



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/50 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/14 (2019.02); A61K 31/155 (2019.02); C07K 14/50 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2014103487, 29.06.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2012Дата регистрации:
20.08.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

01.07.2011 US 61/504,128;

04.08.2011 US 61/515,126

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2015 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 20.08.2019 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.02.2014

(86) Заявка РСТ:

US 2012/045087 (29.06.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2013/006486 (10.01.2013)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение
3, ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЛИН Лэй (US),

ЛИНДХАУТ Даррин Э. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЭнДжиЭм БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2010/148142 A1, 23.12.2010. WU
A.L. FGF19 regulates cell proliferation, glucose
and bile acid metabolism via FGFR4-dependent
and independent pathways, PLoS One., 2011, v.6,
is.3, p.e17868, реферат, стр.1-10. WO 2011/047267,
21.04.2011. FRANKEL A.E. et al. Characterization
of diphtheria fusion proteins targeted to the
human interleukin-3 (см. прод.)(54) КОМПОЗИЦИИ, ПРИМЕНЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ И ЗАБОЛЕВАНИЙ
ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к химерному пептиду, который способен снижать уровни глюкозы у субъекта, а также к фармацевтической композиции, содержащей такой пептид и фармацевтически приемлемый носитель. Химерный полипептид согласно изобретению можно также применять для лечения гипергликемического состояния, для улучшения

метаболизма глюкозы, для лечения неалкогольного стеатогепатита, для лечения резистентности инсулина, для лечения гиперинсулинемии. Изобретение позволяет расширить арсенал средств для лечения гипергликемических состояний. 79 н. и 221 з.п. ф-лы, 8 ил., 9 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

receptor, Protein Eng., 2000, v.13, n.8, p.575-581, реферат, с.579-580. ЕА 015363 В1, 30.06.2011.

R U 2 6 9 7 7 6 2 C 2

R U 2 6 9 7 7 6 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/14 (2019.02); A61K 31/155 (2019.02); C07K 14/50 (2019.02)(21)(22) Application: **2014103487, 29.06.2012**(24) Effective date for property rights:
29.06.2012Registration date:
20.08.2019

Priority:

(30) Convention priority:
01.07.2011 US 61/504,128;
04.08.2011 US 61/515,126(43) Application published: **10.08.2015 Bull. № 22**(45) Date of publication: **20.08.2019 Bull. № 23**(85) Commencement of national phase: **03.02.2014**(86) PCT application:
US 2012/045087 (29.06.2012)(87) PCT publication:
WO 2013/006486 (10.01.2013)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

LIN Lej (US),
LINDKHAUT Darrin E. (US)

(73) Proprietor(s):

EnDzhiEm BAJOFARMASYUTIKALZ, INK.
(US)(54) **COMPOSITIONS, APPLICATIONS AND METHODS OF TREATING METABOLIC DISORDERS AND DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to a chimeric peptide which is capable of reducing glucose levels in a subject, as well as a pharmaceutical composition containing such a peptide and a pharmaceutically acceptable carrier. Chimeric polypeptide according to the invention can also be used for treating a

hyperglycaemic condition, for improving glucose metabolism, for treating non-alcoholic steatohepatitis, for treating insulin resistance, for treating hyperinsulinemia.

EFFECT: invention allows extending the range of products for treating hyperglycemic conditions.

300 cl, 8 dwg, 9 tbl, 8 ex

Родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по заявке с серийным номером 61/504128, поданной 1 июля 2011 года, и заявки с серийным номером 61/515126, поданной 4 августа 2011 года, которые обе полностью включены в настоящее описание

посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

[0002] Изобретение относится к вариантам белков фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и пептидным последовательностям (и пептидомиметикам), и слияниям белков и пептидных последовательностей (и пептидомиметиков) фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и/или фактора роста фибробластов 21 (FGF21), и вариантам слияния белков и пептидных последовательностей (и пептидомиметиков) фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и/или фактора роста фибробластов 21 (FGF21), обладающих снижающей уровень глюкозы активностью, и способам и применениям при лечении гипергликемии и других нарушений.

Введение

[0003] Сахарный диабет представляет собой истощающее метаболическое заболевание, вызываемое отсутствием продукции инсулина (1 тип) или резистентностью к инсулину, или недостаточной продукцией инсулина (2 типа) β -клетками поджелудочной железы. β -клетки представляют собой специализированные эндокринные клетки, которые вырабатывают и хранят инсулин для высвобождения после приема пищи. Инсулин представляет собой гормон, который облегчает перенос глюкозы из крови в ткани, где она является необходимой. Пациенты с диабетом должны часто наблюдать за уровнями глюкозы в крови, и для них могут быть необходимы многочисленные ежедневные инъекции инсулина для выживания. Однако такие пациенты редко получают идеальные уровни глюкозы посредством инъекции инсулина (Turner R.C. et al., JAMA, 281:2005 (1999)). Кроме того, продолжительное повышение уровней инсулина может приводить к вредным побочным эффектам, таким как гипогликемический шок и десенсибилизация ответа организма на инсулин. Таким образом, у пациентов с диабетом все еще развиваются хронические осложнения, такие как сердечнососудистые заболевания, заболевание почек, слепота, повреждение нервов и нарушения заживление ран (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, Lancet 352:837 (1998)).

[0004] В качестве потенциального лечения диабета была предложена бариатрическая хирургия. Предполагали, что изменения секреции гормонов желудочно-кишечного тракта после хирургической операции обуславливают нормализацию диабетических состояний. Указанный выше молекулярный механизм до сих пор не ясен, хотя в качестве возможного кандидата предлагают глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1) (Rubino F., Diabetes Care, 32 Suppl 2:S368 (2009)). FGF19 высоко экспрессируется в дистальном отделе тонкого кишечника, и трансгенная повышенная экспрессия FGF19 улучшает гомеостаз глюкозы (Tomlinson E., Endocrinology, 143(5): 1741-7 (2002)). После операции желудочного шунтирования у людей повышаются уровни FGF19 в сыворотке. Повышенной экспрессией и секрецией FGF19 можно по меньшей мере частично объяснять ремиссию диабета, наступающую после хирургической операции.

[0005] Таким образом, существует необходимость в альтернативных видах лечения гипергликемических состояний, таких как диабет, предиабет, резистентность к инсулину, гиперинсулинемия, непереносимость глюкозы или метаболический синдром, и других нарушений и заболеваний, ассоциированных с повышенными уровнями глюкозы у людей. Изобретение удовлетворяет эту потребность и предоставляет родственные преимущества.

Сущность изобретения

[0006] Изобретение частично основано на вариантах пептидных последовательностей фактора роста фибробластов 19 (FGF19), слияниях пептидных последовательностей фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и/или фактора роста фибробластов 21 (FGF21) и вариантах слияний (химер) пептидных последовательностей фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и/или фактора роста фибробластов 21 (FGF21), обладающих одной или более активностей, таких как снижающая уровень глюкозы активность. Такие варианты и слияния (химеры) пептидных последовательностей FGF19 и/или FGF21 включают последовательности, которые не повышают или не индуцируют образование печеночноклеточной карциномы (HCC) или образование опухолей HCC. Такие варианты и слияния (химеры) пептидных последовательностей FGF19 и/или FGF21 также включают последовательности, которые не индуцируют по существу повышение или увеличение липидного профиля.

[0007] В одном из вариантов осуществления химерная пептидная последовательность содержит или состоит из: N-концевой области, содержащей по меньшей мере семь аминокислотных остатков, где N-концевая область имеет первое аминокислотное положение и последнее аминокислотное положение, где N-концевая область содержит последовательность DSSPL или DASPH, и C-концевой области, содержащей участок FGF19, где C-концевая область имеет первое аминокислотное положение и последнее аминокислотное положение, где C-концевая область содержит аминокислотные остатки 16-29 FGF19 (WGDPIRLRHLYTSG), и где остаток W соответствует первому аминокислотному положению C-концевой области.

[0008] В другом варианте осуществления химерная пептидная последовательность содержит или состоит из: N-концевой области, содержащей участок FGF21, где N-концевая область имеет первое аминокислотное положение и последнее аминокислотное положение, где N-концевая область содержит последовательность GQV, и где остаток V соответствует положению последней аминокислоты N-концевой области, и C-концевой области, содержащей участок FGF19, где C-концевая область имеет первое аминокислотное положение и последнее аминокислотное положение, где C-концевая область содержит аминокислотные остатки 21-29 FGF19 (RLRHLYTSG), и где остаток R соответствует первому положению C-концевой области.

[0009] В дополнительном варианте осуществления химерная пептидная последовательность содержит или состоит из любой из: N-концевой области, содержащей участок SEQ ID NO:100 [FGF21], где N-концевая область имеет первое аминокислотное положение и последнее аминокислотное положение, где N-концевая область содержит по меньшей мере 5 (или более) смежных аминокислот SEQ ID NO:100 [FGF21], включая аминокислотные остатки GQV, и где остаток V соответствует положению последней аминокислоты N-концевой области; и C-концевой области, содержащей участок SEQ ID NO:99 [FGF19], где C-концевая область имеет первое аминокислотное положение и последнее аминокислотное положение, где C-концевая область содержит аминокислотные остатки 21-29 SEQ ID NO:99 [FGF19], RLRHLYTSG, и где остаток R соответствует первому положению C-концевой области. В конкретных аспектах N-концевая область содержит по меньшей мере 6 смежных аминокислот (или более, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100 смежных аминокислот) SEQ ID NO: 100 [FGF21], включая аминокислотные остатки GQV.

[0010] В дополнительном варианте осуществления пептидная последовательность содержит или состоит из любого из: варианта последовательности фактора роста

фибробластов 19 (FGF19), содержащего одну или более замен, вставок или делеций аминокислот по сравнению с эталоном или FGF19 дикого типа; варианта последовательности фактора роста фибробластов 21 (FGF21), содержащего одну или более замен, вставок или делеций аминокислот по сравнению с эталоном или FGF21 дикого типа; участка последовательности FGF19, слитого с участком последовательности FGF21; или участка последовательности FGF19, слитого с участком последовательности FGF21, где участок(и) последовательности FGF19 и/или FGF21 содержат одну или более замен, вставок или делеций аминокислот по сравнению с эталоном или FGF19 и/или FGF21 дикого типа.

[0011] В дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность содержит или состоит из аминоконцевых аминокислот 1-16 SEQ ID NO:100 [FGF21], слитых с карбоксиконцевыми аминокислотами 21-194 SEQ ID NO:99 [FGF19], или пептидная последовательность содержит аминоконцевые аминокислоты 1-147 SEQ ID NO:99 [FGF19], слитые с карбоксиконцевыми аминокислотами 147-181 SEQ ID NO:100 [FGF21] (M41), или пептидная последовательность содержит аминоконцевые аминокислоты 1-20 SEQ ID NO:99 [FGF19], слитые с карбоксиконцевыми аминокислотами 17-181 SEQ ID NO:100 [FGF21] (M44), или пептидная последовательность содержит аминоконцевые аминокислоты 1-146 SEQ ID NO:100 [FGF21], слитые с карбоксиконцевыми аминокислотами 148-194 SEQ ID NO:99 [FGF19] (M45), или пептидная последовательность содержит аминоконцевые аминокислоты 1-20 SEQ ID NO:99 [FGF19], слитые с внутренними аминокислотами 17-146 SEQ ID NO:100 [FGF21], слитыми с карбоксиконцевыми аминокислотами 148-194 SEQ ID NO:99 [FGF19] (M46).

[0012] В дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность содержит мотив последовательности WGDPI, соответствующий последовательности WGDPI аминокислот 16-20 SEQ ID NO:99 [FGF19], или содержит замещенный, мутантный или не содержит мотив последовательности WGDPI, соответствующий последовательности WGDPI FGF19 аминокислот 16-20 FGF19, или мотив последовательности WGDPI содержит одну или более аминокислот, замещенных, мутантных или не содержит; или является отличной от варианта последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDP или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI FGF19 при аминокислотах 16-20.

[0013] В дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность содержит N-концевую область, которая содержит или состоит из аминокислотных остатков VHYG, где N-концевая область содержит аминокислотные остатки DASPHVHYG, или где N-концевая область содержит аминокислотные остатки DSSPLVHYG, или где N-концевая область содержит аминокислотные остатки DSSPLLQ, или где N-концевая область содержит аминокислотные остатки DSSPLLQFGGQV. В конкретных аспектах G соответствует последнему положению N-концевой области, или Q остаток имеет последнее аминокислотное положение N-концевой области, или V остаток соответствует последнему положению N-концевой области.

[0014] В других дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность содержит N-концевую область, которая содержит или состоит из RHPIR, где R имеет первое аминокислотное положение N-концевой области; или HPIR (например, где HPIR представляют собой

первые 4 аминокислотных остатка N-концевой области), где Н имеет первое аминокислотное положение N-концевой области; или RPLAF, где R имеет первое аминокислотное положение N-концевой области; или PLAF, где Р имеет первое аминокислотное положение N-концевой области; или R, где R имеет первое аминокислотное положение N-концевой области, или содержит в N-концевой области любую из следующих последовательностей: MDSSPL, MSDSSPL, SDSSPL, MSSPL или SSPL.

[0015] В других вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность содержит в первом положении N-концевой области остаток "М", остаток "R", "S" остаток, остаток "Н", остаток "Р", остаток "L" или остаток "D". В альтернативных вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность не содержит остаток "М" или остаток "R" в положении первой аминокислоты N-концевой области.

[0016] В других вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность содержит в первом и втором положениях N-концевой области последовательность MR или в первом и втором положениях N-концевой области последовательность RM, или в первом и втором положениях N-концевой области последовательность RD, или в первом и втором положениях N-концевой области последовательность DS, или в первом и втором положениях N-концевой области последовательность MD, или в первом и втором положениях N-концевой области последовательность MS, или в положениях с первого по третье N-концевой области последовательность MDS, или в положениях с первого по третье N-концевой области последовательность RDS, или в положениях с первого по третье N-концевой области последовательность MSD, или в положениях с первого по третье N-концевой области последовательность MSS, или в положениях с первого по третье N-концевой области последовательность DSS, или в положениях с первого по четвертое N-концевой области последовательность RDSS, или в положениях с первого по четвертое N-концевой области последовательность MDSS, или в положениях с первого по пятое N-концевой области последовательность MRDSS, или в положениях с первого по пятое N-концевой области последовательность MSSPL, или в положениях с первого по шестое N-концевой области последовательность MDSSPL, или в положениях с первого по седьмое N-концевой области последовательность MSDSSPL.

[0017] В других вариантах осуществления пептидная последовательность или химерная пептидная последовательность... добавление аминокислотных остатков 30-194 SEQ ID NO:99 [FGF19] при С-конце, приводящее к химерному полипептиду, находящемуся в последнем положении С-концевой области, которое соответствует приблизительно остатку 194 SEQ ID NO:99 [FGF19]. В еще одних других вариантах осуществления химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность содержит всю или участок последовательности FGF19 (например, SEQ ID NO:99), расположенную на С-конце пептида, или где аминоконцевой остаток "R" удаляют из пептида.

[0018] В более конкретных вариантах осуществления химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность содержит или состоит из любого из вариантов пептидных последовательностей M1-M98, или подпоследовательности или фрагмента любого из вариантов пептидных последовательностей M1-M98.

[0019] В дополнительных конкретных вариантах осуществления химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность содержит N-концевую или С-концевую область длиной приблизительно от 20 приблизительно до 200 аминокислотных

остатков. В дополнительных конкретных вариантах осуществления химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность содержит по меньшей мере одну делецию аминокислоты. В других дополнительных конкретных вариантах осуществления, химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность, или подпоследовательность или ее фрагмент содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более делеций аминокислот на N-конце, C-конце или внутренних. В конкретном неограничивающем аспекте замена аминокислоты или делеция происходит в любых положениях аминокислот 8-20 FGF19 (AGPHVHYGWDPI).

[0020] В более конкретных вариантах осуществления химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность содержит или состоит из аминокислотной последовательности из приблизительно от 5 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100 или более аминокислот. В более конкретных вариантах осуществления химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность содержит или состоит из аминокислотной последовательности из приблизительно от 5 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 60, от 60 до 70, от 70 до 80, от 80 до 90, от 90 до 100 или более аминокислот FGF19 или FGF21.

[0021] В дополнительных конкретных вариантах осуществления химерные пептидные последовательности и пептидные последовательности обладают конкретными функциями или активностями. В одном из аспектов химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность поддерживает или повышает опосредованную FGFR4 активность. В дополнительных аспектах химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность связывается с рецептором 4 фактора роста фибробластов (FGFR4) или активирует FGFR4, или на детектируемом уровне не связывается с рецептором 4 фактора роста фибробластов (FGFR4) или не активирует FGFR4, или связывается с FGFR4 с аффинностью меньшей, сопоставимой или большей, чем аффинность связывания FGF19 с FGFR4, или активирует FGFR4 в степени или количестве, меньшем, сопоставимом или большем, чем FGF19 активирует FGFR4. В дополнительных аспектах химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность уменьшала образование печеночноклеточной карциномы (HCC) по сравнению с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащим любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19, и/или обладает большей снижающей уровень глюкозы активностью по сравнению с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19, и/или обладает меньшей повышающей уровень липидов активностью по сравнению с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19, и/или обладает меньшей повышающей уровень триглицерида, холестерина, не-HDL или HDL активностью по сравнению с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19, и/или обладает меньшей

снижающей массу нежировых тканей активностью по сравнению с FGF21. Такие функции и активности можно выявлять *in vitro* или *in vivo*, например, на мышцах db/db.

[0022] В еще одних дополнительных вариантах осуществления в композиции можно вводить выделенные или очищенные химерные пептидные последовательности и пептидные последовательности и/или химерные пептидные последовательности и пептидные последовательности. В одном из вариантов осуществления химерная пептидная последовательность или пептидная последовательность содержится в фармацевтической композиции. Такие композиции содержат комбинации неактивных или других активных ингредиентов. В одном из вариантов осуществления композиции, такие как фармацевтическая композиция, содержат химерную пептидную последовательность или пептидную последовательность и снижающее уровень глюкозы средство.

[0023] Дополнительные варианты осуществления относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим химерную пептидную последовательность или пептидную последовательность. Такие молекулы могут дополнительно содержать функционально связанный элемент контроля экспрессии, который обеспечивает экспрессию кодирующей пептид молекулы нуклеиновой кислоты *in vitro*, в клетке или *in vivo*, или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты (например, вирусный вектор). Также предоставлены трансформированные клетки и клетки-хозяева, которые экспрессируют химерные пептидные последовательности и пептидные последовательности.

[0024] Также предоставлены применения и способы лечения, которые включают введение или доставку любой химерной пептидной последовательности или пептидной последовательности. В конкретных вариантах осуществления применение или способ лечения индивидуума включает введение химерной пептидной или пептидной последовательности по изобретения индивидууму, такому как индивидуум, страдающий или подвергающийся риску заболевания или нарушения, поддающегося лечению пептидной последовательностью по изобретению, в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения. В дополнительном варианте осуществления способ включает введение химерной пептидной или пептидной последовательности по изобретению индивидууму, такому как индивидуум с гипергликемическим состоянием (например, диабетом, таким как инсулинозависимый диабет (I типа), диабет II типа или гестационный диабет), резистентностью к инсулину, гиперинсулинемией, непереносимостью глюкозы или метаболическим синдромом, или страдающему ожирением или имеющему нежелательную массу тела.

[0025] В конкретных аспектах способов и применений химерную пептидную последовательность или пептидную последовательность вводят индивидууму в количестве, эффективном для улучшения метаболизма глюкозы у индивидуума. В более конкретных аспектах у индивидуума до введения уровень глюкозы в плазме натощак составляет более 100 мг/дл, или уровень гемоглобина A1c (HbA1c) составляет более 6%.

[0026] В дополнительных вариантах осуществления применение или способ лечения индивидуума предназначен для или приводит к снижению уровней глюкозы, сниженной чувствительности к инсулину, сниженной резистентности к инсулину, снижению уровня глюкагона, улучшению переносимости глюкозы или метаболизма или гомеостаз глюкозы, улучшенной функции поджелудочной железы, или сниженным уровням триглицерида, холестерина, IDL, LDL или VLDL, или снижению артериального давления, уменьшению утолщения интимы кровеносного сосуда или снижению массы тела или увеличению массы тела.

[0027] Также предоставлены способы анализа и/или определения химерной пептидной последовательности или пептидной последовательности, такой как химерные пептидные последовательности и пептидные последовательности, которые обладают снижающей уровень глюкозы активностью глюкозы по существу без активности в отношении

5 печеночноклеточной карциномы (НСС). В одном из вариантов осуществления способ включает: а) предоставление кандидатной химерной пептидной последовательности или пептидной последовательности; б) введение кандидатной пептидной последовательности тестируемому животному (например, мыши db/db); в) измерение

10 уровней глюкозы у животного после введения кандидатной пептидной последовательности для определения, снижает ли кандидатная пептидная последовательность уровни глюкозы. В конкретном аспекте химерную пептидную последовательность или пептидную последовательность также анализируют в отношении индукции НСС у животного (например, оценивая образец ткани печени

15 тестируемого животного), или экспрессии маркера, коррелирующего с активностью НСС, где кандидатный пептид обладает снижающей уровень глюкозы активностью и не обладает по существу активностью в отношении НСС. Такими способами определяют кандидата, как обладающего снижающей уровень глюкозы активностью, также необязательно по существу без активности в отношении печеночноклеточной карциномы (НСС).

20 Описание чертежей

[0028] На фиг. 1 представлены последовательности белков FGF19 и FGF21 и характерные варианты последовательностей, а именно пептидные последовательности варианта М5, варианта М1, варианта М2, варианта М69, варианта М3, варианта М48, варианта М49, варианта М50, варианта М51, варианта М52, варианта М53 и варианта

25 М70. Также представлены 3 дополнительные аллельные (полиморфные) формы FGF21, а именно М71, М72 и М73.

[0029] На фиг. 2 представлены характерные замены домена последовательностей белков FGF21 (без штриховки) и FGF19 (серая штриховка) и получаемые слитые (химерные) последовательности. Области аминокислот из каждого из FGF21 и FGF19, содержащиеся в слиянии (химере) указаны числами. Для каждой из химерных

30 последовательностей представлены снижение уровня глюкозы и повышение уровня липидов.

[0030] На фиг. 3А-3І представлены данные снижения уровня глюкозы и массы тела. Пептидные последовательности А) варианта М5; В) варианта М1; С) варианта М2 и

35 варианта М69; D) варианта М3; Е) варианта М48 и варианта М49; F) варианта М51 и варианта М50; G) пептида варианта М52; H) пептида варианта М53 и I) варианта М70 все обладают снижающей уровень глюкозы (т.е. противодиабетической) активностью у мышей db/db. Мышам инъектировали вектор AAV, экспрессирующий FGF19, FGF21, отобранные варианты, и физиологический раствор и GFP представляют собой

40 отрицательные контроли.

[0031] На фиг. 4А-4І представлен липидный профиль (триглицерид, общий холестерин, HDL и не-HDL) в сыворотке мышей db/db, которых инъектируют вектором AAV, экспрессирующим FGF19, FGF21 или пептидные последовательности А) варианта М5; В) варианта М1; С) варианта М2 и варианта М69; D) варианта М3; Е) варианта М48 и

45 варианта М49; F) варианта М51 и варианта М50; G) пептида варианта М52; H) пептида варианта М53 и I) варианта М70. Вариант пептидной последовательности М5 не увеличивает или не повышает уровень липидов в отличие от FGF19, М1, М2 и М69, которые увеличивают и повышают уровень липидов. Уровни в сыворотке всех вариантов

являлись сравнимыми. Физиологический раствор и GFP являются отрицательными контролями.

[0032] На фиг. 5A-5I представлены связанные с печеночноклеточной карциномой (НСС) данные для пептидных последовательностей А) варианта М5; В) варианта М1; С) варианта М2 и варианта М69; D) варианта М3; Е) варианта М48 и варианта М49; F) варианта М51 и варианта М50; G) варианта М52; Н) пептида варианта М53 и I) варианта М70. Все варианты не повышают значительно или не индуцируют образование печеночноклеточной карциномы (НСС) или образование опухолей НСС в отличие от FGF19. Балл НСС записан в виде числа узлов НСС на поверхности всей печени мышей, которым инъецируют варианты, деленного на число узлов НСС у мышей, которым инъецируют FGF19 дикого типа.

[0033] На фиг. 6A-6I представлены данные массы нежировых тканей или жировой массы для пептидных последовательностей А) варианта М5; В) варианта М1; С) варианта М2 и варианта М69; D) варианта М3; Е) варианта М48 и варианта М49; F) варианта М51 и варианта М50; G) варианта М52; Н) пептида варианта М53 и I) варианта М70. За исключением М2, М5 и М69, варианты пептидных последовательностей снижают массу нежировых тканей или жировую массу в отличие от FGF21.

[0034] На фиг. 7A-7B представлены графические данные, демонстрирующие, что инъекция рекомбинантных полипептидов А) варианта М5 и В) варианта М69 снижает уровень глюкозы в крови у мышей ob/ob.

[0035] На фиг. 8 представлены данные, указывающие на то, что наблюдают, что экспрессия в печени семейства альдокеторедуктаз 1, члена C18 (Akr1C18) и семейства транспортера растворенных веществ 1, члена 2 (slc1a2) коррелирует с активностью в отношении НСС.

25 Подробное описание

[0036] Изобретение относится к химерным и пептидным последовательностям, которые способны снижать или уменьшать уровни глюкозы. В одном из вариантов осуществления химерная пептидная последовательность содержит или состоит из N-концевой области, содержащей по меньшей мере семь аминокислотных остатков, и N-концевой области, находящейся в положении первой аминокислоты и положении последней аминокислоты, где N-концевая область содержит последовательность DSSPL или DASPH; и С-концевой области, содержащей участок FGF19, и С-концевой области, находящейся в положении первой аминокислоты и положении последней аминокислоты, где С-концевая область содержит аминокислотные остатки 16-29 FGF19 (WGDPRLRLHLYTSG), и остаток W соответствует положению первой аминокислоты С-концевой области.

[0037] В другом варианте осуществления химерная пептидная последовательность содержит или состоит из N-концевой области, содержащей участок FGF21, и N-концевой области, находящейся в положении первой аминокислоты и положении последней аминокислоты, где N-концевая область содержит последовательность GQV, и остаток V соответствует положению последней аминокислоты N-концевой области; и С-концевой области, содержащей участок FGF19, и С-концевой области, находящейся в положении первой аминокислоты и положении последней аминокислоты, где С-концевая область содержит аминокислотные остатки 21-29 FGF19 (RLRHLYTSG), и остаток R соответствует первому положению С-концевой области.

[0038] В дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность содержит или состоит из варианта последовательности фактора роста фибробластов 19 (FGF19), содержащего одну или более замен, вставок или делеций аминокислот по

сравнению с эталоном или FGF19 дикого типа. В дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность содержит или состоит из варианта последовательности фактора роста фибробластов 21 (FGF21), содержащего одну или более замен, вставок или делеций аминокислот по сравнению с эталоном или FGF21 дикого типа. В дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность содержит или состоит из участка последовательности FGF19, слитой с участком последовательности FGF21. В еще одних дополнительных вариантах осуществления пептидная последовательность содержит или состоит из участка последовательности FGF19, слитой с участком последовательности FGF21, где участок (и) последовательности FGF19 и/или FGF21 содержит одну или более замен, вставок или делеций аминокислот по сравнению с эталоном или FGF19 и/или FGF21 дикого типа.

[0039] Изобретение также относится к способам и применениям при лечении индивидуума, страдающего или подвергающегося риску нарушения обмена веществ, поддающегося лечению с использованием вариантов и слияний пептидных последовательностей фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и/или фактора роста фибробластов 21 (FGF21). В одном из вариантов осуществления способ включает контактирование или введение индивидууму одного или более вариантов или слияний пептидных последовательностей фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и/или фактора роста фибробластов 21 (FGF21) в количестве, эффективном для лечения нарушения. В другом варианте осуществления способ включает контактирование или введение индивидууму одной или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант или слияние пептидной последовательности фактора роста фибробластов 19 (FGF19) и/или фактора роста фибробластов 21 (FGF21) (например, элемента контроля экспрессии, функционально связанного с нуклеиновой кислотой, кодирующей пептидную последовательность, необязательно содержащую вектор), в количестве эффективном для лечения нарушения.

[0040] Хотя для практического осуществления изобретения не требуется понимание указанных выше механизмов действия пептидов по изобретению, не будучи связанными какой-либо конкретной теорией или гипотезой, полагают, что пептиды по изобретению имитируют по меньшей мере частично эффект, который оказывает бариатрическая хирургия, например, гомеостаз глюкозы и потеря массы. Полагают, что изменения секреции желудочно-кишечного гормона (например, глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1)) после бариатрической хирургии обуславливают нормализацию, например, диабетических состояний. FGF19 высоко экспрессируется в дистальном отделе тонкого кишечника, и трансгенная повышенная экспрессия FGF19 улучшает гомеостаз глюкозы. Вследствие того, что у людей уровни FGF19 также повышаются после операции желудочного шунтирования, повышенные уровни FGF19 могут быть связаны с ремиссией диабета, наблюдаемого после бариатрической хирургии.

[0041] Репрезентативная эталонная последовательность или последовательность FGF19 дикого типа установлена как:

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLLEI
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHR
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPF
GLVTGLEAVRSPSFKEK (SEQ ID NO:99).

[0042] Репрезентативная эталонная последовательность или последовательность FGF21 дикого типа установлена как:

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGVGGAADQSPESLLQLKALKP
 GVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
 NKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
 (SEQ ID NO:100).

Аллельные варианты FGF21 проиллюстрированы на фигуре 1 (например, M70, M71 и M72).

[0043] Термины "пептидная", "белковая" и "полипептидная" последовательность в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения двух или более аминокислот или "остатков", включая химические модификации и производные аминокислот, ковалентно связанных амидной связью или эквивалентной. Аминокислоты, образующие весь или часть пептида, могут входить в число известной 21 природной аминокислоты, которые обозначают как их однобуквенное сокращение или общепринятое трехбуквенное сокращение. В пептидных последовательностях по изобретению общепринятые аминокислотные остатки имеют их общепринятое значение. Таким образом, "Leu" представляет собой лейцин, "Ile" представляет собой изолейцин, "Nle" представляет собой норлейцин и т.д.

[0044] В настоящем описании проиллюстрированы пептидные последовательности, отличные от эталонных полипептидов FGF19 и FGF21, указанных в настоящем описании, которые уменьшают или снижают уровень глюкозы *in vivo* (таблицы 1-8 и фигура 1). Неограничивающие конкретные примеры представляют собой пептидную последовательность с аминоконцевыми аминокислотами 1-16 FGF21, слитыми с карбоксиконцевыми аминокислотами 21-194 FGF19; пептидную последовательность с аминоконцевыми аминокислотами 1-147 FGF19, слитыми с карбоксиконцевыми аминокислотами 147-181 FGF21; пептидную последовательность с аминоконцевыми аминокислотами 1-20 FGF19, слитыми с карбоксиконцевыми аминокислотами 17-181 FGF21; пептидную последовательность с аминоконцевыми аминокислотами 1-146 FGF21, слитыми с карбоксиконцевыми аминокислотами 148-194 FGF19, и пептидную последовательность с аминоконцевыми аминокислотами 1-20 FGF19, слитыми с внутренними аминокислотами 17-146 FGF21, слитыми с карбоксиконцевыми аминокислотами 148-194 FGF19.

[0045] Дополнительные конкретные пептидные последовательности содержат мотив последовательности WGDPI, соответствующий последовательности WGDPI аминокислот 16-20 FGF19, не содержат мотив последовательности WGDPI, соответствующий последовательности WGDPI аминокислот 16-20 FGF19 или содержат замещенный (т.е. мутантный) мотив последовательности WGDPI, соответствующий последовательности WGDPI FGF19 аминокислот 16-20 FGF19.

[0046] Конкретные пептидные последовательности по изобретению также включают последовательности, отличные от FGF19 и FGF21 (например, как указано в настоящем описании), и вариант последовательностей FGF19, содержащих любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI FGF19 при аминокислотах 16-20. Таким образом, FGF19 и FGF21 дикого типа (например, как указано в настоящем описании в виде SEQ ID NO:99 и 100, соответственно) могут представлять собой исключенные последовательности, и FGF19, содержащий любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19, также можно исключать. Такое исключение, однако,

не применяют там, где последовательность содержит, например, 3 остатка FGF21, слитых с FGF19, содержащим, например, любую из GQV, GQV, GDI или GPI, или 2 остатка FGF21, слитых с любой из WGPI, WGDI, GDPI, WDPI, WGDI или WGDP.

