



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0025839

(51)⁷ A61K 47/48; C07K 14/50

(13) B

(21) 1-2014-01375

(22) 26/09/2012

(86) PCT/US2012/057384 26/09/2012

(87) WO 2013/049247 04/04/2013

(30) 61/539,280 26/09/2011 US

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/07/2014 316A

(73) NOVARTIS AG (CH)

Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH)

(72) BOETTCHER, Brian R. (US); CAPLAN, Shari L. (US); DANIELS, Douglas S.

(US); HAMAMATSU, Norio (JP); LICHT, Stuart (US); WELDON, Stephen Craig (US).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) PROTEIN DUNG HỢP CHỨA BIẾN THỂ FGF21

(57) Sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa polypeptit và biến thể protein của yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (Fibroblast Growth Factor 21 - FGF21) với các đặc tính được lý được cải thiện.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (fibroblast growth factor 21 - FGF21) được biết đến để cải thiện profin chuyển hóa ở đối tượng sử dụng protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Họ yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF) được đặc trưng bởi 22 phối tử khác biệt, tương đồng về mặt di truyền, chúng được nhóm vào bảy phân họ. FGF-21 có mối quan hệ chặt chẽ với, và tạo ra phân họ với, FGF-19 và FGF-23. Phân họ FGF này điều biến nhiều quá trình sinh lý không thường gặp ở các FGF cổ điển, cụ thể là nội cân bằng năng lượng và axit mật, chuyển hóa glucoza và lipit, và nội cân bằng phosphat cũng như là vitamin D. Ngoài ra, không giống với các FGF khác, phân họ này hoạt động kiểu nội tiết. (Moore, D.D. (2007) Science 316, 1436-8)(Beenken et al. (2009) Nature Reviews Drug Discovery 8, 235).

FGF21 là polypeptit gồm 209 axit amin chứa trình tự dẫn đầu gồm 28 axit amin (SEQ ID NO:5). FGF21 người có khoảng 79% axit amin tương đồng với FGF21 chuột nhắt (mouse) và khoảng 80% axit amin tương đồng với FGF21 chuột (rat). Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (FGF21) được mô tả là yếu tố điều trị bệnh thiếu máu cục bộ, lên da non vết thương, và các bệnh liên quan đến sự mất chức năng tế bào phổi, phế quản hoặc phế nang. (Nishimura et al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206; công bố đơn quốc tế số WO01/36640; và công bố đơn quốc tế số WO01/18172). Mặc dù FGF-21 hoạt hóa thụ thể FGF và phân tử truyền tín hiệu xuôi dòng, bao gồm FRS2a và ERK, sự tương tác trực tiếp của FGFR và FGF-21 không phát hiện được. Những nghiên cứu nhận biết β -klotho, được biểu hiện cao trong gan, tế bào tạo mỡ và tuyến tụy, là yếu tố quyết định sự phản ứng của tế bào với FGF-21 và các đồng yếu tố gián tiếp truyền tín hiệu FGF-21 thông qua các FGFR (Kurosu, H. et al. (2007) J Biol Chem 282, 26687-95). FGF21 là chất chủ vận hiệu nghiệm của FGFR1(IIIc), FGFR2(IIIc) và phức hợp truyền tín hiệu FGFR3(IIIc) β -klotho.

FGF-21 thể hiện là gây ra sự hấp thu glucoza không phụ thuộc insulin. FGF-21 còn thể hiện là cải thiện hiện tượng đường huyết cao trong phạm vi mẫu động vật gặm nhấm mắc bệnh đái tháo đường. Ngoài ra, chuột chuyển gen biểu hiện quá mức FGF-21 được phát hiện là có khả năng chống lại sự bất thường trong chuyển hóa do khẩu

phần ăn gây ra, và thấy rõ giảm trọng lượng cơ thể và khối lượng chất béo, và tăng độ nhạy của insulin (Badman, M.K. et al. (2007) *Cell Metab* 5, 426-37). Việc sử dụng FGF-21 cho động vật linh trưởng không phải là người mắc bệnh đái tháo đường đã gây ra sự hao mòn lượng glucoza, triglyxerit, insulin và glucagon trong huyết tương lúc đói, và dẫn đến sự cải thiện đáng kể profin của lipoprotein bao gồm tăng gần 80% cholesterol HDL (Kharitononkov, A. et al. (2007) *Endocrinology* 148, 774-81). Những nghiên cứu gần đây điều tra nghiên cứu về cơ chế phân tử của hoạt động của FGF21 đã nhận biết FGF21 là hormon nội tiết quan trọng để giúp kiểm soát sự đáp ứng với tình trạng bị đói. (Badman et al. (2009) *Endocrinology* 150, 4931) (Inagaki et al. (2007) *Cell Metabolism* 5, 415). Điều này tạo ra sản phẩm đầu ra liên kết còn thiếu trước đó của PPAR α , bằng cách đó gan liên lạc với phần còn lại của cơ thể trong sự điều hòa sinh học nội cân bằng năng lượng. (Galman et al. (2008) *Cell Metabolism* 8, 169) (Lundasen et al. (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 437).

FGF21 điều hòa nội cân bằng của tế bào tạo mỡ thông qua sự kích hoạt con đường AMPK/SIRT1/PGC1 α để ức chế sự biểu hiện PPAR γ và tăng chức năng của ty thể. (Chau et al. (2010) *PNAS* 107, 12553). FGF21 còn làm tăng sự hấp thụ glucoza ở cơ xương như được xác định trong ống cơ người được nuôi cấy và mô chuột được phân lập. Sự điều trị bằng FGF21 của tế bào đảo tụy ở động vật gặm nhấm làm cải thiện chức năng và sự sống sót thông qua sự hoạt hóa con đường ERK1/2 và Akt. (Wente et al. (2006) *Diabetes* 55, 2470). Sự điều trị bằng FGF21 còn dẫn đến sự thay đổi trong biểu hiện gen hình thành lipid và enzym oxy hóa axit béo trong gan loài gặm nhấm, có thể thông qua tín hiệu HNF4 α và Foxa2.

Khó khăn liên quan đến việc sử dụng FGF-21 trực tiếp dưới dạng chất điều trị sinh học là chu kỳ bán rã của nó quá ngắn. (Kharitononkov, A. et al. (2005) *Journal of Clinical Investigation* 115:1627-1635). Ở chuột, chu kỳ bán rã của FGF21 người là 0,5 đến 1 giờ, và ở khỉ cynomolgus, chu kỳ bán rã là 2 đến 3 giờ. FGF21 có thể được sử dụng làm dược phẩm đa dụng, vô trùng. Tuy nhiên, đã xác định rằng các chất bảo quản, tức là, m-cresol, có tác động phụ có hại lên sự ổn định của nó trong các điều kiện này.

Trong sự phát triển protein FGF21 để sử dụng làm protein trị liệu trong điều trị bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2 và các tình trạng chuyển hóa khác, mong muốn

tăng chu kỳ bán rã và tính ổn định. Protein FGF21 tăng chu kỳ bán rã và tính ổn định sẽ cho phép làm giảm liều protein thường xuyên được dùng cho bệnh nhân. Rõ ràng là, cần phải phát triển chế phẩm protein dạng nước ổn định cho protein FGF21 trị liệu.

Ngoài ra, thách thức lớn trong sự phát triển FGF21 làm dược phẩm protein, là đối phó với tính không ổn định về mặt vật lý và hóa học của nó. Sự đa dạng về thành phần và đặc điểm của protein xác định các hoạt động cụ thể như sự gấp nếp, tính ổn định thể cấu tạo, và tháo xoắn/biến tính. Các đặc tính này nên được chú tâm đến khi hướng đến làm ổn định protein trong quá trình phát triển các điều kiện bào chế được phẩm sử dụng dung dịch protein chứa nước (Wang, W., Int. J. of Pharmaceutics, 18, (1999)). Hiệu quả mong muốn của việc ổn định protein trị liệu quan tâm, ví dụ, protein theo sáng chế, là tăng tính kháng với sự phân giải protein và sự biến chất do enzym, do đó cải thiện tính ổn định của protein và làm giảm sự tích tụ protein.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất protein dung hợp chứa yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (FGF21) và có đặc tính dược lý được cải thiện so với FGF21 kiểu đại và các biến thể của nó trong điều kiện bào chế thuốc, ví dụ, ổn định hơn, có khả năng cải thiện các thông số chuyển hóa cho đối tượng sử dụng chúng, là giảm sự ảnh hưởng của chất phân giải protein và sự suy thoái do enzym, và ít có khả năng tích tụ và hình thành phức hợp. Protein dung hợp theo sáng chế bao gồm thể cắt ngắn, đột biến, và biến thể của FGF21.

Cũng được bộc lộ ở đây là phương pháp điều trị rối loạn liên quan đến FGF21, cũng như là rối loạn về chuyển hóa, nội tiết, và tim mạch, như bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2, bệnh viêm tụy, lipid máu bất thường, bệnh gan nhiễm chất béo không do rượu (nonalcoholic fatty liver disease-NAFLD), bệnh viêm gan có u mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis-NASH), kháng insulin, insulin máu cao, không dung nạp glucoza, glucoza máu cao, hội chứng chuyển hóa, bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính, bệnh cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, đột quy, suy tim, bệnh tim hình vành, bệnh về thận, biến chứng do bệnh đái tháo đường, bệnh thần kinh, chứng liệt nhẹ dạ dày, các rối loạn liên quan đến đột biến bất hoạt nghiêm trọng trong thụ thể insulin, và các rối loạn chuyển hóa khác, và trong việc làm giảm tỷ lệ tử vong và sự mắc bệnh của các bệnh nhân ốm nặng.

Protein dung hợp theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng có thể tiêm được một lần một tuần hoặc một mình hoặc kết hợp với chất chống đái tháo đường dùng theo đường miệng, chất này sẽ cải thiện sự điều chỉnh đường, trọng lượng cơ thể và các đặc trưng về lipid của bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2. Protein này cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh béo phì hoặc các tình trạng bệnh lý khác liên quan đến FGF21.

Protein dung hợp theo sáng chế khắc phục trở ngại đáng kể về tính ổn định vật lý liên quan đến điều trị bằng protein, bao gồm, ví dụ, việc sử dụng FGF21 kiểu đại, bằng cách đề xuất protein ổn định hơn, là giảm sự ảnh hưởng của sự phân giải protein và sự suy thoái do enzym, và ít có khả năng tích tụ và hình thành phức chất, so với FGF21 kiểu đại trong các điều kiện bào chế được.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất protein dung hợp của yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi 21 (FGF21) chứa một hoặc nhiều trình tự được liệt kê trong bảng 1, và cũng được mô tả ở đây. Trình tự FGF21 được liệt kê trong bảng 1 có thể là biến thể của trình tự FGF21 kiểu đại, ví dụ, trình tự FGF21 kiểu đại với số tham chiếu NCBI NP_061986.1, và được tìm thấy trong các patent như, ví dụ, US 6,716,626B1, được chuyển nhượng cho Chiron Corporation.

Sự dung hợp này có thể là, ví dụ, giữa các trình tự FGF21 khác nhau, ví dụ, trình tự trong bảng 1, và phân tử khác (phần không phải là FGF21), ví dụ, miền cố định IgG hoặc mảnh của nó (ví dụ, vùng Fc), albumin huyết thanh người (Human Serum Albumin-HSA), hoặc polypeptit gắn kết albumin. Theo phương án được ưu tiên, phần không phải là FGF21 của phân tử là vùng Fc.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa protein dung hợp theo sáng chế, vectơ chứa polynucleotit này và tế bào chủ mang vectơ này.

Sáng chế đề xuất phương pháp được sử dụng để tạo protein dung hợp theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm sự cải biến protein FGF21 kiểu đại, thông qua ví dụ, sự kết hợp tính đặc hiệu vị trí của axit amin ở vị trí mong muốn của protein FGF21 kiểu đại, cũng như là sự dung hợp giữa phần FGF21 của phân tử này với phân tử khác, ví dụ, miền cố định IgG hoặc mảnh của nó (ví dụ, vùng Fc), albumin huyết thanh người (Human Serum Albumin - HSA), hoặc polypeptit gắn kết albumin. Sự cải biến và dung hợp này tăng các đặc tính sinh học của protein dung hợp theo sáng chế so với protein kiểu đại cũng như là, trong một số trường hợp, tạo điểm gắn kết với, ví dụ,

yếu tố đánh dấu và chất kéo dài chu kỳ bán rã của protein, và đối với mục đích gắn các biến thể này vào bề mặt giá thể rắn. Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào có khả năng tạo ra protein nêu trên của sáng chế, và tạo ra vectơ chứa ADN mã hóa các biến thể và thể dung hợp nêu trên.

Theo các phương án khác nhau, protein dung hợp theo sáng chế bộc lộ ở đây có thể chứa một hoặc nhiều mảnh của trình tự FGF21 kiểu đại, bao gồm mảnh nhỏ dài 8-12 gốc axit amin, và trong đó polypeptit có khả năng làm giảm lượng glucoza máu ở động vật có vú. Theo các phương án khác nhau, protein dung hợp theo sáng chế ở đây có thể chứa một hoặc nhiều biến thể của trình tự FGF21 kiểu đại, ví dụ, với một hoặc nhiều sự loại bỏ, chèn vào, thêm vào, hoặc thay thế axit amin so với trình tự kiểu đại của nó.

Theo một số phương án, protein dung hợp theo sáng chế bộc lộ ở đây có thể được liên kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều polyme, như polyetylen glycol (PEG) hoặc axit polysialic, tại vị trí mà sự cải biến axit amin đặc hiệu vị trí được tạo ra so với FGF21 kiểu đại, hoặc ở vị trí axit amin có chung với kiểu đại của protein này. Nhóm PEG được gắn theo cách sao cho tăng cường, và/hoặc không gây trở ngại, chức năng sinh học của các thành phần cấu tạo của protein dung hợp theo sáng chế, ví dụ, biến thể protein FGF21. Theo phương án khác, polypeptit của sáng chế có thể được dung hợp với trình tự axit amin khác loại, tùy ý thông qua cầu nối (linker), như GS, GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:6). Trình tự axit amin khác loại có thể là miền cố định IgG hoặc mảnh của nó (ví dụ, vùng Fc), albumin huyết thanh người (Human Serum Albumin - HSA), hoặc polypeptit gắn kết với albumin. Protein dung hợp được bộc lộ ở đây còn có thể tạo multime.

Theo một số phương án, trình tự axit amin khác loại (ví dụ, HSA, Fc, v.v.) được dung hợp với đầu amin của protein dung hợp theo sáng chế. Theo phương án khác, trình tự axit amin dung hợp khác loại (ví dụ, HSA, Fc, v.v.) được dung hợp với đầu carboxyl của protein dung hợp theo sáng chế.

Theo phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân biểu hiện một hoặc nhiều rối loạn liên quan đến FGF21, như bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường typ 2, bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh viêm tụy, lipid máu bất thường, bệnh gan nhiễm chất béo không do rượu (NAFLD), bệnh viêm gan có u mỡ không do rượu (NASH), kháng insulin, insulin máu cao, không dung nạp glucoza, glucoza máu

cao, hội chứng chuyển hóa, bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính, bệnh cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh mạch ngoại biên, đột quỵ, suy tim, bệnh tim hình vành, bệnh thận, biến chứng do bệnh đái tháo đường, bệnh thần kinh, bệnh liệt nhẹ dạ dày, các rối loạn liên quan đến sự đột biến bất hoạt thụ thể insulin, và các rối loạn chuyển hóa khác, bao gồm cho bệnh nhân cần sự điều trị này sử dụng lượng có hiệu quả điều trị một hoặc nhiều protein theo sáng chế hoặc dược phẩm của nó.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa protein dung hợp theo sáng chế được bọc lộ ở đây và chất bào chế được dụng. Dược phẩm này có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị rối loạn chuyển hóa, và phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân là người cần sự điều trị này sử dụng dược phẩm của sáng chế. Ví dụ không giới hạn về rối loạn chuyển hóa có thể được điều trị bao gồm bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2 và bệnh béo phì.

Khía cạnh này và khía cạnh khác của sáng chế sẽ được làm sáng tỏ trong phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A-1D thể hiện V188 có hiệu quả được cải thiện trong mẫu chuột ob/ob bị mắc bệnh đái tháo đường so với V76. V188 thể hiện kết quả tốt hơn khi được sử dụng 1 miligam/ kilogam (mpk), so với 5 miligam/ kilogam khi V76 được sử dụng. Fig. 1A thể hiện glucoza huyết tương lúc no như hiển thị (hình tròn thể hiện tá dược lỏng (PBS – phosphate buffered saline – muối đệm phosphat), hình vuông thể hiện V76 ở 5 mpk, và hình tam giác thể hiện V188 ở 1 mpk. Fig. 1B thể hiện insulin huyết tương lúc no như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng, V76 ở 5 mpk, và V188 ở 1 mpk). Fig. 1C thể hiện trọng lượng cơ thể như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng, V76 ở 5 mpk, và V188 ở 1 mpk). Fig. 1D thể hiện hàm lượng lipid trong gan như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng, V76 ở 5 mpk, và V188 ở 1 mpk).

Fig. 2A-2D thể hiện V101 có hiệu quả được cải thiện trong mẫu chuột ob/ob mắc bệnh đái tháo đường so với V76. V101 thể hiện kết quả cao hơn khi được sử dụng ở 1 miligam/ kilogam (mpk), so với 5 miligam/ kilogam khi V76 được sử dụng. Fig. 2A thể hiện glucoza huyết tương lúc no như hiển thị (hình tròn thể hiện tá dược lỏng (PBS – phosphate buffered saline), hình vuông thể hiện V76 ở 5 mpk, và hình tam giác thể hiện V101 ở 1 mpk. Fig. 2B thể hiện insulin huyết tương lúc no như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng V76 ở 5 mpk, và V101 ở 1 mpk). Fig. 2C thể hiện trọng

lượng cơ thể như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng V76 ở 5 mpk, và V101 ở 1 mpk). Fig. 2D thể hiện hàm lượng lipid trong gan như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng V76 ở 5 mpk, và V101 và 1 mpk).

Fig. 3A-3D thể hiện V103 có hiệu quả được cải thiện trong mẫu chuột ob/ob mắc bệnh đái tháo đường so với V76. V103 thể hiện kết quả cao hơn khi được sử dụng ở 1 miligam/ kilogam (mpk), so với 5 miligam/ kilogam khi V76 được sử dụng. Fig. 3A thể hiện glucoza huyết tương lúc no như hiển thị (hình tròn thể hiện tá dược lỏng (PBS – phosphate buffered saline), hình vuông thể hiện V76 ở 5 mpk, hình tam giác thể hiện V103 ở 1 mpk. Fig. 3B thể hiện insulin huyết tương lúc no như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng V76 ở 5 mpk, và V103 ở 1 mpk). Fig. 3C thể hiện trọng lượng cơ thể như hiển thị (từ trái sang phải: tá dược lỏng V76 ở 5 mpk, và V103 ở 1 mpk). Fig. 3D thể hiện hàm lượng lipid trong gan như thể hiện (từ trái sang phải: tá dược lỏng V76 ở 5 mpk, và V103 ở 1 mpk).

Fig. 4A-4D minh họa các đặc tính dược động học và nhiệt động học của protein dung hợp theo sáng chế so với protein dung hợp FGF21 trong lĩnh vực này. Fig. 4A thể hiện nồng độ trong huyết tương của protein dung hợp theo sáng chế trong công bố đơn PCT WO10/129600 đã mô tả là Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G) và Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E), sau khi tiêm tĩnh mạch thể dung hợp này vào chuột. Fig. 4B thể hiện đặc tính dược động học của protein dung hợp theo sáng chế (V101, V103 & V188) sau khi phân tích liều đơn tiêm tĩnh mạch ở chuột bằng ELISA kháng-Fc-so với dữ liệu động học tạo ra ở chuột của V76 trong nghiên cứu trước đây sử dụng ELISA kháng thể kháng FGF21. Fig. 4C thể hiện sự kiểm tra vết protein dung hợp theo sáng chế trong thử nghiệm Western blot kháng -FGF21, thích hợp với dữ liệu ELISA kháng-Fc trong 120 giờ và 15 ngày. Các mẫu trong lớp lót là như sau: A thể hiện V101, B thể hiện V103, và C thể hiện V188. Đối chứng là V101 và huyết thanh. Fig. 4D minh họa sự ổn định nhiệt động học của protein dung hợp theo sáng chế tăng đáng kể so với V76. Từ đỉnh đến đáy, hình này thể hiện V101, V103, và V188, tất cả chúng cải thiện nhiệt độ nóng chảy (T_m) so với V76 ($T_m < 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (không được thể hiện)) và FGF21 kiểu đại ($T_m = 46,5^{\circ}\text{C} \pm 0,3$ (không được thể hiện)).

Mô tả chi tiết sáng chế

Protein dung hợp theo sáng chế là dạng cải biến của polypeptit FGF21 kiểu đại có độ dài hoàn chỉnh như đã biết đến trong lĩnh vực này. Trình tự FGF21 kiểu đại sẽ

sử dụng làm trình tự tham chiếu (SEQ ID NO:1), ví dụ, khi so sánh giữa trình tự FGF21 kiểu dại và biến thể protein là cần thiết. Trình tự FGF21 kiểu dại có trình tự tham chiếu theo NCBI số NP_061986.1, và có thể được tìm thấy trong các bằng sáng chế như, ví dụ, US 6,716,626B1, đã chuyển nhượng cho Chiron Corporation (SEQ ID NO:1).

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

Trình tự mARN tương ứng mã hóa polypeptit FGF21 có độ dài hoàn chỉnh (trình tự tham chiếu theo NCBI số NM_019113.2) được thể hiện dưới đây (SEQ ID NO:2)

```

1 ctgtcagctg aggateccagc cgaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc
61 acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc
121 ccggagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac
181 tcaggactgt gggtttctgt gctggctggg ctctgctggg gaggctgcca ggcacacccc
241 atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac
301 acagatgatg cccagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg
361 ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt
421 attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg
481 tatggatcgc tccactttga cctgagggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac
541 ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac ggctcccgcc tgcacctgcc aggaacaag

```

601 tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgct tctgccact accaggcctg
661 cccccgcac tcccggagcc acccggaatc ctggcccccc agccccccga tgtgggctcc
721 teggaccctc tgagcatggt gggaccttcc cagggccgaa gccccagcta cgcttctga
781 agccagaggc tgttactat gacatctcct cttatttat taggttattt atcttattta
841 ttttttatt ttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa
901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Trình tự FGF21 không có trình tự dẫn đầu và có thể cũng bao gồm sự cải biến khác của polypeptit như sự xử lý gây phân hủy protein của đầu amin (cùng với hoặc không cùng với trình tự dẫn đầu) và/hoặc đầu carboxyl, sự phân cắt của polypeptit nhỏ hơn từ tiền thân lớn hơn, sự glycosyl hóa liên kết N- và/hoặc liên kết O-, và sự cải biến sau dịch mã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu. Ví dụ điển hình về trình tự FGF21 thuần thực có trình tự sau (SEQ ID NO:3, thể hiện các vị trí axit amin 29-209 của trình tự protein FGF21 có độ dài hoàn chỉnh (trình tự tham chiếu theo NCBI số NP_061986.1)):

[illegible]

Trình tự cADN tương ứng mã hóa polypeptit FGF21 thuần thực (SEQ ID NO:3) được thể hiện dưới đây (SEQ ID NO:4):

1 caccceatcc ctgactccag tctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag
61 ctctacacag atgatgccca gcagacagaa gccacactgg agatcaggga ggatggggacg

121 gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctctgc agctgaaagc cttgaagccg
 181 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg
 240 gccctgtatg gatcgctcca ctttgacct gaggcctgca gcttcggga gctgcttct
 301 gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgtgca cctgccaggg
 360 aacaagtcac cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca
 421 ggctgcccc ccgcactccc ggagccaccc ggaatcttgg cccccagcc ccccgatgtg
 481 ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct
 541 tctga

Protein dung hợp theo sáng chế có thể chứa biến thể protein hoặc thể đột biến của protein kiểu đại được liệt kê ở đây, ví dụ, các biến thể FGF21. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể protein,” “biến thể người,” “biến thể polypeptit hoặc biến thể protein,” “biến thể,” “thể đột biến,” cũng như là thuật ngữ tương tự bất kỳ hoặc sự thay đổi cụ thể của nó (ví dụ, “biến thể protein FGF21,” “biến thể,” “đột biến FGF21,” v.v.) xác định trình tự protein hoặc polypeptit chứa sự cải biến, cắt ngắn, hoặc các biến thể khác của protein hoặc polypeptit vốn có trong tự nhiên (tức là, kiểu đại) hoặc bản đối chiếu polypeptit hoặc trình tự tự nhiên tương đồng. Ví dụ, “biến thể FGF21” hoặc “đột biến FGF21,” được mô tả liên quan đến protein FGF21 kiểu đại (tức là, vốn có trong tự nhiên) như được mô tả ở đây.

Trình tự protein dung hợp điển hình của sáng chế được liệt kê trong bảng 1. Sự mô tả về thể dung hợp này chứa biến thể FGF21 và, nếu thích hợp, một cầu nối. Sự thay đổi hoặc thay thế được sử dụng bởi biến thể FGF21 được đánh số và được mô tả so với FGF21 kiểu đại. Ví dụ, “biến thể 101 (V101)” (SEQ ID NO:10) là thể dung hợp Fc-FGF21 với cầu nối hai axit amin và sự thay thế sau đây được tạo ra liên quan đến FGF21 kiểu đại: Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, P174L, S195A, P199G, G202A.

Bảng 1: Protein dung hợp Fc biến thể FGF21

SEQ ID NO:	Trình tự		Tên*
7	DKTHTCPPCP FLFPPKPKDT CVVVDVSHED GVEVHNAKTK RVVSVLTVLH CKVSNKALPA GQPREPQVYT NQVSLTCLVK WESNGQPENN DGSFFLYSKL NVFSCSVMHE LSLSPGKGS VRQRYLYTDD REDGTVGGAA KALKPGVIQI QRPDGALYGS RELLLEDGYN LHLPGNKSPH FLPLPGLPPA QPPDVGSSDP SPSYAS	APEAAGGPSV LMISRTPEVT PEVKFNWYVD PREEQYNSTY QDWLNGKEYK PIEKTISKAK LPPSREEMTK GFYPSDIAVE YKTTTPVLDS TVDKSRWQQG ALHNHYTQKS SSPLLQFGGQ AQQTEAHLEI DQSPESLLQL LGVKTSRFLC LHFDPEACSF VYQSEAHGLP RDPAPRGPARG LPEPPGILAP LSMVGPSQGR	Thế dung hợp Fc có đầu N có độ dài hoàn chỉnh với cầu nối 2 AA (GS) và WT FGF21
8	DKTHTCPPCP FLFPPKPKDT CVVVDVSHED GVEVHNAKTK RVVSVLTVLH CKVSNKALPA GQPREPQVYT NQVSLTCLVK WESNGQPENN DGSFFLYSKL NVFSCSVMHE LSLSPGKGGG GSDSSPLLQF TDDAQQTEAH GAADQSPESL IQILGVKTSR YGSLHFDPEA GYNVYQSEAH SPHRDPAPRG	APEAAGGPSV LMISRTPEVT PEVKFNWYVD PREEQYNSTY QDWLNGKEYK PIEKTISKAK LPPSREEMTK GFYPSDIAVE YKTTTPVLDS TVDKSRWQQG ALHNHYTQKS GSGGGGSGGG GGQVRQRYLY LEIREDTGVG LQLKALKPGV FLCQRPDGAL CSFRELLLED GLPLHLPGNK PARFLPLPGL	Thế dung hợp Fc có đầu N có độ dài hoàn chỉnh với cầu nối 15 AA (GGGGS x 3) giữa Fc và WT FGF21

	PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS	
9	DSSPLLQFGG QVRQRYLYTD DAQTEAHLE IREDGTVGGA AHQSPESLLE LKALKPGVIQ ILGVKTSRFL CQKPDGALYG SLHFDPEACS FRELLLEDGY NVYQSEAHGL PLHLPGNRSP HCDPAPQGPA RFLPLPGLPP ALPEPPGILA PQPPDVGSSD PLAMVGPSQG RSPSYAS	Biến thể #76 = Protein với 9 đột biến so với FGF21 kiểu dại (như trong WO01/018172)
10	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL KALKPGVIQI LGVKTSRFLC QRPDGTLYGS LHFDPEACSF RELLLEDGYN VYQSEAHGLP LHLPCNRSPH RDPASRGPAR FLPLPGLPPA LPEPPGILAP QPPDVGSSDP LAMVGGSQAR SPSYAS	Biến thể # 101 = thể dung hợp đầu N với cầu nối 2 AA (GS) giữa Fc và FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
11	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSD SSPLLQFGGQ VRQRYLYTDD ACQTEAHLEI REDGTVGGAA DQSPESLLQL	Biến thể # 103 = thể dung hợp Fc đầu N với cầu nối 2 AA (GS) = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

	KALKPGVIQI QKPDGALYGS RELLLEDGYN LHLPCNRSPH FLPLPGLPPA QPPDVGSSDP SPSYAS	LGVKTSRFLC LHFDPEACSF VYQSEAHGLP RDPASRGPAR LPEPPGILAP LAMVGGSQAR	
12	DKTHTCPPCP FLFPPKPKDT CVVVDVSHED GVEVHNAKTK RVVSVLTVLH CKVSNKALPA GQPREPQVYT NQVSLTCLVK WESNGQPENN DGSFFLYSKL NVFSCSVMHE LSLSPGKGGG <u>GSDSSPLLQF</u> TDDACQTEAH GAADQSPESL IQILGVKTSR YGSLHFDPEA GYNVYQSEAH SPHRDPASRG PPALPEPPGI SDPLAMVGGG QARSPSYAS	APEAAGGPSV LMISRTPEVT PEVKFNWYVD PREEQYNSTY QDWLNGKEYK PIEKTISKAK LPPSREEMTK GFYPSDIAVE YKTTTPVLDS TVDKSRWQQG ALHNHYTQKS <u>GSGGGGSGGG</u> GGQVRQRYLY LEIREDGTVG LQLKALKPGV FLCQKPDGAL CSFRELLLED GLPLHLPCNR PARFLPLPGL LAPQPPDVGS	Biến thể #188 = V103 với cầu nối 15 AA (GGGS x 3) giữa Fc và FGF21 = (Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)
13	DKTHTCPPCP FLFPPKPKDT CVVVDVSHED GVEVHNAKTK RVVSVLTVLH CKVSNKALPA GQPREPQVYT NQVSLTCLVK WESNGQPENN DGSFFLYSKL NVFSCSVMHE LSLSPGKGGG <u>GSDSSPLLQF</u> TDDACQTEAH GAADQSPESL IQILGVKTSR YGSLHFDPEA GYNVYQSEAH SPHRDPASRG	APEAAGGPSV LMISRTPEVT PEVKFNWYVD PREEQYNSTY QDWLNGKEYK PIEKTISKAK LPPSREEMTK GFYPSDIAVE YKTTTPVLDS TVDKSRWQQG ALHNHYTQKS <u>GSGGGGSGGG</u> GGQVRQRYLY LEIREDGTVG LQLKALKPGV FLCQRPDGT CSFRELLLED GLPLHLPCNR PARFLPLPGL	Biến thể #204 = V101 với cầu nối 15 AA (GGGS x 3) giữa Fc và FGF21 = (Q55C, A109T, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, G202A)

	PPALPEPPGI LAPQPPDVGS SDPLAMVGGG QARSPSYAS	
--	--	--

*- Lưu ý rằng trình tự FGF21 kiểu đại trong bảng này đề cập đến trình tự tham chiếu theo NCBI số NP_061986.1 (SEQ ID NO:1) trừ khi có trường hợp cụ thể khác.

