



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110997726 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 29

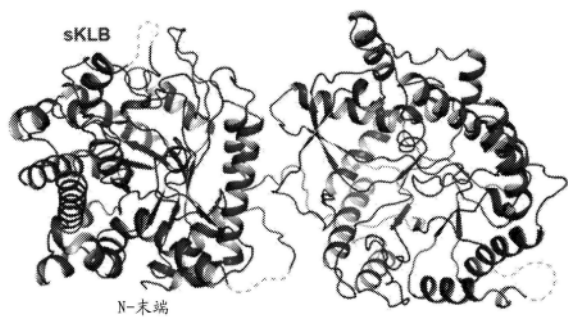
(21) 申请号 201880054775.3	(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
(22) 申请日 2018.07.05	专利代理师 董志勇
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110997726 A	(51) Int.Cl.
(43) 申请公布日 2020.04.10	G07K 16/28 (2006.01)
(30) 优先权数据 62/529,215 2017.07.06 US	G01N 33/50 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.02.24	G01N 33/574 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2018/040932 2018.07.05	G01N 33/68 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/010314 EN 2019.01.10	G01N 33/74 (2006.01)
(73) 专利权人 耶鲁大学 地址 美国康涅狄格州	A61K 39/395 (2006.01)
(72) 发明人 J·施莱辛格 S·李	A61K 45/06 (2006.01)
	A61P 3/04 (2006.01)
	(56) 对比文件
	US 2010158914 A1, 2010.06.24
	US 2011135657 A1, 2011.06.09
	审查员 陈皓
	权利要求书2页 说明书34页
	序列表6页 附图21页

(54) 发明名称

治疗或预防内分泌FGF-关联疾病的组合物和方法

(57) 摘要

本发明在一个方面中涉及以下发现： β -Klotho是FGF21的主要细胞表面受体，其中FGFR1c起到最终介导细胞内信号传导的催化亚基的作用。在一个方面中，本发明提供了可用于治疗或预防内分泌FGF相关的疾病或障碍的组合物和方法。



1. 一种非天然可溶性构建体,其阻止或最小化FGF21与 β Klotho的结合,其中所述构建体包含包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基169-209 (FGF21_{CT}) 的FGF21多肽,其中所述构建体在SEQ ID NO:3的氨基酸序列中具有突变L194F和R203W。
2. 根据权利要求1所述的构建体,其中所述FGF21多肽缺少SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-168。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的构建体,其中所述 β -Klotho在哺乳动物的细胞表面上。
4. 根据权利要求1-2中任一项所述的构建体,其识别SEQ ID NO:1所示的 β -Klotho中的氨基酸残基379-942内的一个或多个氨基酸,和/或与其结合。
5. 根据权利要求1-2中任一项所述的构建体,其能够与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho结合并将其隔离。
6. 根据权利要求1-2中任一项所述的构建体,其与稳定性增强结构域融合。
7. 根据权利要求6所述的构建体,其中所述稳定性增强结构域包括选自白蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶和抗体的Fc区的至少一种。
8. 根据权利要求6所述的构建体,其中所述多肽和所述稳定性增强结构域通过包括约1-18个氨基酸的多肽进行关联。
9. 根据权利要求1所述的构建体,其与野生型FGF21相比更紧密地与 β -Klotho结合。
10. 根据权利要求9所述的构建体,其与稳定性增强结构域融合。
11. 根据权利要求10所述的构建体,其中所述稳定性增强结构域包括选自白蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶和抗体的Fc区的至少一种。
12. 根据权利要求10所述的构建体,其中所述多肽和所述稳定性增强结构域通过包括约1-18个氨基酸的多肽进行关联。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的构建体在制备用于治疗有需要的哺乳动物中的内分泌FGF-相关疾病或障碍的药物中的用途。
14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述构建体阻止或最小化FGF21与所述哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho的结合。
15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述疾病或障碍包括选自肝癌和结肠癌的至少一种。
16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述构建体与野生型FGF21相比更紧密地与所述哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho结合。
17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述疾病或障碍包括选自肥胖、糖尿病、胰腺炎、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 和非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 中的至少一种。
18. 根据权利要求13所述的用途,其中所述哺乳动物是人。
19. 根据权利要求13所述的用途,其中所述构建体通过选自以下中至少一种途径施用:吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、颅内、局部、经皮、肺、鼻内、口腔、眼内、鞘内和静脉内。
20. 根据权利要求13所述的用途,其中所述哺乳动物进一步被施用治疗或预防所述疾病和/或障碍的至少一种另外的药物。
21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述构建体和所述至少一种另外的药物共同施用。

22. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述构建体和所述至少一种另外的药物共同配制。

治疗或预防内分泌FGF-关联疾病的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请按照35 U.S.C. §119 (e) 要求于2017年7月6日提交的美国临时申请号62/529,215的优先权,其出于所有目的通过引用以其全部并用本文。

背景技术

[0003] 成纤维细胞生长因子 (FGF) 启动的细胞信号传导控制成年动物中正常胚胎发育和体内稳态期间的重要生理过程。因此,多种疾病是由FGF依赖性细胞信号传导途径的遗传破坏或异常调节引起的。FGF家族的22个成员通过与为受体酪氨酸激酶 (RTK) 的家族的成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 的四个成员的胞外结构域结合而刺激其细胞反应。

[0004] 规范的FGF通过旁分泌或自分泌机制激活FGFR,在此过程中需要FGF配体与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG) 一起发挥作用,其中硫酸乙酰肝素蛋白聚糖是FGF的关键共受体。对HSPG的这一需要将FGFR与大多数其他RTK区别开来,后者通常由与关联受体 (cognate receptor) 的胞外结构域结合的特异性生长因子直接激活。与其他RTK一样,受体二聚化对于FGFR激活至关重要。但是,与其他生长因子 (诸如,EGF和PDGF) 相反,规范FGF仅在与HSPG结合时才能刺激FGFR二聚化。FGFR二聚化导致受体胞质结构域中特定酪氨酸残基的激酶激活和反式磷酸化。这又或者通过信号传导分子与激活的FGFR的直接缔合或者通过紧密相关的停靠蛋白 (诸如,FRS2和Gab1) ——其专用于招募信号传导蛋白的独特补体——介导的间接相互作用,来触发多种信号传导路径的刺激。

[0005] FGF19、FGF21和FGF23通过展现出循环激素的特征而从规范的FGF中脱颖而出,并因此被称为内分泌FGF。FGF19和FGF21既发挥与位于肝脏、脂肪组织和下丘脑中的受体特异性结合的激素的功能,又调节诸如胆汁酸合成和脂肪生成的代谢功能,还刺激胰岛素敏感性、能量消耗和体重减轻。FGF23的靶器官是肾脏和甲状旁腺——FGF23结合分别刺激尿磷酸盐排泄并降低甲状旁腺激素水平。不同于需要HSPG激活FGFR的规范FGF,内分泌FGF没有此需要,而是特异性依赖于Klotho共受体,用于FGFR激活。

[0006] 存在两种由不同的基因编码的Klotho。 α -Klotho是FGF23依赖性信号传导所需的,而 β -Klotho是特定组织和器官中FGF19-或FGF21-依赖性信号传导所必需的。尽管整个身体表达不同的FGFR,但Klotho蛋白的表达限于特定的组织—— α -Klotho表达约束于肾脏和甲状旁腺,而 β -Klotho表达限于脂肪组织、肝脏、胰腺和下丘脑。两种Klotho蛋白都是膜受体,其由N末端胞外区和单跨膜跨越区 (transmembrane spanning region) 然后短的胞质区组成。每个Klotho胞外区都包含串联结构域,这些结构域与酶的糖苷水解酶家族共享序列相似性。氨基酸序列比对指示,每个Klotho的糖苷水解酶样结构域 (GH结构域) 的两个催化氨基酸残基之一在其进化中在一些点处被取代,这指示Klotho的GH结构域缺乏酶促活性并可定义为假酶。然而,一些报道已经表明 α -Klotho具有一些可检测的酶活性。

[0007] 本领域需要鉴定可用于调节 (如,抑制或刺激) FGF受体的活性和被内分泌FGF激活的信号传导途径的组合物和方法。在某些实施方式中,这些组合物和方法可用于治疗、改善和/或预防与内分泌FGF相关的疾病 (诸如但不限于,代谢疾病和/或癌症)。本发明满足了这

些需求。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种非天然可溶性构建体,其阻止或最小化选自FGF受体(FGFR)、FGF19和FGF21的至少一种与 β -Klotho的结合。

[0009] 在某些实施方式中, β -Klotho在哺乳动物的细胞的表面上。

[0010] 在某些实施方式中,构建体至少选自抗体、纳米体、重组蛋白和小分子。在其他实施方式中,构建体是选自抗体和重组肽的至少一种。在又其他实施方式中,抗体是选自多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人抗体、抗体的生物活性片段、以及其任意组合的至少一种。