[0047] Конкретные неограничивающие примеры пептидных последовательностей, содержат или состоят из всех или части варианта последовательностей, обозначаемого в настоящем описании как M1-M98 (SEQ ID NO:1-98). Более конкретные неограничивающие примеры пептидных последовательностей содержат или состоят из всех или части последовательностей, установленных как:

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAAVAL
RTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGL

EAVRSPSFEEK (последовательности FGR21 также могут содержать остаток "R" на N-конце) или ее подпоследовательность или фрагмент;

DSSPLLQFGGQVRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAAVALRTV
AIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK
QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAV
RSPSFEEK, или ее подпоследовательность или фрагмент, или;

RPLAFSDASPHVHYGWDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEI
KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHR
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPF
GLVTGLEAVRSPSFEEK, или ее подпоследовательность или фрагмент, или;

RPLAFSDSSPLVHYGWDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK
AVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRL
PVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG
LVTGLEAVRSPSFEEK, или ее подпоследовательность или фрагмент, или;

DSSPLVHYGWDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALR
TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTGLE
AVRSPSFEEK, или ее подпоследовательность или фрагмент, или;

RDSSPLVHYGWDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVAL
RTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTGL
EAVRSPSFEEK (M69), или ее подпоследовательность или фрагмент, или;

RDSSPLLQWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRT
VAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSA
KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTGLEA
VRSPSFEEK (M52), или ее подпоследовательность или фрагмент, или;

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVAL
RTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTGL
EAVRSPSFEEK (M5), или ее подпоследовательность или фрагмент;

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHSLPLHLPG
NKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
(M71), или ее подпоследовательность или фрагмент, или;

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
NKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS
(M72), или ее подпоследовательность или фрагмент; или

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKP
GVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
NKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVVODELOGVGEGE
CHMHPENCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE (M73), или ее подпоследовательность или
фрагмент; или

RPLAFSDASPHVHYGWDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
 KAVARTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHR
 LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPF
 5 GLVTGLEAVRSPSEK (M1), или ее подпоследовательность или фрагмент; или
 RPLAFSDSSPLVHYGWDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIK
 AVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRL
 PVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG
 10 LVTGLEAVRSPSEK (M2), или ее подпоследовательность или фрагмент; или
 RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
 KAVARTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEILEDGYNVYRSEKHR
 LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPF
 15 GLVTGLEAVRSPSEK (M3), или ее подпоследовательность или фрагмент; или
 RDSSPLLQFGGQVRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVART
 VAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSA
 KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTGLEA
 20 VRSPSEK (M48), или ее подпоследовательность или фрагмент; или
 RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKA
 VALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLP
 VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG
 25 VTGLEAVRSPSEK (M49), или ее подпоследовательность или фрагмент; или
 RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
 LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEILEDGYNVYRSEKHRLPVSL
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTG
 30 LEAVRSPSEK (M50), или ее подпоследовательность или фрагмент; или
 RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
 LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL
 SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTG
 35 LEAVRSPSEK (M51), или ее подпоследовательность или фрагмент; или
 MDSSPLLQWGDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVART
 VAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSA
 KQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLVTGLEA
 40 VRSPSEK (M53), или ее подпоследовательность или фрагмент; и
 MRDSSPLVHYGWDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
 ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
 SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGGLV
 45 TGLEAVRSPSEK (M70), или для любой из указанных выше пептидных последовательностей
 можно удалять R-концевой остаток.

[0048] Дополнительные конкретные неограничивающие примеры пептидных

последовательностей содержат или состоят из:

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAV
RTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL
5 SAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGL
EAVRSPSF EK, или ее подпоследовательность или фрагмент; или

DSSPLLQFGGQVRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAV
AIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAK
10 QRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAV
RSPSF EK, или ее подпоследовательность или фрагмент;

RPLAFSDASPHVHYG WGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEI
KAVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRL
15 LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPF
GLVTGLEAVRSPSF EK, или ее подпоследовательность или фрагмент;

RPLAFSDSSPLVHYG WGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIK
AVALRTVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRL
20 PVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG
LVTGLEAVRSPSF EK, или ее подпоследовательность или фрагмент;

DSSPLVHYG WGDPIRLRHL YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAV
TVAIKGVH SVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSS
25 AKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFG
LVTGLEAVRSPSF EK, или ее подпоследовательность или фрагмент.

[0049] Дополнительные конкретные неограничивающие примеры пептидных последовательностей, содержащих на N-конце пептидную последовательность, содержащую или состоящую из всех или части любой из:

30 HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSG (M5); DSSPLLQFGGQVRLRHL YTSG (M6);

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHL YTSG (M7); HPIPDSSPLLQWGDPIRLRHL YTSG (M8);

HPIPDSSPLLQFGWGDPIRLRHL YTSG (M9); HPIPDSSPHVHYG WGDPI RLRHL YTSG

35 (M10); RPLAFSDAGPLLQWGDPIRLRHL YTSG (M11);

RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHL YTSG (M12);

RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHL YTSG (M13); HPIPDSSPHVHYGGQVRLRHL YTSG

(M14); RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHL YTSG (M15); RPLAFSDAGPHVHWGDPI

40 RLRHL YTSG (M16); RPLAFSDAGPHVGWGDPI RLRHL YTSG (M17);

RPLAFSDAGPHYG WGDPIRLRHL YTSG (M18); RPLAFSDAGPVYGWGDPIRLRHL YTSG

(M19); RPLAFSDAGPVHGWGDPI RLRHL YTSG (M20);

RPLAFSDAGPVHYWGDPIRLRHL YTSG (M21);

45 RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHL YTSG (M22);

RPLAFSDAGPHHGWDPIRLRHLTYTSG (M23); RPLAFSDAGPHHYWDPIRLRHLTYTSG
 (M24); RPLAFSDAGPHVYWDPIRLRHLTYTSG (M25);
 RPLAFSDSSPLVHWGDPIRLRHLTYTSG (M26); RPLAFSDSSPHVHWGDPIRLRHLTYTSG
 5 (M22); RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHLTYTSG (M28); RPLAFSDAGPHVHYWDPI-
 RLRHLTYTSG (M29); RPLAFSDAGPHVHYAWGDPIRLRHLTYTSG (M30);
 RHPIPDSSPLLQFGAQVRLRHLTYTSG (M31); RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLTYTSG
 (M32); RHPIPDSSPLLQFGPQVRLRHLTYTSG (M33);
 10 RHPIPDSSPLLQFGGAVRLRHLTYTSG (M34); RHPIPDSSPLLQFGGEVRLRHLTYTSG
 (M35); RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLTYTSG (M36);
 RHPIPDSSPLLQFGGQARLRHLTYTSG (M37); RHPIPDSSPLLQFGGQI RLRHLTYTSG
 (M38); RHPIPDSSPLLQFGGQTRLRHLTYTSG (M39);
 15 RHPIPDSSPLLQFGWGQPVRLRHLTYTSG (M40); DAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSG
 (M74); VHYGWGDPIRLRHLTYTSG (M75); RLRHLTYTSG (M77);
 RHPIPDSSPLLQFGWGDPRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPLLQWGDPIRLRHLTYTSG;
 RPLAFSDAGPLLQFGWGDPRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLTYTSG;
 20 RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPHVHYGGQVRLRHLTYTSG;
 RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRHLTYTSG; RDSSPLLQFGGQVRLRHLTYTSG;
 RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPLLQFGAQVRLRHLTYTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPLLQFGPQVRLRHLTYTSG;
 25 RHPIPDSSPLLQFGGAVRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPLLQFGGEVRLRHLTYTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPLLQFGGQARLRHLTYTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGGQIRLRHLTYTSG; RHPIPDSSPLLQFGGQTRLRHLTYTSG;
 RHPIPDSSPLLQFGWGQPVRLRHLTYTSG; и для любой из указанных выше пептидных
 30 последовательностей можно удалять аминоконцевой остаток R.

[0050] Пептидные последовательности по изобретению дополнительно включают
 пептидные последовательности со сниженной или отсутствующей индукцией или
 образованием печеночноклеточной карциномы (HCC) по сравнению с FGF19 или
 вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI,
 35 WGGI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDPI, WGDPA, WDPI, WGGI,
 WGGP или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-
 20 FGF19. Пептидные последовательности по изобретению также включают пептидные
 последовательности с большей снижающей уровень глюкозы активностью по сравнению
 с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI,
 40 WGPI, WGGP, WGGI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDPI, WGDPA,
 WDPI, WGGI, WGGP или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при
 аминокислотах 16-20 FGF19. Пептидные последовательности по изобретению кроме
 того включают пептидные последовательности с меньшей повышающей уровни липидов
 (например, триглицерида, холестерина, не-HDL или HDL) активностью по сравнению
 45 с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI,
 WGPI, WGGP, WGGI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPI, AGDPI, WADPI, WGDPI, WGDPA,
 WDPI, WGGI, WGGP или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при
 аминокислотах 16-20 FGF19.

[0051] Как правило, число аминокислот или остатков в пептидной последовательности по изобретению в целом составляет менее приблизительно 250 (например, аминокислот или их миметиков). В различных конкретных вариантах осуществления число остатков составляет приблизительно от 20 приблизительно до 200 остатков (например, аминокислот или их миметиков). В дополнительных вариантах осуществления число остатков составляет приблизительно от 50 приблизительно до 200 остатков (например, аминокислот или их миметиков). В дополнительных вариантах осуществления число остатков составляет приблизительно от 100 приблизительно до 195 остатков (например, аминокислот или их миметиков) в длину.

[0052] Аминокислоты или остатки могут быть связанными амидом или неприродными и неамидными химическими связями, включающими, например, связи, образованные глутаральдегидом, сложными эфирами N-гидроксисукцинимидом, бифункциональными малеинимидами или N,N'-дициклогексилкарбодиимидом (DCC). Неамидные связи включают, например, кетометилен, аминометилен, олефин, простой эфир, тиоэфир и т.п. (см., например, Spatola in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids. Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357 (1983), "Peptide and Backbone Modifications", Marcel Decker, NY). Таким образом, когда пептид по изобретению содержит участок последовательности FGF19 и участок последовательности FG21, необходимо, чтобы два участка являлись связанными друг с другом амидной связью, но могут быть связаны любой другой химической функциональной группой или конъюгированы друг с другом через линкерную функциональную группу.

[0053] Изобретение также включает подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстративных пептидных последовательностей (включая варианты и подпоследовательности FGF19 и FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, и слияния и химеры FGF19/FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1) при условии, что указанные выше примеры сохраняют по меньшей мере детектируемую или измеряемую активность или функцию. Например, определенные иллюстративные варианты пептидов содержат С-концевую последовательность FGF19,

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKM
QGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML

PMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFЕК в С-концевом положении, например, после аминокислотных остатков "TSG" варианта.

[0054] Кроме того, определенные иллюстративные варианты пептидов, например, которые содержат всю или участок последовательности FGF21 на N-конце, содержат остаток "R", находящийся на N-конце, который можно исключать. Аналогично, определенные иллюстративные варианты пептидов содержат остаток "M", находящийся на N-конце, который можно добавлять или дополнительно замещать на исключаемый остаток, такой как остаток "R". Более конкретно, в различных вариантах осуществления пептидные последовательности на N-конце содержат любую из: RDSS, DSS, MDSS или MRDSS. Кроме того, в клетках, когда остаток "M" примыкает к остатку "S", остаток "M" может отщепляться таким образом, что остаток "M" удаляется из пептидной последовательности, при этом, когда остаток "M" примыкает к остатку "D", остаток "M" может не отщепляться. Таким образом, в качестве примера, в различных вариантах осуществления пептидные последовательности включают пептидные последовательности со следующими остатками на N-конце: MDSSPL, MSDSSPL (расщепляемый до SDSSPL) и MSSPL (расщепляемый до SSPL).

[0055] Таким образом, "пептидные", "полипептидные" и "белковые"

последовательности по изобретению включают подпоследовательности, варианты и модифицированные формы вариантов и подпоследовательностей FGF19 и FGF21, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1, и слияния и химеры FGF19/FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, при условии, что подпоследовательность, вариант или модифицированная форма (например, слияние или химера) сохраняет по меньшей мере детектируемую активность или функцию.

[0056] Как применяют в настоящем описании, термин "модифицировать" и его грамматические варианты означают, что композиция отличается относительно эталонной композиции, такой как пептидная последовательность. Такие модифицированные пептидные последовательности, нуклеиновые кислоты и другие композиции могут обладать большей или меньшей активностью или функцией или обладают отличающейся функцией или активностью по сравнению с эталонной немодифицированной пептидной последовательностью, нуклеиновой кислотой или другой композицией, или могут обладать желаемым свойством в белке, получаемом для терапии (например, временем полувыведения из сыворотки), для индукции антитела для применения в детектируемом анализе и/или для очистки белка. Например, пептидную последовательность по изобретению можно модифицировать для увеличения времени полувыведения из сыворотки, для повышения стабильности белка *in vitro* и/или *in vivo* и т.д.

[0057] Конкретные примеры таких подпоследовательностей, вариантов и модифицированных форм пептидных последовательностей, иллюстрируемые в настоящем описании (например, пептидной последовательности, приведенной в таблицах 1-8 и на фигуре 1), включают замены, делеции и/или вставки/добавления одной или более аминокислот к или в N-конце, C-конце или внутреннем участке. Один из примеров представляет собой замену аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток в пептидной последовательности. Другой пример представляет собой делецию одного или более аминокислотных остатков в пептидной последовательности, или вставку или добавление одного или более аминокислотных остатков в пептидной последовательности.

[0058] Число замещенных, удаленных или вставленных/добавленных остатков составляет одну или более аминокислот (например, 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 или более) пептидной последовательности. Таким образом, последовательность FGF19 или FGF21 может содержать несколько или много аминокислот, замещенных, удаленных или вставленных/добавленных (например, 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 или более). Кроме того, аминокислотная последовательность FGF19 может содержать или состоят из аминокислотной последовательности из приблизительно 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 или более аминокислот из FGF21; или аминокислота или последовательность FGF21 может содержать или состоят из аминокислотной последовательности из приблизительно 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 или более аминокислоты из FGF19.

[0059] Конкретные примеры замен включают замещение D-остатка на L-остаток. Таким образом, хотя остатки приведены в L-изомерной конфигурации, включены D-

аминокислоты в любом конкретном или всех положениях пептидных последовательностей по изобретению, если только D-изомер не приводит к последовательности, которая обладает недетектируемой или неизмеряемой функцией.

[0060] Дополнительные конкретные примеры представляют собой неконсервативные и консервативные замены. "Консервативная замена" представляет собой замену одной аминокислоты биологически, химически или структурно аналогичным остатком. Биологически аналогичный означает, что замена является совместимой с биологической активностью, например, снижающей уровень глюкозы активностью. Структурно аналогичный означает, что аминокислоты содержат боковые цепи аналогичной длины, такие как аланин, глицин и серин, или аналогичного размера, или сохраняется структура первой, второй или дополнительной пептидной последовательности. Химически аналогичный означает, что остатки имеют одинаковый заряд или оба являются гидрофильными и гидрофобными. Конкретные примеры включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой или замену одного полярного остатка на другой, такую как замена аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту, или глутамин на аспарагин, серина на треонин и т.д. Для определения, обладает ли подпоследовательность, вариант или модифицированная форма активностью, например, снижающей уровень глюкозы активностью, можно использовать общепринятые анализы.

[0061] Конкретные примеры подпоследовательностей, вариантов и модифицированных форм пептидных последовательностей, иллюстрируемых в настоящем описании, (например, пептидной последовательности, приведенной в таблицах 1-8 и на фигуре 1) обладают 50%-60%, 60%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95% или 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью с эталонной пептидной последовательностью (например, пептидной последовательностью в любой из таблиц 1-8 и на фигуре 1). Термин "идентичность" и "гомология" и их грамматические варианты означают, что два или более приводимых соединения являются аналогичными. Таким образом, если две аминокислотные последовательности являются идентичными, то они содержат идентичную аминокислотную последовательность. "Участки, области или домены идентичности" означают, что участок двух или более приводимых соединений является аналогичным. Таким образом, если две аминокислотные последовательности являются идентичными или гомологичными по одной или более областям последовательности, они являются идентичными в этих областях.

[0062] Степень идентичности между двумя последовательностями можно определять с использованием известных в данной области компьютерной программы и математического алгоритма. Такие алгоритмы, которые вычисляют процент идентичности (гомологии) последовательности, как правило, учитывают пропуски и несоответствия последовательности в сравниваемой области. Например, алгоритм поиска BLAST (например, BLAST 2.0) (см., например, Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403 (1990), общедоступный через NCBI) имеет примерные параметры поиска, как указано ниже: несоответствие -2; внесение пропуска 5; продление пропуска 2. Для сравнений пептидных последовательностей, как правило, используют алгоритм BLASTP в сочетании с оценочной матрицей, такой как PAM 100, PAM 250, BLOSUM 62 или BLOSUM 50. Программы сравнения последовательностей FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) и SSEARCH также используют для количественного определения степени идентичности (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988); Pearson, Methods Mol. Biol., 132: 185 (2000); и Smith et al., J. Mol. Biol., 147:195 (1981)). Также разработаны программы для количественного определения структурного сходства белков с использованием

топологического картирования на основе принципа Делоне (Bostick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 304:320 (2003)).

[0063] В пептидных последовательностях по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы пептидных последовательностей, иллюстрируемые в настоящем описании (например, последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), "аминокислота" или "остаток" содержит общепринятые альфа-аминокислоты, а также бета-аминокислоты, альфа, альфа-дизамещенные аминокислоты и N-замещенные аминокислоты, где по меньшей мере одна боковая цепь представляет собой функциональную группу боковой цепи аминокислоты, как определено в настоящем описании. "Аминокислота" дополнительно включает N-алкил-альфа-аминокислоты, где N-концевая аминогруппа содержит C₁-C₆-алкильный заместитель, линейный или с разветвленной цепью. Таким образом, термин "аминокислота" включает стереоизомеры и модификации природных аминокислот белков, небелковых аминокислот, посттрансляционно модифицированные аминокислоты (например, гликозилированием, фосфорилированием, сложноэфирным или амидным расщеплением т.д.), ферментативно модифицированные или синтезированные аминокислоты, дериватизированные аминокислоты, конструкции или структуры, сконструированные для моделирования аминокислот, аминокислоты с модифицированными функциональными группами боковой цепи, получаемые из природных молекул или синтетических, или не природных и т.д. В пептидных последовательностях по изобретению содержится модифицированные и нетипичные аминокислоты (см., например, в Synthetic Peptides: A User's Guide: Hruby et al., Biochem. J., 268:249 (1990); и Toniolo C., Int. J. Peptide Protein Res., 35:287 (1990)).

[0064] Кроме того, содержатся защитные и модифицирующие группы аминокислот. Как применяют в настоящем описании, термин "функциональная группа боковой цепи аминокислоты" включает любую боковую цепь любой аминокислоты, т.к. термин "аминокислота" определен в настоящем описании. Таким образом, он включает функциональную группу боковой цепи в природных аминокислотах. Он дополнительно включает функциональные группы боковой цепи в модифицированных природных аминокислотах, как указано в настоящем описании и известно специалисту в данной области, такие как функциональные группы боковых цепей в стереоизомерах и модификациях природных аминокислот белков, аминокислот не белков, посттрансляционно модифицированных аминокислот, ферментативно модифицированных или синтезированных аминокислот, дериватизированных аминокислоты, конструкций или структур, сконструированных для моделирования аминокислот и т.д. Например, функциональная группа боковой цепи любой аминокислоты, описываемой в настоящем описании или известной специалисту в данной области, входит в определение.

[0065] "Производное функциональной группы боковой цепи аминокислоты" входит в определение функциональной группы боковой цепи аминокислоты. Неограничивающие примеры дериватизированных функциональных групп боковых цепей аминокислот включают, например: а) добавление одного или более насыщенных или ненасыщенных атомов углерода к существующей алкильной, арильной или аралкильной цепи; б) замещение углерода в боковой цепи другим атомом, предпочтительно кислородом или азотом; в) добавление концевой группы к атому углерода боковой цепи, включая метил (-CH₃), метокси (-OCH₃), нитро (-NO₂), гидроксил (-OH) или циано (-C≡N); д) для функциональных групп боковых цепей, содержащих гидроксил, тиол или аминогруппы, добавление подходящей защитной гидроксил, тиольной или аминогруппы или е) для

функциональных групп боковых цепей, содержащих кольцевые структуры, добавление одного или более кольцевых заместителей, включая гидроксил, галогеновые, алкильные или арильные группы, присоединенные непосредственно или через простую эфирную связь. Специалисту в данной области известны подходящие защитные группы для

5 аминокислот. Проводя такую дериватизацию, обеспечивают желаемую активность конечной пептидной последовательности (например, снижающую уровень глюкозы, улучшенный метаболизм глюкозы или липидов, противодиабетическую активность, отсутствие по существу образования НСС или образования опухоли, отсутствие по существу модуляции массы нежировых тканей или жировой массы и т.д.).

10 [0066] "Функциональная группа боковой цепи аминокислоты" включает все такие дериватизации, и конкретные неограничивающие примеры включают: гамма-аминомасляную кислоту, 12-аминододекановую кислоту, альфа-аминоизомасляную кислоту, 6-аминогексановую кислоту, 4-(аминометил)циклогексанкарбоновую кислоту, 8-аминооктановую кислоту, бифенилаланин, Вос-трет-бутоксикарбонил, бензил, бензоил,

15 цитруллин, диаминомасляную кислоту, пирролизин, диаминопропионовую кислоту, 3,3-дифенилаланин, ортонин, цитруллин, 1,3-дигидро-2Н-изоиндолкарбоновую кислоту, этил, Fmoc-флуоренилметоксикарбонил, гептаноил($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-C(=O)-}$), гексаноил($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$), гомоаргинин, гомоцистеин, гомолизин, гомофенилаланин, гомосерин, метил, метионинсульфоксид, метионинсульфон, норвалин (NVA), фенилглицин, пропил,

20 изопропил, саркозин (SAR), трет-бутилаланин и бензилоксикарбонил.

[0067] Отдельную аминокислоту, включая стереоизомеры и модификации природных аминокислот белка, небелковых аминокислот, посттрансляционно модифицированных аминокислот, ферментативно синтезированных аминокислот, неприродных аминокислот,

25 включая дериватизированные аминокислоты, альфа, альфа-дизамещенную аминокислоту, получаемую из любой из указанных выше (т.е. альфа, альфа-дизамещенную аминокислоту, где по меньшей мере одна боковая цепь является аналогичной, как из остатка, из которого ее получают), бета-аминокислоту, получаемую из любой из указанных выше (т.е. бета-аминокислоту, которая за исключением наличия бета-углерода, является иным образом аналогичной как остаток, из которого ее получают)

30 и т.д., включая все указанное выше можно обозначать в настоящем описании как "остаток". Подходящие заместители в дополнение к функциональной группе боковой цепи альфа-аминокислоты включают $\text{C}_1\text{-C}_6$ линейный или разветвленный алкил. Aib представляет собой пример альфа, альфа-дизамещенной аминокислоты. Несмотря на то, что альфа, альфа-дизамещенные аминокислоты можно обозначать с использованием общепринятых обозначений L-изомера и D-изомера, следует понимать, что обозначения служат для удобства, и если заместители в альфа-положении являются различными, такую аминокислоту можно взаимозаменяемо обозначать при необходимости как альфа, альфа-дизамещенная аминокислота, получаемая из L- изомера или D-изомера

35 остатка с обозначаемой функциональной группой боковой цепи аминокислот. Таким образом (S)-2-амино-2-метилгексановую кислоту можно обозначать как альфа, альфа-дизамещенная аминокислота, получаемая из L-Nle (норлейцин) или как альфа, альфа-дизамещенная аминокислота, получаемая из D-Ala. Аналогично, Aib можно обозначать как альфа, альфа-дизамещенная аминокислота, получаемая из Ala. Независимо от того,

40 как получают альфа, альфа-дизамещенную аминокислоту, следует понимать, что она включает все свои (R)- и (S)-конфигурации.

[0068] "N-замещенная аминокислота" включает любую аминокислоту, где функциональная группа боковой цепи аминокислоты ковалентно связана с

аминогруппой основной цепи необязательно, где не содержится заместителей, отличных от Н в положении альфа-углерода. Саркозин представляет собой пример N-замещенной аминокислоты. В качестве примера, саркозин можно обозначать как производное N-замещенной аминокислоты Ala, т.к. функциональная группа боковой цепи аминокислоты саркозина и Ala является одной и той же, т.е. метилом.

[0069] Ковалентные модификации пептидных последовательностей по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы пептидных последовательностей, иллюстрируемых в настоящем описании (например, последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), входят в объем изобретения. Один из типов ковалентной модификации включает взаимодействие являющихся мишенью аминокислотных остатков с органическим дериватирующим средством, которое способно взаимодействовать с отобранными боковыми цепями или с N- или C-концевыми остатками пептида. Дериватизация бифункциональными средствами является пригодной, например, для поперечного сшивания пептида с нерастворимой в воде матрицей или поверхностью подложки для применения в способе очистки антител против пептидов, и наоборот. Широко используемые средства для поперечного сшивания включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, например, сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая сложные эфиры дисукцинимидила, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), бифункциональные малеинимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан, и такие средства, как метил-3-[(пара-азидофенил)дитио]пропиоимидат.

[0070] Другие модификации включают дезамидирование глутаминиловых и аспаргиниловых остатков до соответствующих глутаминовых и аспартиловых остатков, соответственно, гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериловых или треониловых остатков, метилирование альфа-аминогруппы лизина, аргинина и гистидиновых боковых цепей (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина, амидирование любой C-концевой карбоксильной группы и т.д.

[0071] Иллюстративные пептидные последовательности и подпоследовательности, варианты и модифицированные формы пептидных последовательностей, иллюстрируемых в настоящем описании (например, последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), так же могут содержать изменения основной цепи с целью получения стабильности, производных и пептидомиметиков. Термин "пептидомиметик" включает молекулу, которая представляет собой аналог остатка (обозначаемая как "миметик"), включая, но, не ограничиваясь ими, молекулы с пиперазиновым ядром, молекулы с кетопиперазиновым ядром и молекулы с diazepиновым ядром. Если не указано иное, миметик аминокислот пептидной последовательности по изобретению содержит карбоксильную группу и аминогруппу, и группу, соответствующую боковой цепи аминокислоты, или в случае миметика глицина, не содержит боковую цепь, отличную от водорода.

[0072] В качестве примера, они включают соединения, которые имитируют стерические характеристики, распределение поверхностного заряда, полярность и т.д. природной аминокислоты, но необходимо, чтобы они представляли собой аминокислоту, которая обеспечивает стабильность в биологической системе. Например, пролин можно замещать другими лактамами или лактонами подходящего размера и замены; лейцин можно замещать алкилкетонами, N-замещенным амидом, а также

изменения длины боковой цепи аминокислоты с использованием алкила, алкенила или других заместителей, другие могут быть понятны специалисту в данной области. Основным элементом проведения таких замен является получение молекулы точно такого же размера и заряда, и конфигурации как у остатка, используемого для конструирования молекулы. Усовершенствование этих модификаций проводят, анализируя соединений функциональным (например, в отношении снижения уровня глюкозы) или другим анализом, и сравнивая взаимоотношения структуры и активности. Такие способы входят в объем знаний специалиста в данной области, работающего в области медицинской химии и разработки лекарственных средств.

[0073] Другой тип модификации пептидных последовательностей по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательностей и модифицированные формы иллюстративных пептидных последовательностей (включая пептиды, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1), представляет собой гликозилирование. Как применяют в настоящем описании, "гликозилирование" в широком смысле относится к наличию, добавлению или прикреплению одной или более функциональных групп сахаров (например, углевода) к белкам, липидам или другим органическим молекулам. Использование термина "дегликозилирование" в настоящем описании, как правило, подразумевает удаление или делецию одной или более функциональных групп сахаров (например, углевода). Кроме того, фраза включает качественные изменения гликозилирования нативных белков, вызывающие изменение типа и соотношений (количества) содержащихся различных функциональных групп сахаров (например, углевода).

[0074] Гликозилирование можно проводить модификацией аминокислотного остатка или добавлением одного или более участков гликозилирования, которые могут содержаться или не содержаться в нативной последовательности. Например, как правило, негликозилированный остаток можно заменять на остаток, который может являться гликозилированным. Добавление участков гликозилирования можно проводить, изменяя аминокислотную последовательность. Изменение пептидной последовательности можно проводить, например, добавлением или заменой одного или более сериновых или треониновых остатков (для О-связанных участков гликозилирования) или аспарагиновых остатков (для N-связанных участков гликозилирования). Структуры N-связанных и О-связанных остатков олигосахаридов и сахаров, встречающихся в каждом типе, могут различаться. Один из типов сахаров, который широко встречается в обоих, представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту (далее в настоящем описании обозначаемую как сиаловая кислота). Сиаловая кислота, как правило, представляет собой конечный остаток N-связанных и О-связанных олигосахаридов и вследствие своего отрицательного заряда может обеспечивать кислые свойства гликопротеину.

[0075] Пептидные последовательности по изобретению можно необязательно изменять посредством изменений на нуклеотидном (например, ДНК) уровне, в частности, посредством мутаций ДНК, кодирующей пептид по предварительно выбранным основаниям, таким образом, что получают кодоны, которые транслируются в желаемые аминокислоты. Другой способ увеличения числа углеводных групп на пептиде представляет собой химическое или ферментативное связывание гликозидов с полипептидом (см., например, в WO 87/05330). Дегликозилирование можно проводить, удаляя указанный выше участок гликозилирования, удаляя гликозилирование химическими и/или ферментативными способами, или заменой кодонов, кодирующих аминокислотные остатки, которые являются гликозилированными. Известны способы

химического дегликозилирования, и ферментативное отщепление углеводных групп на полипептиде можно проводить с использованием ряда эндо- и экзогликозидаз.

[0076] Для получения белков, которые являются гликозилированными, можно использовать различные клеточные линии. Один из неограничивающих примеров представляет собой клетки китайского хомяка (СНО) с дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR), которые представляют собой широко используемую клетку-хозяина для продукции рекомбинантных гликопротеинов. Эти клетки не экспрессируют фермент бета-галактозид-альфа-2,6-сиалилтрансферазу и, таким образом, не добавляют сиаловую кислоту в связь альфа-2,6 к N-связанным олигосахаридам гликопротеинов, продуцируемых в этих клетках.

[0077] Другой тип модификации представляет собой конъюгирование (например, связывание) одного или более дополнительных компонентов или молекул к N- и/или С-концу пептидной последовательности по изобретению, таких как другой белок (например, белок с аминокислотной последовательностью, гетерологичной целевому белку), или молекулы-носителя. Таким образом, иллюстративную пептидную последовательность можно конъюгировать с другим компонентом или молекулой.

[0078] В определенных вариантах осуществления N- или С-конец пептидной последовательности по изобретению можно объединять с Fc-областью иммуноглобулина (например, Fc человека) с получением слитого конъюгата (или слитой молекулы). Fc-слитые конъюгаты могут увеличивать общее время полужизни биофармацевтических средств, и, таким образом, биофармацевтический препарат может обладать пролонгированной активностью, или для него может быть необходимо менее часто введение. Fc связывается с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) в эндотелиальных клетках, которые выстилают кровеносные сосуды, и после связывания слитая с Fc молекула является защищенной от разрушения и повторного высвобождения в кровеносное русло, что сохраняет молекулу в кровеносном русле более длительное время. Предполагают, что это связывание с Fc является механизмом, посредством которого эндогенный IgG сохраняет свой большой период полувыведения из плазмы. Хорошо известные и одобренные Fc-слитые лекарственные средства состоят из двух копий биофармацевтического средства, связанного с Fc-областью антитела для улучшения фармакокинетики, растворимости и эффективности продукции. В последних технологиях по слиянию с Fc одну копию биофармацевтического средства связывают с Fc-областью антитела для оптимизации фармакокинетических и фармакодинамических свойств биофармацевтического средства по сравнению с традиционными Fc-слитыми конъюгатами.

[0079] Можно использовать модификацию конъюгата для получения пептидной последовательности, которая сохраняет активность с дополнительной или комплементарной функцией или активность второй молекулы. Например, пептидную последовательность можно конъюгировать с молекулой, например, для облегчения растворимости, хранения, продления времени полужизни *in vivo* или срока годности или стабильности, уменьшения иммуногенности, для отсроченного или контролируемого высвобождения *in vivo* и т.д. Другие функции или активности включают конъюгат, который уменьшает токсичность относительно неконъюгированной пептидной последовательности, конъюгат, который воздействует на определенный тип клетки или органа более эффективно по сравнению с неконъюгированной пептидной последовательностью, или лекарственное средство для дополнительного противодействия причинам или эффектам, ассоциированным с нарушением или заболеванием, как указано в настоящем описании (например, диабетом).

[0080] Клиническая эффективность белковых терапевтических средств может быть ограничена коротким периодом полувыведения из плазмы и подверженностью расщеплению. Исследования вариантов терапевтических белков продемонстрировало, что различные модификации, включая конъюгацию или связывание пептидной последовательности с любым из ряда небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем (PEG), полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами (см., например, как правило, через сшивающую функциональную группу, ковалентно связанную с белком и небелковым полимером (например, PEG) может увеличивать время полужизни. Продemonстрировано, что такие конъюгированные с PEG биомолекулы обладают клинически пригодными свойствами, включая лучшую физическую стабильность и термостабильность, защиту от подверженности ферментативному расщеплению, повышенную растворимость, большее время полужизни *in vivo* в кровотоке и сниженный клиренс, сниженную иммуногенность и антигенность и сниженную токсичность.

[0081] PEG подходящие для конъюгации с пептидной последовательностью по изобретению, как правило, являются растворимыми в воде при комнатной температуре и имеют общую формулу $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R представляет собой водород или защитную группу, такую как алкильная или алканольная группа, и где n представляет собой целое число от 1 до 1000. Где R представляет собой защитную группу, она, как правило, содержит от 1 до 8 атомов углерода. Конъюгируемые с пептидной последовательностью PEG могут быть линейными или разветвленными. В объем изобретения входят производные разветвленных PEG, "звездчатые-PEG" и многолучевые PEG. Молекулярная масса PEG, используемого в изобретении, не является ограниченной каким-либо конкретным диапазоном, но определенные варианты осуществления имеют молекулярную массу от 500 до 20000, тогда как другие варианты осуществления имеют молекулярную массу от 4000 до 10000.