Tất cả các đột biến trong gốc FGF21 và việc đánh số axit amin tương ứng của đột biến nêu trên đề cập lại đến (SEQ ID NO:1) chứ không phải trình tự có độ dài đầy đủ trong bảng này, có thể cũng bao gồm vùng Fc và vùng cầu nối.

Biến thể hoặc đột biến được sử dụng trong protein dung hợp theo sáng chế, ví dụ, biến thể của FGF21 kiểu đại, đặc trưng ở ít nhất một axit amin được thay thế, bổ sung, và/hoặc bị loại bỏ so với protein kiểu đại. Ngoài ra, biến thể có thể có sự cắt ngắn đầu N và/hoặc C so với protein kiểu đại. Nói chung, biến thể có nhiều đặc tính, cấu trúc hoặc chức năng được cải biến của protein kiểu đại. Ví dụ, biến thể này có thể có tính ổn định vật lý được tăng cường hoặc được cải thiện trong dung dịch cô đặc (ví dụ, ít sự kết cụm qua trung gian kỵ nước), tính ổn định trong huyết tương được tăng cường hoặc cải thiện khi được ủ với huyết tương máu hoặc hoạt tính sinh học được tăng cường hoặc cải thiện trong khi vẫn duy trì protein về hoạt tính sinh học phù hợp.

Sự thay thế và sự cải biến axit amin chấp nhận được mà tạo nên sự khác nhau giữa các phần của protein dung hợp theo sáng chế và protein đối chứng kiểu đại của chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin, bao gồm sự thay thế bằng chất tương tự axit amin vốn không có trong tự nhiên, và sự cắt ngắn. Do đó, protein dung hợp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đột biến định hướng vị trí, polypeptit cắt ngắn, đột biến chống lại sự phân giải protein, đột biến làm giảm sự tích tụ, các đột biến tổ hợp, và protein dung hợp, như được mô tả ở đây.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biểu hiện protein sẽ xác định rằng trình tự metionin hoặc metionin-arginin có thể được chèn vào ở đầu N của protein dung hợp theo sáng chế, để biểu hiện trong *E. coli*, và được dự tính trong phạm vi sáng chế.

Protein dung hợp theo sáng chế có thể có tính tương hợp tăng với chất bảo quản được (ví dụ, m-cresol, phenol, rượu benzyl), do đó, cho phép bào chế được phẩm bảo quản được mà vẫn duy trì đặc tính hóa lý và hoạt tính sinh học của protein trong khi bảo quản. Do đó, biến thể có tính ổn định được lý được tăng cường so với kiểu đại, có

tính ổn định vật lý được cải thiện trong dung dịch được cô đặc trong cả điều kiện sinh lý và điều kiện bảo quản được phẩm, trong khi vẫn duy trì tiềm năng sinh học. Bằng ví dụ không giới hạn, protein dung hợp theo sáng chế có thể kháng lại sự phân giải protein và sự thoái hóa do enzym; có thể có tính ổn định được cải thiện; và có thể ít có khả năng tích tụ, so với bản đối chiếu kiểu đại của chúng hoặc trình tự tự nhiên tương đồng. Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ này không loại trừ lẫn nhau hoặc bị giới hạn, hoàn toàn có thể là biến thể thu được có một hoặc nhiều đặc tính được cải biến của protein kiểu đại.

Sáng chế cũng bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa protein dung hợp theo sáng chế, bao gồm, ví dụ, trình tự axit amin FGF21 tương đồng ít nhất khoảng 95% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:3, nhưng trong đó các gốc cụ thể tạo đặc tính mong muốn cho biến thể protein FGF21, ví dụ, cải thiện khả năng của thụ thể FGF21-, kháng lại sự phân giải protein, tăng chu kỳ bán rã hoặc các đặc tính làm giảm sự tích tụ và tổ hợp của chúng không được cải biến thêm. Nói cách khác, với sự loại trừ các gốc trong trình tự đột biến FGF21 mà được cải biến để tạo các đặc tính kháng lại sự phân giải protein, giảm sự tích tụ, hoặc các đặc tính khác, khoảng 5% (theo cách khác 4%, theo cách khác 3%, theo cách khác 2%, theo cách khác 1%) của gốc axit amin khác trong trình tự đột biến FGF21 có thể được cải biến. Thể đột biến FGF21 này có ít nhất một hoạt tính của polypeptit FGF21 kiểu đại.

Sáng chế còn bao gồm phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit tương đồng ít nhất khoảng 85%, và tốt hơn nữa, ít nhất khoảng 90 đến 95% với trình tự nucleotit của SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4, nhưng trong đó nucleotit mã hóa gốc axit amin tạo đặc tính kháng lại sự phân giải protein, giảm sự tích tụ hoặc các đặc tính khác của protein được mã hóa mà không được cải biến thêm. Nói cách khác, với sự loại trừ các gốc nucleotit mã hóa các gốc trong trình tự đột biến FGF21 được cải biến để tạo đặc tính kháng lại sự phân giải protein, giảm sự tích tụ, hoặc các đặc tính khác, khoảng 15%, và tốt hơn là khoảng 10 đến 5% tất cả các nucleotit khác trong trình tự đột biến có thể được cải biến. Các phân tử axit nucleic này mã hóa protein có ít nhất một hoạt tính của bản đối chiếu kiểu đại của chúng.

Sáng chế đề xuất phương pháp được sử dụng để tạo protein dung hợp theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm sự cải biến đặc hiệu vị trí và biến đổi không phải đặc hiệu vị trí của protein kiểu đại (ví dụ, protein kiểu đại FGF21 như được mô tả

ở đây), ví dụ, sự cắt ngắn của protein kiểu dài, và sự kết hợp đặc hiệu vị trí của axit amin ở vị trí mong muốn trong protein kiểu dài. Sự cải biến này tăng cường đặc tính sinh học của protein dung hợp theo sáng chế so với protein kiểu dài, cũng như là, trong một số trường hợp, tạo ra điểm gắn, ví dụ, nhãn và chất tăng chu kỳ bán rã, và cho mục đích gắn các biến thể này lên bề mặt của giá thể rắn. Các phương án liên quan của sáng chế là phương pháp tạo ra tế bào có khả năng tạo ra protein dung hợp này của sáng chế, và tạo ra vectơ chứa ADN mã hóa các biến thể này.

Theo một số phương án, các sự cải biến này, ví dụ, cải biến đặc hiệu vị trí, được sử dụng để gắn các thể liên hợp, ví dụ, nhóm PEG với protein, polypeptit, và/hoặc peptit của sáng chế, cho mục đích, ví dụ, tăng chu kỳ bán rã hoặc trường hợp khác, cải thiện các đặc tính sinh học của protein, polypeptit, và/hoặc peptit đã nêu. Kỹ thuật này được mô tả thêm ở đây.

Theo phương án khác, các cải biến này, ví dụ, cải biến đặc hiệu vị trí, được sử dụng để gắn các polyme, phân tử nhỏ và trình tự protein tái tổ hợp khác mà làm tăng chu kỳ bán rã của protein theo sáng chế. Phương án này của sáng chế bao gồm sự gắn axit béo hoặc hợp chất gắn kết albumin đặc hiệu với protein, polypeptit, và/hoặc peptit. Theo phương án khác, các cải biến này được tạo ra ở loại axit amin cụ thể và có thể được gắn tại một hoặc nhiều vị trí trên protein.

Theo phương án khác, các cải biến này, ví dụ, cải biến đặc hiệu vị trí, được sử dụng làm phương tiện gắn sản phẩm multime kiểu dài và/hoặc multime khác, ví dụ, dimer (homodimer hoặc heterodimer) hoặc trimer hoặc tetramer. Các phân tử protein multime có thể có thêm nhóm như PEG, đường, và/hoặc thể liên hợp PEG-cholesterol được gắn hoặc được dung hợp đầu amin hoặc đầu carboxy với protein khác như Fc, albumin huyết thanh người (Human Serum Albumin - HSA), v.v.

Theo phương án khác, sự cải biến đặc hiệu vị trí này được sử dụng để tạo ra protein, polypeptit và/hoặc peptit, trong đó vị trí của tương tự pyrolysin hoặc pyrolysin hợp nhất đặc hiệu vị trí hoặc axit amin vốn không có trong tự nhiên (para-axetyl-Phe, para-azido-Phe) cho phép điều chỉnh hướng và sự gắn kết các protein, polypeptit và/hoặc peptit này lên bề mặt giá thể rắn hoặc để gắn kết các nhóm như PEG, đường và/hoặc liên hợp PEG-cholesterol.

Theo phương án khác, sự cải biến đặc hiệu vị trí sử dụng protein liên kết ngang đặc hiệu vị trí, polypeptit và/hoặc peptit do đó, tạo ra hetero-oligome bao gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, heterodime và heterotrime. Theo phương án khác, cải biến đặc hiệu vị trí này sử dụng protein liên kết ngang đặc hiệu vị trí, polypeptit và/hoặc peptit do đó, tạo ra thể liên hợp protein-protein, thể liên hợp protein-polypeptit, thể liên hợp protein-peptit, thể liên hợp polypeptit-polypeptit, thể liên hợp polypeptit-peptit hoặc thể liên hợp peptit-peptit. Theo phương án khác, sự cải biến đặc hiệu vị trí có thể bao gồm điểm phân nhánh để cho phép một hoặc nhiều loại phân tử được gắn vào vị trí đơn của protein, polypeptit hoặc peptit.

Theo phương án khác, sự cải biến được liệt kê ở đây có thể được thực hiện theo cách phải là đặc hiệu vị trí và tạo ra thể liên hợp protein-protein, thể liên hợp protein-polypeptit, thể liên hợp protein-peptit, thể liên hợp polypeptit-polypeptit, thể liên hợp polypeptit-peptit hoặc thể liên hợp peptit-peptit của sáng chế.

Định nghĩa

Các định nghĩa khác nhau được sử dụng trong tài liệu này. Hầu hết các từ đều có nghĩa đặc trưng trong lĩnh vực này. Các từ được định nghĩa cụ thể dưới đây hoặc bất kỳ chỗ nào khác trong tài liệu này có nghĩa được đề xuất trong phạm vi của toàn bộ sáng chế và thường được hiểu đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “FGF21” để chỉ thành viên họ protein yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF). Trình tự axit amin của FGF21 (GenBank Accession No. NP_061986.1) được nêu trong SEQ ID NO:1, trình tự polynucleotit tương đồng của nó được nêu trong SEQ ID NO:2 (trình tự tham chiếu theo NCBI số NM_019113.2). “Biến thể FGF21,” “đột biến FGF21,” và thuật ngữ tương tự mô tả protein FGF21 được cải biến, ví dụ, với gốc axit amin thành phần bị loại bỏ, bổ sung, cải biến, hoặc thay thế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thụ thể FGF21” để chỉ thụ thể FGF21 (Kharitonov, A, et al. (2008) *Journal of Cellular Physiology* 215:1-7; Kurosu, H, et al. (2007) *JBC* 282:26687-26695; Ogawa, Y, et al. (2007) *PNAS* 104:7432-7437).

Thuật ngữ “polypeptit FGF21” để chỉ polypeptit xuất hiện trong tự nhiên được biểu hiện ở người. Đối với mục đích của bản mô tả này, thuật ngữ “polypeptit FGF21” có thể được sử dụng để chỉ polypeptit FGF21 có độ dài hoàn chỉnh bất kỳ, ví dụ, SEQ ID NO:1, chứa 209 gốc axit amin và được mã hóa bằng trình tự nucleotit SEQ ID NO:2; và dạng thuần thực bất kỳ của polypeptit, chứa 181 gốc axit amin, và trong đó,

28 gốc axit amin ở đầu amino của polypeptit FGF21 có độ dài hoàn chỉnh (tức là, cấu tạo nên peptit tín hiệu) được loại bỏ.

“Biến thể 76,” như được sử dụng ở đây, là biến thể protein FGF21, là của PEG nhánh dài 40kDa được liên kết thông qua Cys154, và tám đột biến điểm liên quan đến protein kiểu đại chứa 177 axit amin. Sự tổng hợp biến thể này được mô tả chi tiết hơn ở đây, và trình tự protein được thể hiện trong bảng 1 và trình tự SEQ ID NO:9.

Thuật ngữ “phân tử axit nucleic được phân lập” để chỉ phân tử axit nucleic của sáng chế mà (1) được phân tách từ ít nhất khoảng 50 phần trăm protein, lipid, hydrat cacbon, hoặc nguyên liệu khác được nhận thấy vốn có trong tự nhiên khi axit nucleic tổng số được phân tách từ các tế bào nguồn, (2) không được liên kết với tất cả hoặc một phần polynucleotit mà “phân tử axit nucleic được phân lập” được liên kết trong tự nhiên, (3) được liên kết linh hoạt với polynucleotit mà nó không được liên kết trong tự nhiên, hoặc (4) không xuất hiện trong tự nhiên dưới dạng một phần của trình tự polynucleotit lớn hơn. Tốt hơn nếu, phân tử axit nucleic được phân lập của sáng chế về cơ bản là không chứa phân tử axit nucleic hoặc tạp chất khác được tìm thấy trong môi trường tự nhiên của nó mà có thể ảnh hưởng tới sự sử dụng trong tạo ra polypeptit hoặc trong sử dụng để điều trị, chẩn đoán, phòng bệnh hoặc nghiên cứu.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng để chỉ phân tử bất kỳ (ví dụ, axit nucleic, plasmit, hoặc virus) dùng để chuyển thông tin mã hóa vào tế bào chủ.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” để chỉ vector thích hợp cho sự biến nạp của tế bào chủ và chứa trình tự axit nucleic điều khiển và/hoặc kiểm soát sự biểu hiện của trình tự axit nucleic khác loại chèn vào. Sự biểu hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các quá trình như phiên mã, dịch mã, và sự ghép nối ARN, nếu có mặt các intron.

Thuật ngữ “được liên kết linh hoạt” được sử dụng ở đây để chỉ sự sắp xếp các trình tự sườn, trong đó trình tự sườn hầu hết được mô tả được tạo cấu trúc hoặc được gắn lại để thực hiện chức năng thông thường của chúng. Các thành phần của protein dung hợp có thể được liên kết linh hoạt với thành phần khác để cho phép protein dung hợp hoạt động như thể nó là protein vốn có trong tự nhiên, protein nội sinh, và/hoặc để kết hợp các thành phần khác loại của protein dung hợp này theo kiểu hiệp đồng.

Ở mức độ nucleotit, trình tự sườn được liên kết linh hoạt với trình tự mã hóa có thể có khả năng tác động lên sự sao chép, sự phiên mã và/hoặc sự dịch mã của trình tự mã hóa. Ví dụ, trình tự mã hóa được liên kết linh hoạt với promoter khi promoter có khả

năng điều khiển sự phiên mã của trình tự mã hóa. Trình tự sườn không cần tiếp giáp với trình tự mã hóa, với điều kiện là nó hoạt động chính xác. Do đó, ví dụ, chèn vào trình tự đã phiên mã mà chưa dịch mã có thể có mặt ở giữa trình tự của promotor và trình tự mã hóa và trình tự promotor có thể vẫn được coi là “được liên kết linh hoạt” với trình tự mã hóa.

Thuật ngữ “tế bào chủ” được sử dụng để chỉ tế bào được biến nạp, hoặc có khả năng biến nạp được với trình tự axit nucleic và sau đó biểu hiện gen quan tâm được chọn lọc. Thuật ngữ này bao gồm thể hệ con của tế bào bố mẹ, cho dù thể hệ con giống hệt về hình thái học hoặc về bản chất di truyền với bố mẹ ban đầu hay không, với điều kiện là có mặt gen được chọn lọc.

Thuật ngữ “axit amin,” như được sử dụng ở đây, để chỉ axit amin vốn có trong tự nhiên, axit amin không có trong tự nhiên, chất tương tự axit amin và giả axit amin có chức năng tương tự như axit amin vốn có trong tự nhiên, tất cả ở chất đồng phân lập thể D và L của chúng nếu cấu trúc của chúng chấp nhận dạng đồng phân lập thể này. Axit amin được đề cập ở đây bằng tên của chúng, bằng ba ký hiệu chữ cái đã biết chung hoặc bằng các ký hiệu chữ cái được đề xuất bởi Ủy ban danh pháp hóa sinh thuộc Hiệp hội hóa học cơ bản và ứng dụng quốc tế - Hiệp hội hóa sinh quốc tế IUPAC-IUB.

Thuật ngữ “vốn có trong tự nhiên” khi được sử dụng kết hợp với vật liệu sinh học như phân tử axit nucleic, polypeptit, tế bào chủ, và nguyên liệu tương tự, để chỉ nguyên liệu được vốn có trong tự nhiên và không bị con người chi phối. Tương tự, “vốn không có trong tự nhiên” như được sử dụng ở đây để chỉ nguyên liệu vốn không có trong tự nhiên hoặc được cải biến cấu trúc hoặc được tổng hợp bởi con người. Khi được sử dụng kết hợp với nucleotit, thuật ngữ “vốn có trong tự nhiên” để chỉ các bazơ adenin (A), xytosin (C), guanin (G), tymin (T), và uraxil (U). Khi được sử dụng kết hợp với axit amin, thuật ngữ “vốn có trong tự nhiên” để chỉ 20 axit amin thiết yếu (tức là, alanin (A), xystein (C), axit aspartic (D), axit glutamic (E), phenylalanin (F), glyxin (G), histidin (H), isoleuxin (I), lysin (K), leuxin (L), metionin (M), asparagin (N), prolin (P), glutamin (Q), arginin (R), serin (S), threonin (T), valin (V), tryptophan (W), và tyrosin (Y)), cũng như là selenoxystein, pyrolysin (Pyl, hoặc O), và pyrolyl-carboxy-lysin (Pcl, hoặc Z).

Pyrolysin (Pyl) là axit amin tự nhiên được tìm thấy trong metylamin metyltransferaza của vi khuẩn cổ sinh metan của họ *Methanosarcina*. Pyrolysin là chất tương tự lysin được kết hợp cùng dịch mã ở các mã bộ ba UAG trong khung trong mARN tương ứng, và nó được xem là axit amin tự nhiên thứ 22.

Như được mô tả ít nhất trong công bố đơn PCT số WO2010/48582 (chủ đơn IRM, LLC), thực nghiệm sinh tổng hợp pyrolysin (Pyl) trong *E. coli* dẫn đến sự hình thành “pyrolysin được khử methyl hóa,” ở đây để chỉ là pyrolin-carboxy-lysin, hoặc Pcl. “Pcl,” như được sử dụng ở đây, để chỉ Pcl-A hoặc Pcl-B.

Các thuật ngữ “axit amin không tự nhiên” và “axit amin không có trong tự nhiên,” như được sử dụng ở đây, thay thế nhau được mong đợi là cấu trúc axit amin không thể được tạo ra bằng cách sinh tổng hợp trong sinh vật bất kỳ bằng cách sử dụng gen không được cải biến hoặc được cải biến từ sinh vật bất kỳ, hoặc giống nhau hoặc khác nhau. Các thuật ngữ này để chỉ gốc axit amin không có trong trình tự protein FGF 21 (kiểu đại) vốn có trong tự nhiên hoặc trình tự của sáng chế. Các axit amin này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin được cải biến và/hoặc chất tương tự axit amin không phải là một trong 20 axit amin vốn có trong tự nhiên, selenoxystein, pyrolysin (Pyl), hoặc pyrolin-carboxy-lysin (Pcl, ví dụ, như được mô tả trong công bố đơn PCT số WO2010/48582). Gốc axit amin không tự nhiên này có thể được đưa vào bằng sự thay thế axit amin vốn có trong tự nhiên và/hoặc bằng cách chèn axit amin không tự nhiên vào trình tự protein FGF21 (kiểu đại) vốn có trong tự nhiên hoặc trình tự của sáng chế. Gốc axit amin không tự nhiên còn có thể được kết hợp sao cho chức năng mong muốn được truyền cho phân tử FGF21, ví dụ, khả năng liên kết gốc chức năng (ví dụ, PEG). Khi được sử dụng kết hợp với axit amin, ký hiệu “U” sẽ có nghĩa là “axit amin không tự nhiên” và “axit amin không có trong tự nhiên” như được sử dụng ở đây.

Ngoài ra, hiểu rằng “axit amin không tự nhiên” này cần tARN được cải biến và tARN synthetaza được cải biến (RS) cho sự kết hợp thành protein. Cặp tARN/RS trực giao “được chọn lọc” này được tạo ra bằng quy trình chọn lọc được phát triển bởi Schultz et al. hoặc bằng đột biến ngẫu nhiên hoặc hướng đích. Ví dụ, pyrolin-carboxy-lysin là “axit amin tự nhiên” vì nó được tạo ra theo cách sinh tổng hợp bằng gen được chuyển từ một sinh vật vào trong tế bào chủ và vì nó được kết hợp thành protein bằng cách sử dụng gen tARN và tARN synthetaza tự nhiên, trong khi *p*-aminophenylalanin

(Xem, Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9) là “axit amin không tự nhiên” bởi vì, mặc dù được tạo ra theo cách sinh tổng hợp, nhưng nó được kết hợp thành protein bằng cặp tARN/tARN synthetaza trực giao được chọn lọc.

Axit amin được mã hóa được cải biến bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hydroxyprolin, γ -carboxyglutamat, O-phosphoserin, axit azetidincarboxylic, axit 2-aminoadipic, axit 3-aminoadipic, beta-alanin, axit aminopropionic, axit 2-aminobutyric, axit 4-aminobutyric, axit 6-aminocaproic, axit 2-aminoheptanoic, axit 2-aminoisobutyric, axit 3-aminoisobutyric, axit 2-aminopimelic, tertiary-butylglyxin, axit 2,4-diaminoisobutyric, desmosin, axit 2,2'-diaminopimelic, axit 2,3-diaminopropionic, N-etyl glyxin, N-metyl glyxin, N-etyl asparagin, homoprolin, hydroxylysin, allo-hydroxylysin, 3-hydroxyprolin, 4-hydroxyprolin, isodesmosin, allo-isoleuxin, N-metylalanin, N-metyl glyxin, N-metyl isoleuxin, N-metyl pentyl glyxin, N-metyl valin, naphthalanin, norvalin, norleuxin, ornithin, pentyl glyxin, axit pipercolic và thioprolin. Thuật ngữ “axit amin” còn bao gồm axit amin vốn có trong tự nhiên mà được chuyển hóa trong nhiều sinh vật nhưng không được mã hóa bằng mã di truyền để kết hợp thành protein. Axit amin này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ornithin, D-ornithin, và D-arginin.

Thuật ngữ “chất tương tự axit amin,” như được sử dụng ở đây, để chỉ hợp chất có cấu trúc hóa học cơ bản giống nhau như axit amin được vốn có trong tự nhiên, chỉ bằng ví dụ, α -carbon được liên kết với hydro, nhóm carboxyl, nhóm amin, và nhóm R. Chất tương tự axit amin bao gồm axit amin tự nhiên và không tự nhiên được phong tỏa hóa học, có tính thuận nghịch hoặc không có tính thuận nghịch, hoặc nhóm carboxy đầu C của chúng, nhóm amin đầu N của chúng và/hoặc nhóm chức mạch bên của chúng được cải biến về mặt hóa học. Chất tương tự này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metionin sulfoxit, metionin sulfon, S-(carboxymetyl)-xystein, S-(carboxymetyl)-xystein sulfoxit, S-(carboxymetyl)-xystein sulfon, (beta-metyl este) của axit aspartic, N-etyl glyxin, alanin carboxamit, homoserin, norleuxin, và metionin metyl sulfonium.

Thuật ngữ “giả axit amin,” như được sử dụng ở đây, để chỉ hợp chất hóa học có cấu trúc khác cấu trúc hóa học chung của axit amin, nhưng chức năng giống với axit amin vốn có trong tự nhiên.

Thuật ngữ “biến thể có hoạt tính sinh học” để chỉ biến thể polypeptit bất kỳ được sử dụng trong protein dung hợp theo sáng chế, ví dụ, khi protein thành phần của thể dung hợp, có hoạt tính của protein kiểu đại của nó (ví dụ, xuất hiện trong tự nhiên) hoặc bản đối chiếu polypeptit, như khả năng điều biến mức glucoza máu, HbA1c, □ insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol; làm tăng chức năng tuyến tụy; làm giảm lượng lipit trong gan; làm giảm trọng lượng cơ thể; và cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu dùng năng lượng, hoặc độ nhạy insulin, không kể tới loại hoặc số lượng biến đổi được đưa vào biến thể polypeptit. Biến thể polypeptit có mức độ hoạt tính giảm nào đó liên quan đến kiểu đại tuy nhiên có thể được xem là biến thể polypeptit có hoạt tính sinh học. Ví dụ điển hình không giới hạn về biến thể polypeptit có hoạt tính sinh học của sáng chế là biến thể FGF21, sau đó được cải biến, và có đặc tính sinh học giống hoặc được tăng cường liên quan đến FGF21 kiểu đại.

Mỗi thuật ngữ “lượng có hiệu quả” và “lượng có hiệu quả điều trị” để chỉ lượng protein dung hợp theo sáng chế được sử dụng để tạo mức độ đáng kể của một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của polypeptit kiểu đại hoặc bản đối chiếu protein, như khả năng làm giảm lượng glucoza máu, insulin, triglyxerit hoặc cholesterol; làm giảm lượng triglyxerit hoặc lipit gan; làm giảm trọng lượng cơ thể; hoặc cải thiện độ dung nạp glucoza, sự tiêu thụ năng lượng, hoặc độ nhạy insulin. Ví dụ, “lượng có hiệu quả điều trị” được sử dụng cho bệnh nhân biểu hiện, trải qua, hoặc dễ bị rối loạn liên quan đến FGF21 (như bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc typ 2, bệnh béo phì, hoặc hội chứng chuyển hóa), là lượng đem lại, cải thiện hoặc trường hợp khác, gây ra sự cải thiện hội chứng bệnh lý, sự tiến triển bệnh, các tình trạng sinh lý học liên quan đến hoặc chống lại cái chết do các rối loạn đề cập đến ở trên. Đối với mục đích của sáng chế “đối tượng” hoặc “bệnh nhân” tốt hơn là người, nhưng cũng có thể là động vật, cụ thể hơn, là động vật động vật làm bạn (ví dụ, chó, mèo, và tương tự), động vật trang trại (ví dụ, bò, cừu, lợn, ngựa, và tương tự) và động vật phòng thí nghiệm (ví dụ, chuột, chuột nhắt, chuột lang, và tương tự).

