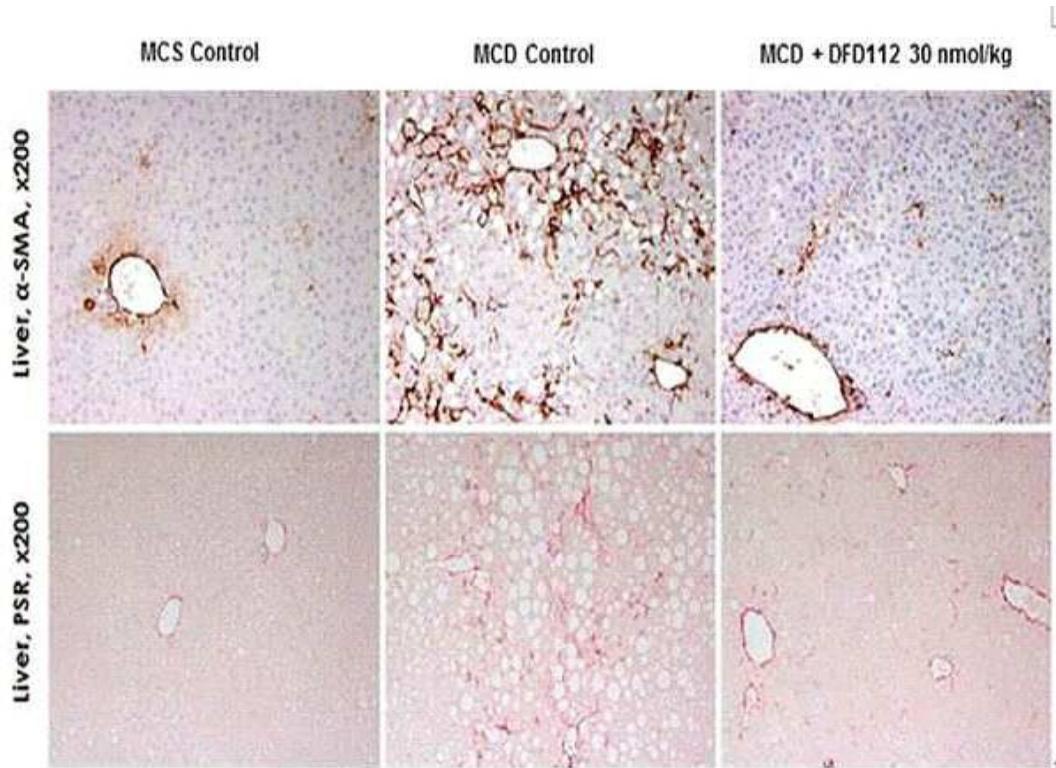
도면 13b



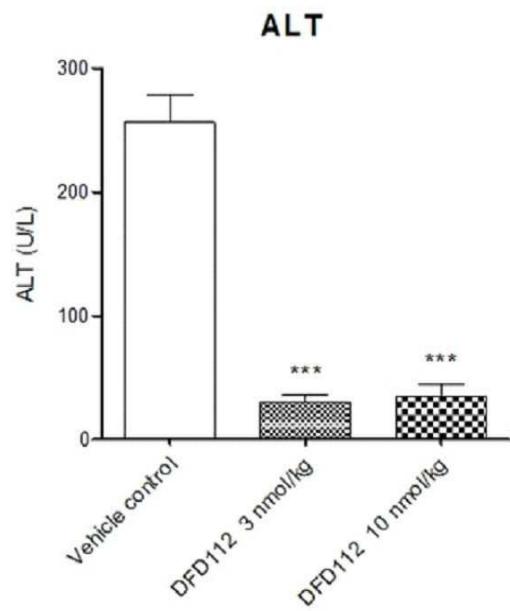
도면 13c



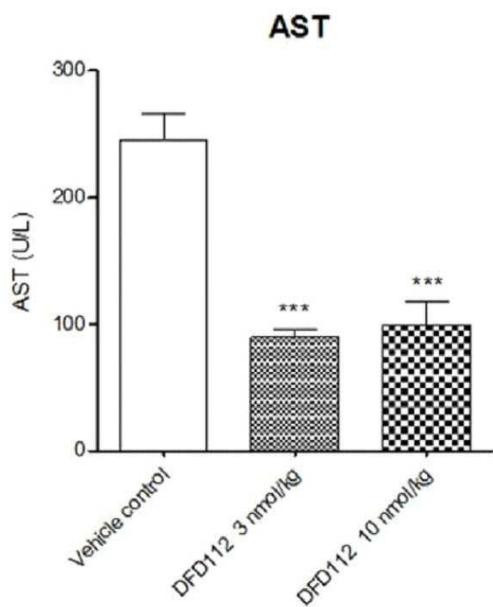
도면 14



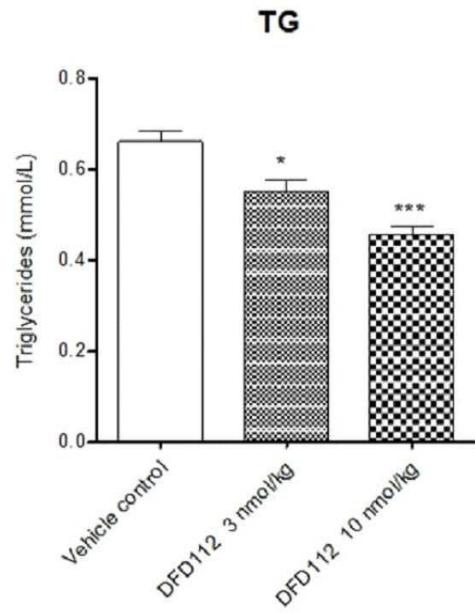
도면 15a



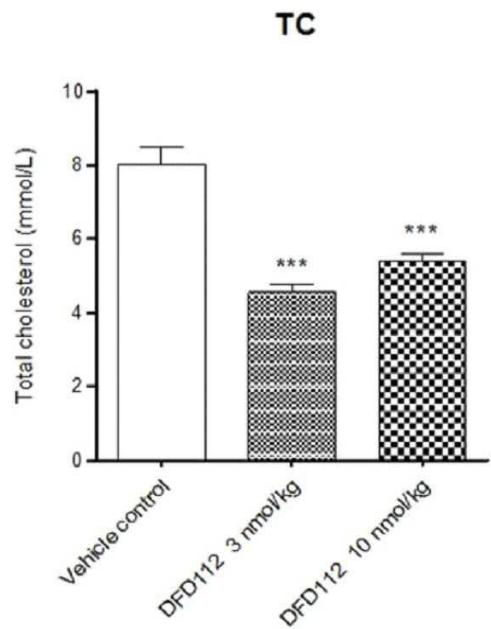
도면 15b



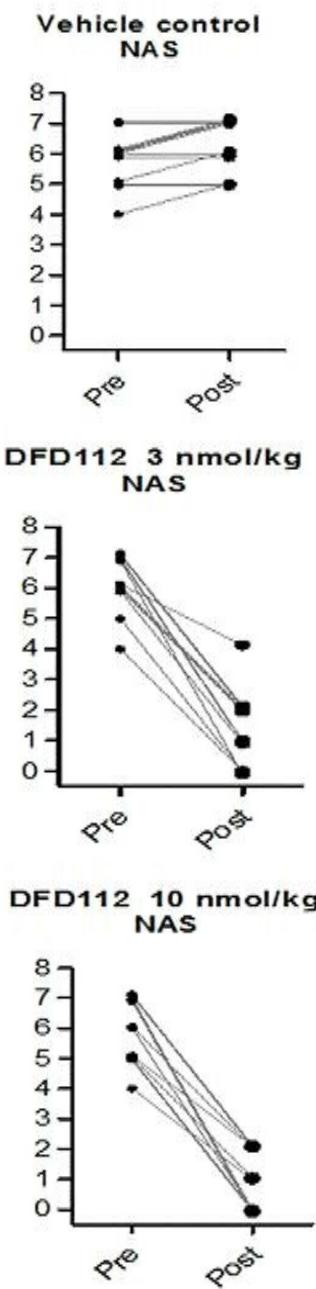
도면 15c



도면 15d

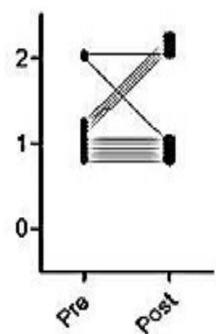


도면 16a

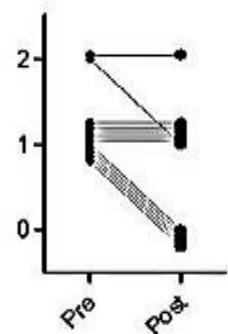


도면 16b

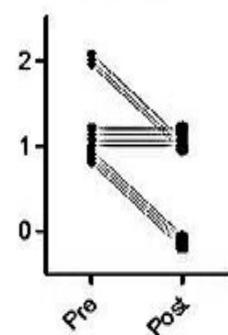
Vehicle control
Fibrosis



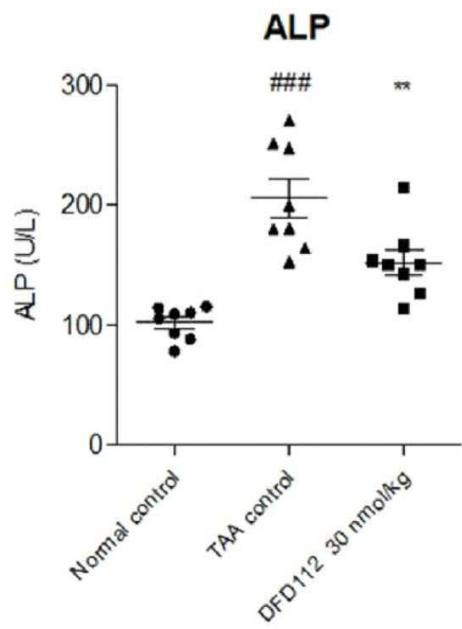
DFD112 3 nmol/kg
Fibrosis



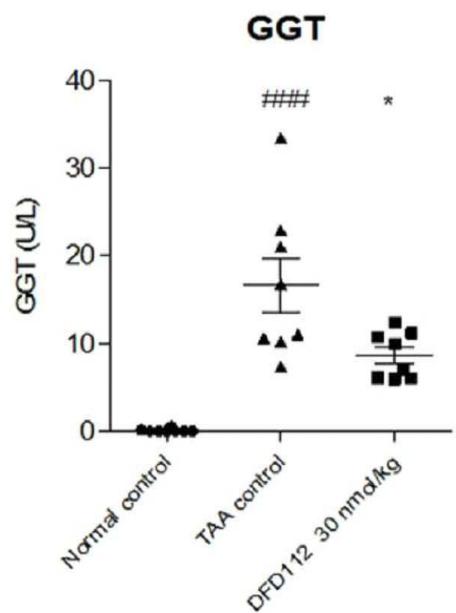
DFD112 10 nmol/kg
Fibrosis



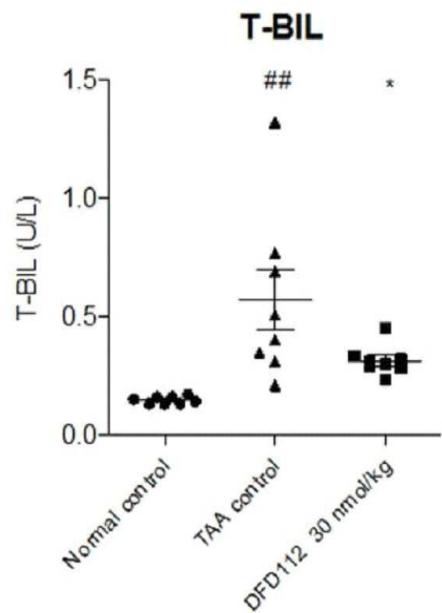
도면17a



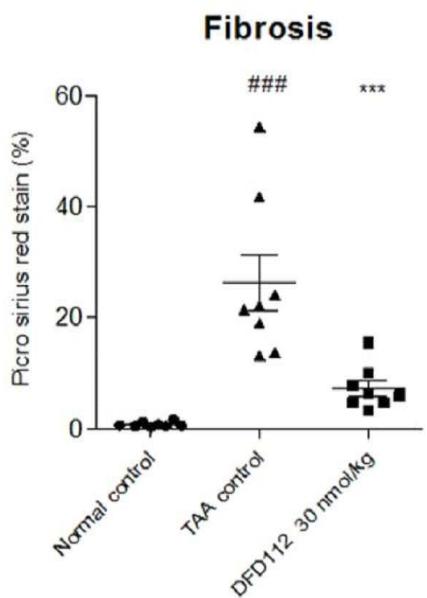
도면17b



도면17c



도면17d

**서 열 목 록**

- <110> YUHAN CORPORATION
 <120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING HEPATITIS,
 HEPATIC FIBROSIS, AND HEPATIC CIRRHOSIS COMPRISING FUSION
 PROTEINS
 <130> FPD201709-0094
 <150> KR 2016/149866
 <151> 2016-11-10

<160> 80
<170> Kopatent In 2.0
<210> 1
<211> 181
<212> PRT
<213> human FGF21
<400> 1

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 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 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 2

<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 2

Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly

1	5	10	15
Gly	Glu	Lys	Lys
Glu	Lys	Glu	Lys
Lys	Glu	Lys	Glu
			Gln
			Glu

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 3

Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly

1	5	10	15
Gly			

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1	5	10	15

<210> 5

<211> 16

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 5

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala

1 5 10 15

<210> 6

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 6

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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 7
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FGF21 variant
<400> 7

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 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg

165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 8

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 8

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 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg

165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 9

<211> 181

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 9

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 Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 10

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 10

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 95
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140

 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180
 <210> 11
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FGF21 variant
 <400> 11

 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 Glu Ile Arg Pro 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

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 12

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequenc

<220><223>

<400> 12

1s Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln

1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val 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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg

165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 13

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 13

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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 14

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 14

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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser

180

<210> 15

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 15

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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 16