[0082] Изобретение включает композиции конъюгатов, где значения "n" PEG являются различными, и, таким образом, ряд различных PEG содержится в конкретном соотношении. Например, некоторые композиции содержат смесь конъюгатов, где $n=1, 2, 3$ и 4. В некоторых композициях процентное содержание конъюгатов, где $n=1$, составляет 18-25%, процентное содержание конъюгатов, где $n=2$, составляет 50-66%, процентное содержание конъюгатов, где $n=3$, составляет 12-16%, и процентное содержание конъюгатов, где $n=4$, составляет до 5%. Такие композиции можно получать посредством условий реакции и известными в данной области способами очистки.

[0083] PEG может непосредственно или опосредованно (например, через промежуточное соединение) связываться с пептидными последовательностями по изобретению. Например, в одном из вариантов осуществления PEG связывается через концевую реакционноспособную группу ("спейсер"). Спейсер, например, представляет собой концевую реакционноспособную группу, которая опосредует связь между свободными аминогруппами или карбоксильными группами одной или более пептидных последовательностей и полиэтиленгликолем. PEG, содержащие спейсер, который можно связывать со свободными аминогруппами включает полиэтиленгликоль с N-гидроксисукцинилимидом, который можно получать активацией сложного эфира янтарной кислоты и полиэтиленгликоля с N-гидроксисукцинилимидом. Другой активируемый полиэтиленгликоль, который можно связывать со свободными аминогруппами, представляет собой 2,4-бис(О-метоксиполиэтиленгликоль)-6-хлор-s-триазин, который можно получать взаимодействием простого монометилового эфира полиэтиленгликоля с цианурхлоридом. Активируемый полиэтиленгликоль, который

связывают со свободной карбоксильной группой, включает полиоксиэтилендиамин.

[0084] Конъюгацию одной или более пептидных последовательностей по изобретению с PEG, содержащим спейсер, можно проводить различными общепринятыми способами. Например, реакцию конъюгации можно проводить в растворе при pH от 5 до 10 при температуре от 4°C до комнатной температуры в течение от 30 минут до 20 часов с использованием молярного отношения реагента к белку от 4:1 до 30:1. Условия реакции можно выбирать, направляя реакцию к получению преимущественно желаемой степени замещения. В основном, низкая температура, низкий pH (например, pH=5) и короткое время реакции уменьшают число прикрепленных PEG, тогда как высокая температура, pH от нейтрального до высокого (например, pH>7) и большее время реакции увеличивают число прикрепленных PEG. Для остановки реакции можно использовать различные известные в данной области способы. В некоторых вариантах осуществления реакцию останавливают подкислением реакционной смеси и замораживанием, например, при -20°C.

[0085] Пептидные последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательностей и модифицированные формы иллюстративных пептидных последовательностей (включая пептиды, представленные в таблицах 1-8 и на фигуре 1), дополнительно содержат конъюгацию с крупными медленно метаболизируемыми макромолекулами, такими как белки, полисахаридами, такими как сефароза, агароза, целлюлоза, целлюлозные гранулы; полимерными аминокислотами, такими как полиглутаминовая кислота, полилизин; сополимерами аминокислот; инактивированными вирусными частицами; инактивированными бактериальными токсинами, такими как дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, холерный анатоксин, молекулы лейкотоксинов; инактивированными бактериями и дендритными клетками. Такие конъюгированные формы при желании можно использовать для получения антител против пептидных последовательностей по изобретению.

[0086] Дополнительные подходящие компоненты и молекулы для конъюгации включают, например, тиреоглобулин, альбумины, такие как сывороточный альбумин человека (HSA), столбнячный токсин, дифтерийный анатоксин, полиаминокислоты, такие как поли(D-лизин:D-глутаминовая кислота), полипептиды VP6 ротавирусов, гемагглютинин вируса гриппа, нуклеопротеин вируса гриппа, гемоцианин морского блюдца (KLH) и коровий белок и поверхностный антиген вируса гепатита В или любую комбинацию из указанных выше.

[0087] Слияние альбумина с пептидной последовательностью по изобретению, например, можно получать генетической манипуляцией, таким образом, что ДНК, кодирующая HSA (сывороточный альбумин человека) или его фрагмент, соединяют с ДНК, кодирующей пептидную последовательность. Затем подходящего хозяина можно трансформировать или трансфицировать слитой нуклеотидной последовательностью в форме, например, подходящей плазмиды, таким образом, чтобы экспрессировать слитый полипептид. Экспрессию можно проводить *in vitro*, например, в прокариотических или эукариотических клетках, или *in vivo*, например, у трансгенного организма. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессию слитого белка проводят в клеточных линиях млекопитающих, например, клеточных линиях CHO.

[0088] Дополнительные способы генетического слияния целевых белков или пептидов с альбумином включают технологию, известную как Albufuse® (Novozymes Biopharma A/S, Denmark), и конъюгированные терапевтические пептидные последовательности

часто становятся более эффективными с лучшим всасыванием в организме. Технологию использовали коммерчески для получения Albuferon® (Human Genome Sciences), комбинации альбумина и интерферона α -2B, используемого для лечения инфекции гепатита С.

5 [0089] Другой вариант осуществления относится к применению одного или более доменных антител (dAb) человека. dAb представляю собой наименьшие функциональные связывающие единицы антител человека (IgG) и обладают подходящими характеристиками стабильности и растворимости. Технология включает dAb, конъюгированные с HSA (таким образом, образующие "AlbudAb", см., например, 10 EP1517921B, WO2005/118642 и WO2006/051288) и представляющей интерес молекулы (например, пептидной последовательности по изобретению). AlbudAb, как правило, является меньше, и его легче получать в микробных экспрессирующих системах, таких как бактерии или дрожжи, по сравнению с современными технологиями, используемыми для увеличения времени полувыведения пептидов из сыворотки. Вследствие того, что 15 время полужизни HSA составляет приблизительно три недели, получаемая конъюгированная молекула улучшает время полужизни. Использование технологии dAb также повышает эффективность представляющей интерес молекулы.

[0090] Дополнительные подходящие компоненты и молекулы для конъюгирования включают такие, которые подходят для выделения или очистки. Конкретные 20 неограничивающие примеры включают связывающие молекулы, такие как биотин (пара специфического связывания биотин-авидин), антитело, рецептор, лиганд, лектин или молекулы, которые содержат твердую подложку, включая, например, пластиковые или полистироловые гранулы, планшеты или гранулы, магнитные гранулы, тестовые полоски и мембраны.

25 [0091] Можно использовать способы очистки, такие как катионообменная хроматография, для разделения конъюгатов по разнице зарядов, которой эффективно разделяют конъюгаты по их различным молекулярным массам. Например, можно 30 нагружать катионообменную колонку, а затем промывать ~20 mM ацетата натрия pH~4, а затем элюировать с линейным градиентом (от 0M до 0,5M) NaCl, забуференным при pH от 3 до 5,5, предпочтительно при pH 4,5. Содержания фракций, получаемых катионообменной хроматографией, можно определять по молекулярной массе общепринятыми способами, например, масс-спектроскопией, SDS-PAGE или другими известными способами разделения молекулярных структур по молекулярной массе. Затем таким образом определяют фракцию, которая содержит конъюгат с желаемым 35 числом прикрепленных PEG, очищенный не содержащий немодифицированные белковые последовательности и не содержащий конъюгаты с другими числами прикрепленных PEG.

[0092] В других вариантах осуществления пептидную последовательность по изобретению связывают с химическим средством (например, иммунотоксином или 40 химиотерапевтическим средством), включая, но, не ограничиваясь ими, цитотоксическое средство, включая таксол, цитохалазин В, грамицидин D, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин и их аналоги или гомологи. Другие химические средства включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 45 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлоретамин, кармустин и ломустин, циклофосфамид, бусульфид, дибромманнит, стрептозотозин, митомицин С, и цисплатин), антибиотики (например, блеомицин) и антимиотические средства (например, винкристин и винбластин). Цитотоксины можно конъюгировать с пептидом

по изобретению с использованием линкерной технологии, известной в данной области и описываемой в настоящем описании.

[0093] Дополнительные подходящие компоненты и молекулы для конъюгации включают такие, которые являются подходящими для детекции в анализе. Конкретные неограничивающие примеры включают детектируемые метки, такие как радиоактивный изотоп (например, ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P), фермент, который образует детектируемый продукт (например, люциферазу, Р-галактозидазу, пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу), флуоресцентный белок, хромогенный белок, краситель (например,

флуоресцеинизотиоцианат), испускающие флуоресценцию металлы (например, ^{152}Eu), хемилюминесцентные соединения (например, люминол и соли акридиния), биолуминесцентные соединения (например, люциферин) и флуоресцентные белки.

Непрямые метки включают меченые или детектируемые антитела, которые связываются с пептидной последовательностью, где антитело можно детектировать.

[0094] В определенных вариантах осуществления пептидную последовательность по изобретению конъюгируют с радиоактивным изотопом для получения цитотоксического радиофармацевтического средства (радиоиммуноконъюгатов), пригодного в качестве диагностического или терапевтического средства. Примеры

таких радиоактивных изотопов включают, но не ограничиваются ими, йод ^{131}I индий ^{111}In , иттрий ^{90}Y и лютеций ^{177}Lu . Способы получения радиоиммуноконъюгатов известны специалисту в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов, которые являются коммерчески доступными, включают ибритумомаб, тиуксетан и тозитумомаб.

[0095] Другие входящие в изобретение средства и способы увеличения времени полужизни в кровяном русле, повышающие стабильность, уменьшающие клиренс или изменяющие иммуногенность или аллергенность пептидной последовательности по изобретению, включают модификацию пептидной последовательности присоединением ГЭК, в которой используют производные гидроксиэтилированного крахмала, связанные с другими молекулами, с целью модификации характеристик молекулы. Различные аспекты присоединения ГЭК описаны, например, в патентных заявках США № 2007/0134197 и 2006/0258607.

[0096] Любой из указанных выше компонентов и молекул, используемых для модификации пептидных последовательностей по изобретению, можно необязательно конъюгировать через линкер. Подходящие линкеры включают "гибкие линкеры", которые, как правило, являются достаточной длины для обеспечения некоторого движения между модифицированными пептидными последовательностями и связанными компонентами и молекулами. Длина линкерных молекул, как правило, составляет приблизительно 6-50 атомов. Линкерные молекулы также могут представлять собой, например, арилацетиленовые, этиленгликолевые олигомеры, содержащие 2-10 мономерных единиц, диамины, двухосновные кислоты, аминокислоты или их сочетания. Подходящие линкеры можно легко отбирать, и они могут быть любой подходящей длины, такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 аминокислот (например, Gly).

[0097] Иллюстративные гибкие линкеры включают полимеры глицина (G)_n, полимеры глицина-серина (например, (GS)_n, GSGGS_n и GGGS_n, где n представляет собой целое число по меньшей мере один), полимеры глицина-аланина, полимеры аланина-серина и другие гибкие линкеры. Полимеры глицина и глицина-серина являются относительно неструктурированными и, таким образом, могут служить в качестве нейтрального

связующего элемента между компонентами. Иллюстративные гибкие линкеры включают, но не ограничиваются ими, GGSg, GGSgG, GSgSG, GSgGG, GGSgG и GSsSG.

[0098] Пептидные последовательности по изобретению, включая варианты и подпоследовательности FGF19 и FGF21 и слияния и химеры FGF19/FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, а также подпоследовательности, варианты последовательностей и модифицированные формы последовательностей, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1 обладают одной или более активностей, как указано в настоящем описании. Один из примеров активности представляет собой снижающую уровень глюкозы активность. Другой пример активности представляет собой уменьшение стимуляции или образования печеночноклеточной карциномы (HCC), например, по сравнению с FGF19. Дополнительный пример активности представляет собой снижающую или сниженный уровень липидов (например, триглицеридов, холестерина, не-HDL) или повышающую уровень HDL активность, например, по сравнению с FGF21. Дополнительный пример активности представляет собой снижающую или сниженную массу нежировых тканей активность, например, по сравнению с FGF21. Еще один другой пример активности представляет собой связывание с рецептором-4 фактора роста фибробластов (FGFR4) или активирование FGFR4, например, пептидные последовательности, которые связываются с FGFR4 с аффинностью сравнимой или большей, чем аффинность связывания FGF19 с FGFR4, и пептидные последовательности, которые активируют FGFR4 со степенью или количеством сравнимом или большим, чем FGF19 активирует FGFR4. Еще одни дополнительные примеры активностей включают подавление или сниженную экспрессию гена альдокеторедуктазы, например, по сравнению с FGF19, активацию или повышенную экспрессию гена Slc1a2 по сравнению с FGF21.

[0099] Более конкретно, пептидные последовательности по изобретению, включая варианты и подпоследовательности FGF19 и FGF21 и слияния и химеры FGF19/FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, а также подпоследовательности, варианты и модифицированные формы последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1, включают такие, которые обладают следующими ниже активностями: пептидные последовательности, обладающие сниженной активностью образования печеночноклеточной карциномы (HCC) по сравнению с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPl, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19; пептидные последовательности, обладающие большей снижающей уровень глюкозы активностью по сравнению с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащим любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPl, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19; пептидные последовательности, обладающие меньшей повышающей уровень липидов активностью (например, меньшей в отношении триглицеридов, холестерина, не-HDL) или большей повышающей уровень HDL активностью по сравнению с FGF19 или вариантом последовательности FGF19, содержащей любую из GQV, GDI, WGPI, WGDPI, WGDI, GDPI, GPI, WGQPI, WGAPl, AGDPI, WADPI, WGDAI, WGDPA, WDPI, WGDI, WGDPI или FGDPI, замещенную на последовательность WGDPI при аминокислотах 16-20 FGF19, и пептидные последовательности, обладающие меньшей снижающей массу нежировых тканей активностью по сравнению с FGF21.

[0100] Более конкретно, пептидные последовательности по изобретению, включая варианты и подпоследовательности FGF19 и FGF21 и слияния и химеры FGF19/FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, а также подпоследовательности, варианты и модифицированные формы последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1, включают такие, которые обладают следующими ниже активностями: пептидные последовательности, которые связываются с рецептором-4 фактора роста фибробластов (FGFR4) или активируют FGFR4, такие как пептидные последовательности, которые связываются с FGFR4 с аффинностью сравнимой или большей, чем аффинность связывания FGF19 с FGFR4; пептидные последовательности, которые активируют FGFR4 со степенью или количеством сравнимым или большим, чем FGF19 активирует FGFR4; пептидные последовательности, которые подавляют или снижают экспрессию гена альдокеторедуктазы, например, по сравнению с FGF19, и пептидные последовательности, которые активируют или повышают экспрессию гена семейства транспортера растворенных веществ 1, члена 2 (Slc1a2) по сравнению с FGF21.

[0101] Активности, такие как, например, активность в отношении образования печеночноклеточной карциномы (НСС) или образования опухоли, снижающая уровень глюкозы активность, снижающая уровень липидов активность или снижающая массу нежировых тканей активность, можно определять на животном, таком как мышь db/db. Измерение связывания FGFR4 или активации FGFR4 можно проводить анализами, описываемыми в настоящем описании (см., например, пример 1) или известными специалисту в данной области.

[0102] Термин "связывается" или "связывание", когда используют по отношению к пептидной последовательности, означает, что пептидная последовательность взаимодействует на молекулярном уровне. Таким образом, пептидная последовательность, которая связывается с FGFR4, связывается со всей или частью последовательности FGFR4. Специфическое и селективное связывание можно устанавливать на основании неспецифического связывания с использованием известных в данной области анализов (например, конкурентного связывания, иммунопреципитации, ELISA, проточной цитометрии, Вестерн-блоттинга).

[0103] Пептиды и пептидомиметики можно получать и выделять известными в данной области способами. Пептиды можно синтезировать полностью или частично химическими способами (см., например, Caruthers (1980). *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 215; Horn (1980); и Banga A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins. Formulation. Processing and Delivery Systems*, (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA). Пептидный синтез можно проводить различными способами с твердой фазой (см., например, Roberge, *Science*, 269:202 (1995); Merrifield, *Methods Enzymol.*, 289:3 (1997)) и можно проводить автоматизированный синтез, например, с использованием синтезатора пептидов ABI431A (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя. Пептиды и пептидные миметики также можно синтезировать комбинаторными способами. Синтетические остатки и полипептиды, входящие в состав миметиков, можно синтезировать рядом известных в данной области способов и методов (см., например, *Organic Syntheses Collective Volumes*, Gilman et al., (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY). Модифицированные пептиды можно получать способом химической модификации (см., например, Belousov, *Nucleic Acids Res.*, 25:3440 (1997); Frenkel, *Free Radic. Biol. Med.*, 19:373 (1995), и Blommers, *Biochemistry*, 33:7886 (1994)). Изменения пептидной последовательности, получение производных, замещения и модификации также можно проводить способами, такими как олигонуклеотид-опосредованный (сайт-специфический) мутагенез, сканирование аланином и мутагенез на основе ПЦР. В отношении клонируемой ДНК можно

проводить сайт-специфический мутагенез (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), кассетный мутагенез (Wells et al., Gene, 34: 315 (1985)), рестрикционно-селективный мутагенез (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc., London Ser. A, 317:415 (1986)) и другие способы с получением пептидных последовательностей по изобретению, вариантов, слияний и химер, и их изменений, производных, замещений и модификаций.

[0104] "Синтезируемая" или "получаемая" пептидная последовательность представляет собой пептид, получаемый любым способом, включающим ручные манипуляции человека. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, указанные выше способы, такие как химический синтез, технология рекомбинантных ДНК, биохимическая или ферментативная фрагментация более крупных молекул, и комбинации указанных выше.

[0105] Пептидные последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательностей и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (например, последовательности, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1), также можно модифицировать с получением химерной молекулы. Изобретение относится к пептидным последовательностям, которые содержат гетерологичный домен. Такие домены можно добавлять к N-концу или к C-концу пептидной последовательности. Гетерологичные домены также можно располагать в пептидной последовательности и/или альтернативно фланкировать получаемыми из FGF19 и/или FGF21 аминокислотными последовательностями.

[0106] Термин "пептид" также включает димеры или мультимеры (олигомеры) пептидов. Изобретение также относится к димерам или мультимерам (олигомерам) иллюстративных пептидных последовательностей, а также подпоследовательностей, вариантов и модифицированных форм иллюстративных пептидных последовательностей (например, последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1).

[0107] Изобретение дополнительно относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующей пептидные последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательностей и модифицированные формы последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1, и векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, которая кодирует пептид. Таким образом, "нуклеиновые кислоты" включают такие, которые кодируют иллюстрируемые пептидные последовательности, описываемые в настоящем описании, а также такие, которые кодируют функциональные подпоследовательности, варианты последовательностей и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей, при условии, что указанные выше сохраняют по меньшей мере детектируемую или измеряемую активность или функцию. Например, подпоследовательность, вариант или модифицированная форма иллюстрируемой пептидной последовательности, описываемой в настоящем описании (например, последовательности, приведенной в таблицах 1-8 и на фигуре 1), которая сохраняет определенную способность снижать или уменьшать уровень глюкозы, обеспечивает нормальный гомеостаз глюкозы или уменьшает гистопатологические состояния, ассоциированные с хронической или острой гипергликемией *in vivo* и т.д.

[0108] Нуклеиновая кислота, которую также можно обозначать в настоящем описании как ген, полинуклеотидная, нуклеотидная последовательность, праймер, олигонуклеотид или зонд, относится к природным или модифицированным содержащим пурин и пиримидин полимерам любой длины, полирибонуклеотидам или полидезоксирибонуклеотидам или смешанным полирибо-полидезоксирибонуклеотидам

и их α -аномерным формам. Два или более содержащих пурин и пиримидин полимера, как правило, являются связанными фосфоэфирной связью или ее аналогом. Термины можно использовать взаимозаменяемо для обозначения всех форм нуклеиновой кислоты, включая дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК).

5 Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными, двойными или тройными, линейными или кольцевыми. Нуклеиновые кислоты включают геномную ДНК и кДНК. Нуклеиновая кислота РНК может представлять собой сплайсированную или несплайсированную мРНК, рРНК, тРНК или являться антисмысловой. Нуклеиновые кислоты включают природные, синтетические, а также нуклеотидные аналоги и
10 производные.

[0109] Вследствие вырожденности генетического кода, молекулы нуклеиновой кислоты содержат вырожденные последовательности в отношении молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей пептидные последовательности по изобретению. Таким образом, предоставлены вырожденные последовательности нуклеиновой кислоты,
15 кодирующей пептидные последовательности, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы пептидных последовательностей, иллюстрируемых в настоящем описании (например, последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1). Термин "комплементарная", когда используют по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, означает, что обозначаемые области
20 являются на 100% комплементарными, т.е. демонстрируют 100% спаривание оснований без несоответствий.

[0110] Нуклеиновую кислоту можно получать любым из ряда известных стандартных способов клонирования и химического синтеза, и можно изменять целенаправленно сайт-специфическим мутагенезом или другими рекомбинантными способами, известными
25 специалисту в данной области. Чистоту полинуклеотидов можно определять посредством секвенирования, электрофореза в геле, УФ-спектрометрией.

[0111] Нуклеиновые кислоты можно встраивать в конструкцию нуклеиновой кислоты, в которой на экспрессию нуклеиновой кислоты влияет или регулирует "элемент контроля экспрессии", обозначаемый в настоящем описании "экспрессирующая кассета". Термин
30 "элемент контроля экспрессии" относится к одному или более элементам последовательности нуклеиновой кислоты, которые регулируют или влияют на экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой он функционально связан. Элемент контроля экспрессии может содержать перед геном, кодирующим белок, при необходимости промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции,
35 сайленсеры гена, иницирующий кодон (например, ATG) и т.д.

[0112] Элемент контроля экспрессии, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, регулирует транскрипцию и при необходимости трансляцию последовательности нуклеиновой кислоты. Термин
"функционально связанный" относится к смежному положению, где указанные
40 компоненты находятся во взаимоотношении, позволяющем им функционировать свойственным им образом. Как правило, элементы контроля экспрессии располагают рядом на 5'- или 3'-концах генов, а также они могут быть интронными.

[0113] Элементы контроля экспрессии включают элементы, которые конститутивно активируют транскрипцию, которая является индуцируемой (т.е. необходим внешний сигнал или стимулы для активации) или дезингибируемой (т.е. необходим сигнал, чтобы прервать транскрипцию; когда сигнал больше не поступает, транскрипция активируется или "дезингибируется"). Также в экспрессирующих кассетах по изобретению содержатся
45 элементы контроля, достаточные для обеспечения регулируемой экспрессии гена для

конкретных типов клеток или тканей (т.е. тканеспецифические регуляторные элементы). Как правило, такие элементы располагают перед или после (т.е. 5'- и 3'-конце) кодирующей последовательности. Как правило, промоторы располагают на 5'-конце кодирующей последовательности. Для обеспечения транскрипции полинуклеотидов по изобретению можно использовать промоторы, получаемые технологией рекомбинантной ДНК или синтетическими способами. "Промотор", как правило, означает минимальный элемент последовательности, достаточный для управления транскрипцией.

[0114] Нуклеиновые кислоты можно встраивать в плазмиду для трансформации клетки-хозяина и последующей экспрессии и/или генетической манипуляции. Плазмида представляет собой нуклеиновую кислоту, которую можно стабильно размножать в клетке-хозяине; плазмиды могут необязательно содержать элементы контроля экспрессии для управления экспрессией нуклеиновой кислоты. Для целей настоящего изобретения вектор является синонимом плазмиды. Плазмиды и векторы, как правило, содержат по меньшей мере участок начала репликации для размножения в клетке и промотор. Плазмиды и векторы также могут содержать элемент контроля экспрессии для экспрессии в клетке-хозяине и, таким образом, являются пригодными для экспрессии и/или генетической манипуляции нуклеиновых кислот, кодирующих пептидные последовательности, экспрессирующих пептидные последовательности в клетках-хозяевах и организмах (например, нуждающегося в лечении индивидуума) или, например, продуцирующих пептидные последовательности.

[0115] Как применяют в настоящем описании, термин "трансген" означает полинуклеотид, который ввели в клетку или организм искусственным путем. Например, клетка, содержащая трансген, где трансген ввели посредством генетической манипуляции или "трансформацией" клетки. Клетка или ее потомство, в которое ввели трансген, обозначают как "трансформированная клетка" или "трансформант". Как правило, трансген содержится в потомстве трансформанта или становится частью организма, который развивается из клетки. Трансгены можно вводить в хромосомную ДНК или поддерживать в виде самореплицирующейся плазмиды, YAC, мини-хромосомы или т.п.

[0116] Промоторы бактериальной системы включают промотор T7 и индуцибельные промоторы, такие как pL бактериофага λ , plac, ptrp, ptac (гибридный промотор ptrp-lac) и реагирующие на тетрациклин промоторы. Промоторы системы на основе клеток насекомых включают конститутивные или индуцибельные промоторы (например, экдизон). Конститутивные промоторы клетки млекопитающего включают SV40, RSV, промотор вируса папилломы крупного рогатого скота (BPV) и другие вирусные промоторы или индуцибельные промоторы, получаемые из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина ПА, промотор теплового шока) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса, индуцируемый промотор длинного концевой повтора вируса опухоли молочной железы мышей). Альтернативно, можно генетически модифицировать ретровирусный геном для введения и управления экспрессией пептидной последовательности в подходящих клетках-хозяевах.

[0117] Вследствие того, что способы и применения по изобретению включают доставку *in vivo*, экспрессирующие системы дополнительно содержат векторы, сконструированные для применения *in vivo*. Конкретные неограничивающие примеры включают аденовирусные векторы (патенты США №№ 5700470 и 5731172), аденоассоциированные векторы (патент США № 5604090), векторы вируса простого герпеса (патент США № 5501979), ретровирусные векторы (патенты США №№ 5624820,

5693508 и 5674703), векторы BPV (патент США № 5719054), векторы CMV (патент США № 5561063) и парвовируса, ротавируса, вируса Норфолк и лентивирусные векторы (см., например, патент США № 6013516). Векторы включают такие, которые доставляют гены в клетки кишечника, включая стволовые клетки (Croyle et al., *Gene Ther.*, 5:645 (1998); S.J. Henning, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 17:341 (1997), патенты США №№ 5821235 и 6110456). Многие из этих векторов были одобрены для исследований на человеке.

[0118] Дрожжевые векторы включают конститутивные и индуцибельные промоторы (см., например, Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Ch. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988; Grant et al., *Methods in Enzymology*, 153: 516 (1987), eds. Wu & Grossman; *Bitter Methods in Enzymology*, 152:673 (1987), eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., и Strathern et al., *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, (1982) eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II). Можно использовать конститутивные дрожжевые промоторы, такие как ADH или LEU2, или индуцибельный промотор, такой как GAL, (R. Rothstein In: *DNA Cloning, A Practical Approach*, Vol. 11, Ch. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986). В данной области известны векторы, которые облегчают встраивание чужеродной последовательности нуклеиновой кислоты в дрожжевую хромосому, например, посредством гомологичной рекомбинации. Когда встраиваемые полинуклеотиды являются крупнее, чем общепринятые векторы (например, более приблизительно 12 т.п.н.), как правило, используют искусственные дрожжевые хромосомы (YAC).

[0119] Экспрессирующие векторы также могут содержать селективируемый маркер, обеспечивающий устойчивость к селективному давлению, или определяемый маркер (например, бета-галактозидазу), таким образом, обеспечивающий возможность отбирать клетки, содержащие вектор для выращивания и размножения. Альтернативно, селективируемый маркер может находиться на втором векторе, который совместно трансфицируют в клетку-хозяина с первым вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую пептидную последовательность. Системы селекции включают, но не ограничиваются ими, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., *Cell* 11: 223 (1977)), ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2026 (1962)) и гены аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., *Cell* 22:817 (1980)), который можно применять в клетках tk, hgp^rt или ap^rt, соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам можно использовать в качестве основы селекции на dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527 (1981)); ген gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072 (1981)); ген неомидина, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1981)); пуромицин и ген гигромицина, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., *Gene*, 30:147 (1984)). Дополнительные селективируемые гены включают trpB, который обеспечивает клеткам возможность использовать индол вместо триптофана; hisD, который обеспечивает клеткам возможность использовать гистинол в место гистидина (Hartman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8047 (1988)) и ODC (орнитиндекарбоксилаза), который придает устойчивость к ингибитору орнитиндекарбоксилазы 2-(дифторметил)-DL-орнитину, DFMO (McConlogue (1987) In: *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory).

[0120] Изобретению относится к трансформированной клетке(ам) (in vitro, ex vivo и in vivo) и клеткам-хозяевам, которые продуцируют вариант или слияние FGF19 и/или FGF21, как указано в настоящем описании, где экспрессия варианта или слияния FGF19 и/или FGF21 обеспечена нуклеиновой кислотой, кодирующей вариант или слияние

FGF19 и/или FGF21. Трансформированные клетки и клетки-хозяева, которые экспрессируют пептидные последовательности по изобретению, как правило, содержат нуклеиновую кислоту, которая кодирует пептидную последовательность по изобретению. В одном из вариантов осуществления трансформированная клетка или клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В другом варианте осуществления трансформированная клетка или клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В различных аспектах эукариотическая клетка представляет собой дрожжевую клетку или клетку млекопитающего (например, человека, примата и т.д.).

[0121] Как применяют в настоящем описании, "трансформированная" клетка или клетка-"хозяин" представляет собой клетку, в которую вводят нуклеиновую кислоту, которую можно размножить и/или транскрибировать для экспрессии кодируемой пептидной последовательности. Термин также включает любое потомство или субклоны клеток-хозяев.

[0122] Трансформированные клетки и клетки-хозяева включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии и дрожжи, и клетки растений, насекомых и млекопитающих. Например, бактерии, трансформированные экспрессирующими векторами на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного бактериофага, плазмидной нуклеиновой кислоты или космидной нуклеиновой кислоты; дрожжи, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами; системы на основе клеток растений, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вируса мозаики цветной капусты CaMV, вируса табачной мозаики TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, плазмиды Ti); системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловируса), и системы на основе клеток животных, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, ретровируса, аденовируса, вируса осповакцины), или трансформированные системы на основе клеток животных, сконструированные для временного или стабильного размножения или экспрессии.

[0123] Для применений и способов генотерапии трансформированная клетка может находиться у индивидуума. Клетку у индивидуума можно трансформировать *in vivo* нуклеиновой кислотой, которая кодирует пептидную последовательность по изобретению, как указано в настоящем описании. Альтернативно, клетку можно трансформировать *in vitro* трансгеном или полинуклеотидом, а затем трансплантировать в ткань индивидууму для эффективного лечения. Альтернативно, первичный изолят клеток или устойчивую клеточную линию можно трансформировать трансгеном или полинуклеотидом, который кодирует вариант FGF19 и/или FGF21 или его слитую/химерную последовательность (или вариант), такую как химерная пептидная последовательность, содержащая весь или участок FGF19 или содержащая весь или участок FGF21, а затем необязательно трансплантировать в ткань индивидууму.

[0124] Неограничивающие клетки-мишени для экспрессии пептидных последовательностей, в частности для экспрессии *in vivo*, включают клетки поджелудочной железы (островковые клетки), мышечные клетки, клетки слизистой оболочки и эндокринные клетки. Такие эндокринные клетки могут обеспечивать индуцируемую продукцию (секрецию) варианта FGF19 и/или FGF21 или его слитой/химерной последовательности (или варианта), такой как химерная пептидная последовательность, содержащая весь или участок FGF19 или содержащая весь или

участок FGF21. Дополнительные клетки для трансформации включают стволовые клетки или другие мультипотентные или плюрипотентные клетки, например, клетки-предшественники, которые дифференцируются в различные клетки поджелудочной железы (островковые клетки), мышечные клетки, клетки слизистой оболочки и
 5 эндокринные клетки. Трансгенные стволовые клетки обеспечивают длительную экспрессию пептидных последовательностей по изобретению.

[0125] Как применяют в настоящем описании, термин "культивируемый", когда применяют по отношению к клетке, означает, что клетку выращивают *in vitro*. Конкретный пример такой клетки представляет собой клетку, выделяемую у
 10 индивидуума и выращиваемую или адаптируемую для роста в тканевой культуре. Другой пример представляет собой клетку, над которой проводят генетическую манипуляцию *in vitro* и трансплантируют обратно тому же или другому индивидууму.

[0126] Термин "выделяемый", когда используют по отношению к клетке, означает клетку, которую выделяют из ее природного окружения *in vivo*. С "культивируемыми" и "выделяемыми" клетками можно проводить манипуляции вручную, такие как
 15 генетическая трансформация. Эти термины включают любое потомство клеток, включая потомство клетки, которая может являться неидентичной родительской клетке вследствие мутаций, которые возникают во время клеточного деления. Термины не включают всего человека.

[0127] Нуклеиновые кислоты, кодирующие пептидные последовательности по изобретению, можно вводить для стабильной экспрессии в клетках всего организма. Такие организмы, включая не являющихся человеком трансгенных животных, пригодны для исследования эффекта экспрессии пептида у всего животного и терапевтического
 20 эффекта. Например, как описано в настоящем описании, продукция варианта FGF19 и/или FGF21 или его слитой/химерной последовательности (или варианта), такой как химерная пептидная последовательность, содержащая весь или участок FGF19 или
 25 содержащая весь или участок FGF21, как указано в настоящем описании, снижает уровень глюкозы у мышей и является противодиабетической.