Thuật ngữ “chất mang dược dụng” hoặc “chất mang sinh lý dụng” như được sử dụng ở đây để chỉ một hoặc nhiều nguyên liệu bào chế thích hợp để thực hiện hoặc tăng cường sự phân phối protein dung hợp theo sáng chế.

Thuật ngữ “kháng nguyên” để chỉ phân tử hoặc một phần của phân tử có khả năng được gắn kết bởi kháng thể, và ngoài ra, còn có khả năng được sử dụng trong động vật để sản xuất kháng thể mà có khả năng gắn kết với epitop của kháng nguyên. Kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều epitop.

Thuật ngữ “Fc tự nhiên” để chỉ phân tử hoặc trình tự chứa trình tự của mảnh không gắn kết kháng nguyên tạo ra từ sự phân cắt toàn bộ kháng thể hoặc sản xuất bằng cách khác, ở dạng monome hoặc multime, và có thể chứa vùng khớp nối. Nguồn globulin miễn dịch gốc của Fc tự nhiên tốt hơn là có nguồn gốc từ người và có thể là globulin miễn dịch bất kỳ, mặc dù IgG1 và IgG2 được ưu tiên. Phân tử Fc tự nhiên được tạo thành polypeptit monome có thể được gắn kết thành dạng dime hoặc multime bằng liên kết cộng hóa trị (tức là, các liên kết disulfua) và không cộng hóa trị. Số lượng liên kết disulfua trong phân tử giữa tiểu đơn vị monome của các phân tử Fc tự nhiên trong phạm vi từ 1 đến 4 phụ thuộc vào lớp (ví dụ, IgG, IgA, và IgE) hoặc phân lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, và IgA2). Một ví dụ của Fc tự nhiên là dime được gắn kết bằng liên kết disulfua tạo ra từ sự phân cắt bằng papain của IgG (xem Ellison et al., 1982, *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9). Thuật ngữ “Fc tự nhiên” như được sử dụng ở đây là chung có các dạng monome, dime, và multime.

Thuật ngữ “biến thể Fc” để chỉ phân tử hoặc trình tự được cải biến từ Fc tự nhiên nhưng vẫn chứa vị trí gắn kết với thụ thể khôi phục, FcRn (thụ thể Fc mới tạo thành). Các công bố đơn quốc tế số WO 97/34631 và WO 96/32478 mô tả biến thể Fc điển hình, cũng như là tương tác với thụ thể khôi phục, và được kết hợp bằng cách viện dẫn ở đây. Do đó, thuật ngữ “biến thể Fc” có thể bao gồm phân tử hoặc trình tự được làm cho giống người từ Fc tự nhiên không phải là người. Ngoài ra, Fc tự nhiên chứa vùng có thể được loại bỏ vì chúng tạo ra đặc trưng về cấu trúc hoặc hoạt tính sinh học không cần thiết cho phân tử dung hợp của protein dung hợp theo sáng chế. Do đó, thuật ngữ “biến thể Fc” bao gồm phân tử hoặc trình tự không có một hoặc nhiều vị trí hoặc gốc Fc tự nhiên, hoặc trong đó một hoặc nhiều vị trí hoặc gốc Fc được cải biến, ảnh hưởng đến hoặc bao gồm: (1) sự tạo thành liên kết disulfua, (2) không tương hợp với tế bào chủ được chọn, (3) biểu hiện không đồng nhất đầu N với sự biểu hiện trong

tế bào chủ được chọn, (4) sự glycosyl hóa, (5) tương tác với bề mặt, (6) gắn kết với thụ thể Fc khác thụ thể khôi phục, hoặc (7) tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC). Biến thể Fc được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Thuật ngữ “vùng Fc” bao gồm Fc tự nhiên và biến thể Fc và trình tự như được định nghĩa ở trên. Khi với biến thể Fc và phân tử Fc tự nhiên, thuật ngữ “vùng Fc” bao gồm phân tử ở dạng monome hoặc multime, được phân cắt từ kháng thể hoặc được sản xuất bằng cách khác. Theo một số phương án của sáng chế, vùng Fc có thể được dung hợp với FGF21 hoặc thể đột biến FGF21 (bao gồm dạng cắt ngắn của FGF21 hoặc đột biến FGF21) thông qua, ví dụ, liên kết cộng hóa trị giữa vùng Fc và trình tự FGF21. Các protein dung hợp này có thể tạo ra multime thông qua sự kết hợp của vùng Fc và cả protein dung hợp này và multime của chúng là một khía cạnh của sáng chế.

Thuật ngữ “mảnh Fc được cải biến”, như được sử dụng ở đây, sẽ có nghĩa là mảnh Fc của kháng thể chứa trình tự được cải biến. Mảnh Fc là một phần của kháng thể bao gồm CH2, CH3 và một phần vùng nối. Mảnh Fc được cải biến có thể có nguồn gốc từ, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4. FcLALA được cải biến mảnh Fc với đột biến LALA (L234A, L235A), gây ra ADCC với hiệu quả thấp, và gắn kết và hoạt hóa bề mặt người yếu. Hessel et al. 2007 Nature 449:101-104. Ngoài ra, sự cải biến mảnh Fc được mô tả trong, ví dụ, U.S. Patent No. 7,217,798.

Thuật ngữ “khác loại” có nghĩa là các vùng này không được vốn có trong tự nhiên kết hợp với miền cố định của kháng thể. Cụ thể, vùng liên kết khác loại này không có cấu trúc điển hình của vùng biến đổi kháng thể chứa 4 vùng khung, FR1, FR2, FR3 và FR4 và 3 vùng xác định bổ sung (complementarity determining region-CDR) ở giữa các vùng khung này. Mỗi cánh của kháng thể fusobody của chúng bao gồm polypeptit mạch đơn thứ nhất chứa vùng gắn kết thứ nhất liên kết cộng hóa trị với phần đầu N của vùng chuỗi nặng hằng định C_{H1} của kháng thể, và polypeptit mạch đơn thứ hai chứa vùng gắn kết thứ hai liên kết cộng hóa trị với phần đầu N của chuỗi nhẹ hằng định C_L của kháng thể. Liên kết cộng hóa trị có thể trực tiếp, ví dụ thông qua liên kết peptit hoặc gián tiếp, ví dụ thông qua các cầu nối, ví dụ, các cầu nối peptit. Hai dime khác nhau của fusobody được liên kết cộng hóa trị, ví dụ, bằng ít nhất một cầu disulfua ở vùng nối của chúng, như cấu trúc kháng thể. Ví dụ về phân tử với cấu trúc fusobody được mô tả trong lĩnh vực này, cụ thể, các fusobody chứa vùng gắn kết phối

tử của thụ thể heterodime (xem ví dụ, các công bố đơn quốc tế số WO01/46261 và WO11/076781).

Thuật ngữ “polyetylen glycol” hoặc “PEG” để chỉ hợp chất polyalkylen glycol hoặc dẫn xuất của nó, với hoặc không với chất liên hợp hoặc tạo dẫn xuất với gốc liên hợp hoặc hoạt hóa.

Thuật ngữ “rối loạn liên quan đến FGF21,” và thuật ngữ được sử dụng tương tự ở đây, bao gồm, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2, bệnh viêm tụy, lipit máu bất thường, bệnh gan nhiễm chất béo không do rượu (NAFLD), bệnh viêm gan có u mỡ không do rượu (NASH), kháng insulin, insulin máu cao, không dung nạp glucoza, glucoza máu cao, hội chứng chuyển hóa, bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính, bệnh cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, đột quỵ, bệnh suy tim, bệnh tim hình vành, bệnh thận, biến chứng do đái tháo đường, bệnh thần kinh, chứng liệt nhẹ dạ dày, các rối loạn liên quan đến các đột biến bất hoạt trầm trọng trong thụ thể insulin, và các rối loạn chuyển hóa khác.

Thuật ngữ “rối loạn liên quan đến đột biến bất hoạt trầm trọng trong thụ thể insulin”, và các thuật ngữ tương tự được sử dụng ở đây, mô tả tình trạng ở đối tượng bị đột biến ở thụ thể insulin (hoặc có thể là protein được tạo ra trực tiếp từ nó) gây ra sự kháng insulin trầm trọng nhưng thường (mặc dù không luôn luôn) thấy không có bệnh béo phì thông thường trong bệnh đái tháo đường typ 2. Theo nhiều cách, đối tượng chịu các tình trạng bệnh này biểu thị hội chứng hỗn hợp của bệnh đái tháo đường typ 1 và bệnh đái tháo đường typ 2. Do đó đối tượng mắc phải nằm trong một số loại tính nghiêm trọng tăng mạnh, bao gồm: Kháng insulin loại A, kháng insulin loại C (hội chứng AKA HAIR-AN), hội chứng Rabson-Mendenhall và hội chứng Donohue sau cùng hoặc bệnh chậm phát triển trí tuệ. Các rối loạn này liên quan đến mức insulin nội sinh rất cao, và rất thường xuyên là, glucoza máu cao. Do đó đối tượng còn chịu các đặc điểm lâm sàng liên quan đến “độc do insulin”, bao gồm hội chứng androgen cao, hội chứng u nang buồng trứng (polycystic ovarian syndrome - PCOS), chứng rậm lông ở phụ nữ, và bệnh gai đen (tăng sinh quá và sự hình thành sắc tố) trong nếp gấp của da.

“Bệnh đái tháo đường typ 2” là tình trạng bệnh được đặc trưng bởi sự sản xuất quá glucoza mặc dù có sẵn insulin, và lượng glucoza lưu thông duy trì ở mức quá cao như là kết quả của sự thanh thải không thích hợp.

“Bệnh đái tháo đường typ 1” là tình trạng được đặc trưng bởi lượng glucoza trong máu cao có nguyên nhân do thiếu hụt insulin tổng số. Điều này xuất hiện khi hệ miễn dịch của cơ thể tấn công tế bào beta sản xuất insulin trong tuyến tụy và phá hủy chúng. Do đó, tuyến tụy sản xuất ít hoặc không sản xuất insulin.

“Không dung nạp glucoza” hoặc sự dung nạp glucoza bị suy yếu (Impaired Glucoza Tolerance - IGT) là trạng thái trước đái tháo đường của tình trạng glucoza trong máu bất thường liên quan đến nguy cơ tăng bệnh tim mạch. Tình trạng bệnh trước đái tháo đường ngăn cản đối tượng chuyển glucoza vào tế bào hiệu quả và sử dụng nó làm nguồn năng lượng hiệu quả, dẫn đến tăng lượng glucoza trong máu và mức độ kháng insulin.

“Glucoza máu cao” được định nghĩa là sự vượt quá lượng đường (glucoza) trong máu.

“Glucoza máu thấp”, còn được gọi là đường trong máu thấp, xuất hiện khi lượng glucoza trong máu rơi xuống quá thấp để cung cấp đủ năng lượng cho hoạt động của cơ thể.

“Insulin máu cao” được định nghĩa là lượng insulin trong máu cao hơn bình thường.

“Kháng insulin” được định nghĩa là trạng thái, trong đó, lượng insulin bình thường tạo ra đáp ứng sinh học bất thường.

“Bệnh béo phì,” khi đối tượng là người, có thể được định nghĩa là trọng lượng cơ thể quá 20 phần trăm trên trọng lượng cơ thể lý tưởng của dân số đạt được (R. H. Williams, Textbook of Endocrinology, 1974, p. 904-916).

“Biến chứng do đái tháo đường” là các vấn đề, với hoạt động cơ thể khác như, thận, thần kinh (bệnh thần kinh), chân (loét chân và tuần hoàn kém) và mắt (ví dụ, bệnh màng lưới) có nguyên nhân do lượng glucoza trong máu cao. Bệnh đái tháo đường còn làm tăng nguy cơ bệnh tim và các rối loạn xương và khớp. Biến chứng do mắc bệnh đái tháo đường trong thời gian dài khác bao gồm các vấn đề về da, vấn đề về tiêu hóa, suy giảm chức năng sinh dục và các vấn đề về răng và lợi.

“Hội chứng chuyển hóa” có thể được định nghĩa là cụm ít nhất ba trong số các dấu hiệu sau: béo bụng ở hầu hết nam giới, vòng eo 101,6 cm (40-inch) hoặc lớn hơn; đường máu cao – ít nhất 110 miligam trên dexilit (mg/dl) sau khi nhịn đói; triglycerit

cao—ít nhất 150 mg/dL trong máu; HDL thấp—thấp hơn 40 mg/dl; và, huyết áp máu 130/85 mmHg hoặc cao hơn.

“Bệnh viêm tụy” là tình trạng viêm tuyến tụy.

“Lipit máu bất thường” là rối loạn của sự chuyển hóa lipoprotein, bao gồm sự sản xuất quá hoặc thiếu hụt lipoprotein. Lipit máu bất thường có thể được bộc lộ bằng giá trị cholesterol tổng số, nồng độ cholesterol và triglycerit lipoprotein mật độ thấp (low-density lipoprotein - LDL), và giảm nồng độ cholesterol lipoprotein mật độ cao (high-density lipoprotein - HDL) ở trong máu.

“Bệnh gan nhiễm chất béo không do rượu (NAFLD)” là bệnh về gan, không liên quan đến việc tiêu thụ rượu, được đặc trưng bởi sự thay đổi tế bào gan.

“Bệnh viêm gan có u mỡ không do rượu (NASH)” là bệnh về gan, không liên quan đến sự việc tiêu thụ rượu, được đặc trưng bởi sự thay đổi chất béo của tế bào gan, cùng với viêm và xơ trong huyết cầu.

“Cao huyết áp” hoặc áp suất máu cao là sự tăng áp suất máu ở động mạch toàn thân tạm thời hoặc liên tục lên mức độ có khả năng gây nguy hại cho hệ tim mạch hoặc kết quả bất lợi khác. Cao huyết áp được tùy ý định nghĩa là áp suất máu tâm thu trên 140 mmHg hoặc áp suất máu tâm trương trên 90 mmHg.

“Các bệnh tim mạch” là bệnh liên quan đến tim và mạch máu.

“Nhồi máu cơ tim” xuất hiện khi có sự gián đoạn sự cung cấp máu tới một phần của kim. Chứng thiếu máu cục bộ và sự thiếu oxy gây ra, nếu không được điều trị trong thời gian đủ lâu, có thể gây ran guy hại hoặc chết (nhồi máu) mô cơ tim (cơ tim).

“Bệnh động mạch ngoại biên” xuất hiện khi mảng bám tạo thành bên trong động mạch vận chuyển máu tới đầu, các cơ quan và chi. Theo thời gian, mảng bám có thể làm cứng và thu hẹp động mạch làm hạn chế dòng máu giàu oxy tới các cơ quan và các phần khác của cơ thể.

“Chứng xơ vữa động mạch” là bệnh về mạch được đặc trưng bởi các phân lắng đọng lipit được phân bố không đều ở màng trong mạch của động mạch lớn và trung bình, gây ra sự hẹp đường ống động mạch và cuối cùng tạo ra sự xơ hóa và vôi hóa. Các tổn thương thường khu trú và tiến triển chậm và liên tục. Hạn chế lưu lượng máu coi là phần lớn các biểu hiện lâm sàng, thay đổi với sự phân bố và mức độ tổn thương.

“Đột quỵ” là hiện tượng lâm sàng cấp tính, liên quan đến sự suy yếu tuần hoàn não, kéo dài hơn 24 giờ. Đột quỵ bao gồm tổn hại cho não không hồi phục được, loại

và độ trầm trọng của hội chứng phụ thuộc vào vị trí và mức độ của mô não có vòng tuần hoàn bị tổn thương.

“Bệnh suy tim”, còn được gọi là bệnh suy tim sung huyết, là tình trạng bệnh, trong đó tim không thể bơm đủ máu cho phần còn lại của cơ thể.

“Bệnh tim hình vành”, còn được gọi là bệnh động mạch vành, là sự thu hẹp mạch máu cung cấp máu và oxy cho tim.

“Bệnh thận” hoặc bệnh về thận là bệnh bất kỳ về thận. Bệnh về thận do đái tháo đường typ 1 và typ 2 là nguyên nhân gây mắc bệnh chính và tử vong ở người.

“Bệnh thần kinh” là bệnh bất kỳ bao gồm thần kinh sọ howcj hệ thần kinh ngoại biên hoặc hệ thần kinh tự trị.

“Chứng liệt nhẹ dạ dày” là tình trạng suy yếu nhu động, gây ra sự đầy thức ăn xuống ruột bị chậm.

Bệnh nhân bị ốm nặng của sáng chế thường trải qua tình trạng chuyển hóa cao không ổn định. Tình trạng chuyển hóa không ổn định này là do sự thay đổi về chuyển hóa chất nền, có thể dẫn đến sự tiêu hụt tương đối một số chất dinh dưỡng. Thông thường có sự oxy hóa cả chất béo và cơ được tăng lên.

Ngoài ra, bệnh nhân bị ốm nặng tốt hơn là bệnh nhân trải qua hội chứng đáp ứng viêm toàn thân hoặc suy hô hấp. Giảm tỷ lệ mắc bệnh có nghĩa là giảm khả năng bệnh nhân bị ốm nặng phát triển thêm bệnh, tình trạng bệnh lý, hoặc hội chứng bệnh bổ sung hoặc giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh, tình trạng bệnh lý, hoặc hội chứng bổ sung này. Ví dụ giảm tỷ lệ mắc bệnh tương ứng với việc giảm tỷ lệ nhiễm khuẩn huyết hoặc nhiễm trùng hoặc các biến chứng liên quan đến sự suy nhiều cơ quan.

Như được sử dụng ở đây, dạng số ít bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi nội dung chỉ định rõ ràng trường hợp khác. Do đó, ví dụ, viện dẫn đến “một kháng thể” bao gồm cả hai hoặc nhiều kháng thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng” để chỉ +/- 20%, tốt hơn là, +/- 10%, hoặc tốt hơn nữa là, +/- 5% giá trị.

Các thuật ngữ “polypeptit” và “protein”, được sử dụng thay thế nhau và để chỉ dạng polyme của axit amin có độ dài bất kỳ, có thể bao gồm axit amin được mã hóa và không được mã hóa, axit amin tự nhiên hoặc không tìm thấy trong tự nhiên hoặc các axit amin được cải biến về mặt hóa học hoặc được tạo dẫn xuất, và polypeptit có khung peptit được cải biến. Thuật ngữ này bao gồm protein dung hợp, bao gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, protein dung hợp với trình tự axit amin khác loại, dung hợp với trình tự khởi đầu khác loại và cùng loại, có hoặc không có gốc metionin đầu N; protein hướng đích miễn dịch; và các dạng tương tự.

Thuật ngữ “cá nhân”, “đối tượng”, “vật chủ” và “bệnh nhân” được sử dụng thay thế nhau và để chỉ đối tượng bất kỳ mà mong muốn việc chẩn đoán, điều trị, hoặc trị liệu, đặc biệt là người. Các đối tượng khác bao gồm, gia súc, chó, mèo, chuột lang, thỏ, chuột, chuột nhắt, ngựa, và các động vật tương tự. Trong một số phương án được ưu tiên, đối tượng là người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mẫu” để chỉ vật liệu sinh học từ bệnh nhân. Mẫu được phân tích bởi sáng chế không bị giới hạn ở dạng cụ thể bất kỳ. Các mẫu này bao gồm, như các ví dụ không giới hạn, tế bào đơn, tế bào đa, mô, khối u, dịch sinh học, phân tử sinh học, hoặc huyền phù hoặc dịch chiết của mẫu bất kỳ nêu trên. Các ví dụ bao gồm mô được tách ra bằng sinh thiết, mô được tách ra khi cắt bỏ, máu, nước tiểu, mô bạch huyết, dịch não tủy, đờm, và mẫu phân. Mẫu được sử dụng sẽ khác nhau phụ thuộc vào dạng thử nghiệm, phương pháp phát hiện và bản chất của các khối u, mô, tế bào hoặc dịch chiết để làm thử nghiệm. Phương pháp để chuẩn bị mẫu là đã biết trong lĩnh vực này và có thể dễ dàng thích được đáp ứng để thu được mẫu tương thích với phương pháp được sử dụng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử sinh học” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polypeptit, axit nucleic, và sacarit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều biến” để chỉ sự thay đổi trong chất lượng hoặc số lượng gen, protein, hoặc phân tử bên trong, bên ngoài, hoặc trên bề mặt tế bào. Sự thay đổi có thể là tăng hoặc giảm biểu hiện hoặc lượng phân tử. Thuật ngữ “điều biến” còn bao gồm sự thay đổi chất lượng hoặc số lượng chức năng/hoạt tính sinh học, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khả năng làm giảm mức glucoza, insulin, triglycerit, hoặc cholesterol trong máu; làm giảm lipid gan hoặc mức triglycerit gan; làm giảm trọng lượng cơ thể; và cải thiện độ dung nạp glucoza, sự tiêu dùng năng lượng, hoặc độ nhạy insulin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất điều biến” để chỉ chế phẩm điều biến một hoặc nhiều sự kiện sinh lý hoặc hóa sinh liên quan đến các rối loạn liên quan đến FGF21-, như bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc typ 2 hoặc các tình trạng bệnh lý chuyển hóa như bệnh béo phì. Các sự kiện này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khả

năng làm giảm mức glucoza, insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol trong máu; làm giảm mức lipit gan hoặc triglyxerit gan; làm giảm trọng lượng cơ thể; và cải thiện độ dung nạp glucoza, sự tiêu dùng năng lượng, hoặc độ nhạy insulin.

“Sản phẩm gen” là sản phẩm polyme sinh học được biểu hiện hoặc được sản xuất từ gen. Sản phẩm gen có thể là, ví dụ, ARN không được ghép nối, mARN, mARN khác nhau được ghép nối, polypeptit, polypeptit được cải biến sau dịch mã, a polypeptit khác nhau được ghép nối, v.v.. Ngoài ra, thuật ngữ này còn bao gồm sản phẩm polyme sinh học được tạo ra bằng cách sử dụng sản phẩm gen ARN làm khuôn (tức là cADN của ARN). Sản phẩm gen có thể được sản xuất nhờ enzym, tái tổ hợp, hóa học, hoặc trong tế bào mà có gen. Theo một số phương án, nếu sản phẩm gen có protein, nó thể hiện hoạt tính sinh học. Theo một số phương án, nếu sản phẩm gen là axit nucleic, nó có thể được dịch mã thành sản phẩm gen là protein bộc lộ hoạt tính sinh học.

“Sự điều biến hoạt tính FGF21,” như được sử dụng ở đây, để chỉ sự tăng hoặc giảm hoạt tính FGF21 có thể là kết quả của, ví dụ, sự tương tác chất với polynucleotit hoặc polypeptit FGF21, sự ức chế phiên mã và/hoặc dịch mã FGF21 (ví dụ, thông qua đối mã hoặc tương tác siARN với gen FGF21 hoặc phiên mã FGF21, thông qua sự điều biến các yếu tố phiên mã thuận lợi cho sự biểu hiện FGF21, và hiện tượng tương tự. Ví dụ, sự điều biến hoạt tính sinh học để chỉ sự tăng hoặc giảm hoạt tính sinh học. Hoạt tính FGF21 có thể được xác định bằng phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm mức glucoza, insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol máu ở đối tượng, đánh giá lượng polypeptit FGF21, hoặc bằng cách đánh giá mức độ phiên mã FGF21. Sự so sánh về hoạt tính còn có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách đo mức dấu chuẩn sinh học sản phẩm đầu ra FGF21, và xác định sự tăng tín hiệu FGF21. Hoạt tính FGF21 còn có thể được xác định bằng cách đo: tín hiệu tế bào; hoạt tính kinaza; sự hấp thụ glucoza vào tế bào tạo mỡ; sự dao động lượng insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol máu; sự thay đổi lượng lipit gan hoặc liver triglyxerit gan; sự tương tác giữa thụ thể FGF21 và FGF21; hoặc phosphoryl hóa thụ thể FGF21. Theo một số phương án phosphoryl hóa thụ thể FGF21 có thể là sự phosphoryl hóa tyrosin. Theo một số phương án, sự điều biến hoạt tính FGF21 có thể là gây ra sự điều biến kiểu hình liên quan đến FGF21.

Phép so sánh hoạt tính FGF21 còn có thể được thực hiện bằng, ví dụ, đo lượng dấu chuẩn sinh học của sản phẩm đầu ra FGF21, và đo sự tăng tính hiệu FGF21. Hoạt tính FGF21 còn có thể được xác định bằng cách đo: tín hiệu tế bào; hoạt tính kinaza; glucoza hấp thụ vào tế bào tạo mỡ; sự dao động lượng insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol máu; sự thay đổi lượng lipit gan hoặc triglyxerit gan; sự tương tác giữa FGF21 và thụ thể (FGFR-1c, FGFR-2c, hoặc FGFR-3c); hoặc sự phosphoryl hóa của thụ thể FGF21. Theo một số phương án, sự phosphoryl hóa thụ thể FGF21 có thể là sự phosphoryl hóa tyrosin. Theo một số phương án, sự điều biến hoạt tính FGF21 có thể gây ra sự điều chỉnh kiểu hình liên quan đến FGF21.

“Dấu chuẩn sinh học của sản phẩm đầu ra FGF21,” như được sử dụng ở đây, là gen hoặc sản phẩm gen, hoặc dấu hiệu có thể xác định được của gen hoặc sản phẩm gen. Theo một số phương án, gen hoặc hoạt tính mà là dấu chuẩn sản phẩm đầu ra của FGF21 thể hiện mức độ biểu hiện thay đổi, hoặc trong mô mạch. Theo một số phương án, hoạt tính của dấu chuẩn sản phẩm đầu ra được thay đổi khi có mặt chất điều biến FGF21. Theo một số phương án, dấu chuẩn sản phẩm đầu ra thể hiện mức độ biểu hiện thay đổi khi FGF21 bị gây nhiễu bằng chất điều biến FGF21 của sáng chế. Dấu chuẩn sản phẩm đầu ra FGF21 bao gồm, không chỉ giới hạn ở, mức độ hấp thụ glucoza hoặc 2-deoxy-glucoza, pERK và protein được phosphoryl hóa hoặc axetyl hóa khác hoặc mức NAD.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều hòa tăng” để chỉ sự tăng, sự hoạt hóa hoặc sự kích thích hoạt tính hoặc số lượng. Ví dụ, trong phạm vi của sáng chế, chất điều biến FGF21 có thể làm tăng hoạt tính thụ thể FGF21. Theo một phương án, một hoặc nhiều FGFR-1c, FGFR-2c, hoặc FGFR-3c có thể được điều hòa tăng đáp ứng với chất điều biến FGF21. Điều hòa tăng còn có thể để chỉ hoạt tính liên quan đến FGF21, như ví dụ, khả năng làm giảm lượng glucoza, insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol máu; giảm lượng lipit gan hoặc triglyxerit gan; làm giảm trọng lượng cơ thể; cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu dùng năng lượng, hoặc độ nhạy insulin; hoặc gây ra sự phosphoryl hóa của thụ thể FGF21; hoặc làm tăng dấu chuẩn sản phẩm đầu ra FGF21. Thụ thể FGFR21 có thể là một hoặc nhiều của FGFR-1c, FGFR-2c, hoặc FGFR-3c. Điều hòa tăng có thể ít nhất 25%, ít nhất 50%, ít nhất 75%, ít nhất 100%, ít nhất 150%, ít nhất 200%, ít nhất 250%, ít nhất 400%, hoặc ít nhất 500% như được so sánh với đối chứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đầu N” để chỉ ít nhất 20 axit amin đầu tiên của protein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đầu N” và “vùng đầu N” được sử dụng thay thế nhau và để chỉ mảnh protein bắt đầu từ axit amin thứ nhất của protein và kết thúc ở axit amin bất kỳ ở nửa đầu của protein. Ví dụ, vùng đầu N của FGF21 là từ axit amin 1 của trình tự SEQ ID NO:1 đến axit amin bất kỳ giữa khoảng axit amin 10 và 105 của trình tự SEQ ID NO:1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đầu C” để chỉ ít nhất 20 axit amin cuối cùng của protein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “miền đầu C” và “vùng đầu C” được sử dụng thay thế nhau và để chỉ mảnh protein bắt đầu ở axit amin bất kỳ trong nửa đầu C của protein và kết thúc ở axit amin cuối cùng của protein. Ví dụ, miền đầu C của FGF21 bắt đầu ở axit amin bất kỳ từ axit amin 105 đến khoảng axit amin 200 của SEQ ID NO:1 và kết thúc ở axit amin 209 của SEQ ID NO:1.