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 16

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 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160

 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg
 165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Glu Ser
 180
<210> 17
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FGF21 variant
<400> 17
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 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg
 165 170 175
 Ser Pro Ser Tyr Glu Ser
 180
 <210> 18
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FGF21 variant
 <400> 18
 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 Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 19

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 19

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 Ala Ala Asp Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Glu Ser
 180

<210> 20
<211> 182
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FGF21 variant

<400> 20
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 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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg

165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 21

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 21

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 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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg

165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 22

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 22

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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115	120	125
-----	-----	-----

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130	135	140
-----	-----	-----

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 23
<211> 181
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> FGF21 variant
<400> 23

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 Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

130 135 140

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser

165 170 175

Pro Ser Tyr Glu Ser

180

<210> 24

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG4 Fc

<400> 24

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210	215	220
Leu Ser Leu Gly Lys		
225		
<210>	25	
<211>	228	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human IgG4 Fc variant	
<400>	25	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala		
1	5	10
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
20 25 30		
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
35	40	45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
50	55	60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
65	70	75
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
85	90	95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser		
100	105	110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
115	120	125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
130	135	140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
145	150	155
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
165	170	175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu		

180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Gly		

225		
<210>	26	
<211>	223	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Hybrid Fc variant		
<400> 26		
Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val		
1	5	10
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
20	25	30
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
35	40	45
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
50	55	60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
65	70	75
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
85	90	95
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
100	105	110
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
115	120	125
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		