[0128] Линии мышей, у которых развивается, или которые являются
 30 предрасположенными к развитию конкретного заболевания (например, диабета, дегенеративного нарушения, злокачественной опухоли и т.д.) также являются пригодными для введения терапевтических белков, как описано в настоящем описании, для исследования эффекта экспрессии терапевтических белков у предрасположенной к заболеванию мыши. Трансгенные и генетические модели на животных, которые
 35 являются предрасположенными к конкретному заболеванию или физиологическим условиям, таких как мыши с индуцируемым стрептозотоцином (STZ) диабетом, представляют собой подходящие мишени для экспрессии вариантов FGF19 и/или FGF21, их слитых/химерных последовательностей (или варианта), таких как химерная пептидная последовательность, содержащая весь или участок FGF19 или содержащая весь или
 40 участок FGF21, как указано в настоящем описании. Таким образом, изобретение относится к не являющимся человеком трансгенным животным, которые продуцируют вариант FGF19 и/или FGF21 или его слитую/химерную последовательность (или вариант), такую как химерная пептидная последовательность, содержащая весь или участок FGF19 или содержащая весь или участок FGF21, продукция которой не встречается в
 45 природе у животного, которая обеспечена наличием трансгена в соматических или половых клетках животного.

[0129] Термин "трансгенное животное" относится к животному, у которого соматические клетки или клетки зародышевой линии несут генетическую информацию,

полученную непосредственно или опосредованно преднамеренной генетической манипуляцией на внутриклеточном уровне, такой как микроинъекция или инфицирование рекомбинантным вирусом. Термин "трансгенный" дополнительно включает клетки или ткани (т.е. "трансгенную клетку", "трансгенную ткань"), получаемые у трансгенного животного, подвергнутого генетической манипуляции, как описано в настоящем описании. В настоящем контексте "трансгенное животное" не включает животных, получаемых классическим скрещиванием или оплодотворением *in vitro*, а означает животных, у которых одна или более клеток получает молекулу нуклеиновой кислоты. Трансгенные животные по изобретению могут являться гетерозиготными или гомозиготными по отношению к трансгену. В данной области хорошо известны способы получения трансгенных животных, включая мышей, овец, свиней и лягушек (см., например, патенты США №№ 5721367, 5695977, 5650298 и 5614396) и, таким образом, являются дополнительно включенными.

[0130] Пептидные последовательности, нуклеиновые кислоты, кодирующие пептидные последовательности, векторы и трансформированные клетки-хозяева, экспрессирующие пептидные последовательности, включают выделенные и очищенные формы. Термин "выделенный", когда используют в качестве определения композиции по изобретению, означает, что композицию выделяют по существу полностью или по меньшей мере частично из одного или более компонентов в окружающую среду. Как правило, при выделении композиции, которые существуют в природе, по существу не содержат одного или более веществ, с которыми они обычно ассоциированы в природе, например, одним или более белками, нуклеиновой кислотой, липидом, углеводом или клеточной мембраной. Термин "выделенный" не исключает альтернативные физические формы композиции, такие как варианты, модификации или дериватизированные формы, слияния и химеры, мультимеры/олигомеры и т.д., или формы, экспрессируемые в клетках-хозяевах. Термин "выделенный" также не исключает форм (например, фармацевтических композиций, комбинированных композиций и т.д.), в которых содержатся комбинации любой из форм, которую получают посредством рук человека.

[0131] "Выделенная" композиция также может являться "очищенной", когда не содержит некоторое значительное число или большую часть, или все из одного или более других веществ, таких как загрязнитель или нежелательное вещество или материал. Как правило, не известно или предполагают, что пептидные последовательности по изобретению не существуют в природе. Однако для композиции, которая не существует в природе, выделенная композиция, как правило, не содержит некоторое значительное число или большую часть, или все другие вещества, с которыми, как правило, является ассоциированной в природе. Таким образом, выделенная пептидная последовательность, которая встречается в природе, не содержит полипептиды или полинуклеотиды, представленные в числе миллионов других последовательностей, таких как, например, белки из библиотеки белков или нуклеиновые кислоты в геномной библиотеке или библиотеке кДНК. "Очищенная" композиция включает комбинации с одной или более других неактивных или активных молекул. Например, пептидная последовательность по изобретению, комбинированная с другим лекарственным средством или средством, таким как, например, снижающее уровень глюкозы лекарственное или терапевтическое средство.

[0132] Как применяют в настоящем описании, термин "рекомбинантный", когда используют в качестве определения пептидных последовательностей, нуклеиновых кислот, кодирующих пептидные последовательности и т.д., означает, что композиции подвергали манипуляциям (т.е. конструировали), таким способом, который, как правило,

не встречается в природе (например, *in vitro*). Конкретный пример рекомбинантного пептида представляет собой такой, где пептидная последовательность по изобретению экспрессируется клеткой, трансфицированной нуклеиновой кислотой, кодирующей пептидную последовательность. Конкретный пример рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой такой, где нуклеиновая кислота (например, геномная или кДНК), кодирующая пептидную последовательность, клонируемая в плазмиду с или без 5'-, 3'-конца или интронной области, к которым обычно примыкает ген в геноме организма. Другой пример рекомбинантного пептида или нуклеиновой кислоты представляет собой гибридную или слитую последовательность, такую как химерная пептидная последовательность, содержащая участок FGF19 и участок FGF21.

[0133] Изобретение относится к композициям и смесям пептидных последовательностей по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (включая варианты и подпоследовательности FGF19 и FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, и слияния и химеры FGF19/FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1). В одном из вариантов осуществления смесь содержит одну или более пептидных последовательностей и фармацевтически приемлемом носителе или эксципиенте. В другом варианте осуществления смесь содержит одну или более пептидных последовательностей и вспомогательное лекарственное или терапевтическое средство, такое как противодиабетическое или снижающее уровень глюкозы лекарственное или терапевтическое средство. Примеры лекарственных и терапевтических средств приведены ниже в настоящем описании. Также предоставлены комбинации, такие как одна или более пептидных последовательностей в фармацевтически приемлемом носителе или эксципиенте с одним или более противодиабетическими или снижающими уровень глюкозы лекарственными или терапевтическими средствами. Такие комбинации пептидной последовательности по изобретению с другим лекарственным средством или средством, таким как, например, снижающее уровень глюкозы лекарственное или терапевтическое средство, являются пригодными в соответствии со способами и применениями по изобретению, например, для лечения индивидуума.

[0134] Комбинации также включают введение пептидных последовательностей или нуклеиновых кислот по изобретению в частицы или полимерные вещества, такие как сложные полиэфиры, углеводы, полиаминовые кислоты, гидрогель, поливинилпирролидон, этиленвинилацетат, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, протаминсульфат или сополимеры лактида/гликолида, сополимеры полилактида/гликолида или сополимеры этиленвинилацетата; заключение в микрокапсулы, получаемые способами коацервации или интерфазной полимеризации, например, путем использования микрокапсул из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновых микрокапсул, или поли(метилметакрилатных) микрокапсул, соответственно; введение в коллоидные системы доставки лекарственного средства и дисперсные системы, такие как комплексы макромолекул, микрокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов (например, N-жирные ацильные группы, такие как N-лауроил, N-олеоил, жирные амины, такие как додециламин, олеоиламин и т.д., см. патент США № 6638513), включая, например, эмульсии "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы.

[0135] Пептиды по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстративных пептидных последовательностей (включая варианты и подпоследовательности FGF19 и FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, и слияния и химеры FGF19/FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1), как указано в настоящем описании, можно использовать для модулирования

метаболизма глюкозы и облегчения транспорта глюкозы из крови к ключевым метаболическим органам, таким как мышца, печень и жир. Такие пептидные последовательности можно получать в количествах, достаточных или эффективных для восстановления толерантности к глюкозе и/или для улучшения или обеспечения

5 нормального гомеостаза глюкозы.

[0136] Как описано в настоящем описании, введение различных вариантов и слитых пептидных последовательностей FGF19 и/или FGF21 мышам эффективно снижало уровни глюкозы. Кроме того, в отличие от FGF19, определенные пептидные последовательности не стимулируют или индуцируют образование НСС или образование

10 опухоли у мышей. Таким образом, для лечения различных нарушений можно использовать введение пептидов по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (включая варианты и подпоследовательности FGF19 и FGF21, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1, и слияния и химеры FGF19/FGF21,

15 приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1), животному прямыми или опосредованными способами *in vivo* или *ex vivo* (например, введение варианта или слитого пептида, нуклеиновой кислоты, кодирующей вариант или слитый пептид, или трансформированной клетки, или генотерапевтического вектора, экспрессирующего вариант или слитый пептид).

20 [0137] Таким образом, изобретение включает способы и применения *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* (например, на или у индивидуума). Такие способы и применения можно осуществлять на практике с любой из пептидных последовательностей по изобретению, указанных в настоящем описании.

[0138] Изобретение относится к способам лечения индивидуума, страдающего или

25 подвергающегося риску нарушения. В различных вариантах осуществления способ включает введение пептидной последовательности, такой как вариант, слияние или химера FGF19 или FGF21, приведенная в таблицах 1-8 и на фигуре 1, или подпоследовательности, варианта или модифицированной формы варианта, слияния или химеры FGF19 или FGF21, приведенной в таблицах 1-8 и на фигуре 1, индивидууму

30 в количестве, эффективном для лечения нарушения.

[0139] Иллюстративные нарушения, поддающиеся лечению, профилактике и т.п. пептидами по изобретению, и способами и применениями включают метаболические заболевания и нарушения. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений включают: 1. нарушения утилизации глюкозы и осложнения, ассоциированные с ними,

35 включая сахарный диабет (1 типа и 2 типа), гестационный диабет, гипергликемию, резистентность к инсулину, аномальный метаболизм глюкозы, "предиабет" (нарушенную гликемию натощак (IFG) или нарушенную толерантность к глюкозе (IGT)) и другие физиологические нарушения, ассоциированные или которые возникают в результате гипергликемического состояния, включая, например, гистопатологические изменения,

40 такие как разрушение β -клеток поджелудочной железы. Для лечения пептидные последовательности по изобретению можно вводить индивидуумам, страдающим повышенным уровнем глюкозы в плазме (FPG) более приблизительно 100 мг/дл. Пептидные последовательности по изобретению также могут являться пригодными в других связанных с гипергликемией нарушениях, включая повреждение почки (например, повреждение канальцев или нефропатию), дистрофию печени, повреждения глаз (например, диабетическую ретинопатию или катаракту) и синдром диабетической

45 стопы; 2. дислипидемии и их осложнения, такие как, например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярные нарушения и т.п.; 3. другие состояния,

которые могут быть ассоциированы с метаболическим синдромом, таким как ожирение и повышенная масса тела (включая его сопутствующие состояния, такие как, но, не ограничиваясь ими, заболевание неалкогольного ожирения печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH) и синдром поликистоза яичников (PCOS)), а также включает тромбоз, состояния гиперкоагуляции и протромбические состояния (артериальные и венозные), гипертензию, сердечнососудистое заболевание, инсульт и сердечную недостаточность; 4. нарушения или состояния, в которые вовлечены воспалительные реакции, включая атеросклероз, хронические воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит), астму, красную волчанку, артрит или другие воспалительные ревматические нарушения; 5. нарушения клеточного цикла или процессов клеточной дифференцировки, такие как опухоли жировых клеток, липоматозные карциномы, включая, например, липосаркомы, солидные опухоли и неоплазии; 6. нейродегенеративные заболевания и/или демиелинизирующие нарушения центральной и периферической нервной системы и/или неврологические заболевания, включающие нейровоспалительные процессы и/или другие периферические нейропатии, включая болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию и синдром Гийена-Барре; 7. кожные и дерматологические нарушения и/или нарушения процессов заживления ран, включая эритемо-сквамозный дерматоз, и 8. другие нарушения, такие как синдром Х, остеоартрит, и острый респираторный дистресс-синдром.

[0140] Как применяют в настоящем описании, термин "гипергликемический" или "гипергликемия", когда используют по отношению к состоянию индивидуума, означает, что в крови индивидуума представлен временный или хронический аномально высокий уровень глюкозы в крови. Состояние может быть вызвано замедлением метаболизма или всасывания глюкозы, таким образом, что у индивидуума выявляют непереносимость глюкозы, или состоянием повышенного уровня глюкозы, как правило, не обнаруживаемым у здоровых индивидуумов (например, у предрасположенных к диабету индивидуумов с непереносимостью глюкозы, подвергающихся риску развития диабета, или у индивидуумов с диабетом). Уровни глюкозы в плазме натощак (FPG) для нормогликемии составляют менее приблизительно 100 мг/дл, для нарушенного метаболизма глюкозы приблизительно от 100 до 126 мг/дл и для страдающих диабетом более приблизительно 126 мг/дл.

[0141] Как описано в настоящем описании, изобретение включает способы профилактики (например, у индивидуумов, предрасположенных к конкретному нарушению(ям)), отсрочивания, замедления или подавления прогрессирования, начала заболевания или лечения (например, улучшения состояния) ожирения или нежелательной массы тела (например, большей, чем индекс нормальной массы тела или "BMI" относительно соответствующего подходящего индивидууму сопоставимого возраста, пола, расы и т.д.). Таким образом, в различных вариантах осуществления способ по изобретению, например, лечения ожирения или нежелательной массы тела (включая сопутствующие ожирению состояния, например, приступы обструктивного апноэ во сне, артрит, злокачественная опухоль (например, молочной железы, эндометрия и толстой кишки), камней в желчном пузыре или гипергликемии, включает контактирование или введение пептида по изобретению, как указано в настоящем описании (например, варианта или слияния FGF19 и/или FGF21, например, как указано в таблицах 1-8 или на фигуре 1) в количестве, эффективном для лечения ожирения или нежелательной массы тела. В конкретных аспектах индекс массы тела индивидуума составляет более 25, например, 25-30, 30-35, 35-40 более 40.

[0142] Кроме того, изобретение включает способы профилактики (например, у индивидуумов, предрасположенных к конкретному нарушению(ям)), отсрочивания, замедления или подавления прогрессирования, начала заболевания или лечения нежелательных уровней или аномально повышенных уровней LDL, VLDL, триглицеридов или холестерина в сыворотке/плазме, все из которых отдельно или в комбинации могут приводить, например, к образованию бляшек, сужению или блокированию кровеносных сосудов и повышенному риску гипертензии, инсульта и ишемической болезни сердца. Такие нарушения могут являться следствием, например, генетической предрасположенности или, например, рациона питания.

[0143] Термин "индивидуум" относится к животному. Как правило, животное представляет собой млекопитающее, на которое окажет благоприятное воздействие лечение пептидной последовательностью по изобретению. Конкретные примеры включают приматов (например, людей), собак, кошек, лошадей, коров, свиней и овец.

[0144] Индивидуумы включают индивидуумов, страдающих нарушением, например, гипогликемическим нарушением, таким как диабет, или индивидуумов, которые не страдают нарушением, но могут подвергаться риску развития нарушения, например, индивидуумы с преддиабетическим состоянием с уровнями FPG более 100 мг/дл, например, приблизительно от 100 до 126 мг/дл. Индивидуумы, подвергающиеся риску развития нарушения, включают, например, индивидуумов, рацион питания которых может способствовать развитию острой или хронической гипергликемии (например, диабета), нежелательной массы тела или ожирения, а также индивидуумов, которые могут иметь семейный анамнез или генетическую предрасположенность в отношении развития острой или хронической гипергликемии или нежелательной массы тела или ожирения.

[0145] Как описано в настоящем описании, способы лечения включают контактирование или введение пептида по изобретению, как указано в настоящем описании (например, варианта или слияния FGF19 и или FGF21, как указано в таблицах 1-8 или на фигуре 1, например), в количестве, эффективном для получения желаемого исхода или результата у индивидуума. Лечение, которое приводит к желаемому исходу или результату, включает снижение, уменьшение или предотвращение тяжести или частоты возникновения одного или более симптомов состояния у индивидуума, например, улучшение состояния индивидуума или "положительное воздействие", или "терапевтический эффект". Таким образом, лечение может снижать или уменьшать, или предотвращать тяжесть или частоту возникновения одного или более симптомов нарушения, стабилизировать или подавлять прогрессирование или усугубление нарушения и в некоторых случаях способствовать регрессии нарушения временно (например, в течение 1-6, 6-12 или 12-24 часов), среднесрочно (например, 1-6, 6-12, 12-24 или 24-48 суток) или долгосрочно (например, в течение 1-6, 6-12, 12-24, 24-48 недель или более 24-48 недель). Таким образом, например, в случае гипергликемического нарушения, лечение может снижать или уменьшать уровни глюкозы в крови, улучшать толерантность к глюкозе, улучшать метаболизм глюкозы, обеспечивать нормальный гомеостаз глюкозы, снижать или уменьшать резистентность к инсулину, снижать или уменьшать уровни инсулина или снижать, предотвращать, улучшать или способствовать регрессии метаболического синдрома или гистопатологического изменения, ассоциированного или которое возникает в результате гипергликемического нарушения, такого как диабет.

[0146] Например, пептидная последовательность, способ или применение может снижать или уменьшать уровни глюкозы у одного или более индивидуумов с уровнями

FPG более 100 мг/дл, например, приблизительно от 100 до 125 мг/дл или более 125 мг/дл, на 5-10%, 10-20%, 20-30% или 30-50% или более, или, например, от более 200 мг/дл до менее 200 мг/дл, от более 150 мг/дл до менее 150 мг/дл, от более 125 мг/дл до менее 125 мг/дл и т.д. Кроме того, пептидная последовательность, способ или применение

5 может снижать или уменьшать уровни глюкозы, например, для индивидуумов с предиабетом или диабетом (например, 2 типа) с фоновыми уровнями HbA1c более приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10%, в частности 5%, 6% или 7%.

[0147] Неограничивающие примеры улучшения гистопатологического изменения, ассоциированного с гипергликемическим состоянием, включают, например, снижение,

10 ингибирование или блокирование: разрушения или атрофии клеток поджелудочной железы (например, β -клеток), повреждения почки, такое как кальцификация канальцев или нефропатия, атрофия печени, повреждения глаз (например, диабетическая ретинопатия, катаракта), синдрома диабетической стопы, образования язв на слизистой оболочке, такой как ротовая полость и десны, периодонтит, избыточное кровотечение,

15 медленного или продолжительного заживления повреждений или ран (например, которое приводит к диабетическим карбункулам), инфекций кожи и других нарушений кожного покрова, сердечнососудистой и ишемической болезни сердца, заболевания периферических сосудов, инсульта, дислипидемии, гипертензии, ожирения или риска развития любого из указанных выше. Улучшение состояния нежелательной массы тела

20 или ожирения может включать, например, снижение массы тела (как отражает BMI или т.п.) или улучшение ассоциированного нарушения, такое как снижение уровней триглицерида, холестерина, LDL или VLDL, снижение артериального давления, уменьшение утолщения интимы кровеносного сосуда, снижение или сниженный риск сердечнососудистого заболевания или инсульта, уменьшение частоты сердечных

25 сокращения в состоянии покоя и т.д.

[0148] "Эффективное количество" или "достаточное количество" для применения и/или лечения индивидуума относится к количеству, которое обеспечивает в однократной или многократных дозах отдельно или в комбинации с одной или более других композиций (терапевтических средств, таких как лекарственное или терапевтическое

30 средство для гипергликемии), лечений, протоколов или средств схемы лечения детектируемый ответ в течение любого периода времени (временного, среднесрочного или длительного), желаемый исход или объективное или субъективное благоприятное действие у индивидуума любой измеряемой или детектируемой степени или в течение любого периода времени (например, в течение часов, суток, месяцев, годов или до

35 излечения). Такие количества, как правило, являются эффективными для улучшения состояния нарушения или одного, многих или всех неблагоприятных симптомов, следствий или осложнений нарушения до измеряемой величины, хотя снижение или подавление прогрессирования или усугубления нарушения рассматривают как удовлетворительный результат.

[0149] Как применяют в настоящем описании, термин "улучшение состояния" означает улучшение состояния нарушения у индивидуума, снижение тяжести нарушения или подавление прогрессирования или усугубления нарушения (например, стабилизация нарушения). В случае гипергликемического нарушения (например, диабета,

40 резистентности к инсулину, непереносимости глюкозы, метаболического синдрома и т.д.), например, улучшение может представлять собой снижение или уменьшение уровня глюкозы в крови, снижение резистентности к инсулину, снижение уровня глюкогона, улучшение состояния толерантности к глюкозе или метаболизма или гомеостаза глюкозы. Улучшение состояния гипергликемического нарушения также может включать

улучшенную функцию поджелудочной железы (например, ингибировать или предотвращать разрушение β -клеток/островковых или увеличивать число и/или функцию β -клеток), уменьшение патологии, ассоциированной или возникающей в результате нарушения, такое как улучшение гистопатологии поврежденной ткани или органа, как

5 указано в настоящем описании. В случае нежелательной массы тела или ожирения, например, улучшение может представлять собой снижение увеличения массы, снижения массы тела (например, как отражено сниженным BMI) или улучшение состояния, ассоциированного с нежелательной массой тела, ожирением, например, как указано в

10 настоящем описании (например, снижение или уменьшение уровней глюкозы в крови, триглицериды, холестерин, LDL или VLDL, снижение артериального давления, уменьшение утолщения интимы кровеносного сосуда и т.д.).

[0150] Таким образом, терапевтический эффект или улучшение, не обязательно представляет собой полное устранение любого, большей части или всех симптомов, осложнений, следствий или указанных выше причин, ассоциированных с нарушением

15 или заболеванием. Таким образом, удовлетворительную конечную точку получают, когда существует временное, среднесрочное или длительное постепенное улучшение состояния индивидуума или уменьшение случаев возникновения, частоты, тяжести, прогрессирования или продолжительности, или подавление или купирование одного или более ассоциированных неблагоприятных симптомов или осложнений, или следствий,

20 или указанных выше причин, усугубления или прогрессирования (например, стабилизация одного или более симптомов или осложнений состояния, нарушения или заболевания) нарушения или заболевания в течение определенного периода времени (часов, суток, недель, месяцев и т.д.).

[0151] Таким образом, в случае нарушения, поддающегося лечению пептидной

25 последовательностью по изобретению, количество пептида, достаточное для улучшения состояния нарушения зависит от типа, тяжести и степени или длительности нарушения, желаемого терапевтического эффекта или результата, и специалист в данной области может легко определять его. Подходящие количества также зависят от отдельного индивидуума (например, биодоступности у индивидуума, пола, возраста и т.д.).

30 Например, при временном или частичном восстановлении нормального гомеостаза глюкозы у индивидуума можно снижать величину дозы или частоты инъекций инсулина, несмотря на то, что полной независимости от инъекций инсулина не получают.

[0152] Эффективное количество можно определять, например, измерением одного или более соответствующих физиологических эффектов. В конкретном

35 неограничивающем примере в случае гипергликемического состояния можно использовать тест на снижение или уменьшение уровня глюкозы в крови или улучшение толерантности к глюкозе для определения, является ли количество пептидной последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательности и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных

40 последовательностей (например, последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1) эффективным для лечения гипергликемического состояния. В другом конкретном неограничивающем примере эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения или уменьшения любого уровня (например, фоновое значение) FPG, где, например, количество, достаточное для снижения уровня FPG от более 200 мг/дл до менее 200 мг/дл, количество, достаточное для снижения уровня FPG от 175 мг/дл до 200 мг/дл до меньшего, чем уровень до введения, количество, достаточное для снижения уровня FPG от 150 мг/дл до 175 мг/дл до меньшего, чем уровень до введения, количество, достаточное для снижения уровня FPG от 125 мг/дл

до 150 мг/дл до меньшего, чем уровень до введения и т.д. (например, снижение уровней FPG до менее 125 мг/дл, до менее 120 мг/дл, до менее 115 мг/дл, до менее 110 мг/дл и т.д.). В случае уровней HbA1c эффективное количество включает количество, достаточное для уменьшения или снижения уровней на более чем приблизительно от 10% до 9%, на более чем приблизительно от 9% до 8%, на более чем приблизительно от 8% до 7%, на более чем приблизительно от 7% до 6%, на более чем приблизительно от 6% до 5% и т.д. Более конкретно уменьшение или снижение уровней HbA1c приблизительно на 0,1%, 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50% или более представляет собой эффективное количество по изобретению. В еще одном другом конкретном неограничивающем примере в случае нежелательной массы тела или ожирения эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения или уменьшения индекса массы тела (BMI) индивидуума, снижения или уменьшения уровня глюкозы, снижения или уменьшения уровней в сыворотке/плазме триглицеридов, липидов, холестерина, жирных кислот, LDL и/или VLDL. В еще одних дополнительных конкретных неограничивающих примерах количество представляет собой количество, необходимое для снижения или уменьшения любого из указанных выше параметров, например, приблизительно на 0,1%, 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50% или более.

[0153] Способы и применения по изобретению для лечения индивидуума можно применять для профилактики с целью предотвращения нарушения у индивидуума, такого как гипергликемическое нарушение, или развития нежелательной массы тела или ожирения. Альтернативно, способы и применения можно осуществлять во время или после лечения индивидуума. Например, перед, во время или после лечения индивидуума с целью снижения уровня глюкозы с использованием инсулина или другого снижающего уровень глюкозы лекарственного или терапевтического средства, например, способом или согласно применению по изобретению можно вводить индивидууму, например, пептидную последовательность по изобретению. Кроме того, композицию, такую как пептидная последовательность по изобретению, можно комбинировать с другим лекарственным средством или средством, таким как, например, снижающее уровень глюкозы лекарственное или терапевтическое средство.

[0154] Таким образом, способы и применения по изобретению для лечения индивидуума можно проводить перед, по существу одновременно или после другого лечения, и их можно дополнять другими видами терапии. Виды дополнительной терапии включают другие виды снижающего уровень глюкозы лечения, такие как инсулин, усилители чувствительности к инсулину и другие виды лекарственного лечения, изменение рациона питания (низкое содержание сахара, жиров и т.д.), хирургию снижения веса (уменьшение объема желудка посредством обходного желудочного анастомоза, гастрэктомии), бандажирование желудка, желудочный баллон, резекцию желудка и т.д. Например, способ или применение по изобретению для лечения гипергликемического нарушения или резистентности к инсулину можно использовать в комбинации с лекарственными средствами или другими фармацевтическими композициями, которые снижают уровень глюкозы или повышают чувствительность к инсулину у индивидуума. Лекарственные средства для лечения диабета включают, например, бигуаниды и сульфонилмочевины (например, толбутамид, хлорпропамид, ацетогексамид, толазамид, глибенкламид и глипизид), тиазолидиндионы (росиглитазон, пиоглитазон), аналоги GLP-1, ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), составы бромокриптина и вещества, усиливающего экскрецию желчных кислот (например, колесевелама), и инсулин

(болюсные и базальные аналоги), метформин (например, метформина гидрохлорид) с тиазолидиндионом (TZD) или без него и ингибиторы SGLT-2. Также хорошо известными являются подавляющие аппетит лекарственные средства, и их можно использовать в комбинации со способами по изобретению. Дополнительную терапию можно вводить перед, одновременно или после способов и применений по изобретению.

[0155] Пептидные последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательности и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), можно формулировать в стандартной дозе или стандартной лекарственной форме. В конкретном варианте осуществления пептидная последовательность находится в количестве, эффективном для лечения нуждающегося в этом индивидуума, например, вследствие гипергликемии. Иллюстративные стандартные дозы находятся в диапазоне приблизительно 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 или 2500-5000, 5000-25000, 25000-50000 нг, приблизительно 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 или 2500-5000, 5000-25000, 25000-50000 мкг и приблизительно 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 или 2500-5000, 5000-25000, 25000-50000 мг.

[0156] Пептидные последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательности и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), можно вводить для обеспечения желаемого эффекта в виде однократной дозы или многократных доз, например, в эффективном или достаточном количестве. Иллюстративные дозы находятся в диапазоне приблизительно 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 или 2500-5000, 5000-25000, 25000-50000 пг/кг, приблизительно 50-500, 500-5000, 5000-25000 или 25000-50000 нг/кг и приблизительно от 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 или 2500-5000, 5000-25000, 25000-50000 мкг/кг. Однократные или многократные дозы можно вводить, например, многократно в сутки, на последующие сутки, чередующиеся сутки, еженедельно или с перерывами (например, дважды в неделю, однократно каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель или однократно каждые 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев).

[0157] Можно вводить пептидные последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1) и можно применять способы системного, регионального или локального введения любого пути. Например, пептидную последовательность можно вводить парентерально (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно или интраперитонеально), перорально (например, прием внутрь, буккально или сублингвально), путем ингаляции, внутрикожно, внутриполостно, интракраниально, трансдермально (местно), трансмукозально или ректально. Пептидные последовательности по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), и способы по изобретению, включая фармацевтические композиции, можно вводить посредством (микро)инкапсулированной системы доставки или помещать в имплантат для введения.

[0158] Изобретение дополнительно относится к "фармацевтическим композициям", которые содержат пептидную последовательность (или последовательности) по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), и один или более фармацевтически приемлемых или

физиологически приемлемых разбавителей, носителей или эксципиентов. В конкретных вариантах осуществления пептидная последовательность или последовательности содержатся в терапевтически приемлемом количестве. Фармацевтические композиции можно использовать способами и применениями по изобретению. Таким образом, например, фармацевтические композиции можно вводить *ex vivo* или *in vivo* индивидууму для проведения способов лечения и использования по изобретению.

[0159] Фармацевтические композиции по изобретению можно формулировать так, чтобы они являлись совместимыми с предполагаемым способом или путем введения; иллюстративные пути введения указаны в настоящем описании. Кроме того, фармацевтические композиции могут дополнительно содержать другие терапевтически активные средства или соединения, описываемые в настоящем описании (например, снижающие уровень глюкозы средства) или известные специалисту в данной области, которые можно использовать в лечении или профилактике различных заболеваний и нарушений, как указано в настоящем описании.

[0160] Фармацевтические композиции, как правило, содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одной из пептидных последовательностей по изобретению, включая подпоследовательности, варианты и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (последовательностей, приведенных в таблицах 1-8 и на фигуре 1), и одного или более фармацевтически и физиологически приемлемых средств состава. Подходящие фармацевтически приемлемые или физиологически приемлемые разбавители, носители или эксципиенты включают, но не ограничиваются ими, антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и бисульфат натрия), консерванты (например, бензиловый спирт, метилпарабены, этил или *n*-пропил, пара-гидроксibenзоат), эмульгаторы, суспендирующие средства, диспергирующие средства, растворители, наполнители, объемообразующие средства, буферы, носители, разбавители и/или адъюванты. Например, подходящий носитель может представлять собой физиологический раствор или забуференный цитратом физиологический раствор, возможно с добавлением других веществ, общепринятых в фармацевтических композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляет собой дополнительные иллюстративные носители. Специалисты в данной области легко определяют ряд буферов, которые можно использовать в фармацевтических композициях и лекарственных формах, используемых в изобретении. Характерные буферы включают, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые слабые кислоты, слабые основания или их смеси. Компоненты буфера также включают водорастворимые вещества, такие как фосфорная кислота, винные кислоты, молочная кислота, янтарная кислота, лимонная кислота, уксусная кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и их соли.

[0161] Первичный растворитель в носителе может быть водным или неводным по природе. Кроме того, носитель может содержать другие фармацевтически приемлемые эксципиенты для изменения или поддержания pH, осмолярности, вязкости, стерильности или стабильности фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель представляет собой водный буфер. В других вариантах осуществления носитель содержит, например, хлорид натрия и/или цитрат натрия.

[0162] Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать еще другие фармацевтически приемлемые средства состава для изменения или поддержания скорости

высвобождения пептида по изобретению. Такие средства состава включают такие вещества, которые известны специалистам в данной области для получения составов с длительным высвобождением. Дополнительную информацию, относящуюся к фармацевтически и физиологически приемлемым средствам состава, см., например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) pages 1435-1712, The Merck Index. 12th Ed. (1996, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ) и Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.). Дополнительные подходящие для введения фармацевтические композиции являются известными в данной области и применимыми в способах и композициях по изобретению.

[0163] Фармацевтическую композицию можно хранить в стерильном флаконе в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие композиции можно хранить в готовой к применению форме, лиофилизированной форме, которую необходимо восстанавливать перед применением, жидкой форме, которую необходимо восстанавливать перед применением, или другой приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предоставлена в одноразовом контейнере (например, одноразовом флаконе, ампуле, шприце или автоинъекторе (аналогичном, например, EpiPen®)), при этом в других вариантах осуществления предоставлен контейнер многоразового использования (например, флакон многоразового использования). Для доставки пептидов по изобретению можно использовать любые устройства доставки лекарственного средства, включая имплантаты (например, имплантируемые насосы) и катетерные системы, которые известны специалистам в данной области. Инъекции веществ замедленного всасывания, которые, как правило, вводят подкожно или внутримышечно, также можно использовать для высвобождения пептидов по изобретению в течение predetermined периода времени. Инъекции веществ замедленного всасывания, как правило, являются на основе твердого вещества или масла и, как правило, содержат по меньшей мере один из компонентов состава, указанных в настоящем описании. Специалисту в данной области известны возможные составы и применения инъекций веществ замедленного всасывания.

[0164] Фармацевтическую композицию можно формулировать, чтобы она являлась совместимой с ее предполагаемым путем введения. Таким образом, фармацевтические композиции содержат носители, разбавители или эксципиенты, подходящие для введения путями, включая парентеральный (например, подкожный (п/к), внутривенный, внутримышечный или интраперитонеальный), внутрикожный, пероральный (например, прием внутрь), посредством ингаляции, внутриполостной, интракраниальный и трансдермальный (местный).