Thuật ngữ “miền” như được sử dụng ở đây để chỉ một phần cấu trúc của phân tử sinh học góp phần vào chức năng đã biết hoặc nghi ngờ của phân tử sinh học. Các miền có thể bao quát các vùng hoặc các phần của nó và còn có thể kết hợp một phần của phân tử sinh học khác biệt với vùng cụ thể, với tất cả hoặc một phần của vùng đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “miền tín hiệu” (còn được gọi là “trình tự tín hiệu” hoặc “peptit tín hiệu”) để chỉ miền peptit ở tại phần mở rộng tiếp giáp của trình tự axit amin ở vùng đầu N của protein tiền thân (thường là protein gắn kết màng hoặc protein tiết) và có trong sự vận chuyển protein sau dịch mã. Trong nhiều trường hợp, miền tín hiệu được loại bỏ khỏi protein có độ dài hoàn chỉnh bằng peptidaza tín hiệu đặc hiệu sau khi hoàn thành quy trình phân loại. Mỗi miền tín hiệu chỉ rõ địa điểm cụ thể trong tế bào của protein tiền thân. Miền tín hiệu của FGF21 là axit amin 1-28 của trình tự SEQ ID NO:1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “miền liên kết thụ thể” để chỉ một phần hoặc vùng bất kỳ của protein tiếp xúc với protein thụ thể gắn kết màng, tạo ra đáp ứng tế bào, như sự kiện truyền tín hiệu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “miền gắn kết phối tử” để chỉ một phần hoặc vùng bất kỳ của protein dung hợp theo sáng chế giữ lại được ít nhất một hoạt tính gắn kết thực chất của trình tự tự nhiên tương đồng.

Thuật ngữ “vùng” để chỉ một phần tiếp giáp vật lý của cấu trúc sơ cấp của phân tử sinh học. Trong trường hợp protein, vùng được xác định bằng phần tiếp giáp của trình tự axit amin của protein đó. Theo một số phương án “vùng” liên quan đến chức năng của phân tử sinh học.

Thuật ngữ “mảnh” như được sử dụng ở đây để chỉ phần tiếp giáp tự nhiên của cấu trúc sơ cấp của phân tử sinh học. Trong trường hợp protein, một phần được xác định bằng phần tiếp giáp trình tự axit amin của protein đó và để chỉ ít nhất 3-5 axit amin, ít nhất 8-10 axit amin, ít nhất 11-15 axit amin, ít nhất 17-24 axit amin, ít nhất 25-30 axit amin, và ít nhất 30-45 axit amin. Trong trường hợp oligonucleotit, một phần được xác định bằng phần tiếp giáp của trình tự axit nucleic của oligonucleotit đó và để chỉ ít nhất 9-15 nucleotit, ít nhất 18-30 nucleotit, ít nhất 33-45 nucleotit, ít nhất 48-72 nucleotit, ít nhất 75-90 nucleotit, và ít nhất 90-130 nucleotit. Theo một số phương án, một phần của phân tử sinh học có hoạt tính sinh học. Trong phạm vi của sáng chế, mảnh polypeptit FGF21 không bao gồm toàn bộ trình tự polypeptit FGF21 được nêu trong SEQ ID NO:1.

Polypeptit có “trình tự tự nhiên” là polypeptit có trình tự axit amin giống như polypeptit có nguồn gốc từ tự nhiên. Trình tự polypeptit tự nhiên này có thể được phân lập từ tự nhiên hoặc có thể được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Do đó, polypeptit có trình tự tự nhiên có thể có trình tự axit amin của polypeptit người vốn có trong tự nhiên, polypeptit chuột, hoặc polypeptit từ bất kỳ loài có vú khác.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ “trình tự nucleotit tương đồng,” hoặc “trình tự axit amin tương đồng,” hoặc dạng biến đổi của nó, để chỉ trình tự được đặc trưng bởi sự tương đồng ở ít nhất một tỷ lệ phần trăm cụ thể, ở mức độ nucleotit hoặc mức độ axit amin, và được sử dụng thay thế nhau với “tương đồng trình tự.” Trình tự nucleotit tương đồng bao gồm trình tự mã hóa đồng phân protein. Đồng phân này có thể được biểu hiện trong các mô khác nhau của các cơ quan giống nhau như kết quả của, ví dụ, sự nổi lên phiên ARN. Theo cách khác, dạng đồng phân có thể được mã hóa bằng các gen khác nhau. Trình tự nucleotit tương đồng bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein của các loài khác không phải là người, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật có vú. Trình tự nucleotit tương đồng còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biến thể alen vốn có trong tự nhiên và thể đột biến của trình tự nucleotit được nêu ở đây. Trình tự axit amin tương đồng bao gồm trình tự axit amin chứa phân tử thể axit

amin bảo tồn và polypeptit có sự gắn kết và/hoặc hoạt tính giống nhau. Theo một số phương án, trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin là tương đồng nếu có ít nhất 60% hoặc lớn hơn, lên tới 99%, đồng nhất với trình tự so sánh. Theo một số phương án, trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin là tương đồng nếu có một hoặc nhiều, lên tới 60, phần tử thể nucleotit/axit amin, phần tử bổ sung, hoặc phần tử loại bỏ so với trình tự so sánh. Theo một số phương án, trình tự axit amin tương đồng có không quá 5 hoặc không quá 3 phần tử thể axit amin bảo tồn.

Tỷ lệ phần trăm tương đồng hoặc đồng nhất có thể được xác định bằng, ví dụ, chương trình Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI), sử dụng cài đặt mặc định, sử dụng thuật toán của Smith và Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489). Theo một số phương án, sự tương đồng giữa mẫu dò và đích là trong giữa khoảng 75% đến khoảng 85%. Theo một số phương án, axit nucleic có nucleotit mà tương đồng ít nhất khoảng 95%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99% và khoảng 100% với trình tự SEQ ID NO:2, hoặc một phần của nó.

Sự tương đồng còn có thể ở mức độ polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit cấu thành của protein dung hợp theo sáng chế có thể tương đồng ít nhất 95% với bản đối chiếu kiểu đại có độ dài hoàn chỉnh hoặc trình tự tự nhiên tương đồng, hoặc với một phần của nó. Độ hoặc tỷ lệ phần trăm đồng nhất với protein dung hợp theo sáng chế, hoặc một phần của nó, và trình tự axit amin khác được tính toán dưới dạng số lượng phù hợp chính xác trong so sánh hai trình tự chia cho chiều dài của “trình tự theo sáng chế” hoặc “trình tự bên ngoài”, trình tự bất kỳ ngắn nhất. Kết quả được thể hiện là tỷ lệ phần trăm đồng nhất.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trộn” để chỉ quy trình kết hợp một hoặc nhiều hợp chất, tế bào, phân tử, và tương tự trong lĩnh vực giống nhau. Điều này có thể được tiến hành, ví dụ, trong ống thử nghiệm, đĩa petri, hoặc đồ chứa cho phép một hoặc nhiều hợp chất, tế bào, hoặc phân tử được trộn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “về cơ bản là được tinh chế” để chỉ hợp chất (ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit hoặc kháng thể) được tách từ môi trường tự nhiên của nó và ít nhất không có 60%, ít nhất 75%, và ít nhất 90% thành phần liên kết với nó trong tự nhiên.

Thuật ngữ “chất mang dược dụng” để chỉ chất mang để dùng chất điều trị, như kháng thể hoặc polypeptit, gen, và chất điều trị. Thuật ngữ để chỉ chất mang dược bất kỳ không tự cảm ứng sự tạo kháng thể có hại cho cá nhân nhận chế phẩm, và có thể được sử dụng không gây ra độc tính quá mức. Chất mang thích hợp có thể là đại phân tử lớn, chuyển hóa chậm như protein, polysacarit, axit polylactic, axit polyglycolic, polyme của các axit amin, đồng polyme của axit amin, khối lipid và hạt virus bất hoạt. Chất mang này được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Chất mang dược dụng trong chế phẩm điều trị có thể bao gồm chất lỏng như nước, muối, glyxerol và etanol. Các chất phụ, như chất thẩm ướt hoặc chất tạo nhũ tương, chất đệm pH, và chất tương tự, cũng có thể có mặt trong các tá dược lỏng này.

Tăng cường tính ổn định vật lý của protein dung hợp theo sáng chế

Các liên kết disulfua vốn có trong tự nhiên, như được tạo ra bởi gốc xystein, thường tăng tính ổn định nhiệt động học của proteins. Ví dụ thành công về tăng tính ổn định nhiệt động học, như được xác định khi tăng nhiệt độ nóng chảy, là đột biến liên kết disulfua của enzym T4 lysozyme (Matsumura et al., PNAS 86:6562-6566 (1989)) và barnaza (Johnson et al., J. Mol. Biol. 268:198-208 (1997)). Một khía cạnh của sáng chế là sự tăng cường tính ổn định vật lý của FGF21 khi có mặt chất bảo quản, đạt được do có mặt liên kết disulfua trong biến thể, kiểm chế khả năng thích ứng của FGF21 kiểu đại và do đó giới hạn sự tiếp cận của chất bảo quản với nhân kỵ nước của protein.

Do đó, theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất biến thể FGF21 người, hoặc peptit có hoạt tính sinh học của nó, với tính ổn định dược lý được tăng cường gây ra do sự kết hợp các liên kết disulfit bổ sung, ví dụ, do sự kết hợp hoặc thay thế các gốc xystein thành kiểu đại protein FGF21 hoặc các biến thể protein và polypeptit theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ ghi nhận rằng xystein tự nhiên, xystein 103 và xystein 121, có thể được sử dụng làm điểm để đưa liên kết disulfua mới vào mà có thể tạo ra các đặc tính được cải thiện, ngoài các phương án gợi ý được mô tả ở đây.

Các biến thể này bao gồm protein dung hợp kết hợp FGF-21 kiểu đại với sự thay thế của xystein cho hai hoặc nhiều chất sau: glutamin 46, arginin 47, tyrosin 48, leuxin 49, tyrosin 50, threonin 51, aspartat 52, aspartat 53, alanin 54, glutamin 55, glutamin 56, threonin 57, glutamat 58, alanin 59, histidin 60, leuxin 61, glutamat 62, isoleuxin 63, valin 69, glyxin 70, glyxin 71, alanin 72, alanin 73, leuxin 144, histidin

145, leuxin 146, prolin 147, glyxin 148, asparagin 149, lysin 150, serin 151, prolin 152, histidin 153, arginin 154, aspartat 155, prolin 156, alanin 157, prolin 158, arginin 159, glyxin 160, prolin 161, alanin 162, arginin 163. phenylalanin 164, trong đó số axit amin dựa vào trình tự hFGF21 của axit amin 209 có độ dài hoàn chỉnh SEQ ID NO:1

Ngoài ra, protein dung hợp theo sáng chế có thể kết hợp biến thể của FGF21 người kiểu đại, hoặc peptit có hoạt tính sinh học của nó, được tăng cường bằng liên kết disulfua được thiết kế, ngoài các biến thể vốn có trong tự nhiên ở Cys103-Cys121, là như sau: Gln46Cys-Ala59Cys, Gln46Cys-His60Cys, Gln46Cys-Leu61Cys, Gln46Cys-Glu62Cys, Gln46Cys-Ile63Cys, Arg47Cys-Ala59Cys, Arg47Cys-His60Cys, Arg47Cys-Leu61Cys, Arg47Cys-Glu62Cys, Arg47Cys-Ile63Cys, Tyr48Cys-Ala59Cys, Tyr48Cys-His60Cys, Tyr48Cys-Leu61Cys, Tyr48Cys-Glu62Cys, Tyr48Cys-Ile63Cys, Leu49Cys-Ala59Cys, Leu49Cys-His60Cys, Leu49Cys-Leu61Cys, Leu49Cys-Glu62Cys, Leu49Cys-Ile63Cys, Tyr50Cys-Ala59Cys, Tyr50Cys-His60Cys, Tyr50Cys-Lue61Cys, Tyr50Cys-Glu62Cys, Tyr50Cys-Ile63Cys, Leu144Cys-Gly160Cys, Leu144Cys-Pro161Cys, Leu144Cys-Ala162Cys, Leu144Cys-Arg163Cys, Leu144Cys-Phe164Cys, His145Cys-Gly160Cys, His145Cys-Pro161Cys, His145Cys-Ala162Cys, His145Cys-Arg163Cys, His145Cys-Phe164Cys, Leu146Cys-Gly160Cys, Leu146Cys-Pro161Cys, Leu146Cys-Ala162Cys, Leu146Cys-Arg163Cys, Leu146Cys-Phe164Cys, Pro147Cys-Gly160Cys, Pro147Cys-Pro161Cys, Pro147Cys-Ala162Cys, Pro147Cys-Arg163Cys, Pro147Cys-Phe164Cys, Gly148Cys-Gly160Cys, Gly148Cys-Pro161Cys, Gly148Cys-Ala162Cys, Gly148Cys-Arg163Cys, Gly148Cys-Phe164Cys, Thr57Cys-Val69Cys, Thr57Cys-Gly70Cys, Thr57Cys-Gly71Cys, Thr57Cys-Ala72Cys, Thr57Cys-Ala73Cys, Glu58Cys-Val69Cys, Glu58Cys-Glu70Cys, Glu58Cys-G71Cys, Glu58Cys-Ala72Cys, Glu58Cys-Ala73Cys, Ala59Cys-Val69Cys, Ala59Cys-Gly70Cys, Ala59Cys-Gly71Cys, Ala59Cys-Ala72Cys, Ala59Cys-Ala73Cys, His60Cys-Val69Cys, His60Cys-Gly70Cys, His60Cys-Gly71Cys, His60Cys-Ala72Cys, His60Cys-Ala73Cys, Leu61Cys-Val69Cys, Leu61Cys-Gly70Cys, Leu61Cys-Gly71Cys, Leu61Cys-Ala72Cys, Leu61Cys-Ala73Cys, Arg47Cys-Gly148Cys, Tyr48Cys-Gly148Cys, Leu49Cys-Gly148Cys, Tyr50Cys-Gly148Cys, Thr51Cys-Gly148Cys, Asp52Cys-Gly148Cys, Asp53Cys-Gly148Cys, Ala54Cys-Gly148Cys, Gln55Cys-Gly148Cys, Gln56Cys-Gly148Cys, Thr57Cys-Gly148Cys, Glu58Cys-Gly148Cys, Arg47Cys-Asn149Cys, Tyr48Cys-

Asn149Cys, Leu49Cys-Asn149Cys, Tyr50Cys-Asn149Cys, Thr51Cys-Asn149Cys,
 Asp52Cys-Asn149Cys, Asp53Cys-Asn149Cys, Ala54Cys-Asn149Cys, Gln55Cys-
 Asn149Cys, Gln56Cys-Asn149Cys, Thr57Cys-Asn149Cys, Glu58Cys-Asn149Cys,
 Arg47Cys-Lys150Cys, Tyr48Cys-Lys150Cys, Leu49Cys-Lys150Cys, Tyr50Cys-
 Lys150Cys, Thr51Cys-Lys150Cys, Asp52Cys-Lys150Cys, Asp53Cys-Lys150Cys,
 Ala54Cys-Lys150Cys, Gln55Cys-Lys150Cys, Gln56Cys-Lys150Cys, Thr57Cys-
 Lys150Cys, Glu58Cys-Lys150Cys, Arg47Cys-Ser151Cys, Tyr48Cys-Ser151Cys,
 Leu49Cys-Ser151Cys, Tyr50Cys-Ser151Cys, Thr51Cys-Ser151Cys, Asp52Cys-
 Ser151Cys, Asp53Cys-Ser151Cys, Ala54Cys-Ser151Cys, Gln55Cys-Ser151Cys,
 Gln56Cys-Ser151Cys, Thr57Cys-Ser151Cys, Glu58Cys-Ser151Cys, Arg47Cys-
 Pro152Cys, Tyr48Cys-Pro152Cys, Leu49Cys-Pro152Cys, Tyr50Cys-Pro152Cys,
 Thr51Cys-Pro152Cys, Asp52Cys-Pro152Cys, Asp53Cys-Pro152Cys, Ala54Cys-
 Pro152Cys, Gln55Cys-Pro152Cys, Gln56Cys-Pro152Cys, Thr57Cys-Pro152Cys,
 Glu58Cys-Pro152Cys, Arg47Cys-His153Cys, Tyr48Cys-His153Cys, Leu49Cys-
 His153Cys, Tyr50Cys-His153Cys, Thr51Cys-His153Cys, Asp52Cys-His153Cys,
 Asp53Cys-His153Cys, Ala54Cys-His153Cys, Gln55Cys-His153Cys, Gln56Cys-
 His153Cys, Thr57Cys-His153Cys, Glu58Cys-His153Cys, Arg47Cys-Arg154Cys,
 Tyr48Cys-Arg154Cys, Leu49Cys-Arg154Cys, Tyr50Cys-Arg154Cys, Thr51Cys-
 Arg154Cys, Asp52Cys-Arg154Cys, Asp53Cys-Arg154Cys, Ala54Cys-Arg154Cys,
 Gln55Cys-Arg154Cys, Gln56Cys-Arg154Cys, Thr57Cys-Arg154Cys, Glu58Cys-
 Arg154Cys, Arg47Cys-Asp155Cys, Tyr48Cys-Asp155Cys, Leu49Cys-Asp155Cys,
 Tyr50Cys-Asp155Cys, Thr51Cys-Asp155Cys, Asp52Cys-Asp155Cys, Asp53Cys-
 Asp155Cys, Ala54Cys-Asp155Cys, Gln55Cys-Asp155Cys, Gln56Cys-Asp155Cys,
 Thr57Cys-Asp155Cys, Glu58Cys-Asp155Cys, Arg47Cys-Pro156Cys, Tyr48Cys-
 Pro156Cys, Leu49Cys-Pro156Cys, Tyr50Cys-Pro156Cys, Thr51Cys-Pro156Cys,
 Asp52Cys-Pro156Cys, Asp53Cys-Pro156Cys, Ala54Cys-Pro156Cys, Gln55Cys-
 Pro156Cys, Gln56Cys-Pro156Cys, Thr57Cys-Pro156Cys, Glu58Cys-Pro156Cys,
 Arg47Cys-Ala157Cys, Tyr48Cys-Ala157Cys, Leu49Cys-Ala157Cys, Tyr50Cys-
 Ala157Cys, Thr51Cys-Ala157Cys, Asp52Cys-Ala157Cys, Asp53Cys-Ala157Cys,
 Ala54Cys-Ala157Cys, Gln55Cys-Ala157Cys, Gln56Cys-Ala157Cys, Thr57Cys-
 Ala157Cys, Glu58Cys-Ala157Cys, Arg47Cys-Pro158Cys, Tyr48Cys-Pro158Cys,
 Leu49Cys-Pro158Cys, Tyr50Cys-Pro158Cys, Thr51Cys-Pro158Cys, Asp52Cys-

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

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein dung hợp chứa biến thể FGF21 người kiểu đại, hoặc peptit có hoạt tính sinh học, bao gồm sự thay thế của axit amin tích điện và/hoặc có cực nhưng không tích điện bất kỳ tại vị trí axit amin bất kỳ được chỉ ra trong phương án một của sáng chế kết hợp với sự thay thế xystein ở hai hay nhiều vị trí axit amin được chỉ ra trong phương án thứ hai của sáng chế.

Cải thiện protein dung hợp theo sáng chế qua phép so sánh protein kiểu đại và biến thể của nó

Biết rằng trong lĩnh vực này, yêu cầu quan trọng trong sự phát triển dược phẩm protein là giải quyết sự không ổn định về mặt vật lý và hóa học của protein. Điều này còn rõ ràng hơn khi dược phẩm protein được dự tính cho nhiều cách dùng, chế phẩm tiêm yêu cầu dung dịch ổn định, cô đặc và bảo quản, trong khi duy trì protein hoạt tính sinh học. Các đặc điểm lý sinh của FGF21 kiểu đại trong tài liệu đã xác định rằng dung dịch protein cô đặc (>5 mg/ml), khi đặt trong các điều kiện bắt buộc, như nhiệt

độ cao hoặc độ pH thấp, dẫn đến gia tăng sự kết hợp và kết cụm (nghĩa là, các đặc điểm dược lý và độ ổn định vật lý kém). Việc tiếp xúc của dung dịch protein cô đặc của FGF21 với các chất bảo quản được phẩm (ví dụ, m-cresol) cũng có tác động tiêu cực lên độ ổn định vật lý.

Do đó, phương án của sáng chế là gia tăng độ ổn định vật lý của các dung dịch cô đặc, trong khi duy trì độ ổn định hóa học và hiệu quả sinh học, trong các điều kiện sinh lý và điều kiện chế phẩm được bảo quản. Được hiểu là sự kết hợp và kết cụm có thể do sự tương tác chất kỵ nước, do đó, ở nồng độ protein cho trước, nhiệt độ, và cường độ ion có tác động đáng kể đến độ ổn định vật lý. Đối với phần lớn, các gốc axit amin tiếp xúc bề mặt giả, không bảo quản được tạo đích. Phân tích môi trường cục bộ của các gốc này và, các gốc không này được cho là quan trọng về mặt cấu tạo được chọn để gây đột biến. Một phương pháp khởi đầu các thay đổi cụ thể là giảm tiếp pI của protein bằng cách đưa các gốc axit glutamic (“quét axit glutamic”) vào. Giả thuyết rằng việc đưa các phân tử thể tích điện vào sẽ ức chế sự kết cụm qua trung gian kỵ nước do lực đẩy điện tích-điện tích và có khả năng cải thiện sự tương thích bảo quản. Ngoài ra, chuyên gia trong lĩnh vực này cũng nhận ra rằng với mức độ gây đột biến đáng kể, pI có thể được thay đổi trong khoảng độ pH bazơ bằng cách đưa điện tích dương có hoặc không có sự giảm sút đồng thời ở điện tích âm, do đó cho phép lực đẩy điện tích-điện tích.

Sự khó khăn gia tăng kết hợp với các biện pháp điều trị FGF21 kiểu đại ở dạng điều trị sinh học, chẳng hạn, là chu kỳ bán rã của nó rất ngắn *in vivo* (theo thứ tự lần lượt là 0,5 và 2 giờ, ở chuột và động vật linh trưởng). Do đó, cần phát triển tiếp các hợp chất mà hiệu quả hơn hoặc hiệu lực cao hơn hoặc chu kỳ bán rã dài hơn. Protein dung hợp theo sáng chế được phát triển ở theo cách để đạt được các hiệu quả mong muốn của việc điều trị FGF21 ở hiệu lực cao hơn và trong chế phẩm mở rộng chu kỳ bán rã.

Như được mô tả ở đây, protein dung hợp theo sáng chế có chu kỳ bán rã lớn hơn hai tuần ở chuột, so với chu kỳ bán rã ít hơn nhiều của FGF21 kiểu đại và chu kỳ bán rã 17 giờ của protein dung hợp Fc-L(15)-FGF21 (L98R, P171G, A180E) trong công bố đơn PCT số WO10/129600. Protein dung hợp theo sáng chế cũng chứng minh các đặc điểm dược động học và chu kỳ bán rã được cải thiện so với PEGyl hóa V76,

nhu được mô tả ở đây và trong đơn sáng chế Mỹ số US 61/415,476, được nộp vào ngày 19/11/2010.

Hơn nữa, các protein dung hợp Fc-FGF21 của sáng chế ở 1 mpk là hiệu quả hơn V76 ở 5 mpk dựa trên việc giảm glucoza, insulin, thể trọng và lipit gan. Trong nghiên cứu điều trị 12 ngày ở chuột ob/ob, protein dung hợp thể hiện % thay đổi sau so với tá được lỏng (tất cả các dung hợp được dùng ở 1,0 mg/kg, và V76 được dùng ở 5,0 mg/kg):

% thay đổi glucoza tổng (AUC) so với tá được lỏng: V76 là -42%; V101 là -53%, V103 là -46%, và V188 là -42%;

% thay đổi insulin huyết tương so với tá được lỏng: V76 là -46%; V101 là -82%, V103 là -69%, và V188 là -59%;

% thay đổi thể trọng tổng so với tá được lỏng: V76 là -7%; V101 là -12%, V103 là -12%, và V188 là -11%; and

% thay đổi lipit gan tổng so với tá được lỏng: V76 là -30%; V101 là -44%, V103 là -50%, và V188 là -51%.

Tương tự, các thử nghiệm *in vitro* bộc lộ khả năng giống gấp 5 lần hoặc nhiều hơn của protein dung hợp theo sáng chế nhờ V76:

Theo pERK trong thử nghiệm tế bào tạo mỡ ở người (trung bình $EC_{50} \pm SEM$), V76 là 21 ± 2 nM (n=3); V101 là $1,0 \pm 0,1$ nM (n=3), V103 là $1,3 \pm 0,2$ nM (n=3), và V188 là $1,4 \pm 0,4$ nM (n=3);

Theo pERK trong thử nghiệm HEK293 với β klotho ở người (trung bình $EC_{50} \pm SEM$), V76 là 13 ± 4 nM (n=5), V101 là $0,60 \pm 0,06$ nM (n=5), V103 là $0,9 \pm 0,3$ nM (n=5), và V188 là $0,4 \pm 0,1$ nM (n=3); và

Theo sự hấp thụ glucoza trong thử nghiệm tế bào tạo mỡ ở chuột (trung bình $EC_{50} \pm SEM$), V76 là 5 ± 1 nM (n=3), V101 là $0,60 \pm 0,06$ nM (n=3), V103 là $0,60 \pm 0,07$ nM (n=3), và V188 là $0,48 \pm 0,14$ nM (n=3).

Mặc dù các phương án của sáng chế liên quan đến độ ổn định vật lý và hóa học trong cả các điều kiện được phẩm được bảo quản và các điều kiện sinh lý, việc duy trì hiệu lực sinh học của protein dung hợp theo sáng chế khi được so sánh với, ví dụ, FGF21 kiểu đại là yếu tố quan trọng cần xem xét. Do đó, hiệu lực sinh học của protein theo sáng chế được xác định bằng khả năng của protein làm ảnh hưởng đến độ hấp thụ

glucoza và/hoặc sự sụt giảm mức glucoza huyết tương, như thể hiện ở đây trong phần ví dụ.

Protein, polypeptit, và/hoặc peptit được dùng theo sáng chế có thể được tạo ra và/hoặc được tách bằng phương pháp bất kỳ trong lĩnh vực này. Phương pháp được ưu tiên nhất để tạo ra biến thể là thông qua phương pháp ADN tái tổ hợp và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp này được mô tả trong *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.), được kết hợp ở đây để tham khảo.

Ngoài ra, các phương án được ưu tiên bao gồm peptit hoạt tính về mặt sinh học được lấy từ biến thể được mô tả ở đây. Peptit này chứa ít nhất một trong số các sự thay thế được mô tả và biến thể có hoạt tính sinh học. Peptit có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ hoặc tất cả các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, ví dụ về các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự phân cắt bằng enzym, sự tổng hợp hóa học hoặc phương pháp ADN tái tổ hợp.

Được xác minh trong lĩnh vực này là các mảnh peptit của các yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi nhất định có hoạt tính về mặt sinh học. Xem ví dụ, Baird et al., *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 85:2324-2328 (1988), và *J. Cell. Phys. Suppl.* 5:101-106 (1987). Do đó, sự lựa chọn các mảnh hoặc peptit của biến thể được dựa trên tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, được biết là dipeptidyl peptidaza IV (DPP-IV, hoặc DPP-4) là proteaza kiểu serin bao gồm sự bất hoạt của neuropeptit, peptit nội tiết, và xytokin (Damme et al. *Chem. Immunol.* 72: 42-56, (1999)). Đầu N của FGF21 (HisProIlePro) chứa hai dipeptit mà có thể có khả năng là cơ chất với DPP-IV, dẫn đến mảnh của FGF21 bị cắt ngắn ở đầu N bằng 4 axit amin. Ngạc nhiên là, mảnh FGF21 kiểu đại này được chứng minh là giữ hoạt tính sinh học, do đó, protein theo sáng chế bị cắt ngắn ở đầu N bằng đến 4 axit amin, là một phương án của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm polynucleotit mã hóa các biến thể được mô tả ở trên mà có thể ở dạng ARN hoặc ở dạng ADN, mà ADN bao gồm cADN, ADN gen, và ADN tổng hợp. ADN có thể là dài đơn hoặc dài kép. Các trình tự mã hóa mà mã hóa protein theo sáng chế có thể thay đổi dựa vào kết quả của phần thừa hoặc phần suy biến của mã gen.

Các polynucleotit mà mã hóa protein dung hợp theo sáng chế có thể bao gồm: chỉ trình tự mã hóa đối với biến thể, trình tự mã hóa đối với biến thể và trình tự mã hóa

bổ sung như polypeptit chức năng, hoặc trình tự dẫn hoặc trình tự kích thích tiết hoặc trình tự tiền protein; trình tự mã hóa đối với biến thể và trình tự không mã hóa, như intron hoặc trình tự không mã hóa 5' và/hoặc 3' của trình tự mã hóa đối với biến thể. Do đó, thuật ngữ “polynucleotit mã hóa biến thể” bao gồm polynucleotit mà có thể bao gồm không chỉ trình tự mã hóa đối với biến thể mà còn polynucleotit, bao gồm trình tự mã hóa bổ sung và/hoặc không mã hóa.