145	150	155	160
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
165	170	175	
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
180	185	190	
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
195	200	205	
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
210	215	220	
<210>	27		
<211>	435		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	modified FGF21 variant connected to hybrid Fc		
<400>	27		
Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val			
1	5	10	15
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
20	25	30	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
35	40	45	
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
50	55	60	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
65	70	75	80
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
85	90	95	
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile			
100	105	110	
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
115	120	125	
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			

130	135	140
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
145	150	155
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
165	170	175
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
180	185	190
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
195	200	205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala		
210	215	220
Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly		
225	230	235
Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu His Pro Ile		
245	250	255
Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg		
260	265	270
Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile		
275	280	285
Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser		
290	295	300
Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly		
305	310	315
Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr		
325	330	335
Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile		
340	345	350
Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro		
355	360	365
Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg		
370	375	380

Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro

385 390 395 400

Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser

405 410 415

Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser

420 425 430

Tyr Ala Ser

435

<210> 28

<211> 422

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc

<400> 28

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys

85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

180 185 190

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala

210 215 220

Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His

260 265 270

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser

275 280 285

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln

290 295 300

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly

305 310 315 320

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg

325 330 335

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His

340 345 350

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro

355 360 365

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro

370 375 380

Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val

385	390	395	400
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg			
405	410	415	
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
420			
<210>	29		
<211>	420		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>			
modified FGF21 variant connected to hybrid Fc			
<400>	29		
Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val			
1	5	10	15
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
20	25	30	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
35	40	45	
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
50	55	60	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
65	70	75	80
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
85	90	95	
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile			
100	105	110	
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
115	120	125	
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
130	135	140	
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
145	150	155	160
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			

165	170	175
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
180	185	190
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
195	200	205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly		
210	215	220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro		
225	230	235
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln		
245	250	255
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu		
260	265	270
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu		
275	280	285
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu		
290	295	300
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu		
305	310	315
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu		
325	330	335
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu		
340	345	350
Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro		
355	360	365
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu		
370	375	380
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
385	390	395
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro		
405	410	415

Ser Tyr Ala Ser

	420	
<210>	30	
<211>	420	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	modified FGF21 variant connected to hybrid Fc	
<400>	30	
Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val		
1	5	10
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
20	25	30
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
35	40	45
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
50	55	60
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
65	70	75
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys		
85	90	95
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
100	105	110
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
115	120	125
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
145	150	155
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
165	170	175
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		

180	185	190
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
195	200	205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly		
210	215	220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro		
225	230	235
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln		
245	250	255
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu		
260	265	270
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu		
275	280	285
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu		
290	295	300
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu		
305	310	315
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu		
325	330	335
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu		
340	345	350
Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro		
355	360	365
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu		
370	375	380
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
385	390	395
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg Ser Pro		
405	410	415
Ser Tyr Ala Ser		
420		

<210> 31
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc
 <400> 31

Glu	Thr	Lys	Thr	Pro	Glu	Cys	Pro	Ser	His	Thr	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	
1																
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
20																
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	
35																
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
50																
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
65																
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Glu	Tyr	Lys		
85																
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
100																
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
115																
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
130																
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
145																
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
165																
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
180																
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
195																
200																
205																

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 245 250 255

 Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
 260 265 270
 Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
 275 280 285
 Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
 290 295 300
 Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 305 310 315 320
 Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu

 325 330 335
 Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
 340 345 350
 Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
 355 360 365
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu
 370 375 380
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 385 390 395 400

 Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser
 405 410 415
 Tyr Ala Ser

<210> 32
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc

<400> 32

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

180 185 190

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly

210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro

225 230 235 240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln

245 250 255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260 265 270

Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu

275 280 285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290 295 300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305 310 315 320

Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu

325 330 335

Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370 375 380

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser

385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405 410 415

Tyr Ala Ser

<210> 33

<211> 419

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc

<400> 33

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20	25	30
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
35	40	45
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
50	55	60
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
65	70	75
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
85	90	95
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
100	105	110
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
115	120	125
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
145	150	155
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
165	170	175
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
180	185	190
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
195	200	205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly		
210	215	220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro		
225	230	235
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln		
245	250	255
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu		

260	265	270
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu		
275	280	285
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu		
290	295	300
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu		
305	310	315
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu		
325	330	335
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu		
340	345	350
Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro		
355	360	365
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu		
370	375	380
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
385	390	395
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Asn Arg Ser Pro Ser		
405	410	415
Tyr Ala Ser		
<210>	34	
<211>	419	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	modified FGF21 variant connected to hybrid Fc	
<400>	34	
Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val		
1	5	10
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
20	25	30
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		

35	40	45
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
50	55	60
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
65	70	75
65 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
85	90	95
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
100	105	110
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
115	120	125
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
145	150	155
145 150 155 160		
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
165	170	175
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
180	185	190
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
195	200	205
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly		
210	215	220
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro		
225	230	235
225 230 235 240		
Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln		
245	250	255
Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu		
260	265	270
Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu		
275	280	285
Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu		

290	295	300
Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu		
305	310	315
Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu		
325	330	335
Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu		
340	345	350
Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro		
355	360	365
Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu		

370	375	380
Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser		
385	390	395
Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser		
405	410	415
Tyr Ala Ser		

<210>	35
<211>	420
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	modified FGF21 variant connected to hybrid Fc
<400>	35
Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val	

1	5	10	15
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
20	25	30	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
35	40	45	
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
50	55	60	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			

65	70	75	80
----	----	----	----

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 245 250 255
 Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
 260 265 270
 Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
 275 280 285
 Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290 295 300
 Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 305 310 315 320

Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu

325 330 335

Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370 375 380

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser

385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro

405 410 415

Ser Tyr Ala Ser

420

<210> 36

<211> 420

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc

<400> 36

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 100 105 110
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140

 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gly Lys Gly

 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 245 250 255
 Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
 260 265 270
 Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
 275 280 285

 Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
 290 295 300
 Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 305 310 315 320
 Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu
 325 330 335
 Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
 340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370 375 380

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser

385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro

405 410 415

Ser Tyr Glu Ser

420

<210> 37

<211> 420

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc

<400> 37

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195	200	205
-----	-----	-----

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 245 250 255
 Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu
 260 265 270

Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
 275 280 285
 Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
 290 295 300
 Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 305 310 315 320
 Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu
 325 330 335
 Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340	345	350
-----	-----	-----

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
 355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370 375 380

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser

385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg Ser Pro

405 410 415

Ser Tyr Glu Ser

420

<210> 38

<211> 419

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc

<400> 38

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 180 185 190

 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 195 200 205
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 245 250 255
 Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

 260 265 270
 Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu
 275 280 285
 Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu
 290 295 300
 Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu
 305 310 315 320
 Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu
 325 330 335

 Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu
 340 345 350
 Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro
 355 360 365
 Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu
 370 375 380
 Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser
 385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405 410 415

Tyr Ala Ser

<210> 39

<211> 419

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified FGF21 variant connected to hybrid Fc

<400> 39

Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val

1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

65 70 75 80

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys

85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

100 105 110

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

115 120 125

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

180 185 190

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly

210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser His Pro

225 230 235 240

Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gln Val Arg Gln

245 250 255

Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu

260 265 270

Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu

275 280 285

Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu

290 295 300

Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu

305 310 315 320

Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu

325 330 335

Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu

340 345 350

Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro

355 360 365

Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu

370 375 380

Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser

385 390 395 400

Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser

405 410 415

Tyr Glu Ser

<210> 40
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> REG(Amgen)
 <400> 40

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

195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
225	230	235
Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly		
245	250	255
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu		
260	265	270
Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Ala Ala Asp		
275	280	285
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val		
290	295	300
Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro		
305	310	315
Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser		
325	330	335
Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu		
340	345	350
Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg		
355	360	365
Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu		
370	375	380
Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro		
385	390	395
Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln Gly		
405	410	415
Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser		
420		
<210>	41	
<211>	424	
<212>	PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 connected to Fc(lilly)