[0165] Фармацевтические композиции могут находиться в форме стерильной инъекционной водной или масляной суспензии. Эту суспензию можно формулировать с использованием подходящих диспергирующих средств или средств для смачивания и суспендирующих средств, описываемых в настоящем описании или известных специалисту в данной области. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксическом парентерально-приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемые разбавители, растворители и диспергирующие среды, которые можно применять, включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS), этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий

полиэтиленгликоль) и подходящие их смеси. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды общепринято используют стерильные жирные масла. Для этой цели можно использовать любое легкое нелетучие масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение для получения инъектируемых средств. Пролонгированное всасывание конкретных инъектируемых составов можно получать введением средства для замедления всасывания (например, моностеарата алюминия или желатина).

[0166] Фармацевтические композиции могут находиться в форме, подходящей для перорального применения, например, в виде таблеток, капсул, пастилок, таблеток-леденцов, водных или масляных суспензий, диспергируемых порошков или гранул, эмульсий, жестких или мягких капсул или сиропов, растворов, микрогранул или эликсиров. Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального применения, можно получать любым известным в данной области способом получения фармацевтических композиций. Такие композиции могут содержать одно или более средств, таких как подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты для обеспечения фармацевтически изящных и приятных на вкус препаратов. Таблетки, содержащие пептид по изобретению, могут находиться в смеси с нетоксическими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, подходящими для получения таблеток. Эти эксципиенты включают, например, разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия, средства для гранулирования и дезинтегрирующие средства, например, кукурузный крахмал или альгиновую кислоту, связывающие средства, например, крахмал, желатин или гуммиарабик, и смазки, например, стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк.

[0167] Подходящие для перорального введения таблетки, капсулы и т.п. можно не покрывать оболочкой или можно покрывать оболочкой известными способами для замедления распадаемости и всасывания в желудочно-кишечном тракте и, таким образом, обеспечения длительного действия в течение более продолжительного периода. Например, можно применять вещество для замедленного высвобождения, такое как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат. Также их можно покрывать оболочкой известными в данной области способами с получением осмотических терапевтических таблеток для контролируемого высвобождения. Дополнительные средства включают биоразлагаемые или биосовместимые частицы или полимерное вещество, такое как сложные полиэфиры, полиаминовые кислоты, гидрогель, поливинилпирролидон, полиангидриды, полигликолевая кислота, этиленвинилацетат, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, протаминсульфат или сополимеры лактида/гликолида, полисополимеры лактида/гликолида или сополимеры этиленвинилацетата, для контролируемой доставки вводимой композиции. Например, пероральное средство можно заключать в микрокапсулы, получаемые способами коацервации или интерфазной полимеризации путем использования микрокапсул из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновых микрокапсул или поли(метилметакрилатных) микрокапсул, соответственно, или в систему доставки коллоидную лекарственного средства. Коллоидные дисперсные системы включают комплексы макромолекул, нанокapsулы, микросферы, микрогранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Способы получения таких составов известны специалистам в данной области и являются коммерчески доступными.

[0168] Составы для перорального применения также могут находиться в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешивают с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция, каолином или

микрористаллической целлюлозой, или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешивают с водой или масляной средой, например, арахисовым маслом, парафиновым маслом или оливковым маслом.

5 [0169] Водные суспензии содержат активные вещества в смеси с подходящими для их получения эксципиентами. Такие эксципиенты представляют собой суспендирующие средства, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и гуммиарабик; диспергирующие средства или средства для смачивания могут представлять собой природный фосфолипид, например, лецитин, 10 или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, стеарат полиоксиэтилена, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, гептадекаэтиленоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами, получаемыми из жирных кислот и гексита, такими как полиоксиэтиленсорбитмоноолеат, или продукты конденсации 15 этиленоксида с неполными эфирами, получаемыми из жирных кислот и ангидридов гексита, например, полиэтиленсорбитанмоноолеат. Водные суспензии могут также содержать один или более консервантов.

[0170] Масляные суспензии можно формулировать суспендированием активного ингредиента в растительном масле, например, арахисовом масле, оливковом масле, 20 кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как парафиновое масло. Масляные суспензии могут содержать сгущающее средство, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Для обеспечения приятного на вкус перорального препарата можно добавлять подсластители, такие как указанные выше, и ароматизаторы.

25 [0171] Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для получения водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергируемым средством или средством для смачивания, суспендирующим средством и одним или более консервантов. Подходящие диспергирующие средства или средства для смачивания и суспендирующие средства проиллюстрированы в настоящем описании.

30 [0172] Фармацевтические композиции по изобретению также могут находиться в форме эмульсий "масло-в-воде". Масляная фаза может представлять собой растительное масло, например, оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например, парафиновое масло, или смеси этих масел. Подходящие эмульгаторы могут представлять собой природные камеди, например, гуммиарабик или трагакантовую 35 камедь, природные фосфолипиды, например, соевые, лецитин, и сложные эфиры или неполные эфиры, получаемые из жирных кислот, ангидриды гексита, например, сорбитанмоноолеат, и продукты конденсации неполных эфиров с этиленоксидом, например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат.

[0173] Фармацевтические композиции также могут содержать носители для защиты 40 композиции от быстрого разложения или элиминации из организма, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, липосомы, гидрогели, пролекарства и микроинкапсулированные системы доставки. Например, можно применять вещество для замедленного высвобождения, такое как глицерилмоностеарат или глицерилстеарат, отдельно или в комбинации с воском. Пролонгированное 45 всасывание инъектируемых фармацевтических композиций можно получать введением средства, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия или желатина. Предотвращение действия микроорганизмов можно получать различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами,

хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п.

[0174] Изобретение также включает пептиды по изобретению в форме суппозитория для ректального введения. Суппозитории можно получать смешиванием пептида по изобретению с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при обычных температурах и жидким при ректальной температуре, и, таким образом, плавится в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такие вещества включают, но не ограничиваются, масло какао и полиэтиленгликоли.

[0175] Изобретение относится к способам идентификации пептида (или подпоследовательности, варианта или модифицированной формы, как указано в настоящем описании), обладающего снижающей уровень глюкозы активностью по существу без активности в отношении печеночноклеточной карциномы (НСС). В одном из вариантов осуществления способ включает: скрининг (например, анализ или измерение) пептидной последовательности (или подпоследовательности, варианта или модифицированной формы, как указано в настоящем описании) в отношении снижающей уровень глюкозы активности, и скрининг (например, анализ или измерение) пептидной последовательности (или подпоследовательности, варианта или модифицированной формы, как указано в настоящем описании) в отношении активности НСС или экспрессии маркера, коррелирующего с активностью НСС. Таким образом, идентифицируют пептид, обладающий снижающей уровень глюкозы активностью и сниженной или отсутствующей активностью НСС. В конкретных аспектах маркер, коррелирующий с активностью НСС, включает липидный профиль - пептид, который обладает меньшей повышающей уровень липидов активностью по сравнению с FGF19, указывает на то, что пептид обладает сниженной активностью НСС или не обладает ей; или маркер, коррелирующий с активностью НСС, включает экспрессию гена альдокеторедуктазы - пептид, который подавляет или снижает экспрессию гена альдокеторедуктазы по сравнению с FGF19, указывает на то, что пептид обладает сниженной активностью НСС или не обладает ей; или маркер, характерный для активности НСС, включает экспрессию гена Slc1a2 - пептид, который активирует или повышает Slc1a2 экспрессию гена по сравнению с FGF19, указывает на то, что пептид обладает сниженной активностью НСС или не обладает ей.

[0176] Термины "анализ" и "измерение" и их грамматические варианты в настоящем описании используют взаимозаменяемо, и они относятся к качественным или количественным определениям, или к качественным и количественным определениям. Когда термины используют по отношению к детектированию, предполагают любые средства, оценивающие относительное количество, включая различные способы, указанные в настоящем описании и известные в данной области. Например, экспрессию гена можно анализировать или измерять нозерн-блоттингом, вестерн-блоттингом, анализом иммунопреципитации, или посредством измерения активности, функции или количества экспрессируемого белка (например, альдокеторедуктазы или Slc1a2).

[0177] Факторы риска НСС, наиболее распространенного типа рака печени, включают диабет 2 типа (вероятно, усугубляемый ожирением). Риск НСС у страдающих диабетом 2 типа является больше (от ~2,5 до ~7 раз по сравнению с риском, не относящимся к диабету) в зависимости от продолжительности диабета и протокола лечения.

[0178] При скрининге и диагностике НСС можно использовать различные способы, и они являются хорошо известными специалисту в данной области. Показатели в отношении НСС включают детекцию опухолевого маркера, такого как повышенные уровни альфа-фетопротейна (AFP) или дес-гамма-карбоксипротромбина (DCP). Также пригодным является ряд различных способов сканирования и визуализации, включая

ультразвук, срезы КТ и МРТ. В отношении изобретения оценку, выявляют ли для пептида (например, кандидатного пептида) признаки индукции НСС, можно проводить *in vivo*, например, количественным определением образования узлов НСС на модели на животных, таких как мыши db/db, которым вводят пептид, по сравнению с образованием узлов НСС, индуцируемое FGF19 дикого типа. С макроскопической точки зрения рак печени может являться узелковым, где опухолевые узлы (которые являются от круглых до овальных, серых или зеленых, хорошо ограниченных, но не инкапсулированных) появляются в виде одной большой массы или многих небольших масс. Альтернативно, НСС может находиться в виде инфильтративной опухоли, которая является диффузной и плохо ограниченной и часто инфильтрирует воротные вены.

[0179] Патологическую оценку образцов ткани печени, как правило, проводят после того, как результаты одного или более указанных выше способов указывают на вероятное наличие НСС. Таким образом, способы по изобретению могут дополнительно включать оценку образца ткани печени животных на модели *in vivo* (например, мыши db/db), пригодной для исследования НСС с целью определения, выявляют ли у пептидной последовательности признаки индукции НСС. Посредством микроскопической оценки патолог может определять, присутствует ли один из четырех основных архитектурных и цитологических типов (паттернов) НСС (т.е. фиброламеллярного, псевдожелезистого (аденоидного), плеоморфного (гигантоклеточного) и светлоклеточного).

[0180] Изобретение также включает получение и применение антител и их фрагментов, которые связываются с пептидными последовательностями по изобретению, включая подпоследовательности, варианты последовательностей и модифицированные формы иллюстрируемых пептидных последовательностей (включая пептиды, приведенные в таблицах 1-8 и на фигуре 1).

[0181] Как применяют в настоящем описании, термины "антитела" (Ab) и "иммуноглобулины" (Ig) относятся к гликопротеинам с аналогичными структурными характеристиками. Несмотря на то, что антитела проявляют специфичность связывания с антигеном, иммуноглобулины включают антитела и другие подобные антителу молекулы, у которых может отсутствовать антигенная специфичность.

[0182] Термин "антитело" включает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и связывающие фрагменты антитела, включая Fab и F(ab')₂, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность. Основная структурная единица антитела содержит тетрамер, и каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара содержит одну "легкую" цепь (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевой участок каждой цепи содержит вариабельную область приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, преимущественно ответственных за распознавание антигена. В противоположность этому, карбоксиконцевой участок каждой цепи определяет константную область, преимущественно ответственную за эффекторную функцию. Легкие цепи человека классифицируют как легкие каппа- и лямбда- цепи, тогда как тяжелые цепи человека классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-, и они определяют изотип антитела, такой как IgM, IgD, IgA и IgE, соответственно. Связывающие фрагменты получают технологиями рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела.

[0183] Каждая тяжелая цепь содержит на одном конце вариабельный домен (VH), за

которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь содержит переменный домен на одном конце (VL) и константный домен на своем другом конце; константный домен легкой цепи является выровненным с первым константным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи является выровненным с переменным доменом тяжелой цепи. В легкой и тяжелой цепях переменные и константные области связаны "J"-областью, состоящей из приблизительно 12 или более аминокислот, где тяжелая цепь также содержит "D"-область, состоящую из приблизительно 10 или более аминокислот. Для всех цепей антитела выявляют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), связанных тремя гиперпеременными областями, также называемыми определяющими комплементарности областями или CDR. CDR от двух цепей каждой пары расположены между каркасными областями, что обеспечивает их связывание со специфическим эпитопом. От N-конца до C-конца легкая и тяжелая цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[0184] Интактное антитело содержит два участка связывания, и два участка связывания являются одинаковыми, за исключением бифункциональных или биспецифических антител. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две различные пары тяжелой/легкой цепей и два различных участка связывания. Биспецифические антитела можно получать различными способами, включая слияние гибридом или связыванием фрагментов Fab'.

[0185] Как применяют в настоящем описании, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, получаемому из популяции по существу однородных антител, таким образом, индивидуальные антитела, содержащиеся в популяции, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут содержаться в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленным против одного иммунодетерминантного сайта. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

[0186] "Нейтрализующее антитело" представляет собой молекулу антитела, которая способна устранять или значительно уменьшать эффекторную функцию антигена-мишени, с которым она связывается.

[0187] Связывающие фрагменты антитела можно получать ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Расщепление антител ферментом папаином приводит к двум идентичным антигенсвязывающим фрагментам, также известным как фрагменты "Fab", и фрагменту "Fc", который не обладает антигенсвязывающей активностью. Расщепление антител ферментом пепсином приводит к фрагменту $F(ab')_2$, в котором два плеча молекулы антитела остаются связанными и содержат два антигенсвязывающих участка. Фрагмент $F(ab')_2$ способен поперечно связываться с антигеном.

[0188] Термин "Fab" относится к фрагменту антитела, который содержит константный домен легкой цепи и домен CH1 тяжелой цепи. Термин "Fv", когда используют в настоящем описании, относится к минимальному фрагменту антитела, который содержит антигенраспознающий и антигенсвязывающий участки. В двухцепочечных молекулах Fv эта область состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в нековалентной ассоциации. В одноцепочечных видах Fv один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой

цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером, таким как легкая и тяжелая цепи, которые могут связываться в "димерную" структуру, аналогичную структуре в двухцепочечных видах Fv. Именно в этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют, определяя антигенсвязывающий участок на поверхности димера VH-VL. Несмотря на то, что в совокупности шесть CDR обеспечивают антигенсвязывающую специфичность антителу, даже один переменный домен (или половина любого Fv, содержащего только три CDR, специфичные к антигену) способен распознавать и связываться с антигеном.

[0189] Термин "определяющие комплементарность области" или "CDR" относится к частям иммунологических рецепторов, которые образуют контакт с конкретным лигандом и определяют его специфичность. Термин "гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые являются ответственными за связывание с антигеном. Гипервариабельная область, как правило, содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" и/или такие остатки из "гипервариабельной петли".

[0190] Как применяют в настоящем описании, термин "эпитоп" относится к участкам связывания антител на белковых антигенах. Антигенные детерминанты, как правило, состоят из химически активных группировок на поверхности молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, а также обладают конкретными трехмерными структурными характеристиками и характеристиками заряда. Считают, что антитело связывается с антигеном, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 10 нМ. Повышенная константа равновесия (" K_D ") означает, что существует менее высокая аффинность антитела к эпитопу, тогда как пониженная константа равновесия означает, что существует более высокая аффинность антитела к эпитопу. Антитело с K_D "не более" определенного количества означает, что антитело связывается с эпитопом с данной K_D или более сильно. Несмотря на то, что K_D описывает характеристики связывания эпитопа и антитела, "активность" описывает эффективность самого антитела как функцию антитела. Необязательно существует корреляция между константой равновесия и активностью, таким образом, например, относительно низкая K_D автоматически не означает высокую активность.

[0191] Термин "селективно связывается" по отношению к антителу не означает, что антитело связывается только с одним субстратом, а также что K_D антитела к первому субстрату является меньше, чем K_D антитела ко второму субстрату. Антитело, которое связывается исключительно с эпитопом, связывается только с одним этим эпитопом.

[0192] При введении людям антитела, которые содержат переменные и/или константные области грызунов (мыши или крысы), иногда являются ассоциированными, например, с быстрым клиренсом из организма или возникновением иммунного ответа организма против антитела. Во избежание использования получаемых от грызунов антител, полностью человеческие антитела можно получать посредством введения функции человеческого антитела грызуну, таким образом, чтобы грызун продуцировал полностью человеческие антитела. Если конкретно не указано в настоящем описании, антитела "человека" и "полностью человеческие" антитела можно использовать взаимозаменяемо в настоящем описании. Термин "полностью человеческое" может являться пригодным при обозначении различия антител, которые принадлежат только частично человеку от антител, которые принадлежат полностью или являются полностью человеческими. Специалисту в данной области знакомы различные способы

получения полностью человеческих антител.

[0193] Для решения проблемы возможного ответа антителами человека против антител мыши, можно использовать химерные или иным образом гуманизированные антитела. Химерные антитела содержат принадлежащую человеку константную область и принадлежащую мыши вариабельную область, и, таким образом, у некоторых пациентов можно наблюдать ответ антител человека против химерных антител. Таким образом, предпочтительно предоставлять полностью человеческие антитела против мультимерных ферментов во избежание возможного ответа антител человека против антител мыши или ответа антител человека против химерных антител.

[0194] Моноклональные полностью человеческие антитела можно получать, например, получением гибридомных клеточных линий способами, известными специалисту в данной области. Другие способы получения включают использование последовательностей, кодирующих конкретные антитела, для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего, такой как клетка СНО. Трансформацию можно проводить любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, включая, например, упаковку полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансдукцию клетки-хозяина вирусом (или вектором), или известными в данной области способами трансфекции. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядро. Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяина для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, клетки СНО, клетки HeLa и клетки печеночноклеточной карциномы человека.

[0195] Антитела можно использовать с диагностической и/или терапевтической целью. Например, антитела можно использовать в качестве диагностического средства, детектируя уровень одного или более пептидов по изобретению у индивидуума и сравнивая детектируемый уровень с контрольным уровнем стандарта или с определяемым ранее исходным уровнем у индивидуума (например, до какого-либо заболевания). Антитела можно использовать в качестве терапевтического средства для модуляции активности одного или более пептидов по изобретению, таким образом, оказывая действие на состояние или нарушения.

[0196] Изобретение относится к наборам, включая, но, не ограничиваясь ими, пептидные последовательности по изобретению необязательно в комбинации с одним или более терапевтическими средствами, их композиции и фармацевтические композиции, упакованные в подходящий упаковочный материал. Набор необязательно содержит этикетку или вкладыш в упаковку, на котором указано описание компонентов или инструкции по применению *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo* содержащихся в нем компонентов. Иллюстративные инструкции включают инструкции по снижению или уменьшению уровня глюкозы в крови, лечению гипергликемии, лечению диабета и т.д.

[0197] Набор может содержать комплект таких компонентов, например, две или более пептидные последовательности отдельно или комбинацию пептидной последовательности с другой терапевтически пригодной композицией (например, противодиабетическим лекарственным средством, таким как соединение гастрин).

[0198] Термин "упаковочный материал" относится к физической структуре, вмещающей компоненты набора. Упаковочный материал может содержать компоненты в стерильных условиях и может быть выполнен из широко используемого для таких

целей материала (например, бумаги, гофрированной фибры, стекла, пластика, фольги, ампул, флаконов, пробирок и т.д.).

[0199] Наборы по изобретению могут содержать этикетки или вкладыши. Этикетки или вкладыши содержат "печатную продукцию", например, бумагу или картон, отдельно или прикрепленный к компоненту, набору или упаковочному материалу (например, коробке), или прикрепленный, например, к ампуле, пробирке или флакону, содержащему компонент набора. Этикетки или вкладыши могут дополнительно содержать машиночитаемый носитель, такой как диск (например, жесткий диск, карту, диск памяти), оптический диск, такой как CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, лету для магнитной записи или электрическое запоминающее устройство, такое как RAM и ROM или их гибриды, такие как магнитные/оптические носители, флеш-носители или карты памяти.

[0200] Этикетки или вкладыши могут содержать идентифицирующую информацию об одном или более компонентах, количествах доз, клинической фармакологии активного ингредиента(ов), включая механизм действия, фармакокинетику и фармакодинамику. Этикетки или упаковки могут содержать информацию, определяющую информацию о производителе, номерах серий, местоположении производителя и дату.

[0201] Этикетки или вкладыши могут содержать информацию о состоянии, нарушении, заболевании или симптоме, для которого можно использовать компонент набора. Этикетки или вкладыши могут содержать инструкции для клинициста или индивидуума по применению одного или более компонентов набора в способе, протоколе лечения или схеме лечения. Инструкции могут содержать величины доз, частоту или продолжительность введения и инструкции для практического осуществления любого из способов, протоколов лечения или схем лечения, указанных в настоящем описании. Иллюстративные инструкции включают инструкции по лечению или применению пептидной последовательности, как указано в настоящем описании. Таким образом, наборы по изобретению могут дополнительно содержать этикетки или инструкции для практического осуществления любого из способов и применений по изобретению, описываемых в настоящем описании, включая способы лечения и применения.

[0202] Этикетки или вкладыши могут содержать информацию о любом благоприятном воздействии, которое может оказывать компонент, такое как профилактический или терапевтический эффект. Этикетки или вкладыши могут содержать информацию о потенциальных неблагоприятных побочных эффектах, такую как предупреждения индивидууму или клиницисту в отношении ситуаций, при которых применение конкретной композиции является неподходящим. Нежелательные побочные эффекты также могут возникать, когда индивидуум принимал, будет принимать или в настоящее время принимает одно или более других лекарственных средств, которые могут являться несовместимыми с композицией, или индивидуум получал, будет получать или в настоящее время получает другой протокол лечения или схему лечения, которая является несовместимой с композицией, и, таким образом, инструкции могут содержать информацию о таких видах несовместимости.

[0203] Наборы по изобретению могут дополнительно содержать другие компоненты. Каждый компонент набора может содержаться в индивидуальном контейнере, и все различные контейнеры могут находиться в одной упаковке. Наборы по изобретению можно конструировать для хранения в холодильнике. Наборы по изобретению можно дополнительно конструировать, чтобы они содержали пептидные последовательности по изобретению или чтобы они содержали нуклеиновые кислоты, кодирующие

пептидные последовательности. Клетки в наборе можно хранить в подходящих условиях хранения до готовности к применению.

[0204] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют аналогичное значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя в практическом осуществлении или тестировании изобретения можно использовать способы и вещества, аналогичные или эквивалентные таким, как описываемые в настоящем описании, подходящие способы и вещества описаны в настоящем описании.

[0205] Все заявки, публикации, патенты и другие ссылки, ссылки на GenBank и ссылки на ATCC, приводимые в настоящем описании, полностью включены посредством ссылки. В случае противоречий, описание, включая определения, имеет преимущественную силу. Как применяют в настоящем описании, формы единственного числа включают формы множественного, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "пептидная последовательность" или "лечение" включает ряд таких последовательностей, видов лечения и т.д.

[0206] Как применяют в настоящем описании, числовые значения, как правило, приводят в формате диапазона на всем протяжении настоящего документа. Формат диапазона используют только для удобства и сокращения, и его не следует истолковывать как строгое ограничение объема изобретения, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, использование диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в диапазоне и все числовые значения или числовые диапазоны, включая целые числа в таких диапазонах, и дробные значения или целые числа в диапазонах, если из контекста явно не следует иное. Эту конструкцию применяют независимо от размера диапазона и во всех контекстах на всем протяжении этого патентного документа. Таким образом, например, ссылка на диапазон 90-100% включает 91-99%, 92-98%, 93-95%, 91-98%, 91-97%, 91-96%, 91-95%, 91-94%, 91-93% и т.д. Ссылка на диапазон 90-100% также включает 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97% и т.д., а также 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5% и т.д., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5% и т.д., и т.д.

[0207] Кроме того, ссылка на диапазон 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и т.д. В дополнительном примере ссылка на диапазон 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500 или 2500-5000, 5000-25000, 5000-50000 включает любое числовое значение или диапазон в пределах или включающий такие значения, например, 25, 26, 27, 28, 29..250, 251, 252, 253, 254...500, 501, 502, 503, 504... и т.д.

[0208] Также как используют в настоящем описании, на всем протяжении этого документа описаны серии диапазонов. Использование таких серий диапазонов включает комбинации верхних и нижних диапазонов для обеспечения другого диапазона. Эту конструкцию применяют независимо от размера диапазона и во всех контекстах на всем протяжении этого патентного документа. Таким образом, например, ссылка на серии диапазонов, таких как 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100, 100-150, включает диапазоны, такие как 5-20, 5-30, 5-40, 5- 50, 5-75, 5-100, 5-150 и 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 10-150 и 20-40, 20-50, 20-75, 20-100, 20-150 и т.д.

[0209] Для краткости в настоящем описании используют определенные сокращения. Один из примеров представляет собой однобуквенное сокращение для представления аминокислотных остатков. Аминокислоты и их соответствующие трехбуквенные и однобуквенные сокращения представляют собой такие, как указано ниже:

	Аланин	Ala	(A)
	Аргинин	Arg	(R)
	Аспарагин	Asn	(N)
5	Аспарагиновая кислота	Asp	(D)
	Цистеин	Cys	(C)
	Глутаминовая кислота	Glu	(E)
	Глутамин	Gln	(Q)
	Глицин	Gly	(G)
	Гистидин	His	(H)
10	Изолейцин	Ile	(I)
	Лейцин	Leu	(L)
	Лизин	Lys	(K)
	Метионин	Met	(M)
	Фенилаланин	Phe	(F)
	Пролин	Pro	(P)
15	Серин	Ser	(S)
	Треонин	Thr	(T)
	Триптофан	Trp	(W)
	Тирозин	Tyr	(Y)
	Валин	Val	(V)

[0210] Изобретение в основном описывают в настоящем описании с использованием утвердительного языка для описания различных вариантов осуществления. Изобретение также конкретно включает варианты осуществления, в которых приводят конкретное описание полностью или частично, такое как вещества или материалы, этапы и условия способов, протоколы, процедуры, опыты или анализы. Таким образом, несмотря на то, что изобретение в основном не отражает в настоящем описании в отношении того, что не входит в изобретение, однако в настоящем описании описаны аспекты, которые явным образом не включены в изобретение.

[0211] Описан ряд вариантов осуществления изобретения. Однако следует понимать, что можно проводить различные модификации, не выходя за рамки сущности и объема изобретения. Таким образом, следующие ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, описываемого в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1

[0212] Следующее ниже представляет собой описание различных способов и веществ, используемых в исследованиях в настоящем описании.

[0213] Животные. Мышей db/db приобретали от The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Мышей содержали в соответствии с руководствами содержания при условиях регулируемого освещения (цикле 12 часов дневного света и 12 часов темноты, темнота 6:30 вечера-6:30 утра), температуре ($22 \pm 4^\circ\text{C}$) и влажности ($50\% \pm 20\%$). Они имели свободный доступ к воде (автоклавируемая дистиллированная вода), и их неограниченно кормили коммерческим кормом (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, Irradiated 2018 Teklad Global 18% 18% Protein Rodent Diet), содержащим 17 ккал% жира, 23 ккал% белка и 60 ккал% углеводов. Для индуцируемого рационом ожирения мышей C57BL6/J (Jackson Laboratory) содержали на корме с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet, New Brunswick, NJ, USA), содержащем 60 ккал% жира, 20 ккал% белка и 20 ккал% углеводов, в течение 16-20 недель. Все исследования на животных были одобрены институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию NGM.

[0214] ДНК и аминокислотные последовательности. кДНК ORF, кодирующей варианты FGF19 человека (*Homo sapiens* FGF19, номер доступа GeneBank NM_005117.2).

[0215] ПЦР последовательности белка, кодируемой кДНК с номером доступа GeneBank NP 005108.1). ORF FGF19 амплифицировали полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием рекомбинантной ДНК (кДНК), получаемой из ткани тонкого кишечника человека. Наборы реагентов ПЦР с высокоточной ДНК-полимеразой Phusion приобретали от New England BioLabs (F-530L, Ipswich, MA). Использовали следующие ниже праймеры: прямой праймер ПЦР: 5' CCGACTAGTCACCatgaggagcggg tgtgtgg и обратный праймер ПЦР: 5' ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTCTCAAAGCTGG GACTCCTC.

[0216] Амплифицированный фрагмент ДНК расщепляли ферментами рестрикции Spe I и Not I (участки рестрикции содержались в 5'- или 3'-праймерах ПЦР, соответственно), а затем лигировали с трансгенными векторами AAV, которые расщепляли такими же ферментами рестрикции. Используемый для экспрессии вектор содержал селектируемый маркер, и экспрессирующая кассета состояла из сильного эукариотического 5'-промотора участка для вставки клонируемой кодирующей последовательности, за которым следовала 3'-нетранслируемая область и полиаденилированный хвост бычьего гормона роста. Экспрессирующая конструкция являлась также фланкированной внутренними концевыми повторами на 5'- и 3'-концах.

[0217] Получение и очистка AAV. Клетки AAV293 (полученные от Agilent Technologies, Santa Clara, CA) культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM, Mediatech, Inc. Manassas, VA) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1х раствора антибиотика-противогрибкового средства (Mediatech, Inc. Manassas, VA). Клетки высевали при плотности 50% на сутки 1 в 150 мм планшеты для клеточных культур и трансфицировали на сутки 2 способом осаждения фосфатом кальция следующими 3 плазмидами (каждая 20 мкг/планшет): трансгенной плазмидой AAV, плазмидами pHelper (Agilent Technologies) и плазмидой AAV2/9 (Gao et al., J. Virol., 78: 6381 (2004)). Через 48 часов после трансфекции клетки соскабливали с планшетов, осаждали центрифугированием при 3000xg и ресуспендировали в буфере, содержащем 20 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl и 1 mM MgCl₂. Суспензию замораживали на спиртовой бане с сухим льдом, а затем размораживали на водяной бане при 37°C. Циклы замораживания и оттаивания повторяли три раза, добавляли бензоназу (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) до 50 единиц/мл, добавляли дезоксихолат до конечной концентрации 0,25%. После инкубации при 37°C в течение 30 минут клеточный детрит осаждали центрифугированием при 5000xg в течение 20 минут. Вирусные частицы в супернатанте очищали с использованием ступенчатого градиента йодиксанола (Sigma-aldrich, St. Louis, MO), как описано ранее (Zolotukhin S. et al., (1999) Gene Ther., 6:973). Исходный раствор вируса концентрировали с использованием Vivaspin 20 (порог ММ 100000 Дальтон, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France) и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 10% глицерина, и хранили при -80°C. Для определения числа копий вирусного генома, 2 мкл исходного раствора вируса инкубировали в 6 мкл раствора, содержащего 50 единиц/мл бензоназы, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂ и 10 mM CaCl₂ при 37°C в течение 30 минут.

[0218] Затем добавляли 15 мкл раствора, содержащего 2 мг/мл протеиназы К, 0,5% SDS и 25 mM ЭДТА, и инкубировали смесь еще 20 минут при 55°C для высвобождения вирусной ДНК. Вирусную ДНК очищали с использованием набора mini DNeasy (Qiagen, Valencia, CA) и элюировали 40 мкл воды. Копии вирусного генома (GC) определяли

количественной ПЦР.

[0219] Исходный раствор вируса разбавляли PBS до желаемого GC/мл. Рабочий раствор вируса (200 мкл) доставляли мышам посредством инъекции в хвостовую вену.

[0220] Анализ уровня глюкозы в крови. Уровень глюкозы в крови в обрезанном кончике хвоста мышей измеряли с использованием тестовых полосок ACCU-CHEK Active, считываемых ACCU-CHEK Active meter (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) по инструкциям производителя.

[0221] Анализ липидного профиля. Цельную кровь из обрезанных кончиков хвостов мышей собирали в прозрачные капиллярные трубки (BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickinson и Co. Sparks, MD). Сыворотку и клетки крови разделяли центрифугированием трубок в Autocrit Ultra 3 (Becton Dickinson и Co. Sparks, MD). Образцы сыворотки анализировали в отношении липидного профиля (триглицерид, общий холестерин, HDL и не-HDL) с использованием клинического анализатора Integra 400 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) по инструкциям производителя.

[0222] Анализ уровня экспозиции FGF19/FGF21/вариантов в сыворотке. Цельную кровь (приблизительно 50 мкл/мышь) из обрезанных кончиков хвостов мышей собирали в прозрачные капиллярные трубки (BD Clay Adams SurePrep, Becton Dickinson и Co. Sparks, MD). Сыворотку и клетки крови разделяли центрифугированием трубок в Autocrit Ultra 3 (Becton Dickinson и Co. Sparks, MD). Уровни экспозиции в сыворотке FGF19, FGF21 и вариант экспозиции определяли с использованием наборов EIA (Biovendor) по инструкциям производителя.

[0223] Анализ печеночноклеточной карциномы (НСС). Образцы печени собирали у мышей db/db через 6 месяцев после инъекции AAV. Баллы НСС регистрировали в виде числа узлов НСС на поверхности всей печени мышей, которым инъецировали варианты, разделенного на число узлов НСС у мышей, которым инъецировали FGF19 дикого типа.

[0224] Анализ экспрессии генов в печени. Собирали образцы печени и гомогенизировали в реагенте тризол (Invitrogen). Тотальную РНК экстрагировали по инструкции производителя. РНК обрабатывали ДНКазой (Ambion) с последующим анализом количественной ПЦР с обратной транскрипцией с использованием праймеров Taqman и реагентов от Applied Biosystems. Относительные уровни мРНК альдокеторедуктазы и slc1a2 в печени рассчитывали способом $\Delta\Delta C_t$.