[0011] 在某些实施方式中,构建体识别与 β -Klotho结合的FGF19或FGF21的至少一个氨基酸残基并与其结合,由此阻止FGF19或FGF21与 β -Klotho结合。

[0012] 在某些实施方式中,构建体识别FGF21 (SEQ ID NO:3) 中氨基酸残基169-209内的至少一个氨基酸并与其结合。

[0013] 在某些实施方式中,构建体识别SEQ ID NO:3中氨基酸残基186-209内的至少一个氨基酸并与其结合。

[0014] 在某些实施方式中,构建体识别FGF19_{CT} (SEQ ID NO:2) 中氨基酸残基170-216内的至少一个氨基酸并与其结合。

[0015] 在某些实施方式中,构建体识别与FGF19或FGF21结合的 β -Klotho的至少一个氨基酸残基,和/或与其结合,由此阻止 β -Klotho与FGF19或FGF21的结合。

[0016] 在某些实施方式中,构建体识别 β -Klotho (SEQ ID NO:1) 中氨基酸残基379-942内的一个或多个氨基酸,和/或与其结合。

[0017] 在某些实施方式中,构建体识别SEQ ID NO:1中氨基酸379-380、392-394、419-422、431、434-435、438、532、643-647、692-694、696-697、743、745、764、768、824、826、829、832、845、847-851、853、862、889、931-932、939-940和942内的一个或多个氨基酸,和/或与其结合。

[0018] 在某些实施方式中,构建体识别与FGFR结合的 β -Klotho的至少一种氨基酸残基并与其结合,由此阻止 β -Klotho与FGFR结合。

[0019] 在某些实施方式中,构建体识别人 β -Klotho的胞外区 (SEQ ID NO:1的氨基酸残基53-983) 或其片段内的一个或多个氨基酸,和/或与其结合。

[0020] 在某些实施方式中,构建体识别包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基533-575的人 β -Klotho的胞外区的片段内的一个或多个氨基酸,和/或与其结合。

[0021] 在某些实施方式中,构建体包括选自能够与哺乳动物的细胞的表面上 β -Klotho结合并隔离(sequester) 其的FGF19多肽和FGF21多肽的至少一种。在其他实施方式中,构建体包括SEQ ID NO:3 (FGF21_{CT}) 的氨基酸残基169-209。在又其他实施方式中,构建体包括SEQ ID NO:2 (FGF19_{CT}) 的氨基酸残基170-216。

[0022] 在某些实施方式中,构建体包括能够与选自FGF19和FGF21的至少一种结合并隔离其的 β -Klotho多肽。在其他实施方式中, β -Klotho多肽包括人 β -Klotho的胞外区 (SEQ ID NO:1的氨基酸53-983) 或其片段。在又其他实施方式中,Klotho多肽包括包含SEQ ID NO:1

的氨基酸379-942的人 β -Klotho的胞外区的片段。

[0023] 在某些实施方式中,构建体包括能够与FGFR结合的 β -Klotho多肽。在其他实施方式中,构建体包括人 β -Klotho的胞外区(SEQ ID NO:1的氨基酸残基53-983)或其片段。在又其他实施方式中,构建体包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基533-575。

[0024] 本发明进一步提供了可溶性构建体,其包括选自FGF19多肽和FGF21多肽的至少一种,其中与选自野生型FGF19和野生型FGF21的至少一种相比,选自FGF19多肽和FGF21多肽的至少一种更紧密地与 β -Klotho结合。

[0025] 在某些实施方式中,选自FGF19多肽和FGF21多肽的至少一种在其C-末端结构域中具有至少一个突变。在其他实施方式中,FGF21多肽在选自V188、R203和L194的至少一个残基中具有突变。在又其他实施方式中,FGF21多肽具有选自R203W和L194F的至少一个突变。在又其他实施方式中,

[0026] 本发明进一步提供了如此构建体,其同时与FGF21_{CT}- β -Klotho复合体中的FGF21_{CT}上的暴露的表位和 β -Klotho上暴露的表位结合,由此稳定FGF21_{CT}- β -Klotho复合体。

[0027] 在某些实施方式中,构建体是选自抗体、纳米体、重组蛋白和小分子的至少一种。在其他实施方式中,构建体是选自抗体和重组肽的至少一种。在又其他实施方式中,抗体选自多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人抗体、抗体的生物活性片段、以及其任意组合。