<400> 41

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

1 5 10 15

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

225 230 235 240

Gly Gly Ser Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe

245 250 255

Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln

260 265 270

Thr Glu Cys His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Cys Ala

275 280 285

Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro

290 295 300

Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln

305 310 315 320

Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala

325 330 335

Cys Ser Phe Arg Glu Asp Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln

340 345 350

Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asp Lys Ser Pro

355 360 365

His Arg Lys Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro

370 375 380

Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln

385 390 395 400

Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Arg Leu Val Glu Pro Ser

405 410 415

Gln Leu Arg Ser Pro Ser Phe Glu

420

<210> 42

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1

<400> 42

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20	25	30
----	----	----

<210> 43

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1 variant

<400> 43

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20	25	30
----	----	----

<210> 44

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1 variant

<400> 44

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20	25	30
----	----	----

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1 variant

<400> 45

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly

20 25 30

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1 variant

<400> 46

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly

20 25 30

<210> 47

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hybrid Fc5

<400> 47

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys

1 5 10 15

Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His

20 25 30

Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

35 40 45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

50 55 60

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

65 70 75 80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

85 90 95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

100 105 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

115

120

125

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

130

135

140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

145 150 155 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

165

170

175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

180

185

190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

195

200

205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

210

215

220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

225 230 235 240

Leu Ser Leu Gly Lys

245

<210> 48

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hybrid Fc40

<400> 48

Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu

1

5

10

15

Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20

25

30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

35

40

45

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

50

55

60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85	90	95
----	----	----

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met

130	135	140
-----	-----	-----

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gln Phe Tyr Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

165	170	175
-----	-----	-----

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

180	185	190
-----	-----	-----

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

195	200	205
-----	-----	-----

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

210	215	220
-----	-----	-----

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

225	230
-----	-----

<210> 49

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1 variant connected to hybrid Fc5

<400> 49

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg

20	25	30
----	----	----

Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu

35	40	45
Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr		
50	55	60
Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
65	70	75
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
85	90	95
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
100	105	110

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

115	120	125
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
130	135	140
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser		
145	150	155
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
165	170	175
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		

180	185	190
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
195	200	205
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro		
210	215	220
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		
225	230	235
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
245	250	255

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

260	265	270
Ser Leu Gly Lys		

275
 <210> 50
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLP-1 variant connected to hybrid Fc40
 <400> 50

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu
 20 25 30

Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys
 35 40 45

Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 85 90 95

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 130 135 140

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 165 170 175

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

195	200	205
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
210	215	220
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		
225	230	235
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
245	250	255
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
260		
<210>	51	
<211>	276	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GLP-1 variant connected to hybrid Fc5	
<400>	51	
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu		
1	5	10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg		
20	25	30
Asn Thr Gly Arg Gly Glu Glu Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu		
35	40	45
Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr		
50	55	60
Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
65	70	75
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
85	90	95
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
100	105	110
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
115	120	125
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		

130	135	140
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser		
145	150	155
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
165	170	175
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
180	185	190
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
195	200	205
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
210	215	220
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		
225	230	235
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		240
245	250	255
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
260	265	270
Ser Leu Gly Lys		
275		
<210> 52		
<211> 264		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> GLP-1 variant connected to hybrid Fc40		
<400> 52		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu		
1	5	10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu		15
20	25	30
Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys		
35	40	45
Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		

50	55	60
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
65	70	75
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val		
85	90	95
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
100	105	110
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
115	120	125
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		
130	135	140
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
145	150	155
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr		
165	170	175
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
180	185	190
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
195	200	205
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
210	215	220
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		
225	230	235
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
245	250	255
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
260		
<210> 53		
<211> 276		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> GLP-1 variant connected to hybrid Fc5		

<400> 53

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Arg

20 25 30

Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu

35 40 45

Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr

50 55 60

Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

65 70 75 80

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

85 90 95

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

100 105 110

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

115 120 125

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

130 135 140

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser

145 150 155 160

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln

165 170 175

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

180 185 190

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

195 200 205

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

210 215 220

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

225 230 235 240

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270
 Ser Leu Gly Lys

275

<210> 54

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-1 variant connected to hybrid Fc40

<400> 54

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Glu
 20 25 30

Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys
 35 40 45

Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

85 90 95

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 130 135 140

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 165 170 175
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 210 215 220
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 225 230 235 240
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 245 250 255
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 260
 <210> 55
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLP-1 variant connected to hybrid Fc5
 <400> 55
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Arg
 20 25 30
 Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu
 35 40 45
 Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr
 50 55 60
 Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 65 70 75 80
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 85 90 95

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 100 105 110
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 115 120 125
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 130 135 140
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 145 150 155 160

 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 165 170 175
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 180 185 190
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 195 200 205
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

 225 230 235 240
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270
 Ser Leu Gly Lys
 275
 <210> 56
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLP-1 variant connected to hybrid Fc40
 <400> 56
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Glu
 20 25 30
 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys
 35 40 45
 Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80

 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 85 90 95
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 130 135 140
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro

 145 150 155 160
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 165 170 175
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 210 215 220

 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 225 230 235 240
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 245 250 255
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 260

<210> 57
<211> 275
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dulaglutide
<400> 57

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly

20	25	30
----	----	----

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Glu

35	40	45
----	----	----

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala

50	55	60
----	----	----

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

65	70	75	80
----	----	----	----

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

85	90	95
----	----	----

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

100	105	110
-----	-----	-----

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

115	120	125
-----	-----	-----

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

165	170	175
-----	-----	-----

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

195	200	205
-----	-----	-----

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

225 230 235 240
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270
 Ser Leu Gly

275

<210> 58
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLP1(A2G)-HyFc40-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV)
 <400> 58

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu
 20 25 30
 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys
 35 40 45
 Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 85 90 95
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 130 135 140
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

 145 150 155 160
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 165 170 175
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 210 215 220

 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 225 230 235 240
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 245 250 255
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
 275 280 285
 Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp

 290 295 300
 Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala
 325 330 335
 Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe
 340 345 350
 Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp
 355 360 365

 Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn

370	375	380
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn		
385	390	395
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu		400
405	410	415
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu		
420	425	430
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val		
435	440	445
Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
450	455	460
<210> 59		
<211> 473		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> GLP1(GE)-HyFc5-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV)		
<400> 59		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu		
1	5	10
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu		15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg		
20	25	30
Asn Thr Gly Arg Gly Glu Glu Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu		
35	40	45
Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr		
50	55	60
Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
65	70	75
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		80
85	90	95
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
100	105	110
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		

115	120	125
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
130	135	140
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser		
145	150	155
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
165	170	175
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
180	185	190
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
195	200	205
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
210	215	220
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		
225	230	235
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
245	250	255
Ser Leu Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly		
260	265	270
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly		
275	280	285
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr		
290	295	300
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly		
305	310	315
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg		
325	330	335
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala		
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly		
340	345	350
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys		

370	375	380
Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser		
385	390	395
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His		
405	410	415
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly		
420	425	430
Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro		
435	440	445
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu		
450	455	460
Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
465	470	
<210> 60		
<211> 461		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> GLP1(GE)-HyFc40-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV)		
<400> 60		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu		
1	5	10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Glu		
20	25	30
Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys		
35	40	45
Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
50	55	60
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
65	70	75
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val		
85	90	95
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln		

100	105	110
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
115	120	125
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		
130	135	140
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
145	150	155
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr		
165	170	175
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
180	185	190
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
195	200	205
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
210	215	220
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		
225	230	235
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
245	250	255
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
260	265	270
Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu		
275	280	285
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp		
290	295	300
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val		
305	310	315
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		
325	330	335
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
340	345	350

Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp
355 360 365

Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn
 370 375 380

Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn
385 390 395 400

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
480 485 490

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
450 455 460

<210>	61
<211>	473
<212>	PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP1(GG)-HyFc5-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV)

<400> 61

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Arg
20 25 30

Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu
35 40 45

Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr

50 55 60

Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
65 70 75 80

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 100 105 110
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 115 120 125