[0225] Анализы связывания и активности FGFR4. Твердофазный ELISA (связывание) и анализ фосфорилирования ERK проводили с использованием очищенных рекомбинантных белков. Анализ связывания FGFR проводили твердофазным ELISA. В кратком изложении, 96-луночные планшеты покрывали 2 мкг/мл антитела против hFc и инкубировали с 1 мкг/мл FGFR-hFc или FGFR4-hFc. Связывание с вариантами FGF19 в присутствии 1 мкг/мл растворимого бета-клотона и 20 мкг/мл гепарина детектировали биотинилированными антителами против FGF19 (0,2 мкг/мл) с последующей инкубацией стрептавидином-HRP (100 нг/мл). Для анализа активации FGFR4 клетки Нер3В стимулировали вариантами FGF19 в течение 10 минут при 37°C, затем немедленно лизировали и оценивали фосфорилирование ERK с использованием коммерчески доступного набора от Cis-Bio.

Пример 2

[0226] Ниже описаны исследования, демонстрирующие снижающую уровень глюкозы активность различных вариантов последовательности FGF19 и FGF21 и слитых конструкций FGF19/FGF21.

[0227] На фигуре 2 проиллюстрированы примерные слитые конструкции FGF19/FGF21 и сегменты каждого из FGF19 и FGF21, содержащиеся в слитых пептидах. Эти

пептиды анализировали в отношении снижающей уровень глюкозы активности и статистически значимой повышающей или увеличивающей уровень липидов активности (таблицы 1-8 и фигура 1).

[0228] Мышам (db/db) инъекцировали вирусный вектор, экспрессирующий FGF19, FGF21 или варианты, и анализировали после инъекции. Снижающая уровень глюкозы активность каждой последовательности представлена символом "+" ("-" символ означает отсутствие снижающей уровень глюкозы активности, символ "+/-" означает, что варианты сохраняют минимальную снижающую уровень глюкозы активность), повышающая уровень липидов активность представлена символом "+" ("-" символ означает отсутствие повышающей уровень липидов активности, символ "+/-" означает, что варианты сохраняют минимальную повышающую уровень липидов активность, фигура 2).

[0229] Два слияния FGF21 и FGF19, обозначаемые как вариант M5 и вариант 45 (M45), демонстрировали снижающую уровень глюкозы активность и отсутствие статистически значимой повышающей или увеличивающей уровень липидов активности. Варианты, обозначаемые как M1, M2 и M69, соответственно (фигура 1), также демонстрировали снижающую уровень глюкозы активность (фигуры 3B и 3C, таблица 5). Сопоставление данных снижающей уровень глюкозы активности M5, M1, M2 и M69 и повышающей или увеличивающей уровень липидов активности для FGF19 и FGF21 проиллюстрированы на фигурах 3A-3C и 4A-4C.

Пример 3

[0230] Ниже описаны исследования, демонстрирующие, что варианты M5, M1, M2 и M69 не являются опухоленными, как определено по образованию печеночноклеточной карциномы (HCC), и что варианты M5, M2 и M69 также не снижают сухую мышечную массу и жировую массу.

[0231] Животных (db/db) инъекцировали векторами AAV, экспрессирующими FGF19, FGF21, M5, M1, M2 или M69, или инъекцировали физиологическим раствором и анализировали через 6 месяцев после инъекции. Данные указывают на то, что варианты M5, M1, M2 и M69 не индуцируют значительного образования (HCC) (фигуры 5A-5C).

[0232] Животным (мышам db/db) также инъекцировали вирусный вектор, экспрессирующий FGF19, FGF21, M5, M1, M2 или M69, или инъекцировали физиологический раствор и анализировали через 6 месяцев после инъекции в отношении эффекта на массу нежировых тканей и жировую массу. Данные указывают на то, что пептиды M5, M2 и M69 не вызывают статистически значимого снижения массы нежировых тканей или жировой массы в отличие от FGF21 и что пептид M1 снижает массу нежировых тканей (фигуры 6A-6C).

Пример 4

[0233] Ниже представлено краткое описание данных 25 дополнительных вариантов пептидов, анализируемых в отношении повышающей уровень липидов активности и образования опухоли. Данные ясно демонстрируют положительную корреляцию между повышением уровня липидов и образованием опухоли, как определено по образованию печеночноклеточной карциномы (HCC) у мышей db/db.

[0234] В таблицах с 1 по 3 представлены данные для 26 различных вариантов пептидов. Такие иллюстративные варианты пептидов содержат C-концевую последовательность FGF19:

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALLRTVAIKGVHHSVRYLCMGADGKM
QGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML

PMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFЕК на С-концевом участке, например, после аминокислотных остатков "TSG". Следует отметить, что варианты пептидов (всего 7, включая M5), которые не вызывали статистически значимого повышения уровня липидов не индуцировали образование печеночноклеточной карциномы (HCC). В противоположность этому, все варианты пептидов (всего 17), которые вызывали статистически значимое повышение липидов, также вызывали образование печеночноклеточной карциномы (HCC) у мышей. Эти данные указывают на то, что существует сильная положительная корреляция между повышающей уровень липидов активностью и образованием печеночноклеточной карциномы (HCC). Таким образом, повышающую уровень липидов активность можно использовать в качестве показателя и/или прогностического фактора образования печеночноклеточной карциномы (HCC) у животных.

Таблица 1

Наблюдают, что повышенные уровни триглицерида и холестерина у мышей db/db положительно коррелируют с образованием HCC

	N-концевой домен	Ядро	Повышение уровня липидов	Образование HCC
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
M74	R-----DAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M75	R-----VHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M76	R-----GDPI	RLRHLYTSG	-	-
M77	R-----	RLRHLYTSG	-	-
M78	R-----AGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M79	R-----GPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M80	R-----PHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M81	R-----HVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-

Таблица 2

Наблюдают, что повышенные уровни триглицерида и холестерина у мышей db/db положительно коррелируют с образованием HCC

	N-концевой домен	Ядро	Повышение уровня липидов	Образование HCC
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
M82	RPLAFSAAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
M83	RPLAFSDAAPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/-
M84	RPLAFSDAGAHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/-
M85	RPLAFSDAGPHVHYGAGDPI	RLRHLYTSG	-	-
M86	RPLAFSDAGPHVHYGWGAPI	RLRHLYTSG	+	+
M87	RPLAFSDAGPHVHYGWGDAI	RLRHLYTSG	+	+

Таблица 3

Наблюдают, что повышенные уровни триглицерида и холестерина у мышей db/db положительно коррелируют с образованием HCC

	N-концевой домен	Ядро	Повышение уровня липидов	Образование HCC
	FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	+	+
	FGF21	HPIDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	-	-
5	H31A/S141A (M88)	FGF19	+	+
	H31A/H142A (M89)	FGF19	+	+
	K127A/R129A (M90)	FGF19	+	+
	K127A/S141A (M91)	FGF19	+	+
	K127A/H142A (M92)	FGF19	+	+
10	R129A/S141A (M93)	FGF19	+	+
	S141A/H142A (M94)	FGF19	+	+
	K127A/H142A (M95)	FGF19	+	+
	K127A/R129A/S141A (M97)	FGF19	+	+
	K127A/R129A/H142A (M98)	FGF19	+	+
15	K127A/R129A/S141A/H142A (M99)	FGF19	+	+

Пример 5

[0235] Ниже приведено краткое описание данных дополнительных вариантов пептидов FGF19, анализируемых в отношении снижающей уровень глюкозы активности и повышающей уровень липидов активности.

[0236] В таблице 4 проиллюстрированы пептидные "коровые последовательности" 35 дополнительных вариантов FGF19, обозначаемых как M5-M40. Такие иллюстративные варианты пептидов содержат C-концевую последовательность FGF19,

PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKM
QGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGLPLSHFLPML
PMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK на C-концевом участке, например, после аминокислотных остатков "TSG" коровой последовательности. Данные ясно демонстрируют, что варианты M6, M7, M8, mM38 и M39 обладают желаемыми характеристиками снижающей уровень глюкозы активности и не обладают статистически значимой повышающей уровень липидов активностью у мышей db/db.

Таблица 4
Дополнительные варианты и тонкое картирование N-концевого домена

		N-концевой домен	Ядро	Снижение уровня глюкозы	Повышение уровня липидов
5	FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+
	FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	+	-
	M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
	M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
	M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
10	M8	R-HPIPDSSPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	+	-
	M9	R-HPIPDSSPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	M10	R-HPIPDSSPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	-	+
	M11	RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	-	+
15	M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
	M14	R-HPIPDSSPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	-	-
	M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	+	+
	M16	RPLAFSDAGPHVH--WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M17	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
20	M18	RPLAFSDAGPH--YGWGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M19	RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M20	RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M21	RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M22	RPLAFSDAGPHVH-GWGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
25	M23	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M24	RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M25	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M26	RPLAFSDSSPLVH--WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M27	RPLAFSDSSPHVH--WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
30	M28	RPLAFSDAPHV---WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M29	RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M30	RPLAFSDAGPHVHYA WGDPI	RLRHLYTSG	не обнаружено	не обнаружено
	M31	R-HPIPDSSPLLQ--FGA QV	RLRHLYTSG	+/-	-
	M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGIYQV	RLRHLYTSG	-	-
35	M33	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
	M34	R-HPIPDSSPLLQ--FG7AV	RLRHLYTSG	+/-	-
	M35	R-HPIPDSSPLLQ--FGGEV	RLRHLYTSG	+/-	+/
	M36	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+/-	-
	M37	R-HPIPDSSPLLQ--FGGUA	RLRHLYTSG	-	-
40	M38	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+	-
	M39	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+	-
	M40	R-HPIPDSSPLLQFGWGQPO	RLRHLYTSG	-	+

Таблица 4а

		N-концевой домен	Ядро	Снижение уровня глюкозы	Повышение уровня липидов	Образование HCC
35	FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	+	+	+
	FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	+	-	-
	M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-	-
	M9	R-HPIPDSSPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+	+
	M8	R-HPIPDSSPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	+	+	+
40	M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	-	+	+
	M10	R-HPIPDSSPHVHYGWDPI	RLRHLYTSG	-	+	+
	M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	+	+
	M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	-	-	+/-
	M14	R-HPIPDSSPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	-	-	+/-
45	M43	RPLAFSDAGPHVHYG-GD-I	RLRHLYTSG	-	-	+/-
	M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-	-
	M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-	-

Таблица 4b

		N-концевой домен	Ядро	Снижение уровня глюкозы	Повышение уровня липидов	Образование НСС
5	FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG		+	+	+
	FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD		+	-	-
	M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		+	-	-
	M31	R-HPIPDSSPLLQ--FGAQV RLRHLYTSG		+	-	+
	M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGDQV RLRHLYTSG		+	-	-
	M33	R-HPIPDSSPLLQ--FGPQV RLRHLYTSG		-	-	+
	M34	R-HPIPDSSPLLQ--FGGAV RLRHLYTSG		-	-	+
	M35	R-HPIPDSSPLLQ--FGGEV RLRHLYTSG		-	-	+
10	M36	R-HPIPDSSPLLQ--FGGNV RLRHLYTSG		+	-	+/-
	M37	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQA RLRHLYTSG		-	-	+
	M38	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQI RLRHLYTSG		-	-	+
	M39	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT RLRHLYTSG		-	-	+
	M40	R-HPIPDSSPLLQFGWGQPV RLRHLYTSG		-	+	+

Таблица 4c

		N-концевой домен	Ядро	Снижение уровня глюкозы	Повышение уровня липидов	Образование НСС
15	FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG		+	+	+
	FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD		+	-	-
	M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG		+	-	-
	M52	R-----DSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG		+	+	-
20	M54	RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M55	RPLAFSDAGPH--YGWGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M56	RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M57	RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M58	RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M59	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M60	RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M61	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M62	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
25	M63	RPLAFSDAGPHVH--WGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
	M64	RPLAFSDSSPLVH--WGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
	M65	RPLAFSDSSPLVH--WGDPI RLRHLYTSG		-	+	+
	M66	RPLAFSDAGPHLQ--WGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
	M67	RPLAFSDAGPHV--WGDPI RLRHLYTSG		-	-	+/-
	M68	RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI RLRHLYTSG		-	+	-
	M4	RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI RLRHLYTSG		+	+	+
30	M69	R-----DSSPLVHYGWDPI RLRHLYTSG		+	+	-
	M70	MR-----DSSPLVHYGWDPI RLRHLYTSG		+	+	-
	M53	M-----DSSPLVHYGWDPI RLRHLYTSG		+	+	-

[0237] В таблице проиллюстрированы пептидные последовательности 3 дополнительных вариантов FGF19, обозначаемых M1, M2 и M69. Данные ясно демонстрируют, что эти три варианта обладают желаемыми характеристиками снижающей уровень глюкозы активности у мышей db/db (фигуры 3B и 3C). Наблюдают, что эти три варианта повышают уровень липидов у мышей db/db (фигуры 4B и 4C).

Таблица 5

Дополнительные варианты

40	M1: RPLAFSDASPHVHYGWDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSL LEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIEIRPDGYNVYRSEK HRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMD PFGLVTGLEAVRSPSEK
45	M2: RPLAFSDSSPLVHYGWDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSL LEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIEIRPDGYNVYRSEK HRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMD PFGLVTGLEAVRSPSEK

M69:RDSSPLVHYGWGDPIRLRHLTYSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKA
VALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLP
VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGL
VTGLEAVRSPSFEEK

Пример 6

[0238] Ниже приведено краткое описание данных, демонстрирующее что FGF19 снижает массу тела у мышей с индуцированным рационом ожирением и у мышей ob/ob, и активность образования опухоли печени и массу тела у мышей db/db.

[0239] Мышам инъецировали FGF19 или FGF21 в векторе AAV. Массу тела регистрировали через 4 недели после инъекции.

Таблица 6
FGF19 снижает массу тела у мышей с индуцированным рационом ожирением и у мышей ob/ob

	N-концевой домен	Ядро	Снижение массы тела при DIO	Снижение массы тела при ob/ob
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	+	+

Таблица 7
Корреляция массы тела и образования опухоли печени FGF19, FGF21 и отобранных вариантов у мышей db/db

	N-концевой домен	Ядро	Опухолевые узлы в печени	Масса тела
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	Повышенная
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	Сниженная
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	Повышенная
M6	R-----DSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	Сниженная
M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGDQV	RLRHLYTSG	-	Сниженная
M52	R-----DSSPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	-	Сниженная
M69	R-----DSSPLVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	Повышенная

Пример 7

[0240] Ниже приведено исследование, демонстрирующее, что пептиды варианта M5 и варианта M69 снижают уровень глюкозы в крови.

[0241] Мышам (ob/ob) инъецировали (подкожно) M5 (0,1 и 1 мг/кг, п/к) или FGF19 (1 мг/кг, п/к), или вариант M69 (0,1 и 1 мг/кг, п/к) или FGF19 (1 мг/кг, п/к). Уровни глюкозы в плазме измеряли через 2, 4, 7 и 24 часов после инъекции, и результаты представлены на фигуре 7. M5 (фигура 7A) и вариант M69 (фигура 7B) демонстрировали аналогичное снижающее уровень глюкозы действие как и FGF19 дикого типа.

Пример 8

[0242] В этом примере описано исследование, демонстрирующее, что наблюдают, что экспрессия в печени семейства альдокеторедуктаз 1, члена C18 (Akr1C18) и семейства транспортера растворенных веществ 1, члена 2 (slc1a2) коррелирует с активностью в отношении HCC.

[0243] Мышам (db/db) инъецировали вирусный вектор, экспрессирующий FGF19 (HCC+), FGF21 (HCC-), dN2 (HCC-) или M5 (HCC-) или инъецировали GFP. Образцы

печени собирали и анализировали количественной ПЦР с обратной транскрипцией через 2 недели после инъекции. Данные, представленные на фигуре 8, демонстрируют, что наблюдают, что экспрессия в печени Akr1C18 и slc1a2 коррелирует с активностью в отношении НСС.

Таблица 8

Краткое описание результатов вариантов FGF19 в анализе сигнального пути на адипоцитах 3T3L1

Анализ P-Erk на адипоцитах 3T3L1	FGF19	FGF21	M5	M2	M63	M64	M1	M8
Эксперимент №1								
E _{max}	3,67	4,33	3,52	4,19	3,21	3,67	4,24	4,16
EC50 (нМ)	0,05	0,65	0,03	0,05	0,92	0,02	0,03	0,03
Эксперимент №2								
E _{max}	4,52	4,83	4,01	5,56	4,17	4,85	5,30	5,34
EC50 (нМ)	0,33	1,48	0,14	0,15	0,66	0,12	0,09	0,09
Эксперимент №3								
E _{max}	4,09	4,14	3,74	4,24	3,15	4,15	4,77	4,16
EC50 (нМ)	0,16	1,50	0,24	0,14	0,28	0,14	0,07	0,14

(57) Формула изобретения

1. Химерный пептид, который способен снижать уровни глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

2. Химерный пептид по п. 1, где пептид имеет менее чем около 250 аминокислот в длину.

3. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1.

4. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1.

5. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2.

6. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 2.

7. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 52.

8. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 52.

9. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 53.

10. Химерный пептид по п. 1, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 53.

11. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

12. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

13. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 69.

14. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 69.

15. Химерный пептид по любому из пп. 1-3, 5, 7, 9, 11 или 13, где указанный пептид

дополнительно содержит Fc-область иммуноглобулина.

16. Фармацевтическая композиция для снижения уровней глюкозы в крови у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

5 17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где композиция дополнительно содержит снижающее уровень глюкозы средство.

18. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект i) имеет уровень глюкозы в плазме натощак(FPG) более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень гемоглобина A1c (HbA1c) более 6%.

10 19. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, где гипергликемическое состояние включает диабет.

15 21. Фармацевтическая композиция по п. 20, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

22. Фармацевтическая композиция по п. 16, где диабет имеет резистентность к инсулину.

23. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект имеет гиперинсулинемию.

20 24. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

25. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект имеет метаболический синдром.

26. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект имеет ожирение.

25 27. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект имеет заболевание неалкогольного ожирения печени (NAFLD).

28. Фармацевтическая композиция по п. 16, где субъект имеет неалкогольный стеатогепатит (NASH).

29. Способ снижения уровней глюкозы в крови у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 1-14.

30 30. Способ по п. 29, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

31. Способ по п. 29, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

35 32. Способ по п. 31, где гипергликемическое состояние включает диабет.

33. Способ по п. 32, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

34. Способ по п. 29, где диабет имеет резистентность к инсулину.

35. Способ по п. 29, где субъект имеет гиперинсулинемию.

40 36. Способ по п. 29, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

37. Способ по п. 29, где субъект имеет метаболический синдром.

38. Способ по п. 29, где субъект имеет ожирение.

39. Способ по п. 29, где субъект имеет NAFLD.

40. Способ по п. 29, где субъект имеет NASH.

45 41. Применение химерного пептида по любому из пп. 1-14 для снижения уровней глюкозы у субъекта.

42. Применение по п. 41, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл

или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

43. Применение по п. 41, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

44. Применение по п. 43, где гипергликемическое состояние включает диабет.

45. Применение по п. 44, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

46. Применение по п. 41, где диабет имеет резистентность к инсулину.

47. Применение по п. 41, где субъект имеет гиперинсулинемию.

48. Применение по п. 41, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

49. Применение по п. 41, где субъект имеет метаболический синдром.

50. Применение по п. 41, где субъект имеет ожирение.

51. Применение по п. 41, где субъект имеет NAFLD.

52. Применение по п. 41, где субъект имеет NASH.

53. Химерный пептид для лечения гипергликемического состояния у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

54. Химерный пептид по п. 53, где пептид имеет менее чем около 250 аминокислот в длину.

55. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1.

56. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1.

57. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2.

58. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 2.

59. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 52.

60. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 52.

61. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 53.

62. Химерный пептид по п. 53, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 53.

63. Химерный пептид для лечения гипергликемии у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

64. Химерный пептид для лечения гипергликемии у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

65. Химерный пептид для лечения гипергликемии у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 69.

66. Химерный пептид для лечения гипергликемии у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 69.

67. Химерный пептид по любому из пп. 53-55, 57, 59, 61, 63 или 65, где указанный пептид дополнительно содержит Fc-область иммуноглобулина.

68. Фармацевтическая композиция для лечения гипергликемического состояния у субъекта, содержащая эффективное количество химерного пептида по любому из пп. 53-66 и фармацевтически приемлемого носителя.

69. Фармацевтическая композиция по п. 68, где композиция дополнительно содержит

снижающее уровень глюкозы средство.

70. Фармацевтическая композиция по п. 68, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень гемоглобина A1c (HbA1c) более 6%.

5 71. Фармацевтическая композиция по п. 68, где гипергликемическое состояние включает диабет.

72. Фармацевтическая композиция по п. 71, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

73. Фармацевтическая композиция по п. 68, где диабет имеет резистентность к
10 инсулину.

74. Фармацевтическая композиция по п. 68, где субъект имеет гиперинсулинемию.

75. Фармацевтическая композиция по п. 68, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

76. Фармацевтическая композиция по п. 68, где субъект имеет метаболический
15 синдром.

77. Фармацевтическая композиция по п. 68, где субъект имеет ожирение.

78. Фармацевтическая композиция по п. 68, где субъект имеет NAFLD.

79. Фармацевтическая композиция по п. 68, где субъект имеет NASH.

80. Способ лечения гипергликемического состояния у субъекта, включающий введение
20 субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 53-66.

81. Способ по п. 80, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

82. Способ по п. 80, где гипергликемическое состояние включает диабет.

25 83. Способ по п. 82, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

84. Способ по п. 80, где диабет имеет резистентность к инсулину.

85. Способ по п. 80, где субъект имеет гиперинсулинемию.

86. Способ по п. 80, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

30 87. Способ по п. 80, где субъект имеет метаболический синдром.

88. Способ по п. 80, где субъект имеет ожирение.

89. Способ по п. 80, где субъект имеет NAFLD.

90. Способ по п. 80, где субъект имеет NASH.

35 91. Применение химерного пептида по любому из пп. 53-66 для снижения уровней глюкозы у субъекта.

92. Применение по п. 91, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

93. Применение по п. 91, где гипергликемическое состояние включает диабет.

40 94. Применение по п. 93, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

95. Применение по п. 91, где диабет имеет резистентность к инсулину.

96. Применение по п. 91, где субъект имеет гиперинсулинемию.

97. Применение по п. 91, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

45 98. Применение по п. 91, где субъект имеет метаболический синдром.

99. Применение по п. 91, где субъект имеет ожирение.

100. Применение по п. 91, где субъект имеет NAFLD.

101. Применение по п. 91, где субъект имеет NASH.

102. Химерный пептид для улучшения метаболизма глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

5 103. Химерный пептид по п. 102, где пептид имеет менее чем около 250 аминокислот в длину.

104. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1.

105. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1.

10 106. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2.

107. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 2.

15 108. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 52.

109. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 52.

110. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 53.

20 111. Химерный пептид по п. 102, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 53.

112. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

25 113. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

114. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 69.

115. Химерный пептид для снижения уровней глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 69.

30 116. Химерный пептид по любому из пп. 102-104, 106, 108, 110, 112 или 114, где указанный пептид дополнительно содержит Fc-область иммуноглобулина.

117. Фармацевтическая композиция для улучшения метаболизма глюкозы у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 102-115 и фармацевтически приемлемый носитель.

35 118. Фармацевтическая композиция по п. 117, где композиция дополнительно содержит снижающее уровень глюкозы средство.

119. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект i) имеет уровень глюкозы в плазме натощак (FPG) более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень гемоглобина 40 A1c (HbA1c) более 6%.

120. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

121. Фармацевтическая композиция по п. 120, где гипергликемическое состояние включает диабет.

45 122. Фармацевтическая композиция по п. 121, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

123. Фармацевтическая композиция по п. 117, где диабет имеет резистентность к инсулину.

124. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект имеет гиперинсулинемию.

125. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

5 126. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект имеет метаболический синдром.

127. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект имеет ожирение.

128. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект имеет NAFLD.

129. Фармацевтическая композиция по п. 117, где субъект имеет NASH.

10 130. Способ улучшения метаболизма глюкозы у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 102-115.

131. Способ по п. 130, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

132. Способ по п. 130, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

15 133. Способ по п. 132, где гипергликемическое состояние включает диабет.

134. Способ по п. 133, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

135. Способ по п. 130, где диабет имеет резистентность к инсулину.

136. Способ по п. 130, где субъект имеет гиперинсулинемию.

20 137. Способ по п. 130, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

138. Способ по п. 130, где субъект имеет метаболический синдром.

139. Способ по п. 130, где субъект имеет ожирение.

140. Способ по п. 130, где субъект имеет NAFLD.

141. Способ по п. 130, где субъект имеет NASH.

25 142. Применение химерного пептида по любому из пп. 102-115 для снижения уровней глюкозы у субъекта.

143. Применение по п. 142, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

30 144. Применение по п. 142, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

145. Применение по п. 144, где гипергликемическое состояние включает диабет.

146. Применение по п. 145, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

147. Применение по п. 142, где диабет имеет резистентность к инсулину.

35 148. Применение по п. 142, где субъект имеет гиперинсулинемию.

149. Применение по п. 142, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

150. Применение по п. 142, где субъект имеет метаболический синдром.

151. Применение по п. 142, где субъект имеет ожирение.

152. Применение по п. 142, где субъект имеет NAFLD.

40 153. Применение по п. 142, где субъект имеет NASH.

154. Химерный пептид для лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

45 155. Химерный пептид по п. 154, где пептид имеет менее чем около 250 аминокислот в длину.

156. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1.

157. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1.

158. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2.

5 159. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 2.

160. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 52.

10 161. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 52.

162. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 53.

163. Химерный пептид по п. 154, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 53.

15 164. Химерный пептид для лечения NASH у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

165. Химерный пептид для лечения NASH у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

20 166. Химерный пептид для лечения NASH у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 69.

167. Химерный пептид для лечения NASH у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 69.

168. Химерный пептид по любому из пп. 154-156, 158, 160, 162, 164 или 166, где указанный пептид дополнительно содержит Fc-область иммуноглобулина.

25 169. Фармацевтическая композиция для лечения NASH у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 154-167 и фармацевтически приемлемый носитель.

170. Фармацевтическая композиция по п. 169, где композиция дополнительно содержит снижающее уровень глюкозы средство.

30 171. Фармацевтическая композиция по п. 169, где субъект i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень гемоглобина A1c (HbA1c) более 6%.

172. Фармацевтическая композиция по п. 169, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

35 173. Фармацевтическая композиция по п. 172, где гипергликемическое состояние включает диабет.

174. Фармацевтическая композиция по п. 173, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

40 175. Фармацевтическая композиция по п. 169, где диабет имеет резистентность к инсулину.

176. Фармацевтическая композиция по п. 169, где субъект имеет гиперинсулинемию.

177. Фармацевтическая композиция по п. 169, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

45 178. Фармацевтическая композиция по п. 169, где субъект имеет метаболический синдром.

179. Фармацевтическая композиция по п. 169, где субъект имеет ожирение.

180. Способ лечения NASH у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 154-167.

181. Способ по п. 180, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

182. Способ по п. 180, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

5 183. Способ по п. 182, где гипергликемическое состояние включает диабет.

184. Способ по п. 183, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

185. Способ по п. 180, где диабет имеет резистентность к инсулину.

186. Способ по п. 180, где субъект имеет гиперинсулинемию.

10 187. Способ по п. 180, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

188. Способ по п. 180, где субъект имеет метаболический синдром.

189. Способ по п. 180, где субъект имеет ожирение.

190. Применение химерного пептида по любому из пп. 154-167 для лечения NASH у субъекта.

15 191. Применение по п. 190, где субъект (i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

192. Применение по п. 190, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

193. Применение по п. 192, где гипергликемическое состояние включает диабет.

20 194. Применение по п. 193, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

195. Применение по п. 190, где диабет имеет резистентность к инсулину.

196. Применение по п. 190, где субъект имеет гиперинсулинемию.

197. Применение по п. 190, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

25 198. Применение по п. 190, где субъект имеет метаболический синдром.

199. Применение по п. 190, где субъект имеет ожирение.

200. Химерный пептид, который не повышает или не индуцирует образование печеночноклеточной карциномы (HCC) у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

30 201. Химерный пептид по п. 200, где пептид имеет менее чем около 250 аминокислот в длину.

202. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1.

35 203. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1.

204. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2.

40 205. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 2.

206. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 52.

207. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 52.

45 208. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 53.

209. Химерный пептид по п. 200, где указанный пептид имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 53.

210. Химерный пептид, который не повышает или не индуцирует образование НСС у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

211. Химерный пептид, который не повышает или не индуцирует образование НСС у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

212. Химерный пептид, который не повышает или не индуцирует образование НСС у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 69.

213. Химерный пептид, который не повышает или не индуцирует образование НСС у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 69.

214. Химерный пептид по любому из пп. 200-202, 204, 206, 208, 210 или 212, где указанный пептид дополнительно содержит Fc-область иммуноглобулина.

215. Фармацевтическая композиция, которая не повышает или не индуцирует образование НСС у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 200-213 и фармацевтически приемлемый носитель.

216. Фармацевтическая композиция по п. 215, где композиция дополнительно содержит снижающее уровень глюкозы средство.

217. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект i) имеет уровень FPG более чем 100 мг/дл, (ii) имеет уровень FPG более чем 125 мг/дл, (iii) имеет уровень FPG между 100 и 125 мг/дл или (iv) имеет уровень HbA1c более 6%.

218. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект имеет гипергликемическое состояние.

219. Фармацевтическая композиция по п. 218, где гипергликемическое состояние включает диабет.

220. Фармацевтическая композиция по п. 219, где диабет представляет собой инсулинозависимый (I типа) диабет, диабет II типа, гестационный диабет или предиабет.

221. Фармацевтическая композиция по п. 215, где диабет имеет резистентность к инсулину.

222. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект имеет гиперинсулинемию.

223. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект имеет непереносимость глюкозы.

224. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект имеет метаболический синдром.

225. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект имеет ожирение.

226. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект имеет NAFLD.

227. Фармацевтическая композиция по п. 215, где субъект имеет NASH.

228. Химерный пептид для лечения резистентности инсулина у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

229. Химерный пептид по п. 228, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 1.

230. Химерный пептид по п. 228, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 2.

231. Химерный пептид по п. 228, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 52.

232. Химерный пептид по п. 228, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ

ID NO: 53.

233. Химерный пептид по п. 228, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 69.

234. Химерный пептид для лечения резистентности инсулина у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

235. Химерный пептид для лечения резистентности инсулина у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

236. Фармацевтическая композиция для лечения резистентности к инсулину у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 228-235 и фармацевтически приемлемый носитель.

237. Способ лечения резистентности к инсулину у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 228-235.

238. Применение химерного пептида по любому из пп. 228-235 для лечения резистентности к инсулину у субъекта.

239. Химерный пептид для лечения гиперинсулинемии у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

240. Химерный пептид по п. 239, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 1.

241. Химерный пептид по п. 239, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 2.

242. Химерный пептид по п. 239, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 52.

243. Химерный пептид по п. 239, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 53.

244. Химерный пептид по п. 239, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 69.

245. Химерный пептид для лечения гиперинсулинемии у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

246. Химерный пептид для лечения гиперинсулинемии у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

247. Фармацевтическая композиция для лечения гиперинсулинемии у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 239-246 и фармацевтически приемлемый носитель.

248. Способ лечения гиперинсулинемии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 239-246.

249. Применение химерного пептида по любому из пп. 239-246 для лечения гиперинсулинемии у субъекта.

250. Химерный пептид для лечения непереносимости глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

251. Химерный пептид по п. 250, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 1.

252. Химерный пептид по п. 250, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 2.

253. Химерный пептид по п. 250, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 52.

254. Химерный пептид по п. 250, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ

ID NO: 53.

255. Химерный пептид по п. 250, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 69.

256. Химерный пептид для лечения непереносимости у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

257. Химерный пептид для лечения непереносимости глюкозы у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

258. Фармацевтическая композиция для лечения непереносимости глюкозы у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 250-257 и фармацевтически приемлемый носитель.

259. Способ лечения непереносимости глюкозы у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 250-257.

260. Применение химерного пептида по любому из пп. 250-257 для лечения непереносимости глюкозы у субъекта.

261. Химерный пептид для лечения метаболического синдрома у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

262. Химерный пептид по п. 261, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 1.

263. Химерный пептид по п. 261, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 2.

264. Химерный пептид по п. 261, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 52.

265. Химерный пептид по п. 261, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 53.

266. Химерный пептид по п. 261, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 69.

267. Химерный пептид для лечения метаболического синдрома у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

268. Химерный пептид для лечения метаболического синдрома у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

269. Фармацевтическая композиция для лечения метаболического синдрома у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 261-268 и фармацевтически приемлемый носитель.

270. Способ лечения метаболического синдрома у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 261-268.

271. Применение химерного пептида по любому из пп. 261-268 для лечения гиперинсулинемии у субъекта.

272. Химерный пептид для лечения ожирения у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

273. Химерный пептид по п. 272, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 1.

274. Химерный пептид по п. 272, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 2.

275. Химерный пептид по п. 272, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 52.

276. Химерный пептид по п. 272, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ

ID NO: 53.

277. Химерный пептид по п. 272, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 69.

278. Химерный пептид для лечения ожирения у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

279. Химерный пептид для лечения ожирения у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

280. Фармацевтическая композиция для лечения ожирения у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 272-279 и фармацевтически приемлемый носитель.

281. Способ лечения ожирения у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 272-279.

282. Применение химерного пептида по любому из пп. 272-279 для лечения ожирения у субъекта.

283. Химерный пептид для лечения заболевания неалкогольного ожирения печени (NAFLD) у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70.

284. Химерный пептид по п. 283, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 1.

285. Химерный пептид по п. 283, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 2.

286. Химерный пептид по п. 283, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 52.

287. Химерный пептид по п. 283, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 53.