Sáng chế còn đề cập đến các biến thể polynucleotit được mô tả mà mã hóa các mảnh, tương tự và dẫn xuất của polypeptit chứa sự thay thế được chỉ định. Biến thể của polynucleotit có thể là biến thể alen vốn có trong tự nhiên của trình tự FGF21 ở người, biến thể vốn không có trong tự nhiên, hoặc biến thể bị cắt như mô tả ở trên. Do đó, sáng chế còn bao gồm polynucleotit mã hóa biến thể đã mô tả ở trên, cũng như các biến thể của polynucleotit này, các biến thể này mã hóa mảnh, dẫn xuất hoặc tương tự của biến thể được bộc lộ. Các biến thể nucleotit này bao gồm các biến thể cắt ngắn, biến thể thay thế, biến thể cắt ngắn, và biến thể bổ sung hoặc biến thể chèn chỉ cần có ít nhất một trong số các sự thể axit amin được chỉ định của phương án thứ nhất hoặc thứ hai.

Polynucleotit của sáng chế sẽ được biểu hiện ở vật chủ sau khi các trình tự được liên kết linh hoạt với (nghĩa là, được xác định vị trí để đảm bảo chức năng của) trình tự kiểm soát sự biểu hiện. Các vector biểu hiện này thường có khả năng sao chép ở sinh vật chủ ở dạng episom hoặc ở dạng phân không thể thiếu của ADN nhiễm sắc thể vật chủ. Nói chung, vector biểu hiện sẽ chứa dấu hiệu chọn lọc, ví dụ, tetracyclin, neomycin, và dihydrofolat reductaza, cho phép sự cắt ngắn của các tế bào này được dịch chuyển bằng trình tự ADN mong muốn. Biến thể FGF21 có thể được biểu hiện ở tế bào động vật có vú, côn trùng, nấm men, vi khuẩn hoặc tế bào khác dưới sự kiểm soát của promoter thích hợp. Hệ dịch mã tự do của tế bào cũng có thể được dùng để tạo ra các protein này bằng cách sử dụng ARN lấy từ cấu trúc ADN của sáng chế.

E. coli là vật chủ sinh vật nhân sơ đặc biệt hữu dụng cho việc tách dòng polynucleotit của sáng chế. Vật chủ vi khuẩn khác thích hợp để sử dụng bao gồm *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, và các loài khác nhau của *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, và *Staphylococcus*, mặc dù các loài khác cũng có thể được dùng làm đối tượng lựa chọn. Trong các vật chủ sinh vật nhân sơ này, người ta cũng có thể tạo ra vector biểu hiện, mà vector này thường chứa trình tự kiểm soát sự

biểu hiện tương thích với tế bào chủ (ví dụ, vùng khởi đầu sao chép). Ngoài ra, bất kỳ trong số các promotor đã biết rõ có thể có mặt, như hệ promotor lactoza, hệ promotor tryptophan (Trp), hệ promotor beta-lactamaza, hoặc hệ promotor từ thực khuẩn thể lamda hoặc T7. Promotor thường kiểm soát sự biểu hiện, tùy ý với trình tự operator, và có trình tự vị trí gắn kết ribosom và tương tự, để khởi đầu và kết thúc phiên mã và dịch mã.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biểu hiện protein sẽ nhận ra rằng trình tự metionin hoặc metionin-arginin có thể được đưa vào ở đầu N của trình tự đầy đủ (SEQ ID NO: 3) đối với sự biểu hiện ở *E. coli* và được dự tính trong nội dung sáng chế. Do đó, trừ khi có quy định khác, các protein theo sáng chế biểu hiện ở *E. coli* có trình tự metionin được đưa vào ở đầu N.

Các vi sinh vật khác, như nấm men hoặc nấm, cũng có thể được sử dụng cho sự biểu hiện. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, và *Pichia angusta* là các ví dụ về vật chủ là nấm men được ưu tiên, với các vector thích hợp có trình tự kiểm soát sự biểu hiện, như promotor, bao gồm 3-phosphoglyxerat kinaza hoặc các enzym đường phân khác, và vùng khởi đầu sao chép, trình tự kết thúc và tương tự như mong muốn. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*; và *Schizophyllum commune*, là các ví dụ về vật chủ nấm, mặc dù các loại khác cũng có thể được dùng làm đối tượng lựa chọn.

Việc nuôi cấy tế bào mô ở động vật có vú cũng có thể được sử dụng để biểu hiện và tạo ra polypeptit theo sáng chế. Các tế bào nhân chuẩn thực sự được ưu tiên, bởi vì một số dòng tế bào chủ thích hợp mà có khả năng tiết ra các biến thể nguyên vẹn đã được phát triển trong lĩnh vực này, và bao gồm dòng tế bào CHO, các dòng tế bào COS khác nhau, tế bào NSO, dòng tế bào buồng trứng chuột Syri, tế bào HeLa, hoặc dòng tế bào thận phôi người (nghĩa là, HEK293, HEK293EBNA).

Vector biểu hiện đối với các tế bào này có thể bao gồm các trình tự kiểm soát sự biểu hiện, như trình tự khởi đầu sao chép, promotor, trình tự tăng cường, và các vị trí xử lý thông tin cần thiết, như vị trí gắn kết ribosom, vị trí ghép nối ARN, vị trí polyadenyl hóa, và trình tự kết thúc dịch mã. Các trình tự kiểm soát sự biểu hiện được ưu tiên là promotor lấy từ SV40, adenovirut, virut u nhú bò, xytomegalovirut, Raus sarcoma virut, và tương tự. Các vị trí polyadenyl hóa được ưu tiên bao gồm các trình tự lấy từ SV40 và hormon tăng trưởng của bò.

Các vectơ chứa trình tự polynucleotit (ví dụ, protein dung hợp theo sáng chế và trình tự kiểm soát sự biểu hiện) có thể được truyền vào tế bào chủ bằng các phương pháp đã biết, chúng thay đổi phụ thuộc vào loại tế bào chủ. Ví dụ, sự truyền canxi clorua thường được dùng cho tế bào của sinh vật nhân sơ, trong khi đó việc xử lý canxi phosphat hoặc xung điện có thể được sử dụng cho các tế bào chủ khác.

Các phương pháp khác nhau của việc tinh sạch protein có thể được dùng và các phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, trong Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) và Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). (Các) bước tinh sạch chọn lọc sẽ phụ thuộc, ví dụ, vào bản chất của quá trình tạo ra được sử dụng cho protein dung hợp theo sáng chế.

Protein, polypeptit, và/hoặc peptit theo sáng chế, ví dụ, protein dung hợp có hoạt tính kép của sáng chế, sẽ được tạo ra và định lượng ở dạng phù hợp với thuốc tốt, đưa vào tính toán điều kiện lâm sàng của bệnh nhân, vị trí phân phối chế phẩm protein, cách dùng, kế hoạch dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sĩ. Do đó, “lượng có hiệu quả điều trị” của protein dung hợp theo sáng chế đối với các mục đích ở đây được xác định bằng các nghiên cứu này.

Dược phẩm chứa protein theo sáng chế có thể được dùng theo cách bất kỳ để đạt được mục đích chung: điều trị bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2, bệnh béo phì, hội chứng chuyển hóa, hoặc bệnh nhân bị ốm trầm trọng. Các cách dùng không giới hạn chấp nhận được bao gồm, ví dụ, bằng cách xông hoặc đặt hậu môn hoặc dùng cho cơ niêm mạc như bằng cách nuốt rửa âm đạo, trực tràng, niệu đạo, mô dưới lưỡi và miệng, dùng qua miệng, dùng qua mũi, dùng tại chỗ, dùng trong mũi, dùng trong bụng, dùng ngoài ruột, dùng trong tĩnh mạch, dùng trong cơ, dùng trong xương ức, bằng cách tiêm trong khớp, trong mạch bạch huyết, khe, trong động mạch, dưới da, trong hoạt dịch, qua biểu bì, và áp da. Theo một số phương án, dược phẩm được dùng bằng cách nuốt rửa, qua đường miệng hoặc trong động mạch. Các phương pháp đưa vào thích hợp khác cũng có thể bao gồm các dụng cụ có thể tái nạp được hoặc dụng cụ thoái biến sinh học và các dụng cụ polime giải phóng chậm hoặc duy trì sự giải phóng. Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được dùng ở dạng một phần của sự điều trị kết hợp với chất chuyển hóa đã biết khác.

Liều dùng phụ thuộc vào độ tuổi, sức khỏe, và cân nặng của người nhận, loại điều trị đồng thời, nếu có, tần suất điều trị, và hiệu quả thực chất mong muốn. Các chế phẩm trong phạm vi sáng chế bao gồm tất cả các chế phẩm mà trong đó biến thể FGF21 có mặt ở lượng có hiệu quả để đạt được tác dụng mong muốn của thuốc để điều trị bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc typ 2, bệnh béo phì, hoặc hội chứng chuyển hóa. Trong khi các nhu cầu cá nhân có thể thay đổi từ bệnh nhân này đến bệnh nhân khác, thì việc xác định khoảng lượng có hiệu quả tối ưu của tất cả các thành phần là nằm trong khả năng của bác sỹ lâm sàng.

Protein theo sáng chế có thể được bào chế theo các phương pháp đã biết để tạo ra dược phẩm hữu dụng. Chế phẩm mong muốn là sản phẩm ổn định được khô lạnh mà được hoàn nguyên lại với chất pha loãng thích hợp hoặc dung dịch nước có độ tinh khiết cao với chất mang dược dụng, chất bảo quản, tá dược hoặc chất ổn định [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition (1980)]. Protein theo sáng chế có thể được kết hợp với chất đệm dược dụng, và điều chỉnh độ pH để tạo ra độ ổn định chấp nhận được, và độ pH chấp nhận được để dùng.

Để dùng theo đường tiêm, theo một phương án, protein dung hợp theo sáng chế thường được bào chế bằng cách trộn một hoặc nhiều trong số chúng ở độ tinh khiết mong muốn, ở dạng tiêm liều đơn vị (dung dịch, huyền phù, hoặc nhũ tương), với chất mang dược dụng, nghĩa là, chúng không độc hại với người nhận ở các liều lượng và nồng độ được dùng và tương thích với các thành phần khác của chế phẩm. Tốt hơn là, có thể thêm vào một hoặc nhiều chất chống vi khuẩn dược dụng. Phenol, m-cresol, và rượu benzyl là các chất chống vi khuẩn dược dụng được ưu tiên.

Tùy ý, một hoặc nhiều muối dược dụng có thể được thêm vào để điều chỉnh tính trương hoặc cường độ ion. Một hoặc nhiều tá dược có thể được thêm vào để điều chỉnh tiếp tính đẳng trương của chế phẩm. Glyxerin, natri clorua, và manitol là các ví dụ về tá dược điều chỉnh tính đẳng trương.

Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể sẵn sàng tối ưu hóa liều dược phẩm hiệu quả và chế độ cho uống thuốc cho các thành phần chữa bệnh bao gồm các protein theo sáng chế, như được xác định bởi sự thực hành ý tế tốt và tình trạng lâm sàng của bệnh nhân. Khoảng liều đặc trưng cho các protein theo sáng chế sẽ là từ 0,01 mg trên ngày đến khoảng 1000 mg trên ngày (hoặc 0,05 mg trên tuần đến khoảng 5000 mg trên tuần cho uống một lần mỗi tuần) cho người lớn. Tốt hơn là, liều

nằm trong khoảng từ 0,1 mg trên ngày đến khoảng 100 mg trên ngày (hoặc khoảng 0,5 mg trên tuần đến khoảng 500 mg trên tuần được cho uống một lần mỗi tuần), tốt hơn nữa là từ khoảng 1,0 mg/ngày đến 10 mg/ngày (hoặc khoảng 5 mg trên tuần đến khoảng 50 mg trên tuần cho uống một lần trên tuần). Tốt nhất là, liều từ khoảng 1-5 mg/ngày (hoặc khoảng 5 mg trên tuần đến khoảng 25 mg trên tuần cho uống một lần trên tuần). Liều phù hợp của biến thể FGF21 được cho uống sẽ làm hạ mức glucoza trong máu và làm tăng tiêu hao năng lượng bằng cách sử dụng glucoza nhanh và hiệu quả hơn, và do đó nó hữu ích để điều trị bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2, bệnh béo phì và hội chứng chuyển hóa.

Ngoài ra, do glucoza máu cao và kháng insulin là thông thường trong bệnh nhân bị ốm nặng do được cung cấp nhiều dinh dưỡng, một số ICUs phân phát insulin để điều trị glucoza máu quá cao ở bệnh nhân bị ốm nặng được cung cấp nhiều dinh dưỡng. Trên thực tế, các nghiên cứu gần đây đưa ra tài liệu về việc sử dụng của insulin ngoại sinh để duy trì glucoza trong máu ở mức không cao hơn 110 mg trên dexilit giảm khả năng mắc bệnh và khả năng mắc bệnh giữa các các bệnh nhân bị ốm nặng trong bộ phận chăm sóc đặc biệt để phẫu thuật, không liên quan đến việc họ có tiền sử bệnh đái tháo đường hay không (Van den Berghe et al. N Engl J Med., 345(19):1359, (2001)). Do đó, các protein theo sáng chế là duy nhất phù hợp để giúp khôi phục lại sự ổn định trong chuyển hóa trao đổi chất ở các bệnh nhân bị ốm nặng có chuyển hóa trao đổi chất không ổn định. Các protein theo sáng chế chẳng hạn như các protein chứa các biến thể FGF21 là duy nhất trong đó chúng kích thích glucoza hấp thu và tăng cường độ nhạy insulin mà không bao gồm hypoglycemia.

Trong khía cạnh khác của sáng chế, các protein theo sáng chế để dùng làm được phẩm điều trị bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường typ 1 và typ 2, bệnh viêm tụy, lipit máu bất thường, bệnh gan nhiễm chất béo không do rượu (NAFLD), bệnh viêm gan có u mỡ không do rượu (NASH), kháng insulin, insulin máu cao, không dung nạp glucoza, glucoza máu cao, hội chứng chuyển hóa, nhồi máu cơ tim cấp tính, các tình trạng gắn với bất chuyển hóa nghiêm trọng trong các thụ thể insulin, và các rối loạn chuyển hóa khác được tính đến.

Đột biến FGF21 vị trí cụ thể

Theo một số phương án, protein dung hợp theo sáng chế bao gồm đột biến FGF21 hoặc chất tương tự FGF21 bổ sung với các axit amin không tự nhiên.

Theo một số phương án, protein dung hợp theo sáng chế bao gồm FGF21 chủ vận với một hoặc nhiều các biến thể của kiểu FGF21 kiểu đại:

(i) disulfua bổ sung, các axit amin tự nhiên, hoặc các biến thể để thúc đẩy sự đime hóa chẳng hạn như tạo thành disulfua ở R154C hoặc sự đưa vào cystein ở vị trí khác, hoặc đime hóa qua miền Fc nóng chảy, hoặc đime tạo thành qua liên kết ngang chẳng hạn như PEG nhị chức;

(ii) các mảnh của FGF21;

(iii) các protein được lựa chọn để có sự hoạt động FGF21 (liên kết với beta-klotho và sự liên kết và hoạt động của FGFR's); và

(iv) giả kháng thể FGF21 (của nhiều định dạng khác nhau chẳng hạn như Fab, nguyên khối, svFc...).

Theo một số phương án, protein dung hợp theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều các cầu nối sau đây: liên kết amit đơn giản, peptit ngắn (cụ thể là sự lặp lại Ser/Gly), gốc bổ sung từ trình tự đã được dịch mã FGF21, hoặc cầu nối lớn hơn phù hợp với toàn bộ protein (chẳng hạn như miền Fc, bó xoắn liên kết HSA, HSA,...). Hai gốc này cũng có thể được liên kết bởi phương tiện hóa học khác, chẳng hạn như qua các axit amin không tự nhiên hoặc các cầu nối hóa học tiêu chuẩn (maleimide-Cys, NHS-Lys, click,...)

Các phương án khác của sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể gắn kết sau đây, để kéo dài thời gian bán hủy: lipid liên kết HSA hoặc phân tử nhỏ hoặc mixen cho phiên bản monome hoặc dimer của sự dung hợp.

Theo một số phương án của sáng chế, các thể gắn kết khác có thể được tạo thành các protein, polypeptit, và/hoặc peptit của sáng chế, để thu được sự kéo dài thời gian bán hủy và các đặc tính sinh học khác. Chúng có thể bao gồm việc gắn các liên hợp PEG-cholesterol (bao gồm mixen và liposome) vào các protein, polypeptit, và/hoặc peptit của sáng chế, và/hoặc gắn đường (glycosylat) vào các protein, polypeptit, và/hoặc peptit của sáng chế. Vẫn theo các phương án khác, kỹ thuật tương tự được thực hiện để thêm các liên hợp của, ví dụ, axit polysialic (PSA), tinh bột hydroxyetyl (HES), phối tử liên kết albumin, hoặc vỏ chần hydrat cacbon vào các protein, polypeptit, và/hoặc peptit.

Kỹ thuật HES hóa, ví dụ, một vài chuỗi phân nhánh tinh bột hydroxyetyl (HES) (60kDa hoặc 100kDa, các mảnh amylopectin phân nhánh mạnh từ tinh bột ngô) vào

protein, polypeptit, và/hoặc peptit qua alkyl hóa khử. Polysial hóa liên hợp các protein, polypeptit, và/hoặc peptit quan tâm với các polyme axit polysialic (PSA) theo phương pháp tương tự với PEGyl hóa. Các polyme PSA tích điện âm, các polyme không gây miễn dịch mà vốn có trong cơ thể và có khối lượng phân tử 10-50kD.

Theo các phương án khác của sáng chế, các thể gắn kết khác hoặc các biến thể có thể được tạo vào các protein, polypeptit, và/hoặc peptit của sáng chế, để thu được sự kéo dài thời gian bán hủy và các đặc tính sinh học khác. Chúng bao gồm sự tạo thành của các nhóm tái tổ hợp PEG (rPEG), và thể gắn kết của chúng vào các protein, polypeptit, và/hoặc peptit của sáng chế. Như được phát triển bởi công ty Amunix, Inc. Công nghệ rPEG là dựa trên các chuỗi protein với các đặc tính giống PEG mà được dung hợp kiểu di truyền vào các được phẩm sinh học, tránh bước liên hợp hóa học thêm. rPEG là cấu trúc exenatit được kéo dài thời gian bán hủy chứa đuôi dài không có cấu trúc của các axit amin ưa nước, và có khả năng tăng cường thời gian bán hủy trong huyết thanh của protein hoặc peptit và làm chậm tỷ lệ hấp thụ của nó, do đó giảm tỷ lệ đỉnh-đáy đi đáng kể. rPEG tăng phạm vi thủy động và thể hiện khối lượng phân tử biểu kiến là vào khoảng 15 lần khối lượng phân tử thật của chúng, làm theo cách PEGyl hóa thu được thời gian bán hủy trong huyết thanh dài.

Polypeptit FGF21 cắt ngắn

Một phương án của sáng chế đề xuất dạng cắt ngắn của polypeptit FGF21 trưởng thành (SEQ ID NO:3). Phương án này của sáng chế phát sinh từ nỗ lực để nhận diện polypeptit FGF21 cắt ngắn mà có khả năng cung cấp sự hoạt động mà tương tự, và trong một số trường hợp tốt hơn các dạng không bị cắt ngắn của polypeptit FGF21 trưởng thành.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polypeptit FGF21 cắt ngắn” dùng để chỉ polypeptit FGF21 trong đó gốc axit amin đã bị loại khỏi đầu amin (hoặc đầu N) của polypeptit FGF21, gốc axit amin bị loại khỏi đầu carboxyl (hoặc đầu C) của polypeptit FGF21, hoặc gốc axit amin bị loại bỏ khỏi cả hai đầu amin và đầu carboxyl của polypeptit FGF21. Các sự cắt ngắn khác nhau bộc lộ ở đây được điều chế như mô tả dưới đây.

Sự hoạt động của polypeptit FGF21 cắt ngắn đầu N và polypeptit FGF21 cắt ngắn đầu C có thể được thử nghiệm sử dụng thử nghiệm phospho-ERK *in vitro*. Các

chi tiết cụ thể của thử nghiệm *in vitro* này có thể được sử dụng để kiểm tra sự hoạt tính của polypeptit FGF21 cắt ngắn có thể được tìm thấy trong các ví dụ.

Hoạt tính của polypeptit FGF21 cắt ngắn của sáng chế cũng có thể được đánh giá trong thử nghiệm *in vivo*, chẳng hạn như chuột ob/ob. Thông thường, để đánh giá hoạt tính *in vivo* của polypeptit FGF21 cắt ngắn, polypeptit FGF21 cắt ngắn có thể được sử dụng cho việc tiêm màng bụng động vật thử nghiệm. Sau thời gian ủ mong muốn (ví dụ, một giờ hoặc nhiều hơn), mẫu máu có thể được rút ra, và glucoza trong mức máu có thể đo được.

a. Sự cắt ngắn đầu N

Theo một số phương án của sáng chế, sự cắt ngắn đầu N bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 gốc axit amin từ đầu N của polypeptit FGF21 trưởng thành. Polypeptit FGF21 cắt ngắn có sự cắt ngắn đầu N ít hơn 9 gốc axit amin giữ lại tổ chất của polypeptit FGF21 trưởng thành để hạ thấp glucoza trong máu trong cá thể. Theo đó, trong các phương án cụ thể, sáng chế chứa đựng dạng rút ngắn của polypeptit FGF21 trưởng thành hoặc các protein FGF21 biến thể có sự cắt ngắn đầu N của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 gốc axit amin.

b. Cắt ngắn đầu C

Theo một số phương án của sáng chế, các cắt ngắn đầu C bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 gốc axit amin từ đầu C của polypeptit FGF21 trưởng thành. Polypeptit FGF21 cắt ngắn có các cắt ngắn đầu C ít hơn 13 gốc axit amin biểu lộ hiệu quả của ít nhất 50% hiệu quả của FGF21 dạng kiểu đại trong thử nghiệm *in vitro* ELK-luciferase (Yie J. et al. FEBS Letts 583:19-24 (2009)), chỉ ra rằng các đột biến FGF21 này giữ lại khả năng của polypeptit FGF21 trưởng thành để hạ thấp glucoza trong máu trong cá thể. Theo đó, trong các phương án cụ thể, sáng chế bao gồm dạng cắt ngắn của polypeptit FGF21 trưởng thành hoặc các protein FGF21 biến thể có cắt ngắn đầu C của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 gốc axit amin.

c. Cắt ngắn đầu N và đầu C

Theo một số phương án của sáng chế, polypeptit FGF21 cắt ngắn có sự kết hợp của cắt ngắn đầu N và đầu C. Polypeptit FGF21 cắt ngắn có sự kết hợp của cắt ngắn đầu N và đầu C chia sẻ sự hoạt tính của polypeptit FGF21 cắt ngắn tương ứng chỉ có cắt ngắn đầu N hoặc đầu C. Nói cách khác, polypeptit FGF21 cắt ngắn có cả sự cắt ngắn đầu N ít hơn 9 gốc axit amin và cắt ngắn đầu C ít hơn 13 gốc axit amin sở hữu

bằng hoặc nhiều hơn glucoza trong máu-hạt thấp hoạt động như polypeptit FGF21 cắt ngắn có sự cắt ngắn đầu N ít hơn 9 gốc axit amin hoặc polypeptit FGF21 cắt ngắn có cắt ngắn đầu C ít hơn 13 gốc axit amin. Theo đó, trong các phương án cụ thể, sáng chế bao gồm dạng cắt ngắn của polypeptit FGF21 trưởng thành hoặc các protein FGF21 biến thể có cả sự cắt ngắn đầu N của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 gốc axit amin và cắt ngắn đầu C của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 gốc axit amin.

Như với tất cả biến thể FGF21 của sáng chế, polypeptit FGF21 cắt ngắn có thể tùy ý bao gồm metionin đầu amin còn lại, mà có thể được đưa vào bởi đột biến được dẫn hướng hoặc như là kết quả của quy trình hiển thị vi khuẩn.

Polypeptit FGF21 cắt ngắn của sáng chế có thể được điều chế như mô tả trong các ví dụ được mô tả ở đây. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, quen thuộc với kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, có thể áp dụng kiến thức này, kết hợp với bộ lộ hiện tại, để điều chế và sử dụng polypeptit FGF21 cắt ngắn của sáng chế. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tái kết hợp ADN, tổng hợp oligonucleotit, nuôi cấy mô, và chuyển đổi (ví dụ, xung điện, nhiễm qua hạt mỡ). Xem, ví dụ, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, trước đây, mà được đính kèm ở đây bằng cách tham chiếu vì bất cứ mục đích nào. Phản ứng Enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo mô tả của nhà sản xuất, mà được tiến hành rộng rãi trong lĩnh vực, hoặc như được mô tả ở đây. Trừ phi các giới hạn cụ thể được cung cấp, các thuật ngữ được áp dụng liên quan đến, và quy trình thí nghiệm và kỹ thuật của, hóa phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp, và thuốc và hóa được được mô tả ở đây là những điều được biết đến và sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực. Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học; phân tích hóa học; bào chế dược phẩm, tạo công thức, và cung cấp; và điều trị bệnh nhân.

Polypeptit FGF21 cắt ngắn của sáng chế cũng có thể được dung hợp với thực thể khác, mà có thể truyền các đặc tính bổ sung vào polypeptit FGF21 cắt ngắn. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit FGF21 cắt ngắn có thể được dung hợp với miền cố định IgG hoặc mảnh của nó (ví dụ, vùng Fc), albumin huyết thanh người (HSA), hoặc polypeptit liên kết albumin. Sự dung hợp này có thể được thực hiện sử dụng phương pháp sinh học phân tử đã biết và/hoặc hướng dẫn được cung cấp ở đây. Hiệu quả của polypeptit dung hợp này, cũng như các phương pháp để điều chế các polypeptit dung hợp, được mô tả chi tiết hơn ở đây.

FGF21 Các protein dung hợp

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thể dung hợp polypeptit FGF21” hoặc “protein FGF21 dung hợp” dùng để chỉ sử dụng hợp của một hoặc nhiều gốc axit amin (chẳng hạn protein hoặc peptit khác loại) ở đầu N hoặc đầu C của bất kỳ biến thể protein FGF21 mô tả ở đây.

Các protein FGF21 dung hợp có thể được tạo thành bằng cách dung hợp các chuỗi khác loại ở đầu N hoặc ở đầu C của, ví dụ, biến thể protein FGF21, như xác định ở đây. Như được mô tả ở đây, chuỗi khác loại có thể là trình tự axit amin hoặc polyme chứa axit không chứa amin. Các chuỗi khác loại có thể được dung hợp trực tiếp vào biến thể protein FGF21 hoặc phân tử liên kết hay tiếp hợp. phân tử tiếp hợp hay liên kết có thể là một hoặc nhiều gốc axit amin (hoặc -mers), ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 phần còn lại (hoặc -mers), tốt hơn là từ 10 đến 50 gốc axit amin (hoặc -mers), ví dụ, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, hoặc 50 phần còn lại (hoặc -mers), và tốt hơn nữa là từ 15 đến 35 gốc axit amin (hoặc -mers). Phân tử tiếp hợp hay liên kết cũng có thể được thiết kế với vị trí tách cho endonucleaza hạn chế ADN hoặc cho proteaza để cho phép chia tách các nửa dung hợp.

Peptit và polypeptit khác loại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, epitop để cho phép phát hiện và/hoặc cách ly biến thể protein FGF21; protein thụ thể xuyên màng hoặc bộ phận của nó, chẳng hạn như miền ngoại bào hoặc màng và miền nội bào; phối tử hoặc bộ phận của nó mà liên kết với protein thụ thể xuyên màng; enzym hoặc bộ phận của nó có hoạt động xúc tác; polypeptit hoặc peptit mà tăng cường sự oligom hóa, chẳng hạn như miền khóa kéo leuxin; polypeptit hoặc peptit mà tăng cường tính ổn định, chẳng hạn như khu vực hằng định globulin miễn dịch; kháng thể chức năng hoặc không chức năng, hoặc chuỗi nặng hoặc nhẹ của chúng; và polypeptit mà có hoạt tính, chẳng hạn như hoạt tính điều trị, khác với các protein FGF21 biến thể của sáng chế. Cũng được bao gồm bởi sáng chế là các đột biến FGF21 được dung hợp vào albumin huyết thanh người (HSA).

a. Dung hợp Fc

Theo một phương án của sáng chế, biến thể protein FGF21 được dung hợp vào một hoặc nhiều miền của vùng Fc của IgG người. Kháng thể bao gồm hai bộ phận chức năng độc lập, miền có khả năng biến đổi được gọi là “Fab,” mà liên kết kháng nguyên, và miền cố định được gọi là “Fc,” mà được bao hàm trong các chức năng tác

động chẳng hạn như hoạt hóa bổ thể và tấn công bằng các tế bào thực bào. Fc có thời gian bán hủy trong huyết thanh dài, trong đó Fab có tuổi thọ ngắn (Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31). Khi cùng tham gia với protein trị liệu, miền Fc có thể cung cấp thời gian bán hủy dài hơn hoặc kết hợp các chức năng như liên kết thụ thể Fc, liên kết protein A, cố định bổ thể, và có thể thậm chí di chuyển nhau thai (Capon et al., 1989).