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 130 135 140
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 145 150 155 160
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 165 170 175
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 180 185 190
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

195 200 205
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270

Ser Leu Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
 290 295 300
 Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
 305 310 315 320
 Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
 325 330 335
 Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly

340	345	350
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg		
355	360	365
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys		
370	375	380
Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser		
385	390	395
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His		
405	410	415
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly		
420	425	430
Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro		
435	440	445
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu		
450	455	460
Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
465	470	
<210>	62	
<211>	461	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
><223>	GLP1(GG)-HyFc40-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV)	
<400>	62	
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly		
1	5	10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Glu		
20	25	30
Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys		
35	40	45
Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
50	55	60
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		

65	70	75	80
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val			
85	90	95	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
100	105	110	
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
115	120	125	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly			
130	135	140	
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
145	150	155	160
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr			
165	170	175	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
180	185	190	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
195	200	205	
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
210	215	220	
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe			
225	230	235	240
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
245	250	255	
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
260	265	270	
Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu			
275	280	285	
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp			
290	295	300	
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val			
305	310	315	320
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala			

325	330	335
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
340	345	350
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
355	360	365
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn		
370	375	380
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn		
385	390	395
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu		
405	410	415
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu		
420	425	430
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val		
435	440	445
Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser		
450	455	460
<210> 63		
<211> 473		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> GLP1(GEG)-HyFc5-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV)		
<400> 63		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu		
1	5	10
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Arg		
20	25	30
Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Lys Glu		
35	40	45
Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr		
50	55	60
Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		

65	70	75	80
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
85	90	95	
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
100	105	110	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr			
115	120	125	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
130	135	140	
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser			
145	150	155	160
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
165	170	175	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
180	185	190	
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
195	200	205	
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
210	215	220	
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr			
225	230	235	240
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
245	250	255	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
260	265	270	
Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
275	280	285	
Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly			
290	295	300	
305	310	315	320
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr			

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala

325 330 335

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly

340 345 350

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg

355 360 365

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys

370 375 380

Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser

385 390 395 400

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His

405 410 415

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly

420 425 430

Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro

435 440 445

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Thr Gly Leu Glu

450 455 460

Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

465 470

<210> 64

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP1(GEG)-HyFc40-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV)

<400> 64

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Glu

20 25 30

Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys

35 40 45

Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 85 90 95

 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 130 135 140
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

 165 170 175
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 210 215 220
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 225 230 235 240

 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 245 250 255
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
 275 280 285
 Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
 290 295 300

Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val

305 310 315 320

Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala

325 330 335

Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe

340 345 350

Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp

355 360 365

Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn

370 375 380

Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn

385 390 395 400

Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu

405 410 415

Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu

420 425 430

Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val

435 440 445

Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser

450 455 460

<210> 65

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP1(GEG)-HyFc40-GS3-FGF21(EIRP, TGLEAV, A180E)

<400> 65

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Glu

20 25 30

Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys

35	40	45
Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Pro Pro Lys Pro		
50	55	60
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
65	70	75
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val		
85	90	95
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
100	105	110
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
115	120	125
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		
130	135	140
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
145	150	155
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr		
165	170	175
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
180	185	190
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
195	200	205
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
210	215	220
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		
225	230	235
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
245	250	255
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
260	265	270
Gly Ser Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu		
275	280	285
Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp		

290	295	300
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val		
305	310	315
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		
325	330	335
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
340	345	350
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
355	360	365
Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn		
370	375	380
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn		
385	390	395
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu		
400	405	410
415		
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu		
420	425	430
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val		
435	440	445
Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser		
450	455	460
<210>	66	
<211>	461	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GLP1(GEG)-HyFc40-GS3-FGF21(EIRP, TLEAN, A180E)	
<400>	66	
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu		
1	5	10
15		
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Glu		
20	25	30
Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys		

35	40	45
Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
50	55	60
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
65	70	75
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val		
85	90	95
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
100	105	110
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
115	120	125
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		
130	135	140
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
145	150	155
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr		
165	170	175
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
180	185	190
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
195	200	205
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
210	215	220
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		
225	230	235
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
245	250	255
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
260	265	270
Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu		
275	280	285

Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp
 290 295 300
 Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala
 325 330 335
 Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe
 340 345 350
 Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp
 355 360 365
 Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn
 370 375 380
 Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn
 385 390 395 400
 Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu
 405 410 415
 Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
 420 425 430
 Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val
 435 440 445
 Thr Gly Leu Glu Ala Asn Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser
 450 455 460
 <210> 67
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLP1(GEG)-HyFc40-GS3-FGF21(EIRP, G170N, A180E)
 <400> 67
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Glu
 20 25 30

Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys
 35 40 45
 Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80

 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 85 90 95
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 130 135 140
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

 145 150 155 160
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 165 170 175
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 210 215 220

 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 225 230 235 240
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 245 250 255
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
 275 280 285

Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp

290	295	300
Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val		
305	310	315
Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala		
325	330	335
Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe		
340	345	350
Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp		
355	360	365

Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn		
370	375	380
Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn		
385	390	395
Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu		
405	410	415
Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu		
420	425	430
Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val		

435	440	445
Asn Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Glu Ser		

450	455	460
-----	-----	-----

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 68

Glu Ile Arg Pro

1

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 69

Thr Gly Leu Glu Ala Val

1 5

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF21 variant

<400> 70

Thr Gly Leu Glu Ala Asn

1 5

<210> 71

<211> 1383

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid molecule coding for DFD23

<400> 71

cacggcgagg ggaccttac aagcgacgtg tcctttatc tggaaaggaca ggccgctaag	60
gagtttatcg catggcttgt caaaggcaga ggcgaaaagg agaaggaaga gcaggaggag	120
agagaaacca aaacacccga gtgtcccagt cacactcagc ctctggagt gtttctttc	180
ccacctaagc ccaaggatac ctttatgatt tcttaggacac ctgaggtgac ctgcgtcggt	240

gtggacgtga gtcaagagga cccagaggc cagtttaact ggtatgttg cggcgtggaa	300
gtgcataatg caaaaactaa accccgcgag gaacaattca attcaaccta ccgggtcggt	360
tctgttgtga cagtgtcgca tcaagattgg ctgaacggga aggagtataa gtgtaaagtc	420
agtaataagg gactcccctc tagtatcgaa aaaactattt caaaggccaa aggccagcct	480
agagagccac aggtgtacac cttcctcca tcccaagagg agatgacaaa gaaccagggtg	540
tctctgactt gtctcgtaa ggggttctac cctagtgaca tcgctgtcgat atgggagtca	600
aacggacagc cagagaataa ttataagaca actcctcccg ttctggattc tgacggcagc	660

ttcttctgt actctaggct tactgtggac aaaagtgcgt ggcaagaagg gaacgtcttt	720
--	-----

tcatgttctg ttatgcacga ggccttgcac aatcattata cacagaagtc tctgagtctc	780
tcactggca aaggcgaaaa aggcagcggg ggaggcggtt ccggaggcgg gggatctcat	840
cccatccctg actccagttcc ttcctgcata ttccccccca aagtccggca gcggtaacctc	900
tacacagatg atgtcagca gacagaagcc caccggaaa tcagggagga tgggaccgtg	960
ggggcgctg ctgaccagag ccccgaaagt ctccctgcagc tgaaaggctt gaaggcttggaa	1020
gttattcaaa tcttggagt caagactagt aggttctgt gccagcggcc agatggggcc	1080

ctgtatggat ctctccattt tgacccttag gcctgcagct tccggagga gatcagaccc	1140
gacggataca atgtttacca gtccgaagcc cacggctcc ctctgcatct gcccggaaac	1200
aagtctccctc accggaccc tgcccccaga ggaccgtc gcttcctgcc actcccgac	1260
ctgccccccg cattgcctga gccacccgga atcctggccc cccagcccc tgatgtggaa	1320
tcctctgacc ctctgagcat ggtgacaggc ctggaggccg tgagaagccc cagctacgct	1380
tcc	1383