288. Химерный пептид по п. 283, где указанный пептид содержит или состоит из SEQ ID NO: 69.

289. Химерный пептид для лечения NAFLD у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 70.

290. Химерный пептид для лечения NAFLD у субъекта, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 70.

291. Фармацевтическая композиция для лечения NAFLD у субъекта, содержащая в эффективном количестве химерный пептид по любому из пп. 283-290 и фармацевтически приемлемый носитель.

292. Способ лечения NAFLD у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного пептида по любому из пп. 283-290.

293. Применение химерного пептида по любому из пп. 283-290 для лечения NAFLD у субъекта.

294. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный пептид по любому из пп. 1-14, 53-66, 102-115, 154-167, 200-213, 228-235, 239-246, 250-257, 261-268, 272-279 или 283-290.

295. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 294.

296. Вектор экспрессии по п. 295, где вектор дополнительно содержит элемент контроля экспрессии в функциональной связи, которая обеспечивает экспрессию кодирующей пептид молекулы нуклеиновой кислоты *in vitro* или *in vivo*.

297. Вектор экспрессии по п. 295, где вектор представляет собой вирусный вектор.

298. Клетка-хозяин для экспрессии химерного пептида по любому из пп. 1-14, 53-66,

102-115, 154-167, 200-213, 228-235, 239-246, 250-257, 261-268, 272-279 или 283-290, содержащая вектор экспрессии по п. 295.

299. Клетка-хозяин для экспрессии химерного пептида по любому из пп. 1-14, 53-66, 102-115, 154-167, 200-213, 228-235, 239-246, 250-257, 261-268, 272-279 или 283-290, 5 содержащая вектор экспрессии по п. 296.

300. Клетка-хозяин для экспрессии химерного пептида по любому из пп. 1-14, 53-66, 102-115, 154-167, 200-213, 228-235, 239-246, 250-257, 261-268, 272-279 или 283-290, содержащая вектор экспрессии по п. 297.

10

15

20

25

30

35

40

45

ФИГ. 1

FGF19

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKH
RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSEK

FGF21

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
S

M5

HPIPDSSPLLQFGGQVRRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
LRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVT
GLEAVRSPSEK

M71

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
S

M72

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA
S

M73

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP
GNKSPHRDPAPRGPAPFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVVQDELQGVGG
EGCHMHPENCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE

M1

RPLAFSDASPHVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI
KAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKH
RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSEK

ФИГ. 1 (продолжение)

M2

RPLAFSDSSPLVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIK
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKH
RLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

M69

RDSSPLVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA
LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVT
GLEAVRSPSFKE

M3

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIK
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEILEDGYNVYRSEKH
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

M48

RDSSPLLQFGGQVRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

M49

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIK
VALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRL
PVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

M50

RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEILEDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

M51

RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

M52

RDSSPLLQWGDPIRLRLHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP
FGLVTGLEAVRSPSFKE

ФИГ. 1 (продолжение)

M53

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGL
EAVRSPSFEK

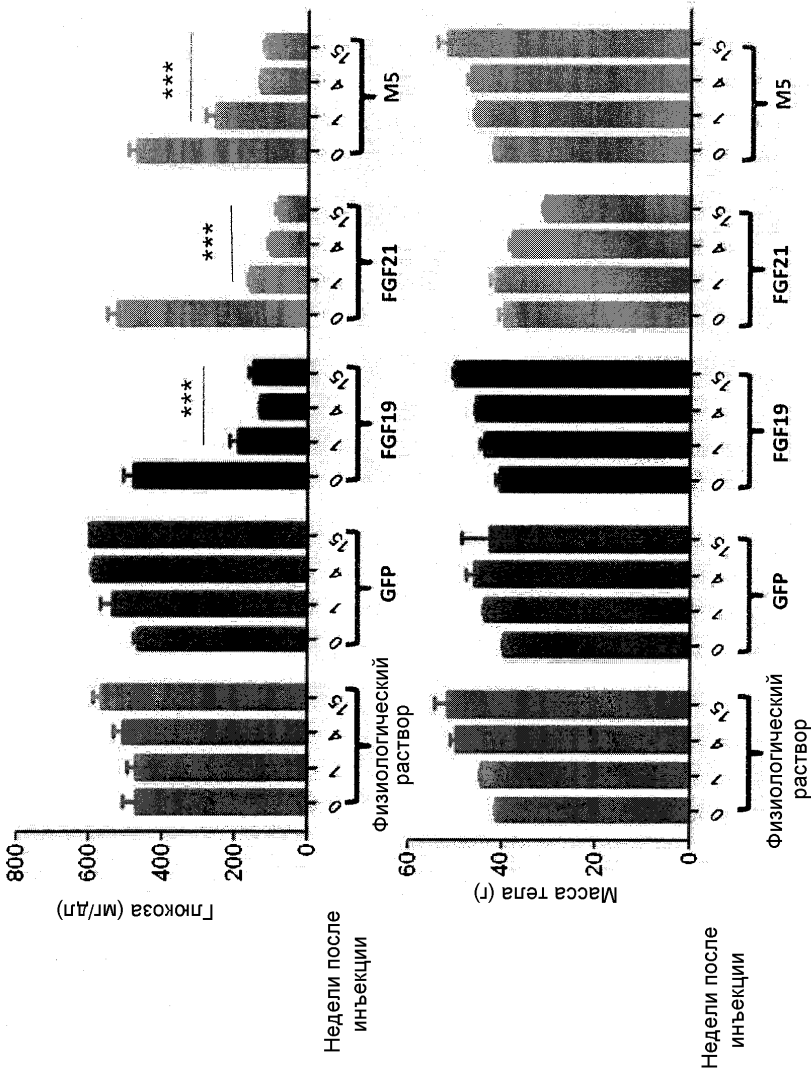
M70

MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPV
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV
TGLEAVRSPSFEK

ФИГ. 2

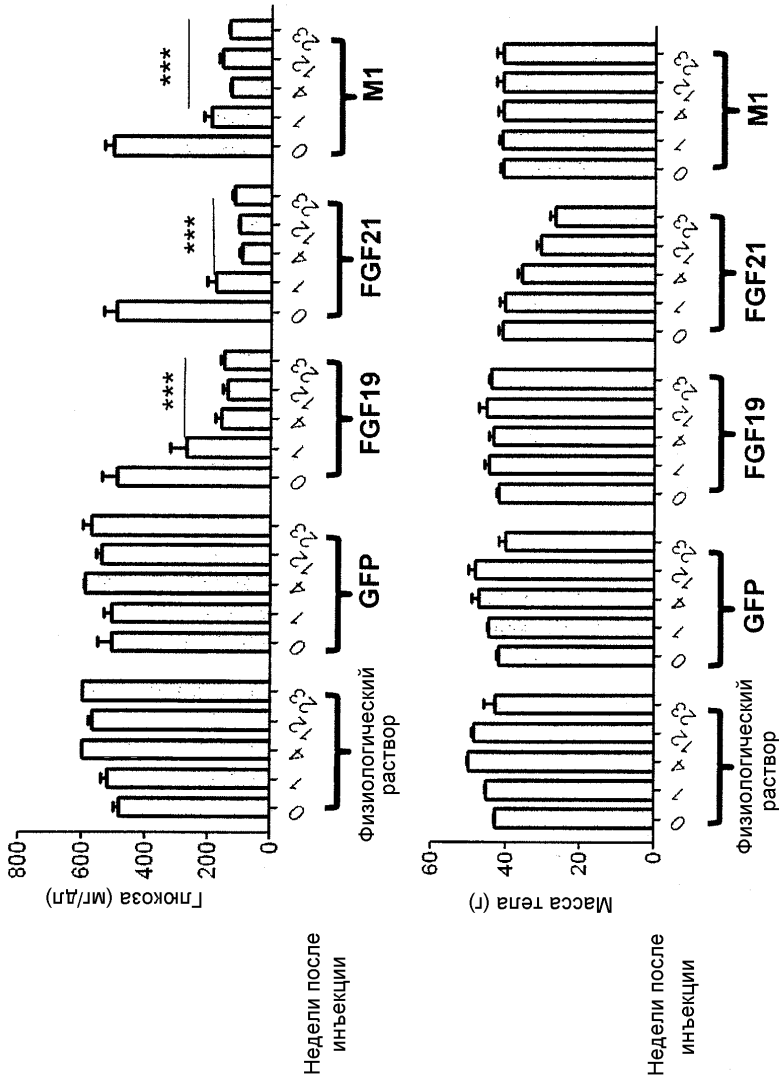
<u>FGF21</u> (положение аминокислоты)	<u>FGF19</u>	Снижение уровня глюкозы	Повышение уровня липидов
1-181	FGF21	+	-
-	FGF19	+	+
1-16	M5	+	-
147-181	M41	+/-	+
1-16 & 147-181	M42	-	-
17-181	M44	+	+
1-146	M45	+	-
17-146	M46	+/-	-

ФИГ. 3А

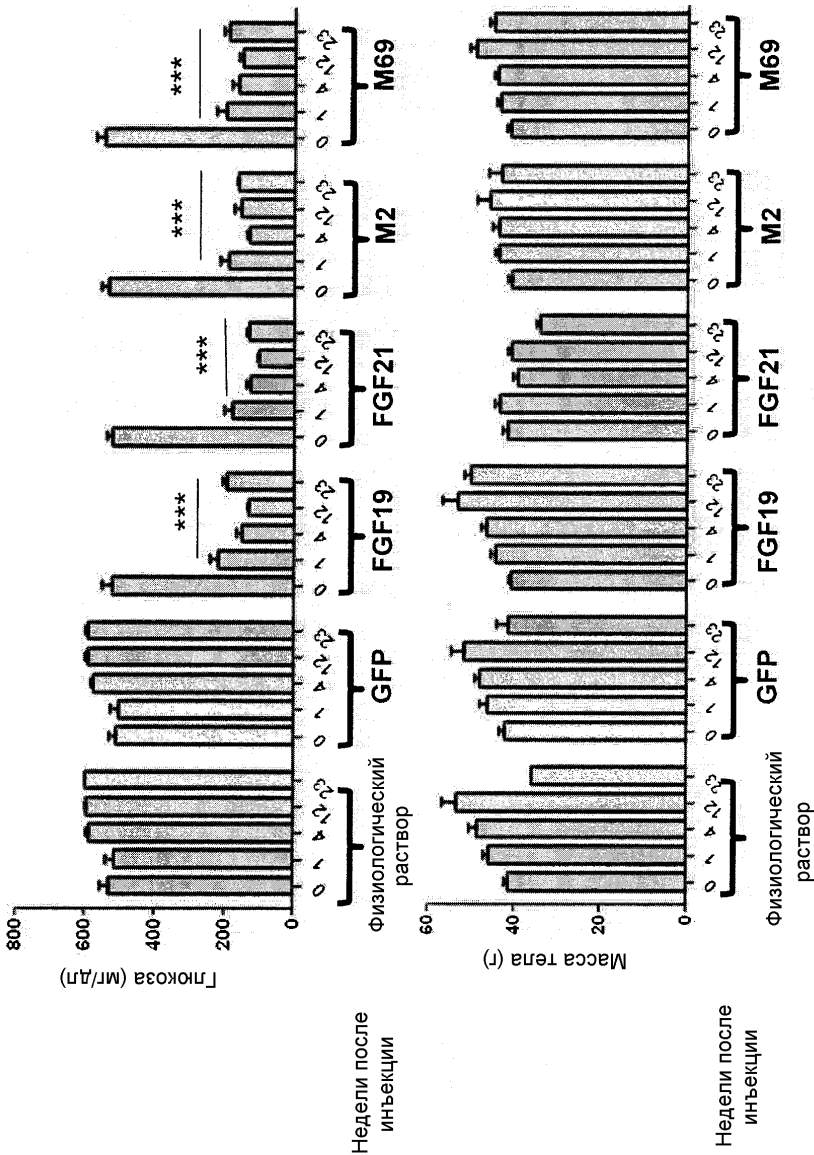


(***P<0.001 в сравнении с физиологическим раствором)

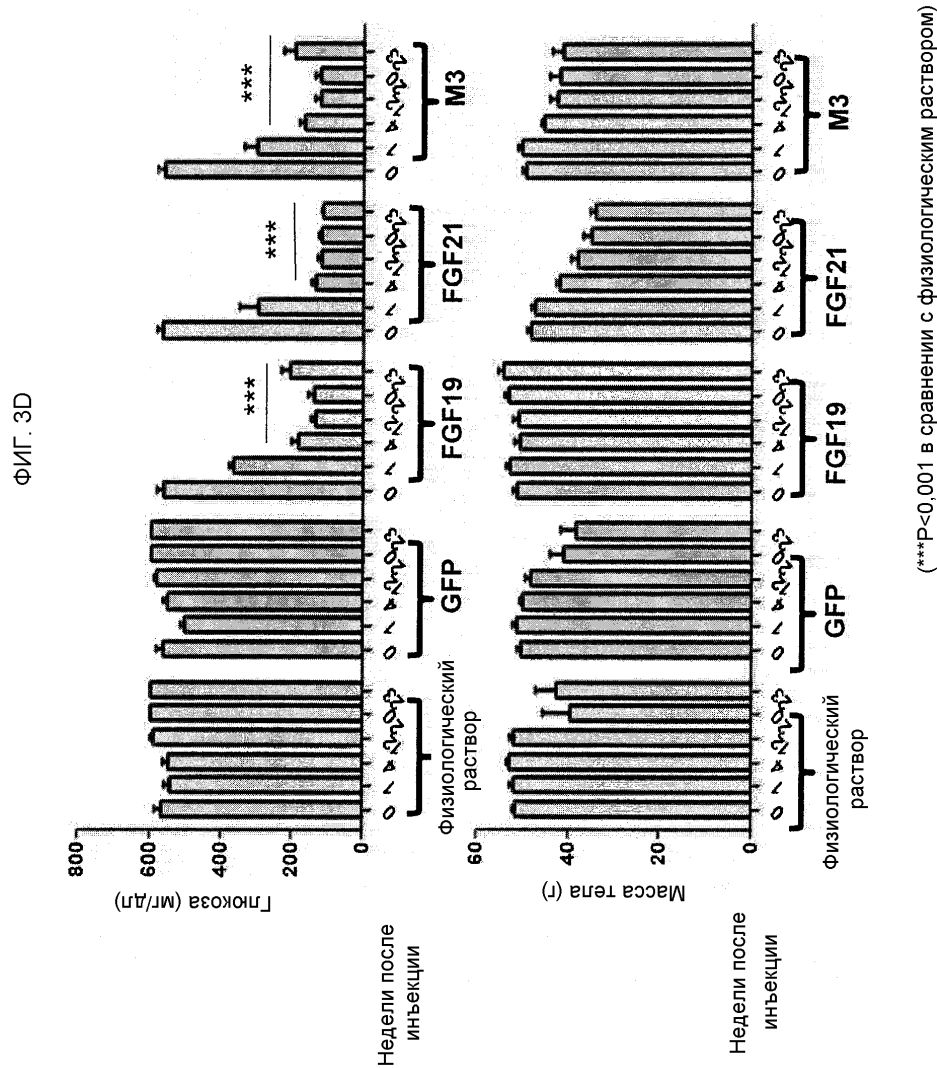
ФИГ. 3В



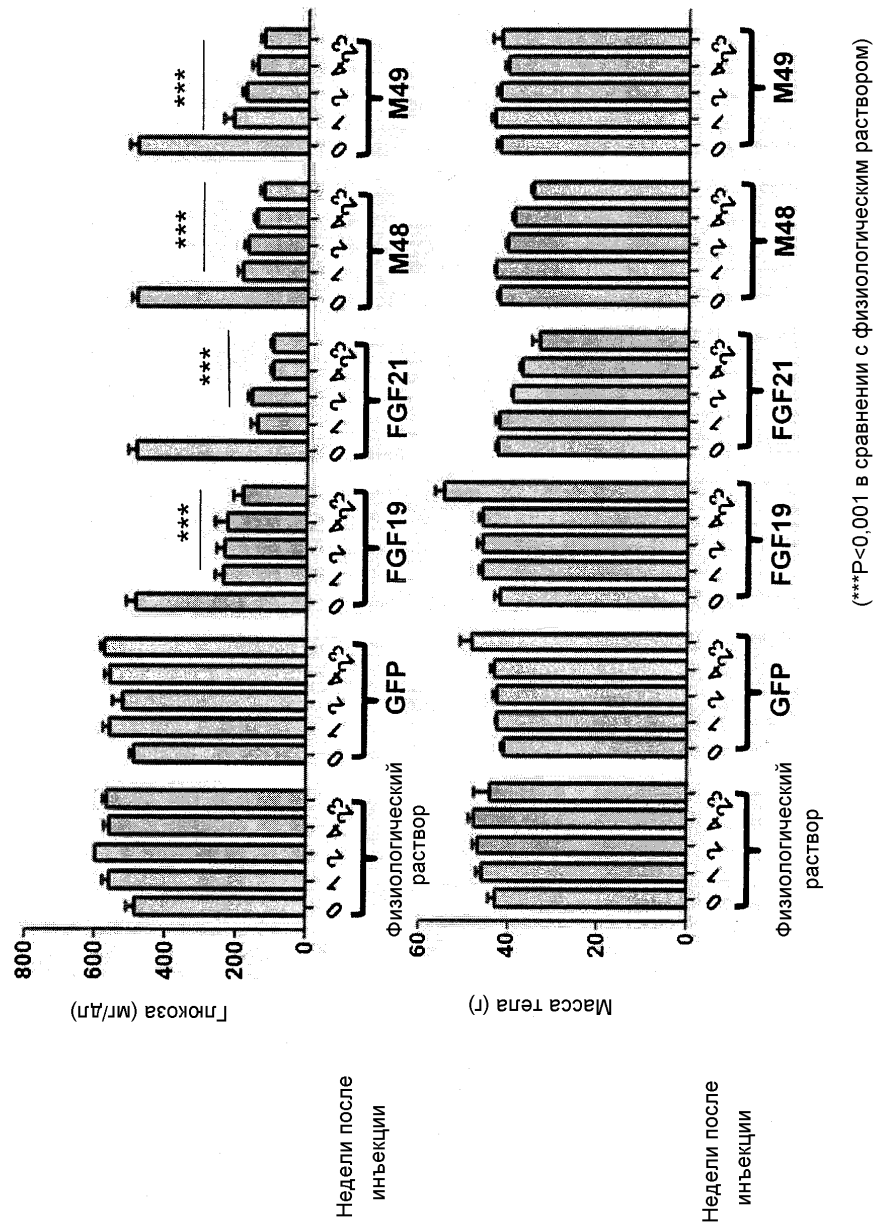
ФИГ. 3С



(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

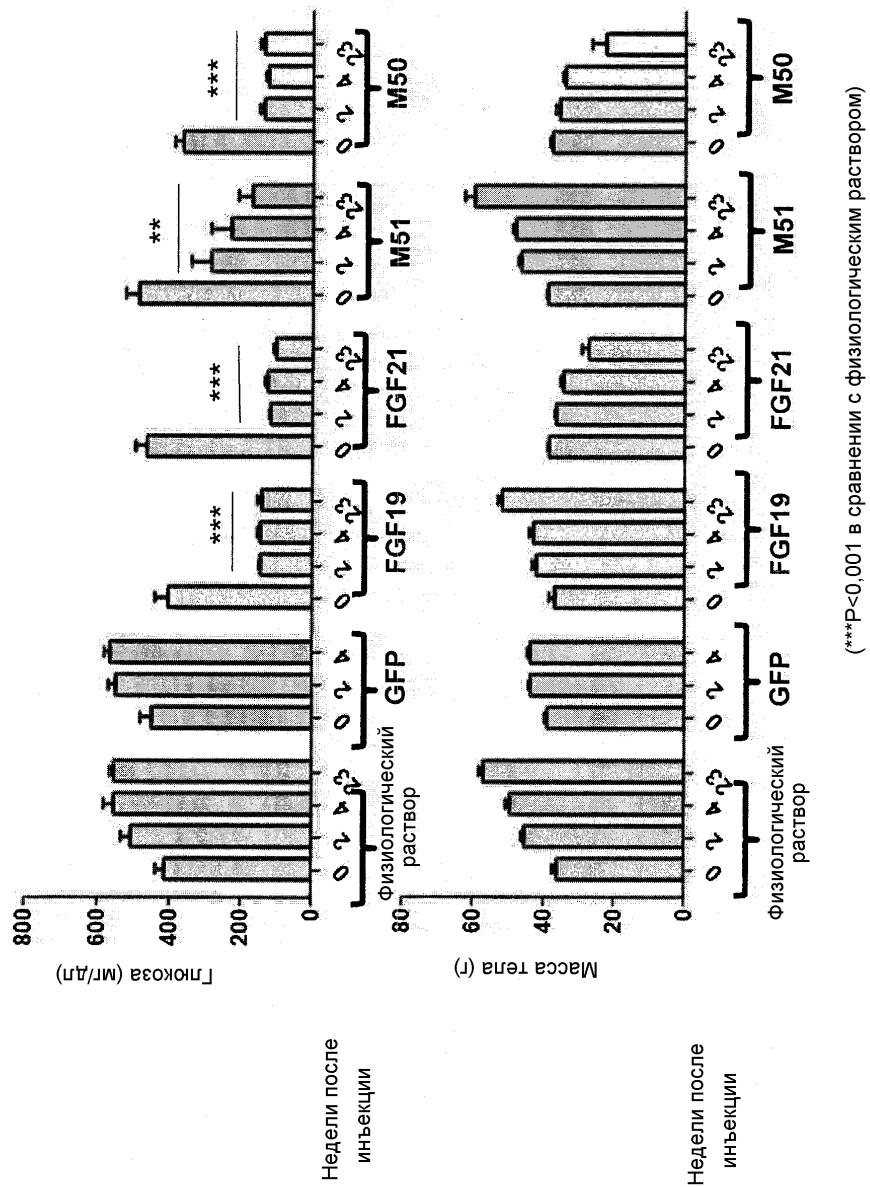


ФИГ. 3Е

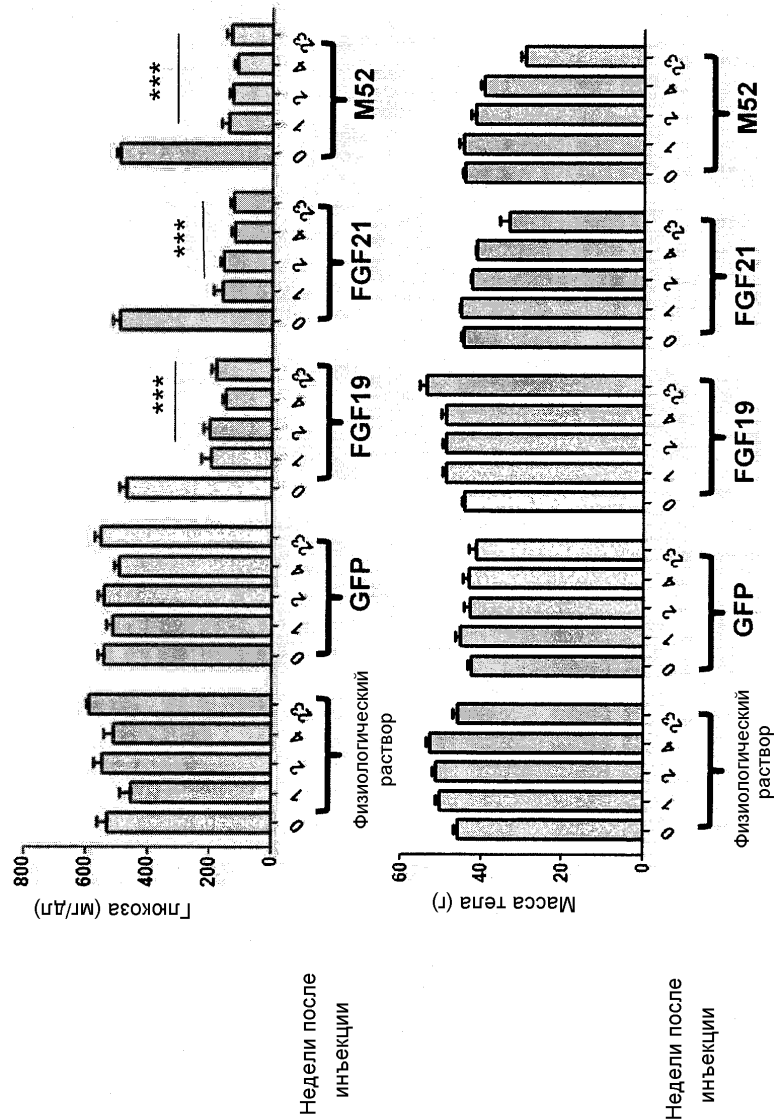


(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 3F

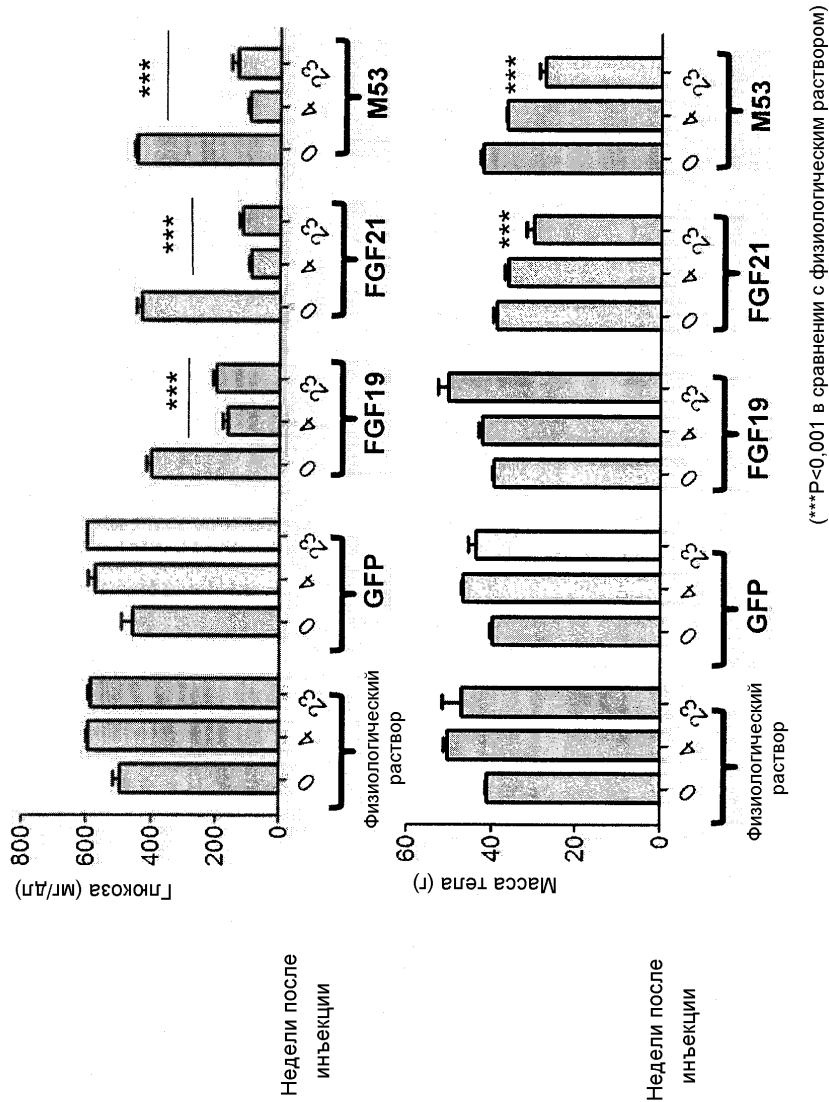


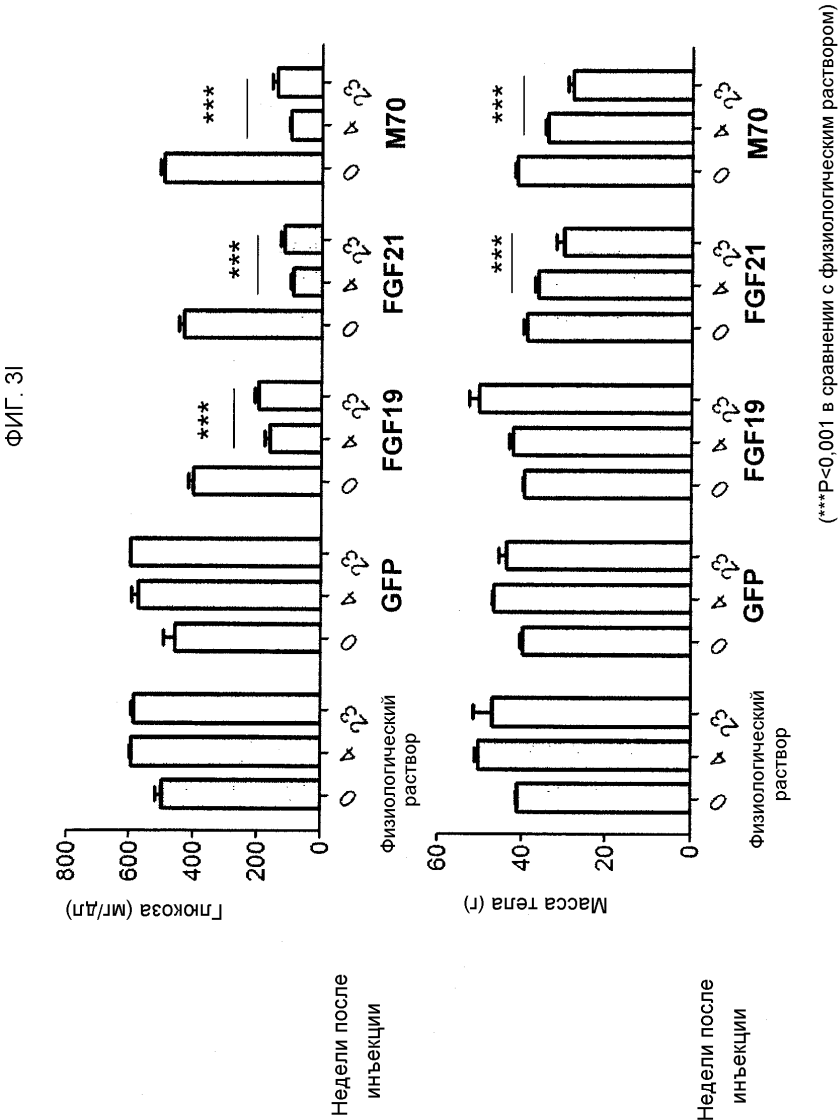
ФИГ. 3G



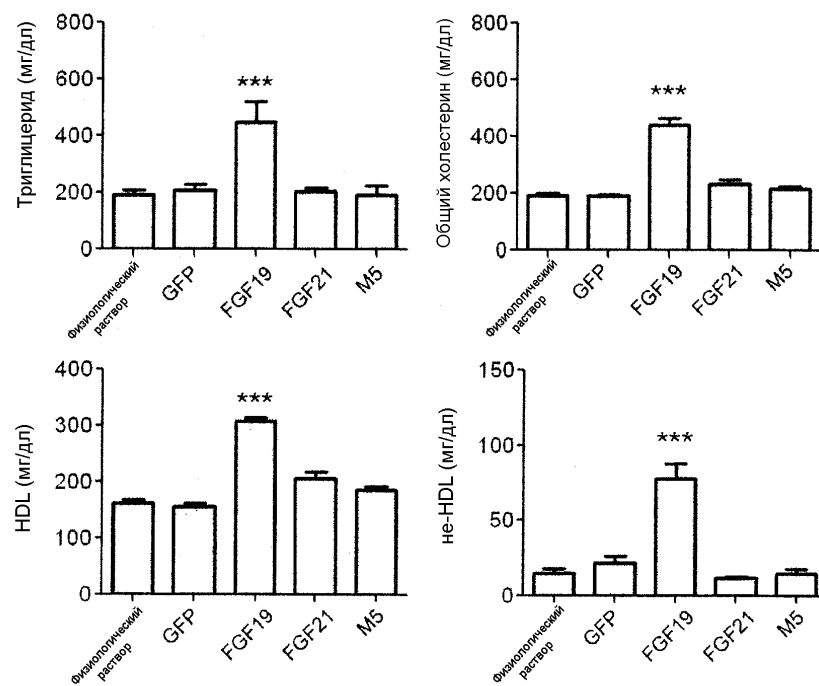
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 3Н