Trong bản mô tả, Fc-FGF21 đề cập đến protein dung hợp trong đó trình tự Fc được dung hợp với đầu N của FGF21. Tương tự, trong bản mô tả, FGF21-Fc đề cập đến protein dung hợp trong đó trình tự Fc được dung hợp với đầu C của FGF21.

Các phương án được ưu tiên của sáng chế là các protein dung hợp Fc-FGF21 bao gồm các biến thể FGF21 như xác định ở đây. Các phương án được ưu tiên đặc biệt là các protein dung hợp Fc-FGF21 bao gồm mảnh Fc được cải biến (ví dụ, FcLALA) và các biến thể FGF21 như xác định ở đây.

Protein dung hợp có thể được tinh chế, ví dụ, bằng cách sử dụng cột ái lực Protein A. Peptit và các protein được dung hợp vào vùng Fc cho thấy thời gian bán hủy in vivo dài hơn đáng kể so với bản đối chiếu không dung hợp. Ngoài ra, sự dung hợp vào vùng Fc cho phép dime hóa/multime hóa của polypeptit dung hợp. Vùng Fc có thể được tìm thấy trong vùng Fc tự nhiên, hoặc có thể được cải biến để tăng cường các phẩm chất nhất định, chẳng hạn như các phẩm chất trị liệu, thời gian lưu hành, hoặc sự kết tụ giảm đi.

Các biến thể hữu ích của các chất protein trị liệu bằng cách dung hợp với miền “Fc” của kháng thể được đề cập chi tiết trong công bố đơn PCT số WO 00/024782. Tài liệu này đề cập sự liên kết với “tá được lỏng” chẳng hạn như polyetylen glycol (PEG), dextran, hoặc vùng Fc.

b. Cầu nối protein dung hợp

Khi tạo thành protein dung hợp theo sáng chế, cầu nối, nhưng không bắt buộc, có thể được sử dụng. Khi có mặt, cấu trúc hóa học của cầu nối có thể không quan trọng, do nó phục vụ chủ yếu như miếng đệm. Cầu nối có thể được tạo thành từ axit amin liên kết cùng nhau bởi các liên kết peptit. Theo một số phương án của sáng chế, cầu nối được tạo thành từ 1 đến 20 axit amin liên kết bởi liên kết peptit, trong đó axit amin được chọn từ 20 axit amin vốn có trong tự nhiên. Theo các phương án khác nhau, 1 đến 20 axit amin được chọn từ axit amin glyxin, serin, alanin, prolin, asparagin, glutamin, và lysin. Theo một số phương án, cầu nối được tạo thành từ nhiều axit amin

mà không bị cản trở không gian, chẳng hạn như glyxin và alanin. Theo một số phương án, các cầu nối là polyglyxin, polyalanin, sự kết hợp của glyxin và alanin (chẳng hạn như poly(Gly-Ala)), hoặc sự kết hợp của glyxin và serin (chẳng hạn như poly(Gly-Ser)). Trong khi cầu nối của 15 gốc axit amin được tìm thấy để làm việc đặc biệt tốt cho các protein dung hợp FGF21, sáng chế dự liệu các cầu nối với bất kỳ độ dài hoặc thành phần nào.

Các cầu nối mô tả ở đây là các ví dụ, và các cầu nối mà dài hơn nhiều bao gồm phần còn lại khác được dự liệu bởi sáng chế. Các cầu nối non-peptit cũng được dự liệu bởi sáng chế. Ví dụ, các cầu nối alkyl chẳng hạn như có thể được sử dụng. Các cầu nối alkyl có thể được thể thêm bởi bất kỳ nhóm không cản trở không gian nào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkyl thấp (ví dụ, C1-C6), acyl thấp, halogen (ví dụ, Cl, Br), CN, NH₂, hoặc phenyl. Một ví dụ về cầu nối non-peptit là cầu nối polyetylen glycol, trong đó cầu nối có phân tử khối từ 100 đến 5000 kD, ví dụ, 100 đến 500 kD.

Các protein dung hợp biến đổi hóa học

Dạng biến đổi hóa học của các protein dung hợp mô tả ở đây, bao gồm, ví dụ, các dạng cắt ngắn và biến thể của các dung hợp FGF21 mô tả ở đây, có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, dựa trên các bộc lộ mô tả ở đây. Các protein dung hợp biến đổi hóa học này được thay thế sao cho sự đột biến biến đổi hóa học là khác với sự đột biến không biến đổi, theo kiểu hoặc vị trí của các phân tử được gắn tự nhiên vào đột biến. Sự đột biến biến đổi hóa học có thể bao gồm các phân tử tạo thành do xóa đi một hoặc nhiều nhóm hóa học được gắn tự nhiên.

Trong một phương án, các protein theo sáng chế có thể được cải biến bởi liên kết cộng hóa trị của một hoặc nhiều polyme. Ví dụ, polyme được chọn là đặc trưng tan được trong nước, nhờ đó protein mà nó được gắn với không kết tủa trong môi trường có nước, chẳng hạn như môi trường sinh lý học. Được bao gồm trong phạm vi của các polyme phù hợp là hỗn hợp của các polyme. Tốt hơn là, vì công dụng trị liệu của việc điều chế sản phẩm cuối, polyme sẽ là được chấp nhận về mặt dược phẩm. Các polyme không tan trong nước mà được liên hợp vào các protein theo sáng chế cũng tạo thành một khía cạnh của sáng chế.

Ví dụ, các polyme có thể có bất kỳ khối lượng phân tử nào và có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Các polyme mà đặc trưng có khối lượng phân tử trung

bình từ khoảng 2kDa đến khoảng 100kDa (Thuật ngữ “khoảng” chỉ ra rằng khi điều chế polyme tan được trong nước, một số phân tử sẽ nặng hơn và một số sẽ nhẹ hơn khối lượng phân tử ban đầu). Khối lượng phân tử trung bình của mỗi polyme tốt hơn là từ khoảng 5kDa đến khoảng 50kDa, tốt hơn nữa là từ khoảng 12kDa đến khoảng 40kDa, và tốt nhất là từ khoảng 20kDa đến 35kDa.

Các polyme tan được trong nước phù hợp hoặc hỗn hợp của chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên kết N hoặc liên kết O của hydrat cacbon, đường, phosphat, polyetylen glycol (PEG) (bao gồm các dạng của PEG mà được dùng để dẫn xuất các protein, bao gồm mono-(C1-C10), alkoxy-, hoặc aryloxy-polyetylen glycol), monomethoxy-polyetylen glycol, dextran (chẳng hạn như dextran phân tử khối thấp là, ví dụ, khoảng 6 kD), xenluloza, hoặc hydrat cacbon khác nền polyme, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyetylen glycol, propylene glycol homopolymes, polypropylene oxit/etylen oxit co-polyme, polyol polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), và rượu polyvinyl. Cũng được bao hàm bởi sáng chế là các phân tử liên kết ngang song chức mà có thể dùng để điều chế biến thể protein FGF21 multimer liên kết cộng hóa trị. Cũng được bao hàm bởi sáng chế là các Đột biến FGF21 được liên kết cộng hóa trị vào axit polysialic.

Các polyme polysaccharit là dạng khác của polyme tan được trong nước mà có thể dùng để biến đổi protein. Do đó, Protein dung hợp theo sáng chế được dung hợp vào polyme polysaccharit tạo thành các phương án của sáng chế. Dextran là các polyme polysaccharit bao gồm các khối phụ của glucoza liên kết chủ yếu bởi liên kết alpha 1-6. Bản thân dextran là có sẵn với rất nhiều khoảng phân tử khối, và đã có sẵn phân tử khối từ khoảng 1 kD đến 70 kD. Dextran là polyme tan được trong nước phù hợp để sử dụng như tá dược lỏng bởi chính nó hoặc kết hợp cùng tá dược lỏng khác (ví dụ, Fc). Xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 96/11953. Việc sử dụng dextran liên hợp với việc điều trị hoặc chẩn đoán globulin miễn dịch đã được báo cáo. Xem, ví dụ, công bố patent châu Âu số 0 315 456, mà được đính kèm ở đây để tham chiếu. Sáng chế cũng bao hàm cả việc sử dụng dextran từ khoảng 1 kD đến khoảng 20 kD.

Nhìn chung, biến đổi hóa học có thể được thực hiện dưới bất kỳ điều kiện phù hợp nào sử dụng để phản ứng protein với phân tử polyme được kích hoạt. Phương pháp điều chế polypeptit biến đổi hóa học nhìn chung bao gồm các bước: (a) phản ứng polypeptit với phân tử polyme được kích hoạt (chẳng hạn như phản ứng este hoặc dẫn

xuấtl adehyde của phân tử polyme) trong điều kiện tại đó biến thể protein FGF21 trở nên được liên kết với một hoặc nhiều các phân tử polyme, và (b) thu được sản phẩm phản ứng. Điều kiện phản ứng tối ưu sẽ được xác định dựa trên các thông số đã biết và sản phẩm mong muốn. Ví dụ, tỷ lệ của các phân tử polyme vào protein càng lớn, tỷ lệ phần trăm của phân tử polyme càng lớn. Theo một phương án của sáng chế, đột biến FGF21 biến đổi hóa học có thể có gốc phân tử polyme đơn nhất ở đầu amin (xem, ví dụ, patent U.S. số 5,234,784)

Trong phương án khác của sáng chế, các protein theo sáng chế có thể được gắn hóa học vào biotin. Biotin/các protein theo sáng chế sau đó được gắn vào avidin, tạo ra avidin/biotin/các protein theo sáng chế hóa trị bốn. Các protein theo sáng chế cũng có thể được liên kết cộng hóa trị vào dinitrophenol (DNP) hoặc trinitrophenol (TNP) và liên hợp thu được kết tủa với kháng-DNP hoặc kháng-TNP-IgM để tạo thành liên hợp decameric với hóa trị 10.

Nhìn chung, các điều kiện mà có thể được giảm nhẹ hoặc điều chế bằng cách áp dụng biến đổi hóa học đột biến FGF21 bao gồm các điều kiện được mô tả ở đây cho các protein theo sáng chế. Tuy nhiên, các đột biến FGF21 biến đổi hóa học được bộc lộ ở đây có thể có các hoạt tính bổ sung, tăng cường hoặc giảm hoạt tính sinh học, hoặc các đặc tính khác, chẳng hạn như tăng hoặc giảm thời gian bán hủy, khi so sánh với các đột biến FGF21 không được cải biến.

Chế phẩm điều trị của các protein dung hợp và việc sử dụng của chúng

Sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm điều trị bao gồm một hoặc nhiều protein dung hợp theo sáng chế mô tả ở đây và trong hỗn hợp với chất bào chế được dụng hoặc sinh lý dụng hoặc chất mang được dụng được chọn để phù hợp với kiểu áp dụng. Các thành phần được dự tính cụ thể dựa trên, ví dụ, sự nhận biết của các protein dung hợp thể hiện các đặc tính tăng cường.

Theo một số phương án, các chế phẩm điều trị được điều chế ở dạng có thể tiêm, hoặc dạng dung dịch lỏng hoặc huyền phù; dạng rắn phù hợp cho dung dịch trong, hoặc huyền phù trong, các tá dược lỏng lỏng để phun cũng có thể được điều chế. Liposom được bao gồm trong giới hạn của chất mang được dụng. Muối được dụng cũng có thể xuất hiện trong dược phẩm, ví dụ, các muối axit khoáng chẳng hạn như hydroclorit, hydrobromit, phosphat, sulfat, và tương tự; và các muối của axit hữu cơ chẳng hạn như axetat, propionat, malonat, benzoat, và tương tự. Sự bàn luận kỹ lưỡng

về tá dược có dược học có thể chấp nhận có sẵn trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkins.

Các vật liệu bào chế có thể chấp nhận tốt hơn là không độc với người tiếp nhận ở liều lượng và nồng độ được dùng.

Thành phần dược học có thể bao gồm các vật liệu điều chế để biến đổi, duy trì, hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, nồng độ mol, độ nhớt, độ rõ nét, màu sắc, tính đẳng trương, mùi, độ vô trùng, tính ổn định, tỷ lệ tan hoặc giải phóng, tính hấp phụ, hoặc độ thấm của thành phần này. Các vật liệu bào chế phù hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin (chẳng hạn như glyxin, glutamin, asparagin, arginin, hoặc lysin), kháng vi sinh vật, chống oxy hóa (chẳng hạn như axit ascorbic, natri sulfit, hoặc natri hydro-sulfit), chất đệm (chẳng hạn như borat, bicarbonat, Tris-HCl, xitrat, phosphat, hoặc các axit hữu cơ khác), các chất phình (chẳng hạn như manitol hoặc glyxin), các chất tạo cang (chẳng hạn như axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA)), các chất phức hợp (chẳng hạn như cafein, polyvinylpyrrolidon, beta-cyclodextrin, hoặc hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), chất độn, monosacarit, disacarit, và hydrat cacbon khác (chẳng hạn như glucoza, mannoza, hoặc dextrin), các protein (chẳng hạn như salbumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch), chất nhuộm màu, chất pha loãng và tạo hương, các chất nhũ tương hóa, các polyme ưa nước (chẳng hạn như polyvinylpyrrolidon), polypeptit phân tử khối thấp, ion đệm tạo muối (chẳng hạn như natri), các chất bảo quản (chẳng hạn như benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salicylic, thimerosal, phenetyl alcohol, metylparaben, propylparaben, chlorhexidin, axit sorbic, hoặc hydrogen peroxit), các dung môi (chẳng hạn như glycerin, propylen glycol, hoặc polyetylen glycol), rượu đường (chẳng hạn như manitol hoặc sorbitol), các chất ngưng, các chất hoạt tính bề mặt hoặc các chất làm ướt (chẳng hạn như pluronic; PEG; sorbitan este; polysorbat chẳng hạn như polysorbat 20 hoặc polysorbat 80; triton; trometamin; lexithin; cholesterol hoặc tyloxapal), các chất tăng cường ổn định (chẳng hạn như sucroza hoặc sorbitol), các chất tăng cường tính trương (chẳng hạn như halogen của kim loại kiềm; tốt hơn là natri hoặc kali clorua; hoặc manitol sorbitol), các tá dược lỏng phân phối, các chất pha loãng, tá dược và/hoặc tá dược dược phẩm (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), và các tái bản của nó, được đính kèm ở đây để tham chiếu cho mọi mục đích).

Dược phẩm tối ưu sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên, ví dụ, các lộ trình dự định áp dụng, dạng thức phân phối, và liều lượng mong muốn (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*). Các thành phần này có thể tác động đến trạng thái vật lý, sự ổn định, tỷ lệ giải phóng *in vivo*, và tỷ lệ làm sạch *in vivo* của protein dung hợp theo sáng chế.

Các tá dược lỏng hoặc chất mang căn bản trong dược phẩm về bản chất có thể có nước hoặc không có nước. Ví dụ, tá dược lỏng hoặc chất mang phù hợp để tiêm có thể là nước, dung dịch chứa muối sinh lý, hoặc dịch não tủy nhân tạo, có thể được bổ sung với các vật liệu khác thông thường trong các dược phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa. Nước muối đệm trung tính hoặc nước muối trộn với albumin huyết thanh là các tá dược lỏng mẫu khác. Dược phẩm mẫu bao gồm đệm Tris khoảng độ pH 7,0-8,5, hoặc đệm axetat có độ pH khoảng 4,0-5,5, mà có thể bao gồm thêm sorbitol hoặc chất thế phù hợp. Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm song chức có thể được điều chế để lưu trữ bằng cách trộn các thành phần được chọn có độ mong muốn của nhiều chất bào chế tùy chọn (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) Trong dạng bánh khô lạnh hoặc dung dịch nước. Ngoài ra, sản phẩm protein song chức có thể được tạo thành dạng khô lạnh sử dụng các tá dược phù hợp chẳng hạn như sucroza.

Dược phẩm chứa protein dung hợp theo sáng chế có thể chọn để phân phối ngoài đường tiêu hóa. Ngoài ra, các thành phần có thể được chọn để xông hoặc để phân phối qua đường tiêu hóa, chẳng hạn như đường miệng. Sự điều chế các thành phần có dược học có thể chấp nhận này là rõ ràng với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các thành phần bào chế là có mặt với nồng độ có thể chấp nhận đối với vị trí áp dụng. Ví dụ, các chất đệm được dùng để duy trì độ pH vật lý hoặc ở độ pH thấp hơn một chút, cụ thể là trong khoảng pH từ khoảng 5 đến khoảng 8.

Khi dùng ngoài đường tiêu hóa được dự tính, các chế phẩm điều trị để sử dụng trong sáng chế có thể là dạng không pyrogen, có thể dùng ngoài đường tiêu hóa, dung dịch nước bao gồm protein song chức mong muốn trong tá dược lỏng có dược học có thể chấp nhận. Tá dược lỏng đặc biệt phù hợp để tiêm ngoài đường tiêu hóa là nước pha loãng vô trùng trong đó protein song chức được tạo thành dạng dung dịch đồng notron, vô trùng được bảo quản phù hợp. Tuy nhiên cách điều chế khác có thể bao gồm sự tạo thành của phân tử mong muốn với một chất, chẳng hạn như các vi cầu có

thể tiêm, các hạt có thể ăn mòn sinh học, các hợp chất polyme (chẳng hạn như axit polylactic hoặc axit polyglycoli), hạt kim loại, hoặc liposom, mà mang đến sự giải phóng được kiểm soát hoặc duy trì của sản phẩm mà sau đó có thể phân phối qua thuốc tiêm trong kho. Axit hyaluronic cũng có thể được sử dụng, và nó có thể có hiệu quả tăng cường thời gian duy trì trong chu trình. Công cụ phù hợp khác để đưa vào phân tử mong muốn bao gồm các thiết bị phân phối thuốc cấy.

Trong một phương án, dược phẩm có thể được bào chế để xông. Ví dụ, protein song chức của sáng chế có thể được bào chế dạng bột khô để xông. Dung dịch xông protein song chức cũng có thể được bào chế với chất đẩy để phân phối son khí. Theo phương án khác nữa, các dung dịch có thể được phun. Cách dùng qua phổi được mô tả thêm trong công bố đơn quốc tế số WO 94/20069, mà mô tả phân phối qua đường phổi của các protein biến đổi hóa học.

Nó cũng được dự tính là các bào chế nhất định có thể được dùng qua đường miệng. Theo một phương án của sáng chế, các protein dung hợp theo sáng chế mà được dùng trong ngành có thể được bào chế với hoặc không có các chất mang được sử dụng thông thường trong hợp chất của dạng liều dùng rắn chẳng hạn như viên nén và viên nang. Ví dụ, viên nang có thể được thiết kế để giải phóng thành phần hoạt tính của sự bào chế ở điểm trong đường dạ dày khi khả dụng sinh học lớn nhất và sự thoái biến tiền hệ thống là nhỏ nhất. Các chất bổ sung có thể được bao gồm để tạo thuận lợi cho sự hấp phụ của protein dung hợp theo sáng chế. Các chất pha loãng, chất tạo hương, sáp hạ điểm nóng chảy, dầu thực vật, chất bôi trơn, các chất ngưng, các chất tan rã viên nén, và các cầu nối cũng được sử dụng.

Thành phần dược học khác có thể bao gồm lượng hữu hiệu protein dung hợp theo sáng chế trong hỗn hợp với tá dược không độc hại mà phù hợp để sản xuất viên nén. Bằng cách hóa tan viên nén trong nước vô trùng, hoặc dung dịch tá dược lỏng phù hợp khác có thể được điều chế theo dạng liều-đơn vị. Tá dược phù hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất pha loãng trợ, chẳng hạn như canxi carbonat, natri carbonat hoặc bicarbonat, lactoza, hoặc canxi phosphat; hoặc các cầu nối, chẳng hạn như tinh bột, gelatin, hoặc cây keo; hoặc các chất bôi trơn chẳng hạn như magie stearat, axit stearic, hoặc bột tan cơ.

Dược phẩm bổ sung bao gồm các protein dung hợp theo sáng chế sẽ là bằng chứng với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm

việc bào chế gồm có các protein dung hợp theo sáng chế dạng bào chế phân phối được hạn chế hoặc được duy trì. Kỹ thuật để bào chế các biện pháp phân phối được hạn chế hoặc được duy trì khác, chẳng hạn như các chất mang liposome, vi hạt có thể ăn mòn sinh học hoặc hạt xốp và tiêm giải phóng chậm, cũng được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 93/15722, mà mô tả sự giải phóng được kiểm soát của vi hạt polymeic xốp để phân phối được phẩm, và Wischke & Schwendeman, 2008, Int. J Pharm. 364: 298-327, và Freiberg & Zhu, 2004, Int. J Pharm. 282: 1-18, mà bàn luận về cách điều chế và sử dụng thể trung tâm/vi hạt).

Các ví dụ bổ sung của việc điều chế giải phóng được duy trì bao gồm các ma trận polyme bán thấm dạng các vật phẩm định hình, ví dụ film, hoặc viên vi nang. Các ma trận giải phóng được duy trì có thể bao gồm polyester, hydrogel, polylactit (patent U.S. số 3,773,919 và patent châu Âu số 0 058 481), copolyme của axit L-glutamic và gamma etyl-L-glutamate (Sidman et al., 1983, Biopolymes 22: 547-56), poly (2-hydroxyethyl-metacrylat) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 và Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), etylen vinyl axetat (Langer et al., nêu trên) hoặc axit poly-D-3-hydroxybutyric (patent EP số 0 133 988). Các thành phần giải phóng được duy trì cũng có thể bao gồm liposom, mà có thể được điều chế bằng bất kỳ phương pháp đã biết nào trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-92; và patent EP số 0 036 676, 0 088 046, và 0 143 949.

Dược phẩm của sáng chế được sử dụng dùng *in vivo* đặc biệt phải được vô trùng. Nó được thực hiện bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Khi các thành phần được đông khô, sự khử trùng sử dụng phương pháp này có thể được thực hiện hoặc trước, hoặc sau khi đông khô và hoàn nguyên. Thành phần để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được bảo quản ở dạng đông khô hoặc dạng dung dịch. Ngoài ra, thành phần dùng ngoài đường tiêu hóa nhìn chung còn được đặc trong bình chứa có đường vào vô trùng, ví dụ túi dung dịch tĩnh mạch hoặc lọ có miếng chặn có thể chọc xuyên bằng kim tiêm dưới da.

Khi dược phẩm được bào chế, nó có thể được bảo quản trong bình vô trùng như dạng dung dịch, huyền phù, keo, nhũ tương, chất rắn, hoặc dạng bụi được khử nước hoặc đông khô. Các bào chế này có thể được bảo quản hoặc ở dạng sẵn sàng sử dụng hoặc ở dạng (ví dụ, đông khô) cần hoàn nguyên trước khi dùng.

Trong phương án cụ thể, sáng chế được chỉ đến các bộ để tạo ra đơn vị dùng một liều. Các bộ này đều chứa cả bình chứa thứ nhất có protein khô và bình chứa thứ hai có nước bào chế. Ngoài ra cũng bao gồm trong phạm vi của sáng chế là các bộ chứa các ống tiêm đơn ngăn và đa ngăn được đóng trước (ví dụ, ống tiêm lỏng và lyosyringes).

Liều của các protein dung hợp và cách dùng của chúng

Lượng hữu hiệu của dược phẩm của sáng chế được dùng trị liệu dựa trên, ví dụ, theo mục tiêu và hoàn cảnh điều trị. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá rằng mức liều lượng phù hợp để điều trị sẽ thay đổi theo đó tùy thuộc, một phần, vào phân tử được phân phối, chỉ thị để sử dụng biến thể protein dung hợp, cách dùng, và kích thước (khối lượng cơ thể, bề mặt cơ thể, hoặc kích thước gan) và tình trạng (tuổi và sức khỏe) của bệnh nhân. Theo đó, bác sĩ lâm sàng có thể chuẩn độ liều lượng và điều chỉnh lộ trình dùng để thu được hiệu quả điều trị tối ưu. Liều lượng đặc trưng có thể nằm trong khoảng từ 0,1 $\mu\text{g/kg}$ đến khoảng 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, dựa trên các nhân tố mô tả ở trên. Theo phương án khác, liều lượng có thể nằm trong khoảng từ 0,1 $\mu\text{g/kg}$ đến khoảng 100 mg/kg ; hoặc 1 $\mu\text{g/kg}$ đến khoảng 100 mg/kg .

Tần suất liều lượng sẽ dựa trên các thông số dược động học của protein song chức trong bào chế được sử dụng. Cụ thể, bác sĩ lâm sàng sẽ điều chỉnh thành phần cho đến khi liều lượng đạt hiệu quả mong muốn. Thành phần do đó có thể được điều chỉnh như một liều, hai liều hoặc nhiều liều (có thể chứa hoặc không chứa lượng như nhau của phân tử mong muốn) theo thời gian, hoặc truyền liên tục qua thiết bị cấy hoặc ống thông. Sự tinh chế thêm của liều phù hợp được thực hiện đều đặn bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bên trong phạm vi của nhiệm vụ thường được họ thực hiện. Các liều lượng phù hợp có thể được cá biệt hóa thông qua việc sử dụng dữ liệu phản ứng lại liều lượng phù hợp.

Lộ trình dùng thuốc của dược phẩm theo các phương pháp đã biết, ví dụ, đường miệng; thông qua việc tiêm vào tĩnh mạch, trong màng bụng, trong não (trong mô mềm), trong não thất, trong cơ, trong động mạch, trong trực chính, hoặc trong vết tổn thương; bằng hệ thống giải phóng được duy trì (mà cũng có thể được tiêm); hoặc bằng các thiết bị cấy. Khi có nhu cầu, các thành phần có thể được điều chỉnh bằng cách tiêm nhanh một liều hoặc liên tục bằng cách truyền, hoặc bằng thiết bị cấy.

Ngoài ra hoặc thêm vào đó, thành phần có thể được điều chỉnh cục bộ thông qua sự cấy của màng, xốp, hoặc vật liệu khác phù hợp ở đó phân tử mong muốn được hấp phụ hoặc nang hóa. Khi thiết bị cấy được sử dụng, thiết bị có thể cấy vào trong bất kỳ mô hoặc gan phù hợp nào, và phân phối của phân tử mong muốn có thể thông qua sự khuếch tán, giải phóng liều tiêm nhanh theo thời gian, hoặc dùng liên tục.

Công dụng điều trị của các protein dung hợp

Các protein theo sáng chế có thể được dùng để điều trị, chẩn đoán, cải thiện hoặc ngăn chặn một số bệnh, rối loạn, hoặc các tình trạng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các rối loạn chuyển hóa. Theo một phương án, rối loạn chuyển hóa được điều trị là bệnh đái tháo đường, ví dụ, bệnh đái tháo đường typ 2. Trong phương án khác, rối loạn chuyển hóa là bệnh béo phì. Các phương án khác bao gồm các tình trạng thuộc trao đổi chất hoặc rối loạn chẳng hạn như bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh viêm tụy, lipit máu bất thường, bệnh gan nhiễm chất béo không do rượu (NAFLD), bệnh viêm gan có u mỡ không do rượu (NASH), kháng insulin, insulin máu cao, không dung nạp glucoza, glucoza máu cao, hội chứng chuyển hóa, chứng tăng huyết áp, các bệnh tim mạch, nhồi máu cơ tim cấp tính, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại biên, đột quỵ, suy tim, bệnh tim mạch vành, bệnh thận, biến chứng tiểu đường, bệnh thần kinh, rối loạn liên quan đến đột biến bất hoạt trầm trọng trong thụ thể insulin, chứng liệt nhẹ dạ dày và các rối loạn chuyển hóa khác.

Khi dùng, rối loạn hoặc tình trạng chẳng hạn như bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc typ 2 hoặc bệnh béo phì có thể được điều trị bằng cách cho dùng biến thể protein FGF21 như được mô tả ở đây đối với bệnh nhân có nhu cầu theo lượng liều dùng điều trị hữu hiệu. Sự cho dùng có thể được thực hiện như được mô tả ở đây, chẳng hạn như bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm vào màng bụng, tiêm vào bắp, hoặc qua đường miệng theo dạng viên nén hoặc bào chế lỏng. Trong hầu hết các tình huống, liều mong muốn có thể được xác định bởi bác sĩ lâm sàng, như được mô tả ở đây, và có thể đại diện cho liều lượng điều trị hữu hiệu của đột biến polypeptit FGF21. Nó là rõ ràng với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng liều lượng điều trị hữu hiệu của Đột biến polypeptit FGF21 sẽ phụ thuộc, không kể những yếu tố khác, vào kế hoạch cho dùng, liều đơn vị của kháng nguyên được cho dùng, liệu phân tử axit nucleic hoặc polypeptit được cho dùng kết hợp với các chất điều trị khác hay không, tình trạng miễn dịch và sức khỏe của thụ thể. Thuật ngữ “liều lượng điều trị hữu hiệu,”

Như được sử dụng ở đây, nghĩa là lượng đột biến polypeptit FGF21 mà gọi ra phản ứng sinh học hoặc y học trong hệ thống mô, động vật, hoặc con người được tìm ra bởi các nhà nghiên cứu, bác sĩ y tế, hoặc các bác sĩ lâm sàng khác, mà bao gồm sự làm dịu triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn được điều trị.