<210> 72

<211> 1419

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid molecule coding for DFD24

<400> 72

cacggcgagg ggacccatc aagcgacgtg tccttttacc tgaaagagca ggcgcctaag	60
gaatttatcg catggcttgtt caaaggaaaga gggagaaaca ccggacgggg cggggaaagag	120
aagaagaag aaaaggagaa ggaagagcag gaggagagag aaaccaaaac acccgagtgt	180
cccaatcaca ctccatccctt gggagtgttt ctctccac ctaagccaa ggataccctt	240
atgatttcta ggacacctga ggtgacactgc gtcgttgtgg acgtgagtca agaggacca	300
gagggtccagt ttaactggta ttttgacggc gtggaaagtgc ataatgaaa aactaaaccc	360

cgcgaggaac aattcaattt aacccatccgg gtcgtttctg ttttgacagt gctgcataaa	420
gattggctga acggaaagga gtataagtgtt aaagttagtataaataaggact cccctctagt	480
atcgaaaaaa ctatccaaa ggccaaaggc cagcctagag agccacagggt gtacaccctt	540
cctccatccc aagaggagat gacaaagaac caggtgtc tgcgttgtt cgtgaagggg	600
ttctacccta gtgacatcgc tgcgttgtt ggttcaaacg gacagccaga gaataattat	660
aagacaactc ctcccgatcc ggattctgac ggcagttctt ttctgtactc taggcttact	720
gtggacaaaaa gtcgtggca agaaggaaac gtcgttgtt gttctgttgcacgaggcc	780

ttgcacaatc attatacaca gaagtctctg agtctctcac tggcaaaagg cgggggaggc	840
agcgggggag gcggtccgg aggccccggta tctcatccca tccctgactc cagtcctctc	900
ctgcaattcg gggccaagt ccggcagcgg tacctctaca cagatgatgc tcagcagaca	960
gaagcccacc tggagatcag ggaggatgg accgtgggg gcgcgtgtga ccagagccc	1020
gaaagtctcc tgtagtgcgaa agccttgaag cctggagtta ttcaaattt gggagtcaag	1080
actagtaggt tcctgtgcca gcggccagat gggccctgt atggatctt ccatttgac	1140
cctgaggcct gcagcttccg ggaggagatc agacccgacg gataaatgt ttaccagtcc	1200
gaagcccacg gcctccctct gcatctgcc gggacaagaat ctccctaccg ggacctgcc	1260
cccgaggac ctgtcgctt cctgccactc ccaggcctgc ccccgccatt gcctgagcca	1320
cccgaaatcc tggcccccga gccccctgtat gtggatctt ctgaccctct gagcatggtg	1380
acagcctgg aggccgtgag aagccccagc tacgtttcc	1419
<210> 73	
<211> 1383	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleic acid molecule coding for DFD25	
<400> 73	
cacggcgagg ggacccatc aagcgacgtg tcctttacc tggaagagca ggccgctaag	60
gaatttatcg catggctcgtaaaagaa gggaaaagg agaaggaaga gcaggaggag	120
agagaaaacca aaacacccga gtgtcccgat cacactcagc ctctggagt gtttcttcc	180
ccacctaagc ccaaggatac ctttatgatt tctaggacac ctgaggtgac ctgcgtcggt	240
gtggacgtga gtcaagagga cccagggc cagtttaact ggtatgtga cggcgtggaa	300
gtgcataatg caaaaactaa accccgcgag gaacaattca attcaaccta ccgggtcggt	360
tctgttttgc cagtgtgc tcaagattgg ctgaacggaa aggatataa gtgtaaagtc	420
agtaataagg gactccctc tagtatcgaa aaaactattt caaaggccaa aggccagct	480
agagagccac aggtgtacac cttccctcca tcccaagagg agatgacaaa gaaccagg	540
tctctgactt gtctcgtaa ggggttctac cctagtgcata tcgctgtcga atggagtc	600
aacggacgc cagagaataa ttataagaca actccctccg ttctggattc tgacggcgc	660
ttcttttgtt actctaggct tactgtggac aaaagtgcgtt ggcaagaagg gaacgtttt	720
tcatgttctg ttatgcacga ggccttgcac aatcattata cacagaagtc tctgagtctc	780
tcactggcga aaggcggggg aggcagcggg ggaggcgggt ccggaggcgg gggatctcat	840

cccatccctg actccagtc ttcctgca atcggggcc aagtccggca gcggtaccc	900
 tacacagatg atgctcagca gacagaagcc cacctggaga tcagggagga tgggaccgtg ggggcgctg ctgaccagag ccccgaaagt ctccctgcagc taaaagccctt gaaggctgga gttattcaaa tcttggaggt caagactagt aggttctgt gccagcggcc agatggggcc ctgtatggat ctctccattt tgaccctgag gcctgcagct tccggagga gatcagaccc gacggataca atgttacca gtccgaagcc cacggcctcc ctctgcacatct gcccggaaac aagtctctc accgggaccc tgccccaga ggacctgctc gttccctgcc actcccgcc ctgccccccg cattgcctga gccacccgga atcctggccc cccagcccc tcatgtggga	960 1020 1080 1140 1200 1260 1320
 tcctctgacc ctctgagcat ggtgacaggc ctggaggccg tgagaagccc cagctacgct tcc	1380 1383
<210> 74	
<211> 1419	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleic acid molecule coding for DFD26	
<400> 74	
cacggcgagg ggacattcac aagcgacgtg tcctttatc tggaaggaca ggccgctaag gagtttatcg catggctcgt caaaggcggc ggcaggaaca ccggacgggg cgaaaaagag aagaagaaag aaaaggagaa ggaagagcag gaggagagag aaaccaaaac acccgagtgt	60 120 180
 cccagtaca ctacgcctt gggagtgttt ctctccac ctaagccaa ggataaccctt atgatttcta ggacacctga ggtgacctgc gtcgttggtt acgtgagtca agaggacca gaggtccagt ttaactggta tggacggc gtggaaatgc ataatgcata aactaaaccc cgcgaggAAC aattcaattt aacctaccgg gtcgttctg tggacagat gtcgcata gattggctga acgggaagga gtataagtgt aaagtcaatc ataaggact ccccttagt atcgaaaaaa ctattcaaa ggccaaaggc cagcctagag agccacaggt gtacaccctt cctccatccc aagaggagat gacaaagaac caggtgtctc tgacttgtct cgtgaagggg	240 300 360 420 480 540 600
 ttctacccta gtgacatcgc tgcgtatgg gagtcaaacg gacagccaga gaataattat aagacaactc ctcccggttct ggattctgac ggcagttct ttctgtactc taggcttact gtggacaaaa gtcgtggca agaaggaaac gtctttcat gttctgttat gcacgaggcc ttgcacaatc attatacaca gaagtctctg agtctctcac tggcaagg cggggggggc agcggggggag gcggtccgg aggcggggga tctcatccca tccctgactc cagtcctctc	660 720 780 840 900