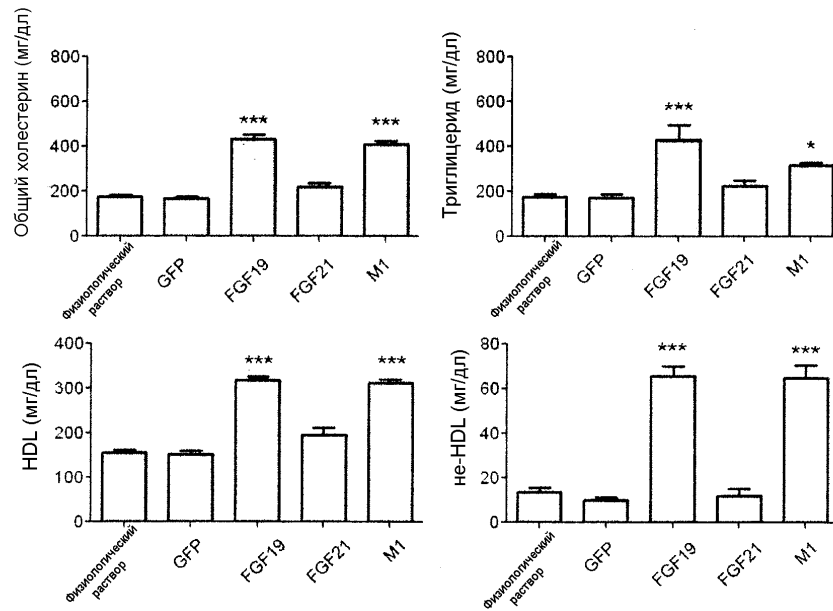




ФИГ. 4А

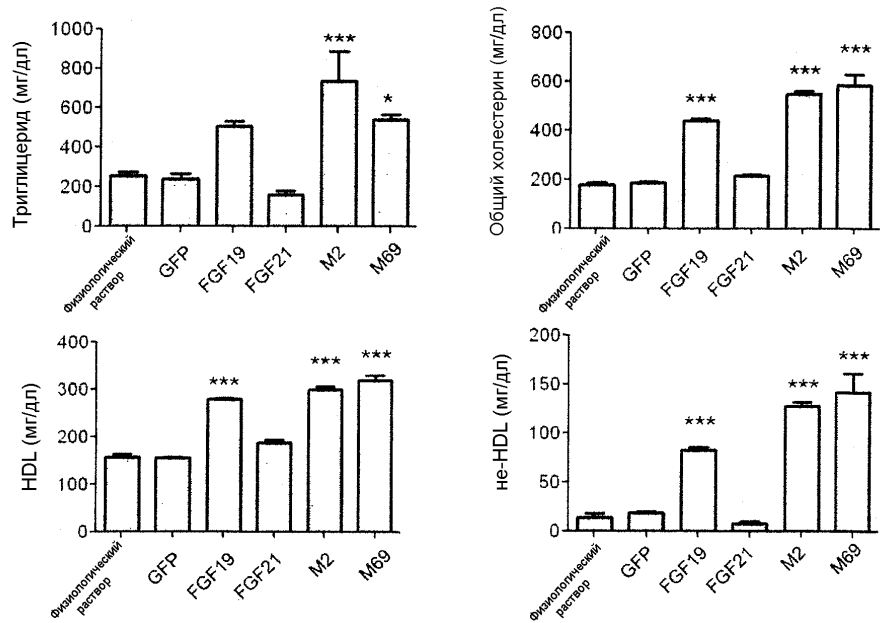


ФИГ. 4В



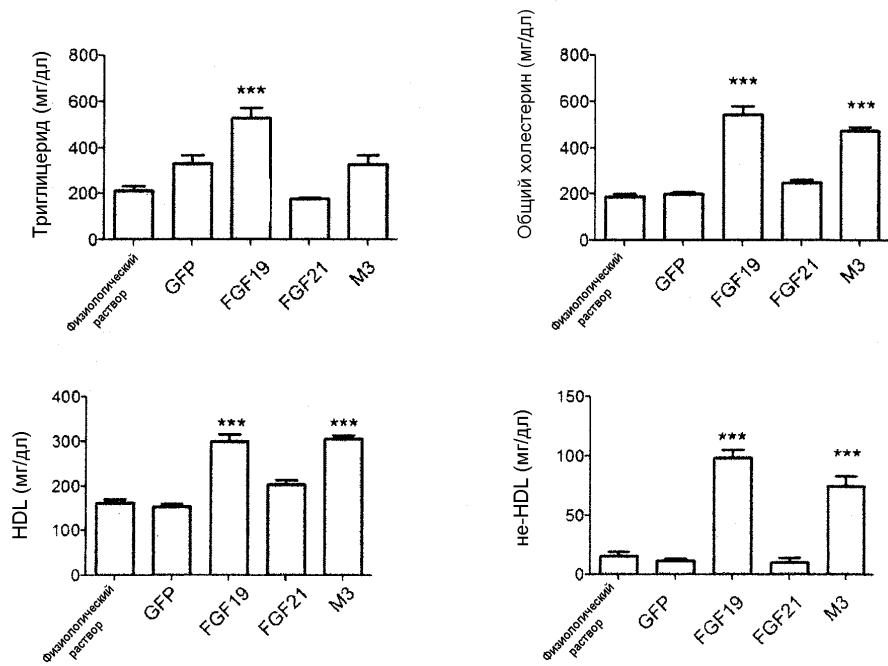
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 4С



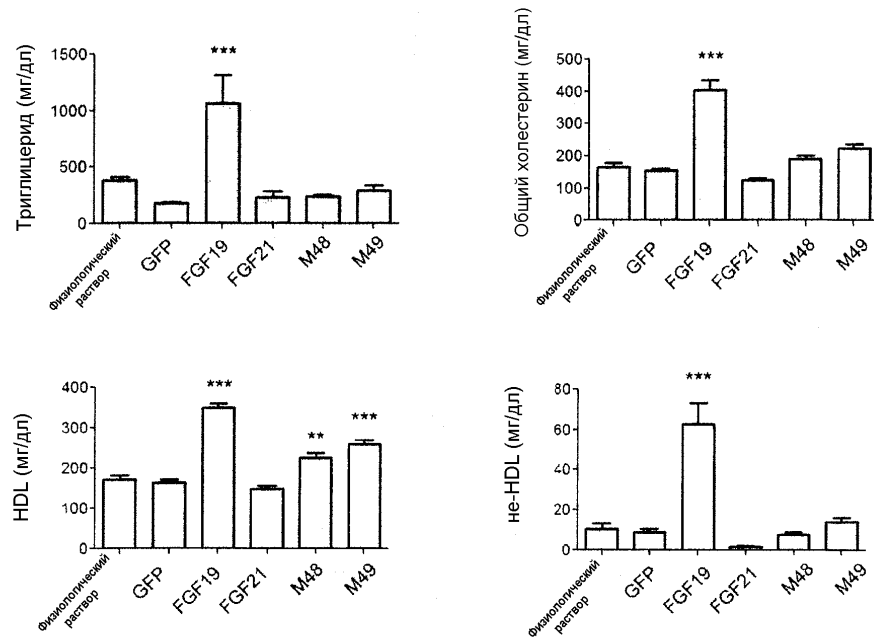
(*** $P < 0.001$ в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 4D

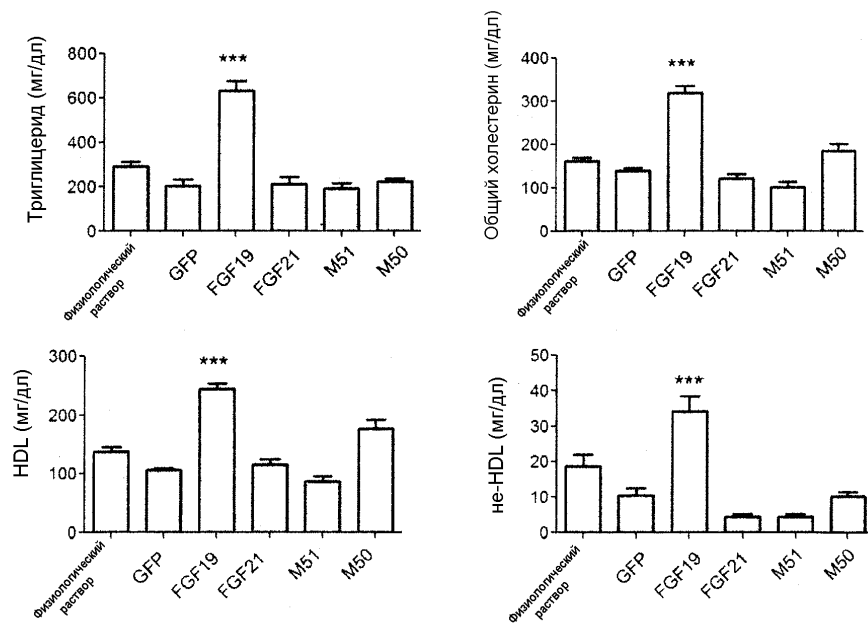


(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

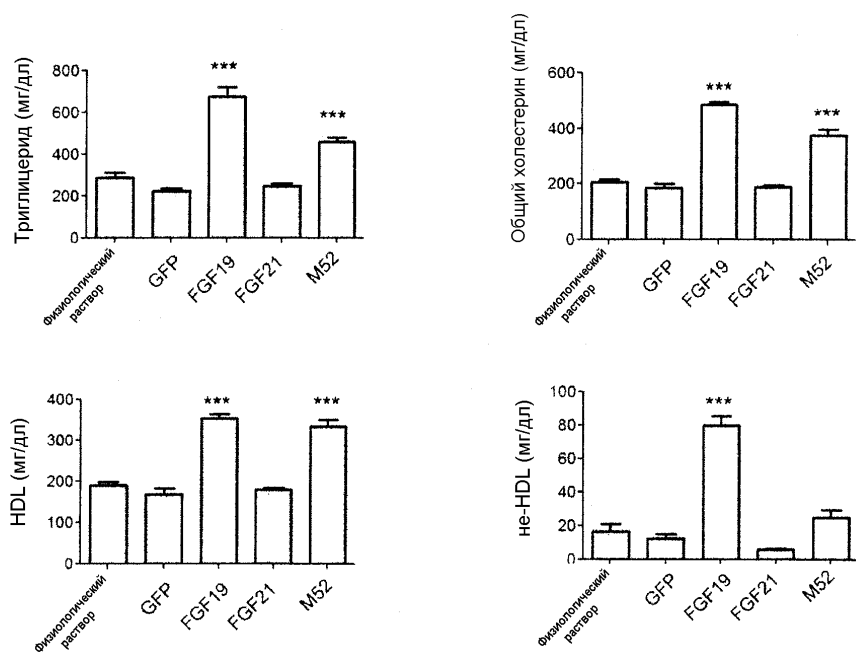
ФИГ. 4Е

(***) $P < 0,001$ в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 4F

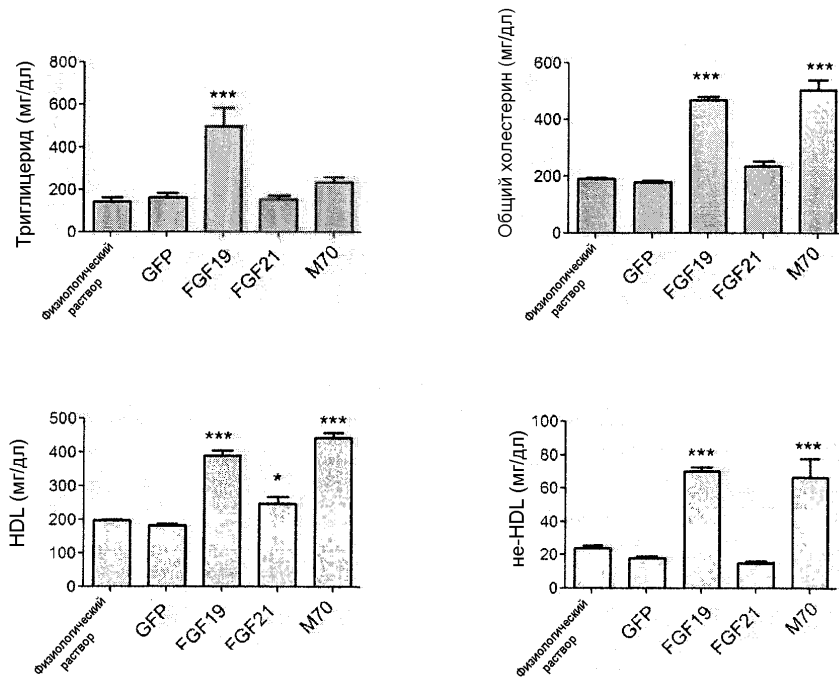
(***) $P < 0,001$ в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 4G



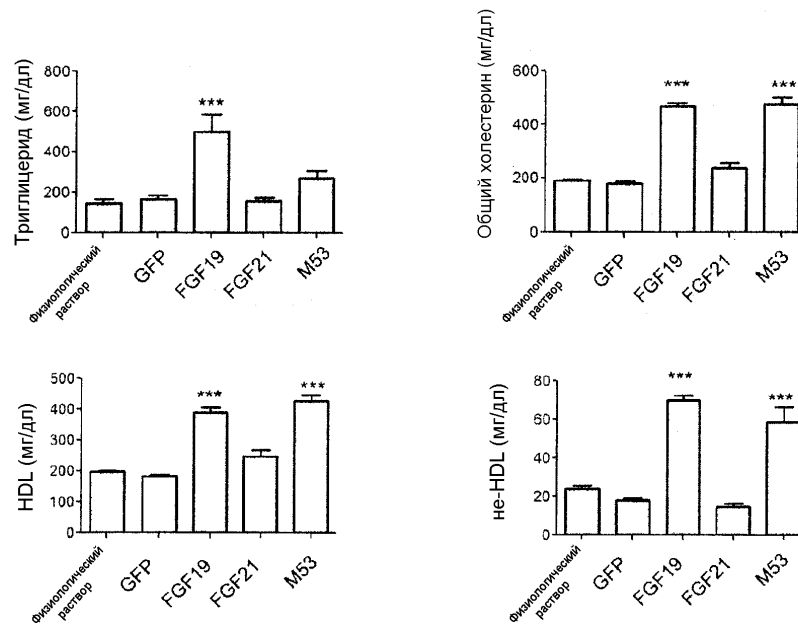
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 4Н



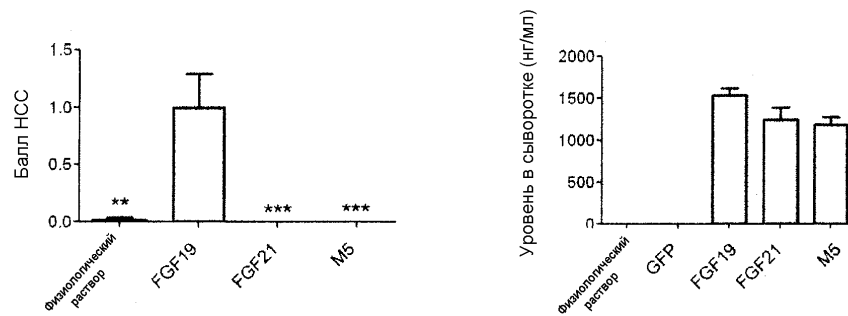
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 4I

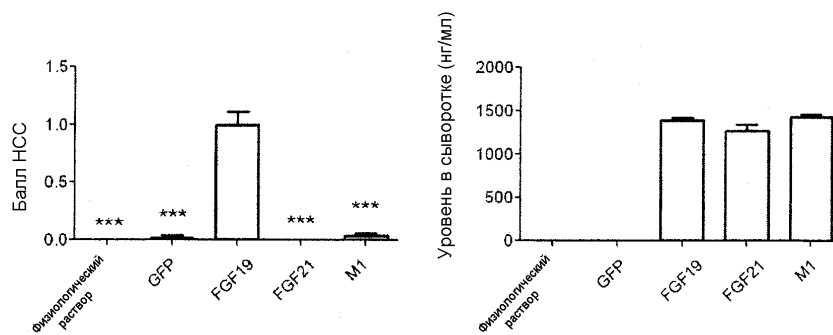


(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

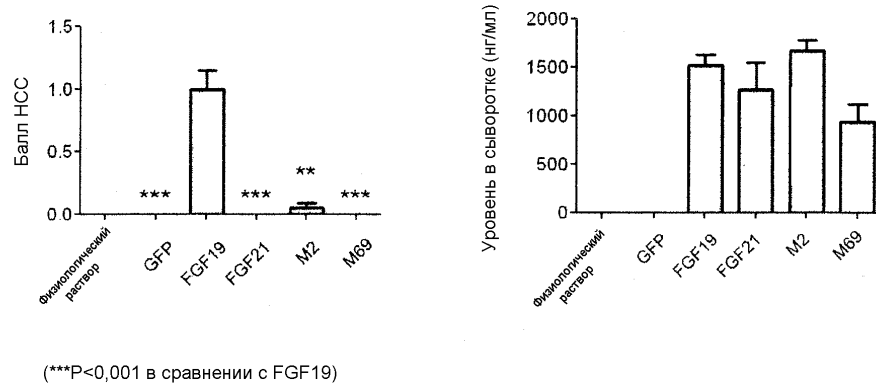
ФИГ. 5А

(***) $P < 0,001$ в сравнении с FGF19)

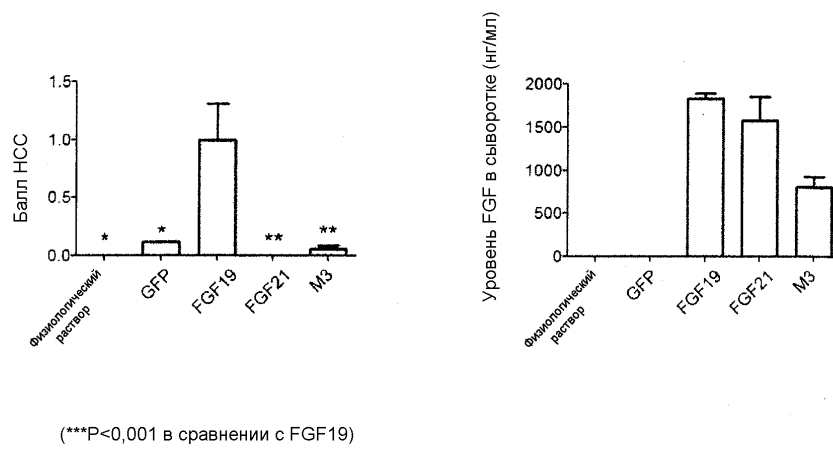
ФИГ. 5В

(***) $P < 0,001$ в сравнении с FGF19)

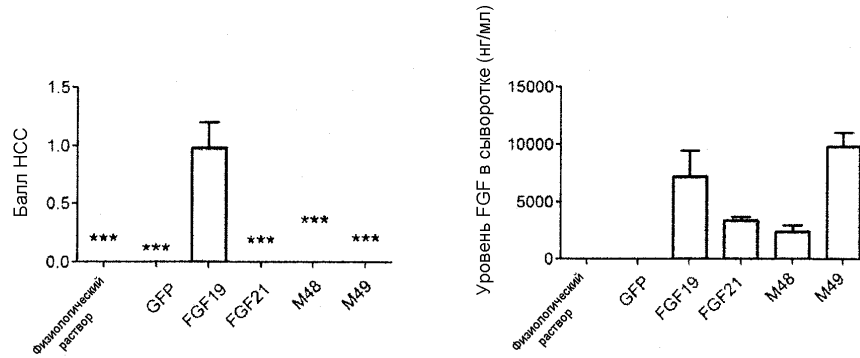
ФИГ. 5С



ФИГ. 5D

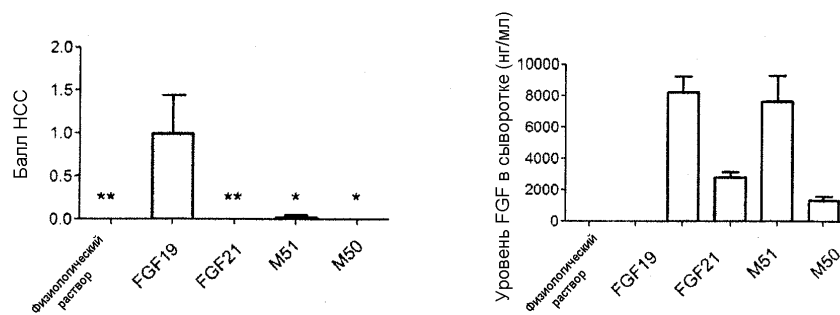


ФИГ. 5Е



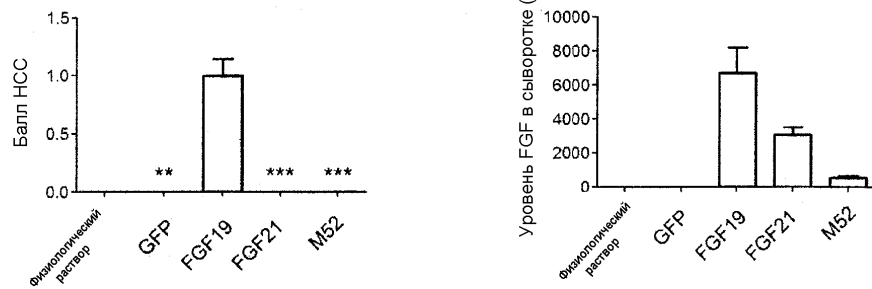
(***P<0,001 в сравнении с FGF19)

ФИГ. 5F

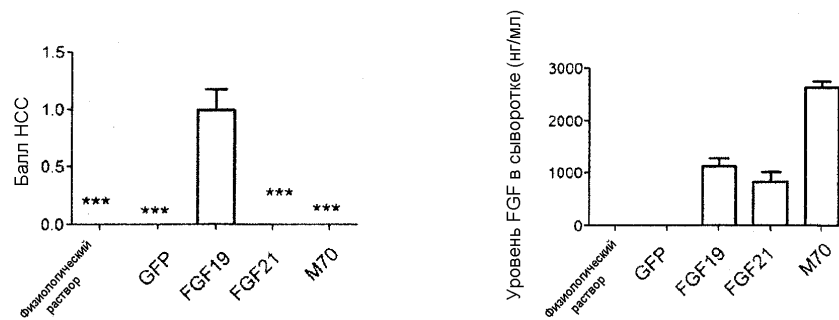


(**P<0,01. *P<0,05 в сравнении с FGF19)

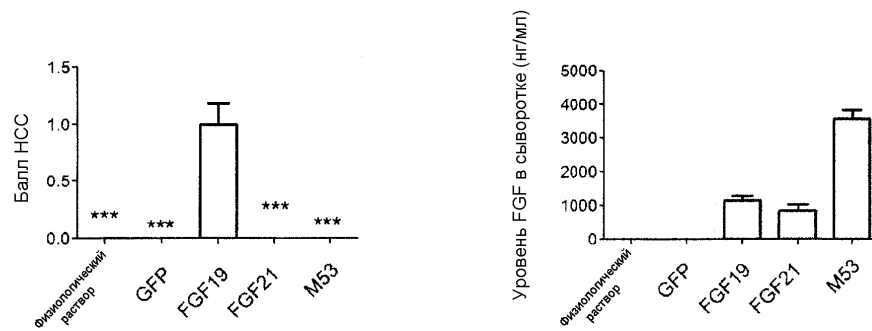
ФИГ. 5G

(***) $P < 0,001$ в сравнении с FGF19)

ФИГ. 5H

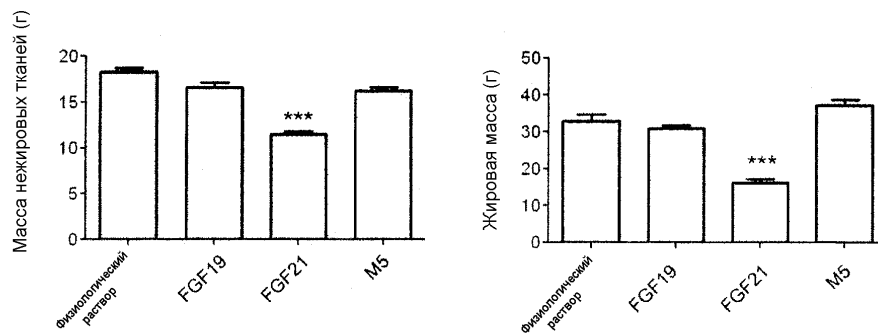
(***) $P < 0,001$ в сравнении с FGF19)

ФИГ. 5I



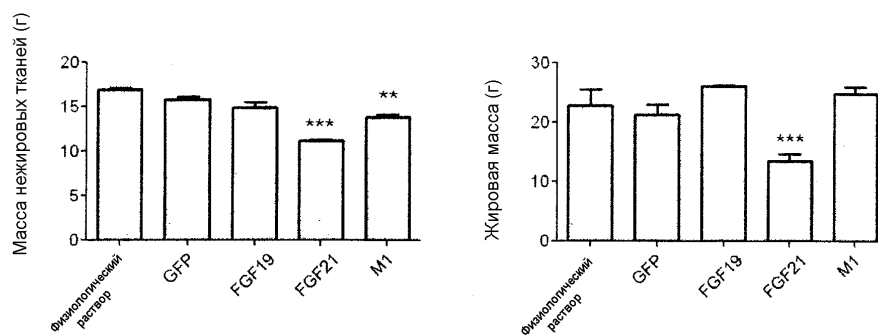
(***P<0,001 в сравнении с FGF19)

ФИГ. 6А



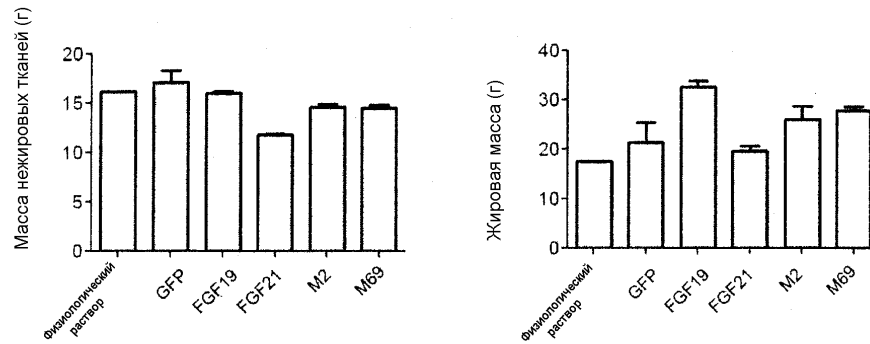
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 6В



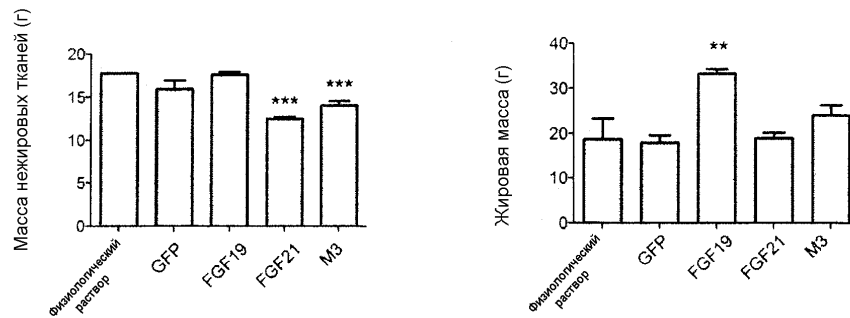
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 6С



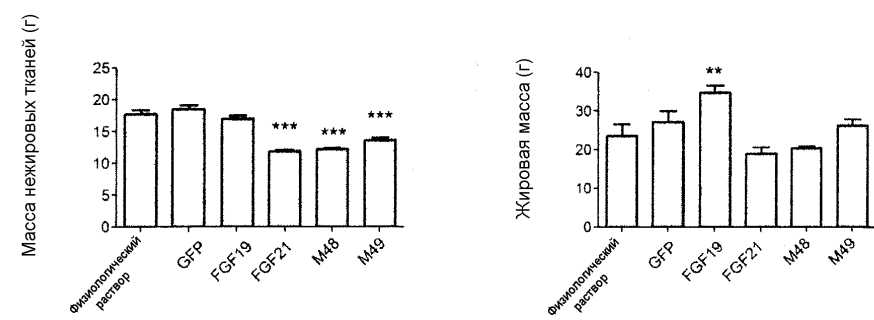
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 6D



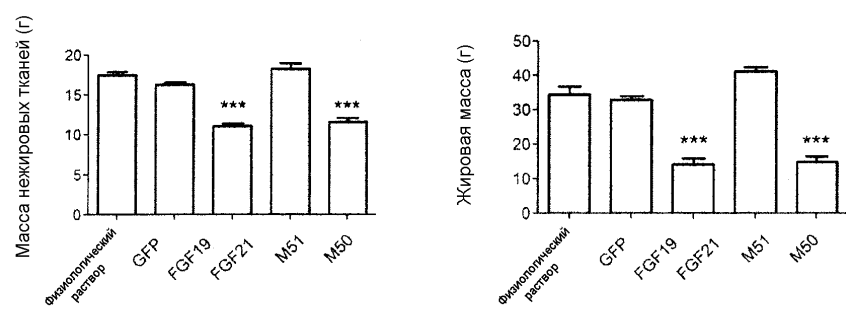
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

ФИГ. 6Е



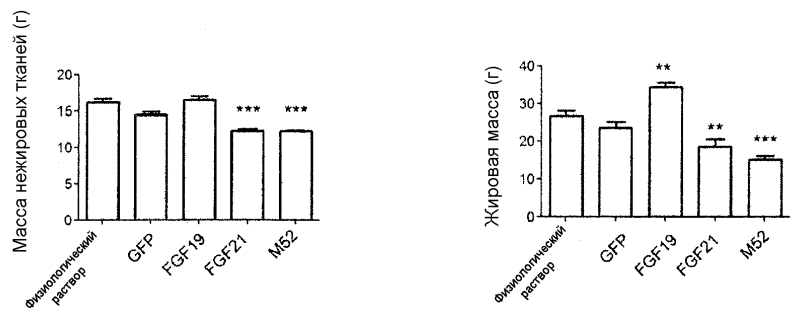
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором) (мыши db/db через 6 месяцев после инъекции AVV)

ФИГ. 6F



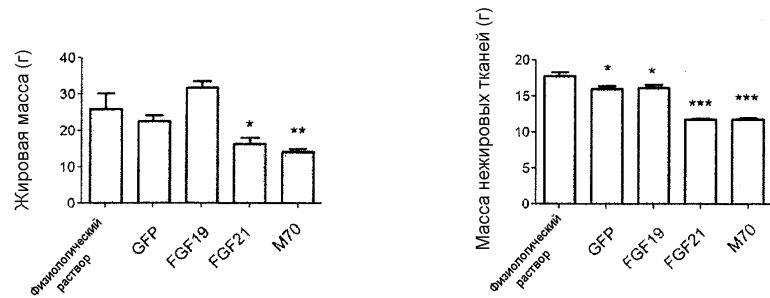
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором) (мыши db/db через 6 месяцев после инъекции AVV)

ФИГ. 6G



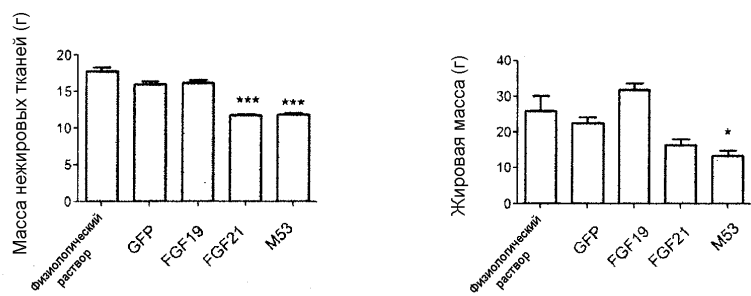
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором) (мыши db/db через 6 месяцев после инъекции AVV)

ФИГ. 6H



(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором) (мыши db/db через 6 месяцев после инъекции AVV)

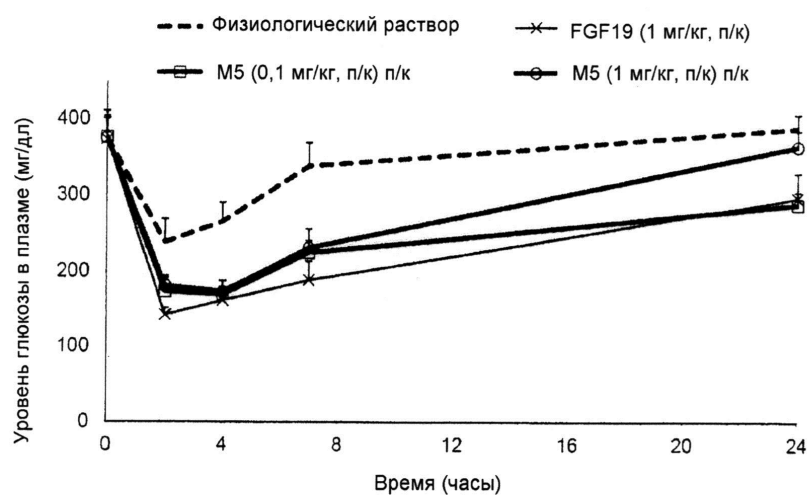
ФИГ. 6I



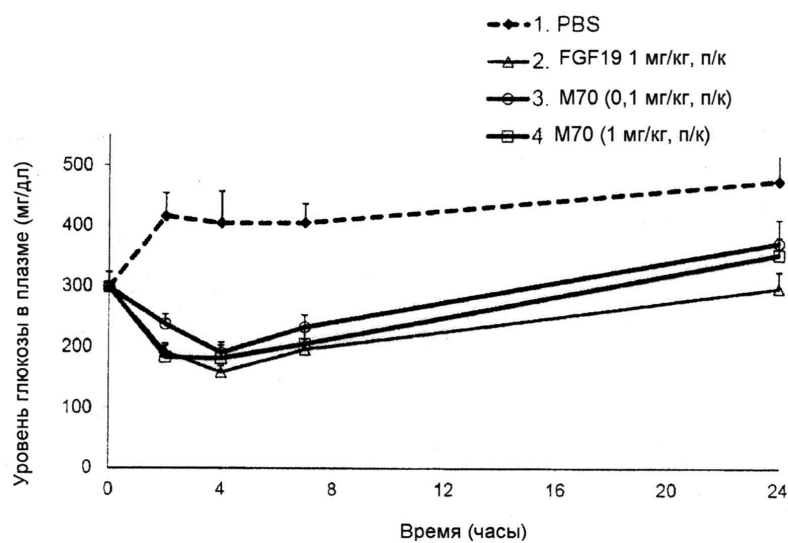
(***P<0,001 в сравнении с физиологическим раствором)

(мыши db/db через 6 месяцев после инъекции AVV)

ФИГ. 7А



ФИГ. 7В



ФИГ. 8