Như được mô tả chi tiết ở đây, sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn với sự tham chiếu đến các ví dụ, mà được bao gồm chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dùng để giới hạn sáng chế.

Sự thực hành của sáng chế sẽ sử dụng, trừ phi được chỉ rõ khác, các phương pháp thông thường về hóa học, sinh hóa học, sinh học phân tử, miễn dịch học và dược học, trong phạm vi lĩnh vực. Các kỹ thuật này được giải thích đầy đủ trong các tài liệu. Xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick và N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); và Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir và C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); và Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế các protein biến thể FGF21

Cấu trúc biểu hiện cho FGF21 V76: Biến thể FGF21 được nhân dòng vào trong vector biểu hiện pET30a được cải biến *E.coli*, mô tả bởi Achmuller et al. (2007) (Nature Methods 4:1037-1043), để tạo ra sự dung hợp trong khung vào đuôi hexahistidin theo sau bởi đuôi N^{pro}-EDDIE ở đầu N của FGF21 (aa 33-209).

Biểu hiện và tinh chế của FGF21 V76: Plasmid biểu hiện pET30a-His-N^{pro}-EDDIE-FGF21 được biến nạp vào tế bào có công hiệu *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen). Sự sinh trưởng qua đêm từ cụm khuẩn đơn của các tế bào mới được cải biến được thực hiện trong 50 mL Terrific Broth (TB) chứa 50 µg/mL kanamycin ở 37°C. Tiền nuôi cấy được cải biến thành môi trường TB 1 L với kanamycin và được nuôi cấy trong bình có vách ngăn ở 37°C và lắc ở 250 rpm. Sau khi 6 giờ, biểu hiện của FGF21 được gây ra bằng cách thêm vào IPTG ở nồng độ cuối cùng là 1 mM, và dịch nuôi cấy được sinh trưởng qua đêm ở 37°C. Các tế bào sau đó được thu hoạch và tái ngưng thành 50 mL chất đệm phân giải đá lạnh; Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, theo sau bởi sự phân giải sử dụng microfluidizer™.

Thế vùi (IBs) được kết tủa bằng cách quay ly tâm ở 30.000 x g trong 1 giờ ở 4°C. IBs được rửa với Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM và sau đó hòa tan thành 30 mL chất đệm hòa tan; Tris-HCl 10 mM, pH8, NaH₂PO₄ 100 mM, GnHCl 6 M. IBs hòa tan được làm trong bằng cách quay ly tâm ở 30.000 x g trong 1 giờ ở 25°C. Dung dịch IB được nạp vào cột 5 mL của nhựa hiệu suất cao Ni-NTA (GE Healthcare) cân bằng với chất đệm hòa tan. Các protein liên kết với nhựa được rửa giải bằng cách giảm độ pH xuống 4,5. Nước giải hấp được điều hòa bằng cách điều chỉnh độ pH và thêm dithiothreitol (DTT) ở nồng độ 20 mM. Nước giải hấp đã điều hòa được pha loãng từ từ nhiều lần thành 1 L đệm; Tris-HCl 50 mM, pH 8, arginin 0,5 M, DTT 20 mM, sau đó ủ trong 2 ngày ở 4°C. Mẫu pha loãng được cô lại chuyển đổi chất đệm thành Tris-HCl 20 mM, pH 9 sử dụng phương pháp siêu lọc. Mẫu cô lại được tải vào cột 10 mL nhựa chảy nhanh Q sepharosa (GE Healthcare) cân bằng với Tris-HCl 20 mM (pH9).

Sau khi rửa nhựa với chất đệm cân bằng, các protein liên kết với nhựa được rửa giải với Tris-HCl 20 mM, pH 9, NaCl 500 mM. Để loại bỏ mảnh dung hợp His-N^{pro} tách ra và bất kỳ protein dung hợp không được tách nào từ protein FGF21 gấp lại, nước giải hấp được tải lên cột 5 mL của nhựa hiệu suất cao Ni-NTA cân bằng với 20 mM Tris, pH 8,0, imidazol 50 mM, và phần chảy qua chứa FGF21 được thu lại. Để giảm mức nội độc tố, phần FGF21 được xử lý với nhựa EndoTrap HD (Hyglos) cân bằng với Tris 10 mM, pH 8, imidazol 50 mM, NaCl 500 mM, CaCl₂ 1 mM. Mẫu có nội độc tố thấp được thẩm tách chống lại PBS và sau đó khử trùng với bộ lọc 0,22 µm. Protein FGF21 đã tinh chế được đông lạnh trong nitơ lỏng và bảo quản ở -80°C. Nồng độ protein được xác định bằng cách thu bức xạ ở 280 nm sử dụng 9362 M-1 cm-1 như hệ số hấp tắt phân tử cho FGF21. Độ tinh khiết và độ toàn vẹn protein được xác định bằng HPLC, SDS-PAGE và phép đo phổ sắc ký lỏng lớn.

Xystein PEGyl hóa biến thể FGF21: Biến thể FGF21 V76 (R154C) có xu hướng dime hóa qua xystein được thiết kế; do đó, trước khi PEGyl hóa dung dịch protein (cụ thể là 5 mg/mL trong chất đệm Tris) được giảm dần với mercaptoethylamin 5 mM trong 30 phút trên đá và khử muối lập tức trong Tris 20 mM, pH 7. Protein mới được giảm (cụ thể là 3 mg/mL) ngay sau đó được PEGyl hóa với 1,5 đương lượng của 40kDa chất phản ứng maleimido-PEG phân nhánh (NOF, Cat. # GL2-400MA từ chuỗi Sunbright) trong 3 giờ trên băng đá. protein được PEGyl hóa cuối cùng được tinh chế bằng phép sắc ký trao đổi anion (MonoQ) với hiệu suất tổng thể khoảng 25%.

Cấu trúc biểu hiện cho các biến thể Fc-FGF21 dung hợp: cADN cho biến thể FGF21 người mã hóa axit amin 33-209 được tách dòng vào sản phẩm vectơ biểu hiện ở động vật có vú của gen khởi động virus cytomegalo (CMV) trong khung với chuỗi đầu N bao gồm peptit khởi đầu (globulin miễn dịch chuỗi kappa) vào sự tách ra trực tiếp của các protein, sau đó miền Fc và cầu nối ngắn.

Biểu hiện và tinh chế biến thể Fc-FGF21: Các protein biến thể Fc-FGF21 được biểu hiện vào trong các tế bào HEK293T (American Type Culture Collection). Các tế bào được sinh trưởng trong dịch nuôi cấy huyền phù ở 37°C, 8%CO₂, trong môi trường biểu hiện Freestyle 293 (Invitrogen, Cat. #12338-018) cho đến ngày chuyển nạp. Các tế bào được quay ly tâm ở 1000xg trong 7 phút trong swinging bucket rotor và được đếm sử dụng bộ đếm tế bào tự động. Các tế bào được pha loãng trong 900 mL môi trường Freestyle 293 thành nồng độ cuối 1,4x10⁶ tế bào/mL và đặt vào trong bình không có vách ngăn 3 L (Corning, Cat. #431252). Các tế bào được chuyển nạp sử dụng hỗn hợp polyetylenimin (PEI) và plasmit như sau. Ba mL dung dịch gốc 1 mg/mL vô trùng theo dây, M.W. 25.000, PEI (Alfa Aesar, Cat.#43896) được thêm vào 50 mL môi trường Freestyle 293, trộn nhẹ và ủ ở 25°C trong 5 phút. Cùng lúc, 1 mg plasmit không nội độc tố được thêm vào 50 mL môi trường Freestyle 293 và lọc vô trùng sử dụng bộ lọc 0,22 µm. Hỗn hợp PEI sau đó được thêm vào ADN đã lọc vô trùng, trộn nhẹ và để ủ ở 25°C trong 10 phút. Hỗn hợp PEI-plasmit sau đó được thêm vào bình 3 L chứa tế bào HEK 293T pha loãng và đặt ở lò ủ khuấy ở 125 RPM, 37°C, 8% CO₂.

Trong ngày thứ 6 sau khi chuyển nạp, các tế bào được quay ly tâm ở 2000xg trong 10 phút và phần nổi trên bề mặt được thu hoạch. Phần nổi trên bề mặt được làm trong thêm bằng cách lọc qua bộ lọc 0,8/0,2 µm (Pall Corporation, Cat. #4628).

Tinh chế mẻ protein FGF21 được thực hiện bằng cách thêm nhanh 1 mL dòng protein A Sepharosa tái tổ hợp (GE, Cat. #17-5138-03), mỗi 20 mg của protein mong muốn được tinh chế, trực tiếp với phần nổi trên bề mặt được làm trong và ủ trong một tiếng ở 4°C và quay nhẹ. Hỗn hợp phần nổi trên bề mặt sau đó được đổ qua Sắc ký cột Poly-Prep dùng một lần (Bio-Rad, Cat. #731-1550) và dòng chảy qua được loại bỏ. Các hạt được giữ lại được rửa với 5 thể tích cột của DPBS, độ pH 7,4 (Invitrogen, Cat. #14190-144). Việc rửa giải protein từ các hạt protein A được thực hiện bằng cách

thêm vào 20 thể tích cột của 50 mM chất đệm natri xitrat, pH 3,0. Chất đệm rửa giải được trung tính hóa bằng cách thêm vào chất đệm Tris-HCL 20%, pH 9,0.

Phép sắc ký loại trừ kích thước được thực hiện như bước khử sạch thứ hai bằng cách chạy vật liệu được tinh chế mề Protein A qua cột High Load 26/600 Superdex 200pg (GE, Cat. #28-9893-36). Hiệu suất protein tinh chế được định lượng bởi A280. SDS-Page được chạy để thẩm tra độ tinh khiết và khối lượng phân tử. Mức nội độc tố được định lượng bằng cách sử dụng hệ thống Endosafe PTS (Charles River Labs).

Ví dụ 2: Đo sự hấp thụ 2-Deoxyglucoza (2-DOG) phụ thuộc FGF21

FGF21 được thể hiện để tăng cường hấp thụ glucoza trong các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 chuột khi có mặt và vắng mặt của insulin, và để giảm sự cho ăn và cố định glucoza trong máu, triglycerit, và mức glucagon trong chuột *ob/ob* và *db/db* và chuột ZDF 8 tuần tuổi trong phương pháp phụ thuộc vào liều lượng, nhờ đó, cung cấp cơ sở để sử dụng FGF21 như liệu pháp để điều trị bệnh đái tháo đường và bệnh béo phì (xem, ví dụ, công bố đơn số WO03/011213, và Kharitonov et al., (2005) Jour. của Clinical Invest. 115:1627-1635). Ngoài ra, FGF21 được quan sát thấy tăng cường sự photphoryl hóa tyroxin của FGFR-1 và FGFR-2 trong các tế bào tạo mỡ 3T3-L1.

Các nguyên bào sợi 3T3-L1 được mua từ ATCC (Cat. # CL173). Các tế bào được sinh trưởng đến điểm được trong đĩa petri 150 cm và được duy trì trong DMEM với glucoza cao (Invitrogen, Cat. # 11995065) được bổ sung với Fetal Bovine Serum 10% và penicillin-streptomycin 1% trong 4 ngày bổ sung. Các tế bào sau đó được biệt hóa trong môi trường nêu trên bổ sung với insulin 4 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma, Cat. # I-5500), 115 $\mu\text{g/mL}$ IBMX (Sigma, Cat. # I5879) và 0,0975 $\mu\text{g/mL}$ dexametason (Sigma, Cat. #D1756) trong 3 ngày sau khi phương tiện biệt hóa được thay thế với DMEM trọn bộ. Một khay của các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 biệt hóa được gieo vào bốn khay 96-giếng một ngày sau khi thay đổi môi trường.

Sau đó các tế bào tạo mỡ được xử lý với protein biến thể FGF21 và FGF21-WT (xem Bảng 2 về danh sách của các biến thể; 30 pM đến 100 nM là khoảng nồng độ đặc trưng được sử dụng) qua đêm trong môi trường hoàn chỉnh. Các tế bào tạo mỡ được xử lý với các mẫu FGF21 là huyết thanh khi đói trong 50 μL trên giếng chất đệm KRH (NaCl 0,75%; KCl 0,038%; CaCl_2 0,0196%; MgSO_4 0,032%; HEPES 0,025M, pH 7,5; BSA 0,5%; natri pyruvat 2 mM) trong 2 giờ. Các giếng để trống được thêm vào với xytochalsin B 1 μL (nồng độ cuối 5 $\mu\text{g/mL}$) trong 15 phút. [3H]-2-DOG (20,6

mCi/mmol, 1 mCi/mL) được pha loãng 1:20 trong 2-DOG 5,1 mM lạnh và 2-DOG 1 μ L pha loãng được thêm vào mỗi giếng và các tế bào được ủ trong 5 phút. Các tế bào được rửa với 100 μ L/giếng chất đệm KRH ba lần. SDS 40 μ L/giếng 1% được thêm vào các tế bào và các tế bào được lắc trong ít nhất 10 phút. Bổ sung chất lỏng phát quang 200 μ L/giếng và các khay được lắc qua đêm và đọc trong bộ đọc beta-microplate. Các giá trị thu được từ toàn bộ cột/dòng, mà được xử lý với cytochalasin B, được lấy trung bình và được trừ từ các giá trị khác. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism, kết quả của nó được tổng kết trong Bảng 2. Các biến thể Fc-FGF21 dung hợp V101, V103 và V188 được cao hơn so với biến thể FGF21 V76 PEGyl hóa trong để đưa vào hấp thụ 2-deoxyglucoza bởi các tế bào tạo mỡ 3T3L1 của chuột.

Ví dụ 3: pERK trong thử nghiệm Western ở tế bào (In Cell Western - ICW)

Các tế bào HEK293 được chuyển nạp ổn định với β -klotho người được nuôi cấy trong DMEM glucoza cao, FBS 10%, PS 1% và G418 600 ng/mL được gieo trong poly-D-lysine phủ các khay 96-giếng (BD bioscience, Cat. #356640) ở 30.000 tế bào mỗi giếng qua đêm. Các tế bào là các huyết thanh đôi trong DMEM glucoza cao, BSA 0,5 % và HEPES 10 mM trong 4 giờ. WT FGF21 và biến thể FGF21 (xem Bảng 3 về danh sách các biến thể) được pha loãng thành các nồng độ khác nhau (100 pM đến 300 nM là khoảng nồng độ cụ thể được sử dụng) trong môi trường đôi. Các tế bào được kích thích với FGF21 trong 10 phút. Sau khi kích thích protein biến thể FGF21 hoặc FGF21, phương tiện được hút ra từ các giếng và các tế bào được rửa một lần với PBS 100 μ L lạnh và sau đó được làm đông với 100 μ L formaldehyt 4% trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó là ủ bổ sung 10 phút với metanol đá lạnh 100 μ L.

Sau khi làm đông, các tế bào được rửa với Triton X-100 0,3% trong PBS bốn lần, 5 phút mỗi lần. Odyssey Blocking Buffer 150 μ L được thêm vào các tế bào được thấm ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Kháng thể Phospho-ERK (pERK) được pha loãng đến nồng độ 0,17 μ g/mL (pha loãng theo tỷ lệ 1:200, hoặc pha loãng như chỉ định), và kháng thể total-ERK (tERK) được pha loãng đến nồng độ 2,2 μ g/mL (pha loãng 1:200, hoặc pha loãng như chỉ định) trong Odyssey Blocking Buffer. Thêm 50 μ L vào mỗi giếng, bỏ qua một cột mà chỉ được xử lý với kháng thể thứ cấp để tiêu chuẩn hóa cho nền tảng. Các khay được phủ với giấy ướt và nắp lại để ngăn bay hơi và sau đó ủ ở 4°C qua đêm.

Sau đó, kháng thể sơ cấp được hút ra và rửa bốn lần với Tween 20 0,3% trong PBS trong mỗi 5 phút. Trong khi rửa, hỗn hợp phản ứng kháng thể thứ cấp được điều chế trong Odyssey Blocking Buffer chứa Alexa 680 của dê kháng chuột pha loãng 1:1000 (hoặc pha loãng như chỉ định) và kháng thể IRDye800 của dê kháng thỏ pha loãng 1:1000 (hoặc pha loãng như chỉ định). Khi việc rửa hoàn thành, 40 μ L của hỗn hợp phản ứng được thêm vào mỗi giếng. Các khay được phủ với nắp đen để bảo vệ kháng thể thứ cấp khỏi ánh sáng, và các khay được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc. Cuối cùng, các tế bào được rửa lại bốn giờ với Tween 20 0.3% trong PBS trong mỗi 5 phút và sau đó quét trên LI-COR Bioscience Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) trong các kênh 700 nm (đỏ) và 800 nm (xanh). Alexa 680 nhuộm màu tERK với huỳnh quang cực đỏ (chiều dài bước sóng phát ra 668 nm), trong khi IRDye800 nhuộm màu pERK với huỳnh quang xanh lá (chiều dài bước sóng phát ra 800 nm). Để loại bỏ nền huỳnh quang, các giá trị thu được từ toàn bộ cột/hàng, mà được xử lý với duy nhất kháng thể thứ cấp, được lấy trung bình và trừ đi từ các giá trị khác thu được từ khay. Để tiêu chuẩn hóa lượng pERK có mặt trong mỗi mẫu, các giá trị cho pERK trong mỗi khay được chia bởi các giá trị của tERK. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism, các kết quả của nó được tổng kết trong Bảng 2. Các biến thể dung hợp Fc-FGF21 V101, V103 và V188 là cao hơn biến thể FGF21 V76 được PEGyl hóa trong thử nghiệm ERK phosphoryl hóa.

Bảng 2: Tổng kết ERK trong kết quả thử nghiệm Western ở tế bào và sự hấp thu glucoza ở tế bào tạo mỡ 3T3L1 của chuột

ID biến thể FGF21	pERK (HEK293/ β -klotho người) EC50 $\pm$ SEM	Hấp thụ Glucoza (Các tế bào tạo mỡ 3T3L1 của chuột) EC50 $\pm$ SEM
V76	13 $\pm$ 4 nM (n=5)	5 $\pm$ 1 nM (n=3)
V101	0,60 $\pm$ 0,06 nM (n=5)	0,60 $\pm$ 0,06 nM (n=3)
V103	0,9 $\pm$ 0,3 nM (n=5)	0,60 $\pm$ 0,07 nM (n=3)
V188	0,4 $\pm$ 0,1 nM (n=3)	0,48 $\pm$ 0,14 nM (n=3)

Ví dụ 4: Các thử nghiệm *in vivo* của biến thể FGF21

Chuột *ob/ob* là mẫu chuột cho bệnh đái tháo đường typ2. Chuột thiếu leptin chức năng và được đặc trưng bởi glucoza máu cao, kháng insulin, háu ăn, gan nhiễm mỡ và bệnh béo phì. Chuột đực *ob/ob* (10-13 tuần tuổi) được sử dụng để đo hiệu quả trên glucoza trong máu của biến thể FGF21 PEGyl hóa V76 và các biến thể dung hợp Fc-FGF21 V101, V103 và V188.

Các biến thể FGF21 hoặc tá dược lỏng PBS được cho dùng s.c. ở 1 mg/kg (V101, V103 và V188) hoặc s.c ở 5 mg/kg V76 hai lần trên tuần 12 ngày (4 liều tổng thể). Trong ngày đầu tiên của nghiên cứu, glucoza trong máu ở đuôi và khối lượng cơ thể được đo và chuột được phân thành các nhóm khác nhau (n=8 mỗi nhóm) với glucoza và khối lượng cơ thể trung bình phù hợp trong các nhóm. Glucoza trong máu được đo sử dụng bộ đo gluco (OneTouch). Insulin huyết tương được đo trong ngày 1 trước khi định lượng trong ngày 12, 24 giờ sau liều lượng cuối. Các kết quả của các nghiên cứu này được tổng kết trong Bảng 5.

Các kết quả của các nghiên cứu này được tổng kết trong Bảng 3 và Các Fig. 1-3. Các biến thể Fc-FGF21 dung hợp V101, V103 và V188 là cao hơn các biến thể FGF21 PEGyl hóa V76 ở mỗi điểm đầu được đo trong nghiên cứu và thấp hơn 5 lần liều lượng.

Bảng 3. % thay đổi so với tá dược lỏng trong glucoza huyết tương, insulin, khối lượng cơ thể (BW) tăng lên, TG/lipit gan bởi biến thể FGF21 trong 12 ngày nghiên cứu trên chuột *ob/ob*.

Tổng kết 12 ngày nghiên cứu điều trị trên chuột <i>ob/ob</i> bị đái tháo đường (% thay đổi so với tá dược lỏng)					
ID biến thể FGF21	Liều (mg/kg)	Glucoza tổng số (AUC)	Insulin trong huyết tương	Thể trọng	Lipit gan
V76	5,0	-42%	-46%	-7%	-30%
V101	1,0	-53%	-82%	-12%	-44%
V103	1,0	-46%	-69%	-12%	-50%
V188	1,0	-42%	-59%	-11%	-51%

Ví dụ 5: Dược động học của biến thể dung hợp FGF21 ở chuột

Để xác định đặc điểm dược động học của biến thể dung hợp Fc-FGF21 V101, V103 và V188, chuột C57BL/6J được tiêm tĩnh mạch với sản phẩm thử nghiệm 1 mg/kg và lấy máu ở các thời điểm khác nhau đến 16 ngày (384 giờ). Thu các mẫu máu vào vi ống được phủ EDTA từ hệ mô dưới hàm hoặc phía sau ổ mắt. Thu xấp xỉ 50 μ L máu ở từng thời điểm, thu được ~25 μ L của plasma.

Để xác định nồng độ sản phẩm thử nghiệm trong huyết tương bằng ELISA, phủ khay 384- giếng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng (RT) bằng 2 μ g/mL kháng thể đa dòng dê kháng Fc γ -gama người (30 μ L/giếng) và sau đó phong tỏa bằng dịch pha loãng có chất nền là casein trong 2 giờ ở RT (100 μ L/giếng). Mẫu được pha loãng, mẫu chuẩn, và đối chứng được bổ sung vào khay (30 μ L/giếng) và được ủ trong 2 giờ ở RT. Sau khi loại bỏ mẫu, rửa các giếng ba lần bằng dịch rửa phosphat (100 μ L/giếng). Kháng thể dò, thể được gắn HRP-của kháng thể bắt giữ, được bổ sung vào khay và ủ trong 1 giờ ở RT (30 μ L/giếng). Sau khi rửa khay lại ba lần bằng dung dịch rửa phosphat (100 μ L/giếng), bổ sung cơ chất phát sáng hóa học (30 μ L/giếng) và đọc độ phát sáng trong khay trong vòng 5 phút bằng cách sử dụng máy đọc khay thích hợp. Như được thể hiện trong các Fig. 4A và 4B, biến thể dung hợp Fc-FGF21 có thời gian bán hủy trong huyết tương được tăng nhiều liên quan đến thể dung hợp Fc-FGF21 đã biết trong lĩnh vực này (Figure 4A) và liên quan đến biến thể FGF21 V76 được PEG hóa (Fig. 4B).

Lượng huyết thanh của sản phẩm thử nghiệm Fc-FGF21 được đánh giá bằng Western blot để so sánh với lượng được xác định bằng ELISA để chắc chắn rằng biến thể Fc-FGF21 có độ dài đầy đủ và không phải duy nhất Fc được phát hiện trong ELISA. Hai μ L huyết thanh chuột được kết hợp với 2,5 μ L đệm nạp 4X, 1 μ L chất làm biến tính 10X và 4 μ L dH₂O, nung nóng đến 95°C trong 5 phút và được nạp vào gel polyacrylamit gradien 4-12% và điện di trong 1 giờ 100 Vol (hiệu điện thế không đổi). Chuyển mẫu lên giấy lọc nitrocellulose phù hợp với Western blot sử dụng hệ iblot (Invitrogen, Cat. # IB1001, thời gian hoạt động là 7 phút). Phong tỏa màng lọc nitrocellulose bằng 30 mL dung dịch phong tỏa Rockland (Cat. #MB-070), dò theo quy trình hệ thống chụp ibot bằng kháng thể sơ cấp kháng FGF21 dê ở độ pha loãng 1:2000 (hệ R&D, Cat. # BAF2539) và streptavidin được đánh dấu huỳnh quang làm chất thứ cấp ở độ pha loãng 1:10000 (Licor, Cat. # 926-68031). Tạo hình ảnh lượng protein lên hệ Licor Odyssey ở 700 nm và so sánh với đối chứng V101 2 nM chạy trên

gel giống như vậy. Như được thể hiện trong Fig. 4C biến thể FGF21 Fc có độ dài hoàn chỉnh V101, V103 và V188 có khả năng phát hiện được bằng cách sử dụng trên Western Blot sử dụng kháng thể kháng FGF21 đến 15 ngày từ huyết thanh chuột từ nghiên cứu được động học.

Ví dụ 6: Các biến thể dung hợp Fc-FGF21 V101, V103 và V188 có tính ổn định nhiệt động học cao

Protein có thể không được gấp nếp ở phạm vi nhiệt độ cụ thể. Nhiệt độ để không gấp nếp protein là thông số thực chất để mô tả sự ổn định về nhiệt của protein. Phép đo nhiệt lượng quét vi sai (Differential Scanning Calorimetry - DSC) được sử dụng để phát hiện nhiệt độ không gấp nếp của protein. Nhiệt độ đặc trưng này được mô tả là nhiệt độ nóng chảy (T_m), là nhiệt độ đỉnh trong khi protein không gấp nếp.

Mẫu protein gốc được pha loãng trong PBS đến nồng độ ~1mg/ml (0,5mg/ml đến 1,2 mg/ml) với tổng thể tích là 0,5ml. Bổ sung vào mỗi giếng của khay 96 giếng DSC ước số của 0,4ml mẫu protein, chất tiêu chuẩn, PBS, và nước DI. Sau đó bọc kín khay. Phân tích mẫu trong máy đo nhiệt lượng quét vi sai của MicroCal. Quét nhiệt độ từ 10 – 110 độ C ở tốc độ 1 độ trên một phút.