ctgcaattcg gggccaagt cggcagcg taccttaca cagatgtgc tcagcagaca	960
gaagccacc tggagatcg ggaggatgg accgtgggg gcgtgtga ccagagccc	1020
gaaagtctcc tgcatgtcaa agcatttgaag cttggaggta ttcaaatctt gggagtcaag	1080
actatgtatcg tcctgtgcca gcggccagat gggccctgt atggatctt ccatttgac	1140
cctgaggcc gcacgttccg ggaggagatc agacccgacg gataaatgt ttaccagtcc	1200
gaagccccac gcctccctct gcatctgccc gggaaacaagt ctctcaccg ggacctgccc	1260
cccagaggac ctgctcgctt cctgccactc ccaggcctgc ccccgccatt gcctgagcca	1320
cccgaaatcc tggcccccga gccccctgat gtggatcct ctgaccctct gagcatggtg	1380
acaggcttgg aggccgttag aagccccagc tacgcttcc	1419
<210> 75	
<211> 1383	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleic acid molecule coding for DFD27	
<400> 75	
cacggcgagg ggacattcac aagcgacgtg tcctttatc tggaaaggaca ggccgctaag	60
gagtttatcg catggctcgta caaaggcgcc ggcgaaaagg agaaggaaga gcaggaggag	120
agagaaacca aaacacccga gtgtcccagt cacactcagc ctctggagt gtttctttc	180
ccacctaagc ccaaggatac ctttatgatt tctaggacac ctgaggtgac ctgcgtcg	240
gtggacgtga gtcaagagga cccagaggc cagtttaact ggtatgtga cggcgtggaa	300
gtgcataatg caaaaactaa accccgcgag gaacaattca attcaaccta cgggtcg	360
tctgtgttga cagtgtcgca tcaagatgg ctgaacggga aggagtataa gtgtaaagtc	420
agtaataagg gactcccctc tagtatcgaa aaaactatcc caaaggccaa aggccagcct	480
agagagccac aggtgtacac ctttcccca tcccaagagg agatgacaaa gaaccagg	540
tctctgactt gtctcgtaa ggggttctac cctagtgcata tcgctgtcgat atggagtca	600
aacggacacg cagagaataa ttataagaca actcctcccg ttctggattc tgacggcagc	660
ttctttctgt actctaggct tactgtggac aaaagtgcgt ggcaagaagg gaacgtttt	720
tcatgttctg ttatgcacga ggcattgcac aatcattata cacagaagtc tctgagtctc	780
tcactggca aaggcgaaaa aggcagcgaaa ggaggcggtt ccggaggcgg gggatctcat	840
cccatccctg actccagtc tctctgcaat ttggggggcc aagtccggca gcggtaccc	900
tacacagatg atgtcagca gacagaagcc cacctggaga tcagggagga tggaccgtg	960

ggggcgctg	ctgaccagag	cccgaaagt	ctcctgcagc	tcaaagcctt	gaaggcttga	1020
gttattcaaa	tcttggagt	caagactagt	aggttcgt	gccagggcc	agatggggcc	1080
ctgtatggat	ctctccattt	tgacccttag	gcctgcagct	tccggagga	gatcagaccc	1140
gacggataca	atgtttacca	gtccgaagcc	cacggcctcc	ctctgcac	gtccggaaac	1200
aagtctctc	accgggaccc	tgccccaga	ggacctgctc	gttccctgcc	actcccgac	1260
ctgccccccg	cattgcctga	gccacccgga	atcctggccc	cccagcccc	tgtatgtggga	1320
tcctctgacc	ctctgagcat	ggtgacaggc	ctggaggccg	tgagaagccc	cagctacgct	1380
tcc						1383
<210>	76					
<211>	1419					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	nucleic acid molecule coding for DFD28					
<400>	76					
cacggcgagg	ggacattcac	aagcgacgtg	tccttttacc	tggaaagagca	ggccgctaag	60
gaatttatcg	catggctcg	caaaggaggc	gggaggaaaca	ccggacgggg	cggggaaagag	120
aagaagaaag	aaaaggagaa	ggaagagcag	gaggagagag	aaaccaaaac	acccgagtgt	180
cccaagtaca	ctcagccctt	gggagttttt	ctttccac	ctaagccaa	ggataaccctt	240
atgatttcta	ggacacctga	ggtgacctgc	gtcggtgtgg	acgtgagtca	agaggaccca	300
gagggtccagt	ttaactggta	tgttgacggc	gtggaaagtgc	ataatgc当地	aactaaaccc	360
cgcgaggaac	aattcaattt	aacctaccgg	gtcgttctg	tgttgacagt	gctgcataa	420
gattggctga	acgggaagga	gtataagtgt	aaagtcagta	ataaggact	ccctctagt	480
atcgaaaaaa	ctatttcaaa	ggccaaaggc	cagcctagag	agccacaggt	gtacaccctt	540
cctccatccc	aagaggagat	gacaaagaac	caggtgtctc	tgacttgtct	cgtgaagggg	600
ttctacccta	gtgacatcgc	tgtcgaatgg	gagtcaaacg	gacagccaga	gaataattat	660
aagacaactc	ctcccgttct	ggattctgac	ggcagttct	ttctgtactc	taggcttact	720
gtggacaaaa	gtcgctggca	agaagggAAC	gtctttcat	gttctgttat	gcacgaggcc	780
ttgcacaatc	attatacaca	gaagtctctg	agtctctcac	tggcaaaagg	cggggaggc	840
agcgggggag	gcgggtccgg	aggcgaaaaa	tctcatccca	tccctgactc	cagtcctctc	900
ctgcaattcg	ggggccaagt	ccggcagcgg	tacctctaca	cagatgatgc	tcagcagaca	960
gaagccacc	tggagatcag	ggaggatggg	accgtgggg	gctgtgtga	ccagagcccc	1020

gaaagtctcc	tgtagtgcggat	ttcaatctt	gggagtcaag	1080	
actatgttgtt	tcgtgtccat	ggggccctgt	atggatctct	1140	
cctgaggcct	gcagcttcg	ggaggagatc	agacccgacg	1200	
gaagccccacg	gcctccctct	gcatctgcc	ggaaacaagt	1260	
cccagaggac	ctgtcgctt	cctgccactc	ccaggcctgc	1320	
cccgaaatcc	tggccccc	gccccctgtat	gtgggatcct	1380	
acaggcctgg	aggccgtgag	aagccccagc	tacgcttcc	1419	
<210>	77				
<211>	1383				
<212>	DNA				
<213>	Artificial Sequence				
<220><223>	nucleic acid molecule coding for DFD29				
<400>	77				
cacggcgagg	ggacccatcac	aagcgacgtg	tccttttacc	tgaaagagca	60
gaatttatcg	catggctgt	caaaggaggc	ggggaaaagg	agaaggaaga	120
agagaaaacca	aaacacccga	gtgtcccagt	cacactcagc	ctctggagt	180
ccacctaagc	ccaaggatac	ccttatgatt	tctaggacac	ctgaggtgac	240
gtggacgtga	gtcaagagga	cccagaggc	cagtttaact	ggtatgttga	300
gtgcataatg	caaaaaactaa	accccgcgag	gaacaattca	attcaaccta	360
tctgtgttga	cagtgtcgca	tcaagattgg	ctgaacggga	aggagtataa	420
agtaataagg	gactccctc	tagtatcgaa	aaaactattt	caaaggccaa	480
agagagccac	aggtgtacac	ccttcctcca	tcccaagagg	agatgacaaa	540
tctctgactt	gtctcgtaa	ggggttctac	cctagtac	tcgtgtcga	600
aacggacagc	cagagaataaa	ttataagaca	actcctcccg	ttctggattc	660
ttctttctgt	actctaggct	tactgtggac	aaaagtgcgt	ggcaagaagg	720
tcatgttctg	ttatgcacga	ggccttgcac	aatcattata	cacagaagtc	780
tcactggca	aaggcgggg	aggcagcggg	ggaggcgggt	ccggaggcgg	840
cccatccctg	actccagtc	tctcctgcaa	ttcggggcc	aagtccggca	900
tacacagatg	atgtcagca	gacagaagcc	cacctggaga	tcagggagga	960
ggggcgcgtg	ctgaccagag	ccccgaaagt	ctcctgcagc	tgaaagcctt	1020
gttattcaaa	tcttggagt	caagactagt	agttcctgt	gccagcggcc	1080