[0028] 构建体包括融合至选自FGF19多肽和FGF21多肽的至少一种的 β -Klotho结合剂(binder),其中构建体具有选自FGF19刺激活性和FGF 21刺激活性的至少一种。

[0029] 在某些实施方式中,本发明的构建体融合至稳定性增强结构域。在其他实施方式中,稳定性增强结构域包括选自白蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶和抗体的Fc区的至少一种。在又其他实施方式中,多肽和稳定性增强结构域通过包括约1-18个氨基酸的多肽进行关联。

[0030] 本发明进一步提供了治疗和/或预防有需要的哺乳动物中的内分泌FGF-相关疾病或障碍的方法。

[0031] 在某些实施方式中,方法包括向哺乳动物施用治疗有效量的构建体,该构建体调制选自FGF19和FGF21的至少一种与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho的相互作用。在其他实施方式中,构建体阻止或最小化选自FGF19和FGF21的至少一种与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho的结合。在其他实施方式中,疾病或障碍包括选自肝癌和结肠癌的至少一种。在又其他实施方式中,与选自野生型FGF19和野生型FGF21的至少一种相比,构建体与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho更紧密地结合。在又其他实施方式中,疾病或障碍包括选自肥胖、糖尿病、胰腺炎、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)和非酒精性脂肪肝炎(NASH)中的至少一种。

[0032] 在某些实施方式中,哺乳动物是人。在其他实施方式中,构建体通过选自以下中至少一种途径施用:吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、颅内、局部、经皮、肺、鼻内、口腔、眼内、鞘内和静脉内。在又其他实施方式中,哺乳动物进一步被施用至少一种治疗或预防疾病和/或障碍的另外的药物。在又其他实施方式中,共同施用构建体和至少一种另外的药物。在又其他实施方式中,共同配制构建体和至少一种另外的药物。

附图说明

[0033] 为了说明本发明,在附图中描绘了本发明的某些实施方式。然而,本发明不限于附图中描绘的实施方式的精确布置和手段。

[0034] 图1A-1B图解了 β -Klotho (sKLB)的胞外结构域的示例性晶体结构,其显示为带状表示(图1A)和表面表示(图1B)。用灰色虚线绘制未显示出显著电子密度的区域

[0035] 图2A-2E图解了sKLB与人胞质 β -葡萄糖苷酶的示例性结构比较。人胞质 β -葡萄糖苷酶(红色,PDB:2Z0X)的结构与sKLB(蓝色)的D1(图2A)和D2(图2B)重叠,其中总 α -碳均方根偏差(RMSD)分别为1.08Å和1.39Å。sKLB中与 β -葡萄糖苷酶不同的区以绿色着色,而 β -葡萄糖苷酶中与sKLB不同的区以灰色着色。与 β -葡萄糖苷酶结合的葡萄糖分子以黄色表示为球棒表示。D1(图2C)和D2(图2D)的叠加显示“催化”谷氨酸的位置。来自每个sKLB结构域的两种催化谷氨酸之一被天冬酰胺(对于D1)或丙氨酸(对于D2)替代。图2E:KLB的图突出显示了sKLB的D1和D2中与催化谷氨酸对应的残基位置。

[0036] 图3A-3E图解了与FGF21_{CT}结合的sKLB的示例性晶体结构,以及sKLB和FGF21_{CT}之间的相互作用。sKLB(绿色)与FGF21_{CT}(橙红色)复合的结构显示为带状和球棒表示(图3A)和表面表示(图3B)。未显示显著电子密度的区显示为灰色虚线。图3C:指示了位点1和位点2区域中sKLB(绿色)和FGF21_{CT}(橙红色)之间相互作用的残基。图3D-3E:位点1(图3D)和位点2(图3E)中sKLB和FGF21_{CT}之间的氨基酸特异性相互作用的图。

[0037] 图4A-4C图解了 β -Klotho上的两个示例性的不同的FGF21结合位点。图4A:sKLB(绿色)的表面表示,突出了FGF21_{CT}的两个结合位点:位点1和位点2(橙红色、球棒)。图4B:位点1通过三个连续的转角(橙色、黄色和浅蓝色)形成一系列内部氢键(黑色虚线),从而产生与sKLB的D1结合的结构元件。图4C:位点2与sKLB的D2的假底物结合区相互作用。