Như được thể hiện trong Fig. 4 D, nhiệt độ nóng chảy của biến thể FGF21 V101, V103 và V188 rất cao. Điều này trái ngược với nhiệt độ nóng chảy thấp của biến thể FGF21 V76 và FGF21 kiểu dại (không thể hiện). Cho rằng tính ổn định của V101, V103 và V188 được cải thiện đối với việc bổ sung đặc biệt của liên kết disulfua thứ hai từ thể đột biến Q55C và G148C mới. Dạng ổn định nhiệt động học này được biến đến là để bảo vệ các protein khỏi chất phân giải protein và ngoài ra có thể dịch mã thành dạng có tính ổn định được kéo dài *in vivo* và đặc điểm được động học được cải thiện được đặc trưng bởi dữ liệu trong các Fig. 4B và 4C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein dung hợp chứa biến thể FGF21 và vùng Fc, trong đó biến thể FGF21 chứa các đột biến sau đây so với trình tự hFGF21 độ dài đầy đủ nêu trong SEQ ID NO:1: Q55C, R105K, G148C, K150R, P158S, S195A, P199G, và G202A.
2. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó protein dung hợp này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.
3. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó biến thể FGF21 được dung hợp với vùng Fc đã nêu bằng cầu nối GS.
4. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó vùng Fc là mảnh Fc được cải biến bằng đột biến LALA.
5. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó protein này chứa ít nhất một liên kết disulfua được thiết kế giữa Gln55Cys và gốc xystein ở một trong số Cys103, Cys121, Gly148Cys, Asn149Cys, Ser151Cys, Pro152Cys, His153Cys, Arg154Cys, Asp155Cys, Pro156Cys, Ala157Cys, Arg159Cys, Gly160Cys, Pro161Cys, Ala162Cys, và Arg163Cys.
6. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó protein này chứa ít nhất một liên kết disulfua được thiết kế giữa Gly148Cys và gốc xystein ở một trong số Cys103, Cys121, Arg47Cys, Tyr48Cys, Leu49Cys, Tyr50Cys, Thr51Cys, Asp52Cys, Asp53Cys, Ala54Cys, Gln55Cys, Gln56Cys, Thr57Cys, Glu58Cys, Gly160Cys, Pro161Cys, Ala162Cys, Arg163Cys, và Phe164Cys.
7. Protein dung hợp theo điểm 6, trong đó protein này còn được tăng cường bằng liên kết disulfua được thiết kế Gln55Cys-Gly148Cys.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```
<110> Boettcher, Brian
      Daniels, Doug
      Caplan, Shari
      Hamamatsu, Norio
      Weldon, Stephen
      Licht, Stuart
```

<120> PROTEIN DUNG HỢP CHỨA BIẾN THỂ FGF21

<130> PAT054783

<150> 61/539280

<151> 2011-09-26

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

[illegible]

<210> 2
 <211> 940
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 ctgtcagctg aggatccagc cgaaagagga gccaggcact caggccacct gagtctactc 60
 acctggacaa ctggaatctg gcaccaattc taaaccactc agcttctccg agctcacacc 120
 ccggagatca cctgaggacc cgagccattg atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac 180
 tcaggactgt gggtttctgt gctggctggg cttctgctgg gagcctgccg ggcacacccc 240
 atccctgact ccagtcctct cctgcaattc gggggccaag tccggcagcg gtacctctac 300
 acagatgatg cccagcagac agaagcccac ctggagatca gggaggatgg gacgggtggg 360
 ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt 420
 attcaaatct tgggagtcaa gacatccagg ttctgtgcc agcggccaga tggggccctg 480
 tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac 540
 ggatacaatg tttaccagtc cgaagcccac ggcctcccgc tgcacctgcc agggaacaag 600
 tccccacacc gggaccctgc accccgagga ccagctcgct tcctgccact accaggcctg 660
 ccccccgcac tcccggagcc acccggaatc ctggcccccc agccccccga tgtgggctcc 720
 tcggaccctc tgagcatggg gggaccttcc cagggccgaa gccccagcta cgcttctga 780
 agccagaggc tgtttactat gacatctcct ctttatttat taggttattt atcttattta 840
 tttttttatt tttcttactt gagataataa agagttccag aggagaaaaa aaaaaaaaaa 900
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 940

<210> 3
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
 Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
 Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125
 Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
 Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
 165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 4
<211> 546
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4
caccccatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcgggtac 60
ctctacacag atgatgccc gcagacagaa gccacactgg agatcagga ggatgggacg 120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180
ggagtatttc aaatcttggg agtcaagaca tccagggttc tgtgccagcg gccagatggg 240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgacct gaggcctgca gcttcggga gctgcttctt 300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacaggcc tcccgtgca cctgccaggg 360
aacaagtccc cacaccggga cctgcaccc cgaggaccag ctgcttctt gccactacca 420
ggcctgcccc ccgcaactccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540
tcctga 546

<210> 5
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala
20 25

<210> 6
<211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
ggggsggggs ggggs 15

<210> 7
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50	55	60																	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr				
65					70					75					80				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly				
				85					90					95					
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile				
			100					105					110						
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val				
		115					120						125						
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser				
	130					135					140								
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu				
145					150					155					160				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
			165					170						175					
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val				
		180						185					190						
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met				
	195						200					205							
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser				
	210				215						220								
Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln				
225					230					235					240				
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala				
			245					250						255					
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln				
		260					265						270						
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile				
	275						280					285							
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp				
	290				295						300								
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe				
305					310				315						320				
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala				
			325					330						335					
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp				
		340						345					350						
Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro				
		355					360						365						
Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp				
	370				375						380								
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg				
385					390					395					400				
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser														
				405															

<210> 8

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

1				5					10					15			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
			20					25					30				
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
		35					40					45					
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
	50					55					60						
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
65					70					75					80		
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
				85					90					95			
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
			100					105					110				
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val		
		115					120					125					
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser		
	130					135					140						
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu		
145					150					155					160		
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro		
			165					170						175			
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val		
			180					185					190				
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met		
		195					200					205					
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser		
	210				215						220						
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
225					230					235					240		
Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln		
			245					250						255			
Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu		
			260					265					270				
Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu		
		275					280					285					
Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu		
	290				295						300						
Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu		
305					310					315					320		
Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu		
			325					330					335				
Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu		
			340					345					350				
Pro	Leu	His	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Pro		
		355				360						365					
Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu		
	370					375					380						
Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser		
385					390					395					400		
Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Pro	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Pro	Ser		
			405						410					415			
Tyr	Ala	Ser															

<210> 9
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10 15
 Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Glu Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
 20 25 30
 Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala His Gln Ser Pro Glu Ser Leu
 35 40 45
 Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
 50 55 60
 Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Lys Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 85 90 95
 Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
 100 105 110
 His Leu Pro Gly Asn Arg Ser Pro His Cys Asp Pro Ala Pro Gln Gly
 115 120 125
 Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
 130 135 140
 Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
 145 150 155 160
 Pro Leu Ala Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
 165 170 175
 Ser

<210> 10
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

```

      115      120      125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130      135      140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145      150      155      160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
      165      170      175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      180      185      190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      195      200      205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      210      215      220
Pro Gly Lys Gly Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
225      230      235      240
Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Cys Gln Thr Glu Ala
      245      250      255
His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
      260      265      270
Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
      275      280      285
Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
      290      295      300
Gly Thr Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
305      310      315      320
Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
      325      330      335
His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Cys Asn Arg Ser Pro His Arg Asp
      340      345      350
Pro Ala Ser Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
      355      360      365
Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
      370      375      380
Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ala Met Val Gly Gly Ser Gln Ala Arg
385      390      395      400
Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
      405

```

<210> 11

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

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

```

65					70					75				80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn Gly
				85					90					95
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro Ile
			100					105					110	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln Val
		115					120					125		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val Ser
	130					135					140			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val Glu
145					150					155				160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro Pro
			165					170						175
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr Val
		180						185					190	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val Met
		195					200					205		
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu Ser
	210				215						220			
Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly Gln
225				230					235					240
Val	Arg	Gln	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu Ala
			245					250						255
His	Leu	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp Gln
		260					265					270		
Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val Ile
	275					280						285		
Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Lys	Pro Asp
	290				295					300				
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser Phe
305					310				315					320
Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu Ala
			325					330						335
His	Gly	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg Asp
		340					345					350		
Pro	Ala	Ser	Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu Pro
	355					360						365		
Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro Asp
	370				375				380					
Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala Arg
385				390					395					400
Ser	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser									
				405										

<210> 12
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

			20					25					30			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
		35					40					45				
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	50					55					60					
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
65					70					75					80	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
				85					90					95		
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
			100					105					110			
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
		115					120					125				
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
	130					135					140					
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
145					150					155					160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
			165						170					175		
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			180					185					190			
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
		195					200					205				
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	210				215						220					
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln	
				245					250					255		
Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu	
			260					265					270			
Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	
		275					280					285				
Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu	
	290				295						300					
Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	
305					310					315					320	
Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu	
				325					330					335		
Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu	
			340					345					350			
Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser	
		355					360					365				

$\langle 210 \rangle$ 13

<211> 419
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25					30		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		35					40					45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	50					55					60				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				85					90					95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
	130					135						140			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145					150					155					160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
			165						170					175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			180					185					190		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Arg	Gln
			245						250					255	
Arg	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Asp	Asp	Ala	Cys	Gln	Thr	Glu	Ala	His	Leu	Glu
			260				265						270		
Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu
		275					280					285			
Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Gln	Ile	Leu
	290					295					300				
Gly	Val	Lys	Thr	Ser	Arg	Phe	Leu	Cys	Gln	Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Leu
305					310					315					320
Tyr	Gly	Ser	Leu	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Cys	Ser	Phe	Arg	Glu	Leu
				325					330					335	
Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gln	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Leu
			340					345					350		
Pro	Leu	His	Leu	Pro	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser
		355					360					365			
Arg	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu
	370					375					380				
Pro	Glu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Asp	Val	Gly	Ser

385					390					395					400
Ser	Asp	Pro	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser
				405					410					415	
Tyr	Ala	Ser													

Glucoza huyết tương lúc no

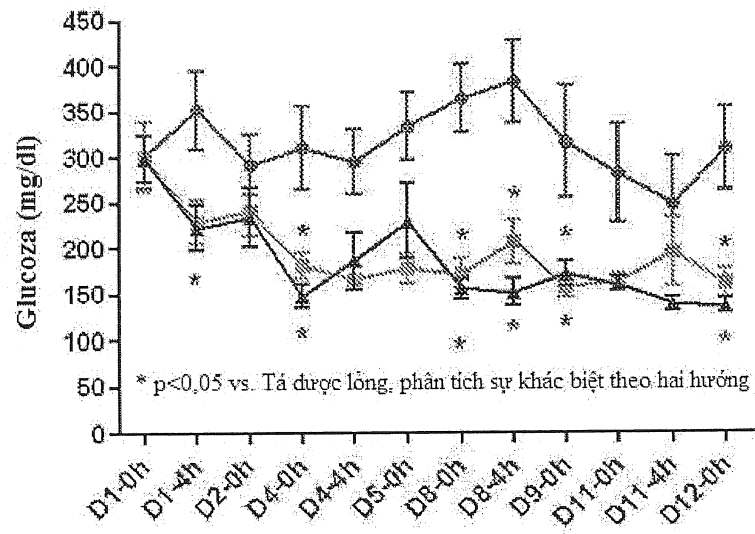


FIG 1A

Insulin huyết tương lúc no

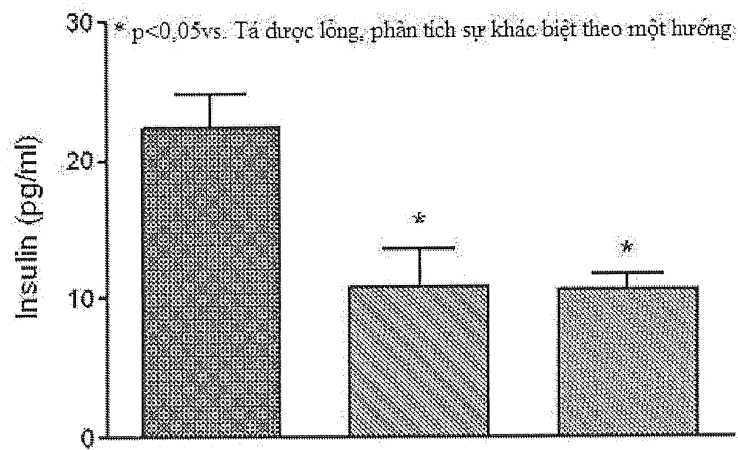


FIG 1B

Trọng lượng cơ thể

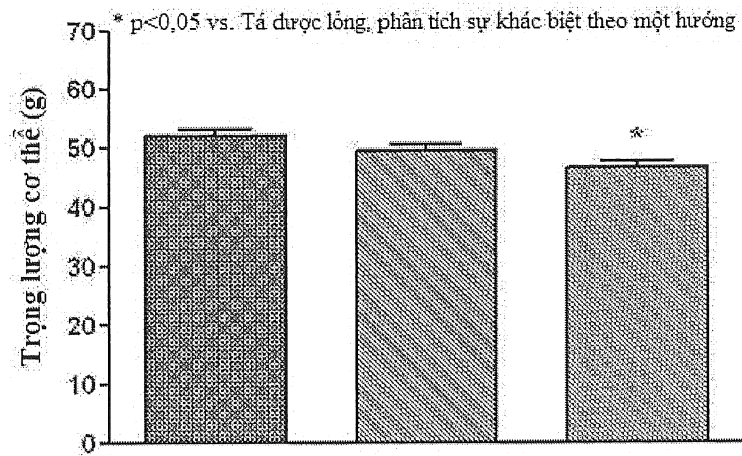


FIG 1C

Hàm lượng lipid trong gan

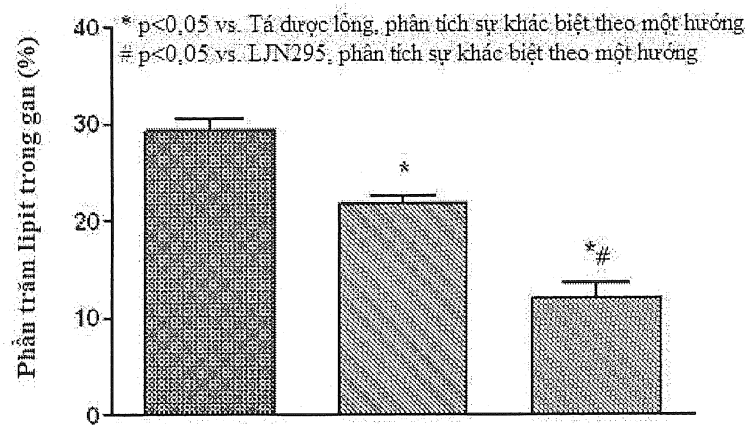


FIG 1D

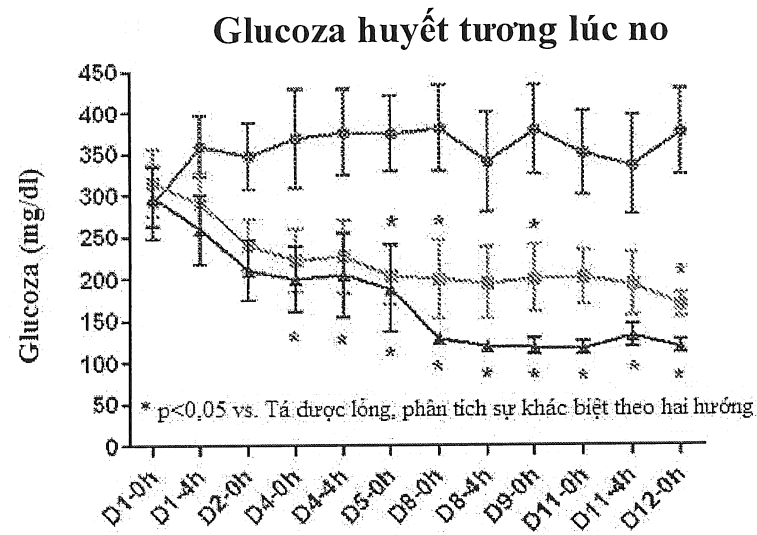


FIG 2A

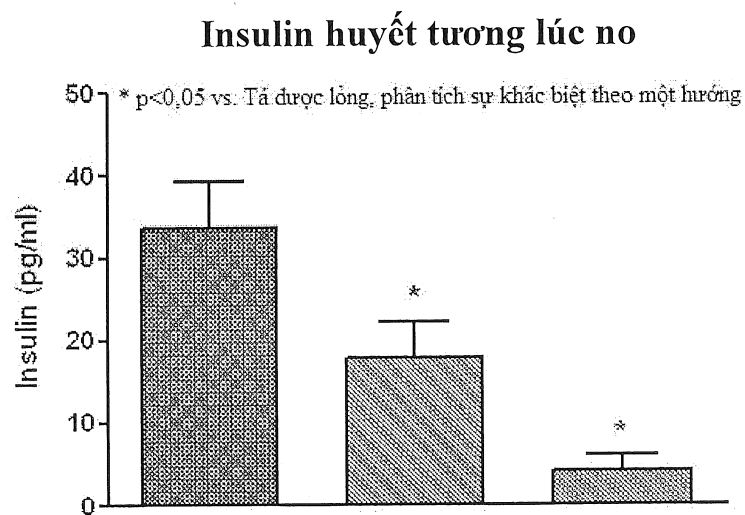


FIG 2B

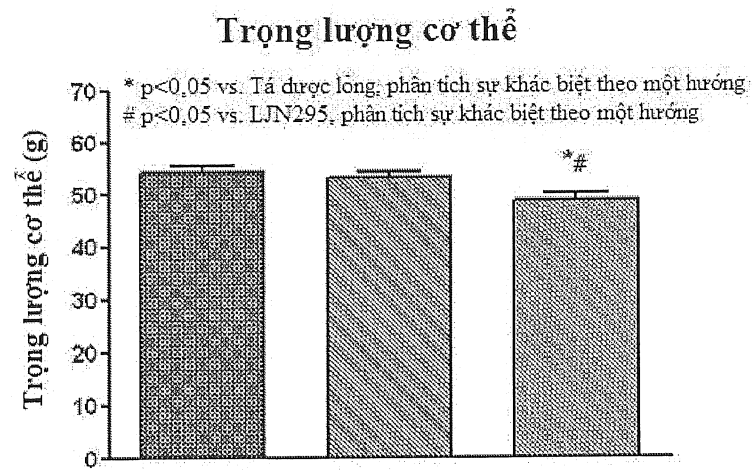


FIG 2C

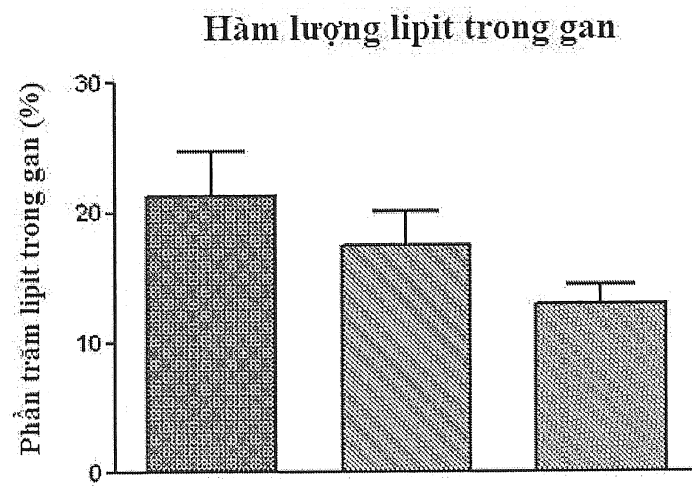


FIG 2D

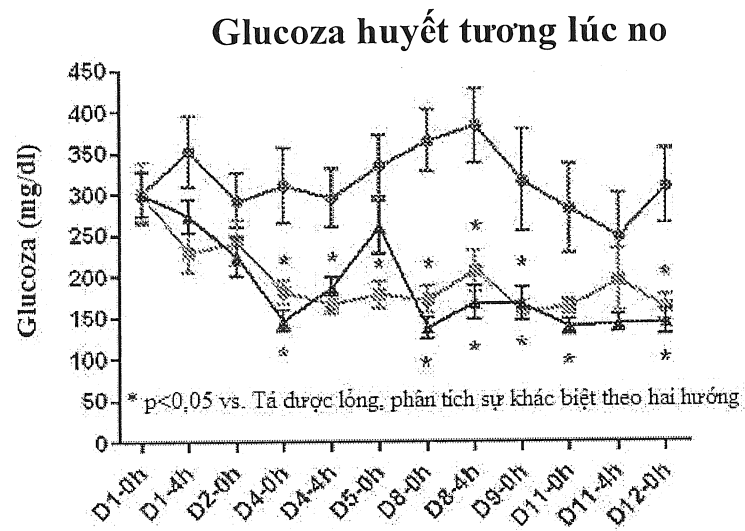


FIG 3A

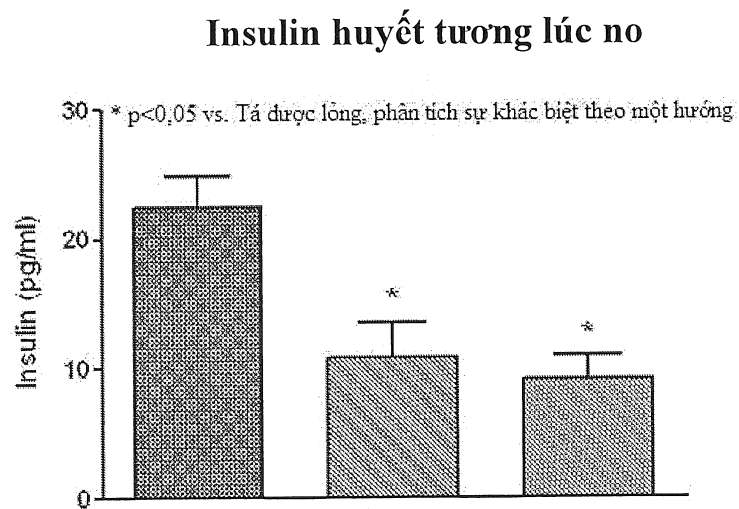


FIG 3B

Trọng lượng cơ thể

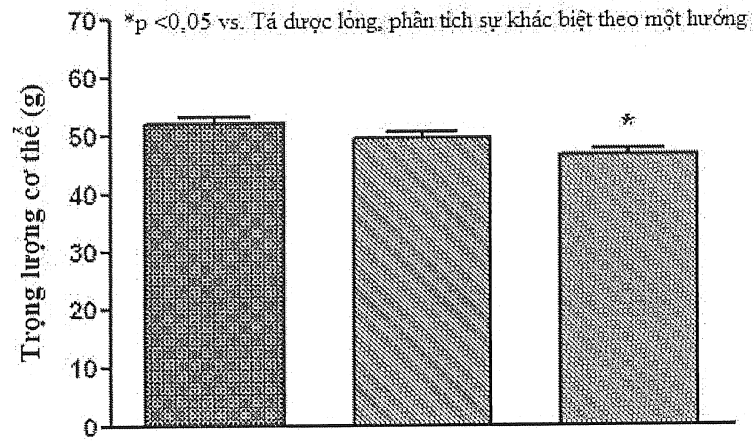


FIG 3C

Hàm lượng lipid trong gan

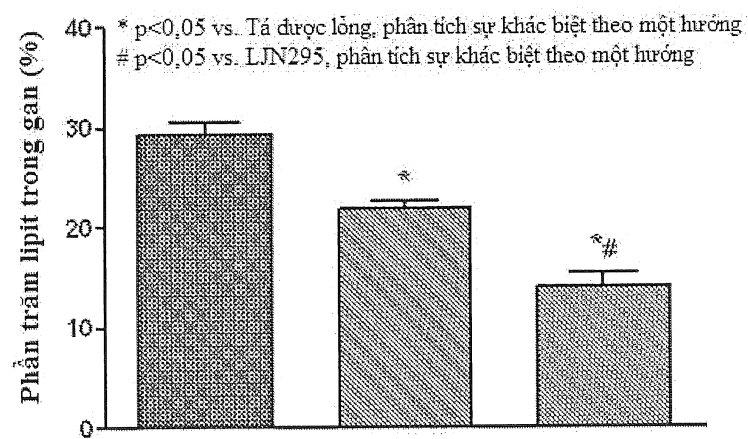


FIG 3D

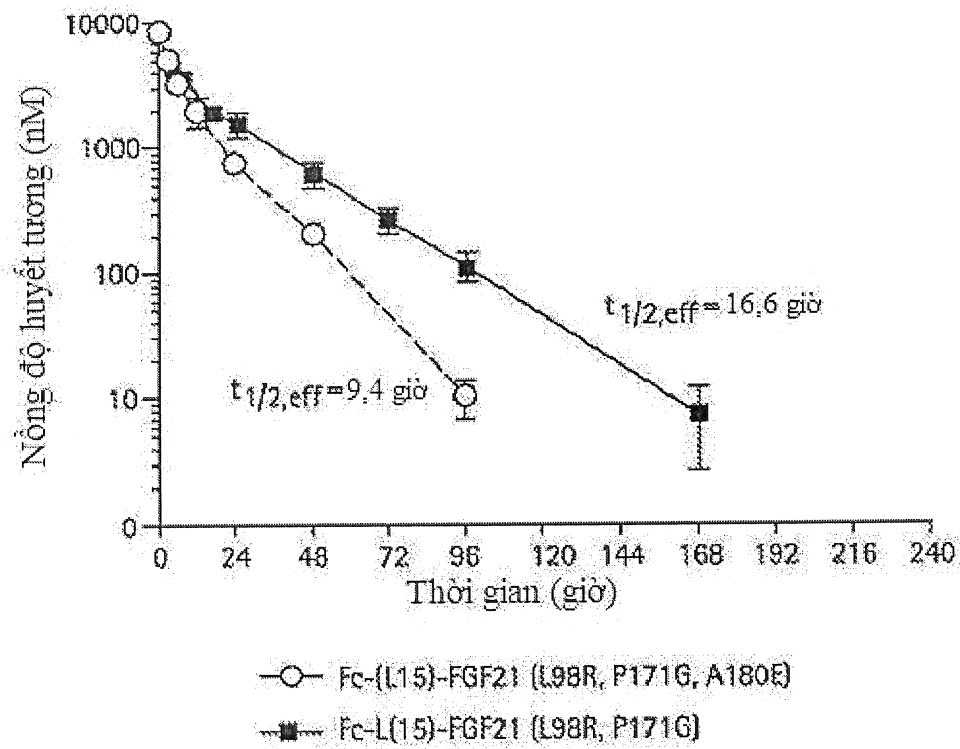
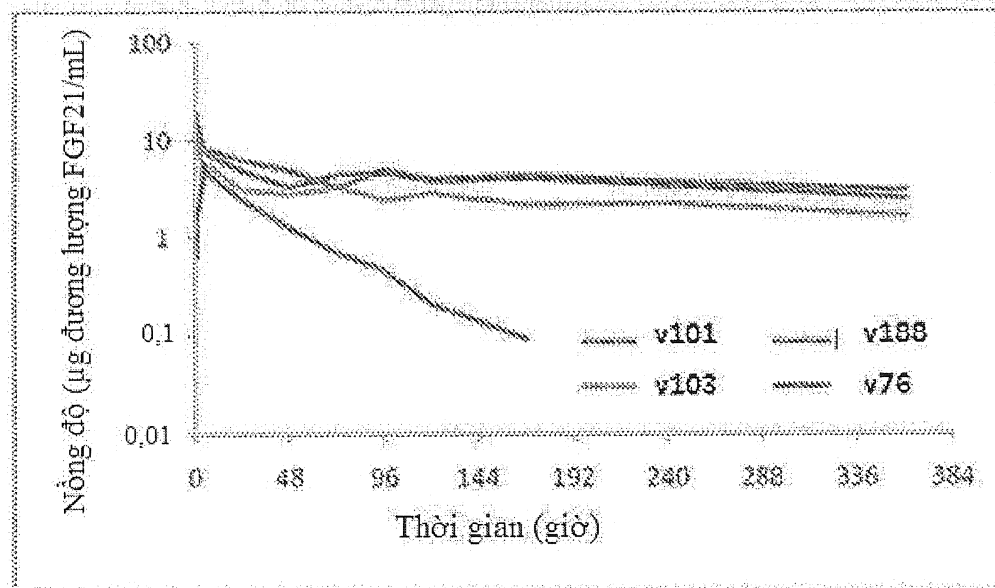


FIG 4A

PK IV chuột liều duy nhất 1mg/kg**FIG 4B**

Động vật 3
120 giờ I.V. Động vật 3
15 ngày I.V. Động vật 6
15 ngày I.V.

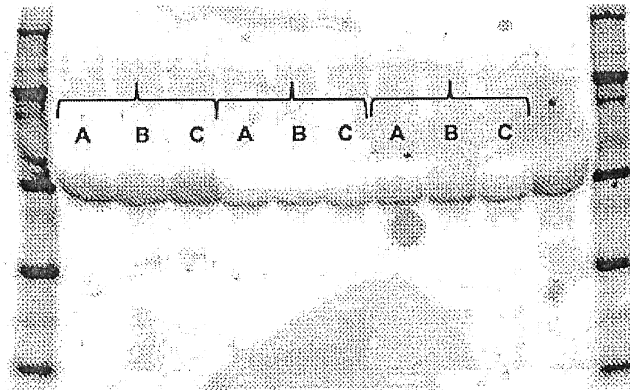


FIG 4C

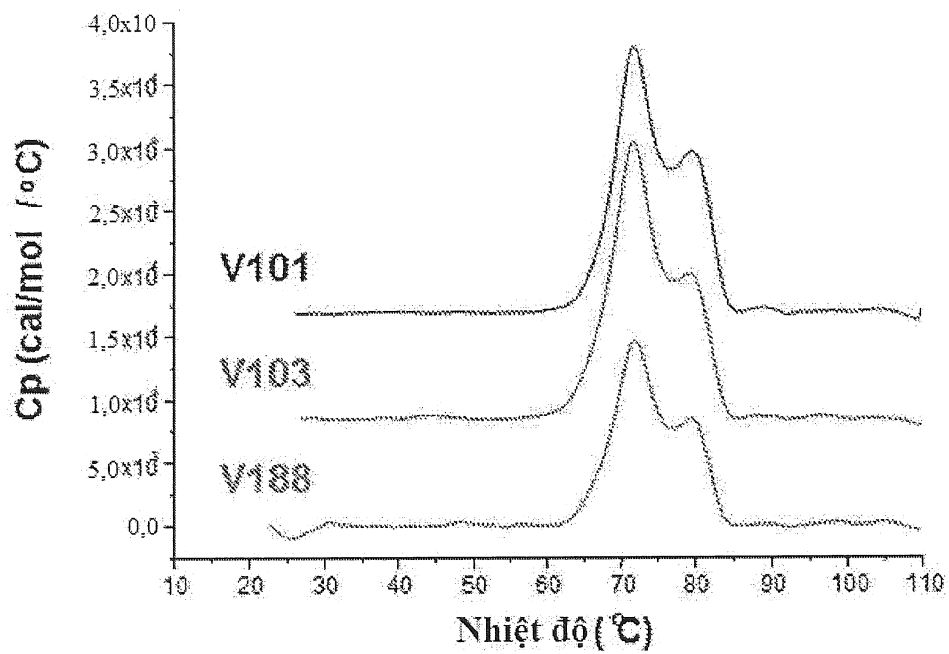


FIG4D