ctgtatggat ctctccattt tgacccttag gcctgcagct tccgggagga gatcagaccc	1140
gacggataca atgtttacca gtccgaagcc cacggcctcc ctctgcacatct gcccgggaac	1200
aagtctcctc accgggaccc tgccccaga ggacctgctc gcttcctgcc actcccagc	1260
ctgccccccg cattgcctga gccacccgga atcctgtccc cccagcccc tcatgtggga	1320
tcctctgacc ctctgagcat ggtgacaggc ctggaggccg tgagaagccc cagctacgct	1380
tcc	1383
<210> 78	
<211> 1383	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleic acid molecule coding for DFD69	
<400> 78	
cacggcgagg ggaccc tac aagcgacgtg tcctttacc tggaaagagca ggccgctaag	60
gaatttatcg catggctcgt caaaggaggc gggaaaagg agaaggaaga gcaggaggag	120
agagaaaacca aaacacccga gtgtcccagt cacactcagc ctctggagt gtttcttc	180
ccacctaagc ccaaggatac ctttatgatt tcttaggacac ctgaggtgac ctgcgtcg	240
gtggacgtga gtcaagagga cccagaggc cagtttaact ggtatgttg cgccgtggaa	300
gtgcataatg caaaaactaa accccgcgag gaacaattca attcaaccta ccgggtcg	360
tctgtgttga cagtgcgtca tcaagatgg ctgaacggg aggagtataa gtgtaaagtc	420
agtaataagg gactcccctc tagtatcgaa aaaactatcaa aaaaaggccaa aggccagc	480
agagagccac aggtgtacac cttccctcca tcccaagagg agatgacaaa gaaccagg	540
tctctgactt gtctcgtaa ggggttctac cctagtgaca tcgctgtcg atggagtc	600
aacggacagc cagagaataa ttataagaca actccctccg ttctggattc tgacggc	660
ttctttctgt actctaggct tactgtggac aaaagtgcgt ggcaagaagg gaacgtctt	720
tcatgttctg ttatgcacga ggccttgcac aatcattata cacagaagtc tctgagtctc	780
tcactggca aaggcggggg aggcagcggg ggaggcggg ccggaggcgg gggatctcat	840
cccatccctg actccagtc ttcctgc aa ttccccccca aagtccggca gcggtac	900
tacacagatg atgctcagca gacagaagcc cacctggaga tcagggagga tggaccgt	960
ggggcgcgtg ctgaccagag ccccgaaagt ctccgcagc tggaaaggctt gaaggctt	1020
gttattcaaa tcttggagt caagactagt aggttctgt gccagcggcc agatggg	1080
ctgtatggat ctctccattt tgacccttag gcctgcagct tccgggagga gatcagaccc	1140

gacggataca atgttacca gtccgaagcc cacggcctcc ctctgcatct gcccggAAC	1200
aagtctcctc accgggaccc tgccccaga ggacctgctc gtttcctgcc actcccaggC	1260
ctgcccccccg cattgcctga gccaccggA atccTggccc cccagccccC tgatgtggGA	1320
tccTctgacc ctctgagcat ggtgacaggc ctggaggccg tgagaAGGCC cagctacgag	1380
tCC	1383
<210> 79	
<211> 1383	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid molecule coding for DFD112

<400> 79

cacggcgagg ggaccttac aagcgacgtg tcctttacc tgaaagagca ggccgctaag	60
gaatttatcg catggcttgt caaaggaggc gggaaaagg agaaggaaga gcaggaggag	120
agagaaacca aaacacccga gtgtcccagt cacactcagc ctctggagt gtttctctc	180
ccacctaagc ccaaggatac cttatgatt tcttaggacac ctgaggtgac ctgcgtcggt	240
gtggacgtga gtcaagagga cccagaggc cagtttaact ggtatgttga cggcgtggaa	300
gtgcataatg caaaaactaa accccgcgag gaacaattca attcaaccta ccgggtcggt	360

tctgtgttga cagtgcgtca tcaagatgg ctgaacggga aggagtataa gtgtaaagtc	420
agtaataagg gactccccctc tagtatcgaa aaaactattt caaaggccaa aggccagcct	480
agagagccac aggtgtacac ccttcctcca tcccaagagg agatgacaaa gaaccaggtg	540
tctctgactt gtctcgtaaa ggggttctac cctagtgaca tcgctgtcga atgggagtc	600
aacggacagc cagagaataa ttataagaca actcctcccg ttctggattc tgacggcagc	660
ttctttctgt actcttaggct tactgtggac aaaagtgcgtt ggcaagaagg gaacgtctt	720
tcatgttctg ttatgcacga ggccttgacaa aatcattata cacagaagtc tctgagtctc	780

tcaactggcga aaggcggggg aggccagcggg ggaggcgggt ccggaggcgg gggatctcat	840
cccatccctg actccagtc tctccctgcaa ttccccccca aagtccggca gcggtaacctc	900
tacacagatg atgctcagca gacagaagcc caccctggaga tcagggagga tgggaccgtg	960
gggggcgcgtg ctgaccagag ccccgaaagt ctccctgcagc tgaaagcctt gaagcctgga	1020
gttattcaaa tcttgggagt caagactagt agttcctgt gccagcggcc agatgggcc	1080
ctgtatggat ctctccattt tgacccttag gcctgcagct tccgggagga gatcagaccc	1140
gacggataca atgtttacca gtccgaagcc cacggcctcc ctctgcacat gccccggaaac	1200

aagtctcctc accgggaccc	tgccccaga ggacctgctc	gcttcctgcc actcccagc	1260
ctgcccccg cattgcctga	gccaccggaa atcctggccc	cccagcccc tgatgtggga	1320
tcctctgacc ctctgagcat	ggtgacagggc	ctggaggcca acagaagccc	1380
tcc		cagctacgag	1383
<210>	80		
<211>	1380		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	nucleic acid molecule coding for DFD114		
<400>	80		
cacggcgagg ggaccc tac aagcgacgtg	tccttttacc tggaagagca	ggccgctaag	60
gaatttatcg catggctcgtaaaagg	ggggaaaagg agaaggaaga	gcaggaggag	120
agagaaaacca aaacacccga	gtgtcccagt cacactcagc	ctctggagt gtttcttcc	180
ccacctaagc ccaaggatac	ccttatgatt tcttaggacac	ctgaggtgac ctgcgtcg	240
gtggacgtga gtcaagagga	cccagaggc	cagtttaact ggtatgtga	300
gtgcataatg caaaaactaa	accccgcgag	gaacaattca attcaaccta	360
tctgtgttga cagtgcgtca	tcaagattgg	ctgaacggga aggagtataa	420
agtaataagg gactccctc	tagtatcgaa	aaaactat ttcaaaggccaa	480
agagagccac aggtgtacac	ctttcctcca tcccaagagg	agatgacaaa gaaccagg	540
tctctgactt gtctcgtaa	ggggttctac cctagtgaca	tcgctgtcgatggagtca	600
aacggacagc cagagaataa	ttataagaca actcctcccg	ttctggattc tgacggc	660
ttctttctgt actctaggct tactgtggac	aaaagtgc	ggcaagaagg gaacgtctt	720
tcatgttctg ttatgcacga	ggccttgac	aatcattata cacagaagtc	780
tcactggca aaggcgggg	aggcagcggg	ggaggcgggt ccggaggcgg	840
cccatccctg actccagtc	tctcctgcaa	ttcgaaaaa aagtccggca	900
tacacagatg atgctcagca	gacagaagcc	cacctggaga tcagggagga	960
ggggcgcgtg ctgaccagag	ccccgaaagt	ctcctgcagc tgaaaggc	1020
gttattcaaa tcttggagt	caagactagt	agtttctgt gccagcggcc	1080
ctgtatggat ctctccat	tttgaccc	tgacccatgc	1140
gacggataca atgttacca	gtccgaagcc	cacggcctcc	1200
aagtctcctc accgggaccc	tgccccaga	ggacctgctc	1260

ctgccccccg cattgcctga gccacccgga atcctggccc cccagcccc tgatgtggga 1320

tcctctgacc ctctgagcat ggtgaacct tcccaggca gaagccccag ctacgagtcc 1380

1380