[0038] 图5A-5E图解了 β -葡萄糖苷酶到 β -Klotho的示例性进化。(图5A)水稻 β -葡萄糖苷酶(浅蓝色,表面表示)与纤维戊糖(橙色,棒状表示)(PDB:3F5K)复合的结构和(图5B)sKLB的位点2(浅绿色,表面表示)与FGF21_{CT}(红色,棒状表示)复合的结构。纤维戊糖与 β -葡萄糖苷酶的活性位点结合,而FGF21_{CT}与 β -Klotho的相应假底物结合位点结合。图5C:结合纤维戊糖的水稻 β -葡萄糖苷酶和结合FGF21_{CT}的sKLB的结构重叠。图5D: β -Klotho的E693(单“催化”谷氨酸)通过与丝氨酸的羟基部分的相互作用而与FGF21的S-P-S基序接触,模拟在 β -葡萄糖苷酶的催化位点中它们与谷氨酸相互作用时的糖羟基。图5E:比较底物结合口袋(包括糖苷水解酶活性所需的两种谷氨酸)与 β -Klotho的配体结合口袋(描绘E693与S-P-S基序之间的相互作用)的示意图。

[0039] 图6A-6G图解了通过配体结合和细胞刺激实验对与 β -Klotho的FGF21结合界面的示例性验证。(图6A)FGF21和sKLB以及(图6B)FGFR1_{CD2D3}和sKLB的基于MST的结合亲和力测量,分别产生 $K_D=43.5\pm5.0\text{nM}$ 和 $K_D=940\pm176\text{nM}$ 。与GST-FGF21_{CT}的基于MST的竞争分析,其包含(图6C)位点1相互作用区或(图6D)位点2相互作用区中的突变。WT的 IC_{50} 值, $704\pm96\text{nM}$;D192A, $15900\pm6210\text{nM}$;P193A, $7160\pm2350\text{nM}$;S204A, $5990\pm1040\text{nM}$;S206A, $5560\pm1590.1\text{nM}$;Y207A, $6630\pm1570\text{nM}$ 。每个点的误差线代表 ΔF_{norm} 的方差($n=3$)。图6E:在面板F和G中分析的FGF21(橙红色)占据的sKLB(绿色)中突变的氨基酸残基(黄色)的位置。图6F-6G:用FGF1或FGF21刺激共表达FGFR1c连同WT或 β -Klotho突变体的稳定转染的L6细胞,并通过监测FGFR1c的酪氨酸磷酸化来分析FGFR1c的激活。用抗FGFR1抗体对配体刺激或未刺激

的细胞的裂解液进行免疫沉淀,然后用抗pTyr或抗FGFR1抗体进行免疫印迹。

[0040] 图7A-7B图解了FGF21的优异类似物的基于示例性结构的工程化。FGF21突变体的增强的结合亲和力(图7A)和生物活性(图7B)。携带FGF21_{CT}中的双L194F/R203W突变的FGF21的MST结合测量显示与sKLB的结合亲和力增加了约10倍,KD为 3.4 ± 1.3 nM,以及刺激FGFR1c酪氨酸磷酸化的效力提高了约10倍。

[0041] 图8图解了通过涉及 β -Klotho和FGF受体的复合体介导的内分泌FGF激活和信号传导的示例性机制。在未刺激的细胞的细胞膜中, β -Klotho和FGFR1c单体与FGFR/ β -Klotho异二聚体平衡。由于尺寸减小,FGF21通过FGF21 C-尾与 β -Klotho的结合和FGF21的FGF核心与两个FGFR1c分子的二价结合将使平衡朝向形成FGF21/FGFR1c/ β -Klotho三元复合体移动,导致刺激酪氨酸激酶活性和通过FGFR1c的细胞信号传导。此外, β -Klotho充当FGF21的主要高亲和力受体,而FGFR1c起到介导受体二聚化和细胞内信号传导的催化亚基的作用。

具体实施方式

[0042] 在一个方面中,本申请涉及如下发现: β -Klotho为FGF21的主要细胞表面受体,其中FGFR1c起到最终介导细胞内信号传导的催化亚基的作用。在一个方面中,本发明提供了可用于治疗和预防内分泌FGF-相关疾病或障碍的组合物和方法。

[0043] FGF19和FGF21是循环激素,其调节多种组织中的代谢过程。它们以需要Klothos的方式通过FGFR传导信号,Klotho是具有串联糖苷水解酶(GH)结构域的细胞表面蛋白。本发明提供了单独的以及和FGF21的Klotho结合区复合的 β -Klotho(sKLB)的胞外结构域的晶体结构。结构分析以及生化和细胞实验共同揭示了分子相互作用的细节,这些分子相互作用决定了FGF21和其他内分泌FGF对 β -Klotho的特异性,并且还证明了FGFR如何以Klotho依赖性方式被激活。在晶体结构中可见的FGF结合模式进一步揭示了FGF21的富含丝氨酸的C末端尾部如何呈递羟基以模拟结合在Klotho糖苷水解酶结构域的残留活性位点中的碳水化合物。Klotho对FGF21识别的这种预料不到的方式,以及对Klotho如何促进FGFR激活的机制的深入了解,为开发用于与内分泌FGF及其信号传导途径有关的代谢和其他疾病的新疗法提供了合理的路线图。

[0044] 定义

[0045] 如本文所使用,以下每个术语在本节中具有与其相关的含义。

[0046] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语通常具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。通常,本文所用的命名法以及细胞培养、分子遗传学、晶体学和化学中的实验室程序是本领域众所周知的和常用的。

[0047] 如本文所使用,冠词“一个”和“一种”是指该冠词的语法对象中的一个或多于一个(即,至少一个)。举例来说,“一个元件”是指一个元件或多于一个元件。

[0048] 如本文所使用,术语“约”将被本领域普通技术人员理解,并且将在使用它的上下文有所变化。如本文中所使用的,当指代诸如量、持续时间等的可测量值时,术语“约”旨在涵盖偏离规定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化适合执行所公开的方法。

[0049] 如本文所使用,术语“ β -Klotho”指的是SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白:

	10	20	30	40	50
	MKPGCAAGSP	GNEWIFFSTD	EITTRYRNTM	SNGGLQRSVI	LSALILLRAV
	60	70	80	90	100
	TGFSGDGRAI	WSKNPNFTPV	NESQLFLYDT	FPKNFFWGIG	TGALQVEGSW
	110	120	130	140	150
	KKDGKGPSIW	DHFIHTHLKN	VSSTNGSSDS	YIFLEKDLSA	LDFIGVSFYQ
	160	170	180	190	200
	FSISWPRLFP	DGIVTVANAK	GLQYYSTLLD	ALVLRNIEPI	VTLYHWDLPL
[0050]	210	220	230	240	250
	ALQEKYGGWK	NDTIIDIFND	YATYCFQMFG	DRVKYWITIH	NPYLVAWHGY
	260	270	280	290	300
	GTGMHAPGEK	GNLAAVYTVG	HNLIKAHSKV	WHNYNTHFRP	HQKGWLSITL
	310	320	330	340	350
	GSHWIEPNRS	ENTMDIFKCQ	QSMVSVLGWF	ANPIHGDGDY	PEGMRKKLFS
	360	370	380	390	400
	VLPIFSEAEK	HEMRGTADFF	AFSFGPNNFK	PLNTMAKMGQ	NVSLNLREAL
	410	420	430	440	450
	NWIKLEYNNP	RILIAENGWF	TDSRVKTEDT	TAIYMMKNFL	SQVLQAIRLD
	460	470	480	490	500
	EIRVFGYTAW	SLLDGFQWQD	AYTIRRGIFY	VDFNSKQKER	KPKSSAHYYK
	510	520	530	540	550
	QIIRENGFSL	KESTPDVQGG	FPCDFSWGVT	ESVLKPESVA	SSPQFSDPHL
	560	570	580	590	600
	YVWNATGNRL	LHRVEGVRLK	TRPAQCTDFV	NIKKQLEMLA	RMKVTHYRFA
	610	620	630	640	650
	LDWASVLPTG	NLSAVNRQAL	RYYRCVVSEG	LKLGISAMVT	LYYPHTAHLG
	660	670	680	690	700
	LPEPLLHADG	WLNPTAEAF	QAYAGLCFQE	LGDLVKLWIT	INEPNRLSDI
	710	720	730	740	750
[0051]	YNRSGNDTYG	AAHNLLVAHA	LAWRLYDRQF	RPSQRGAVSL	SLHADWAEPA
	760	770	780	790	800
	NPYADSHWRA	AERFLQFEIA	WFAEPLFKTG	DYPAAMREYI	ASKHRRGLSS
	810	820	830	840	850
	SALPRLTEAE	RRLLKGTVD	CALNHFTTRF	VMHEQLAGSR	YDSDRDIQFL
	860	870	880	890	900
	QDITRLSSPT	RLAVIPWGV	KLLRWVRRNY	GDMDIYITAS	GIDDQALED
	910	920	930	940	950
	RLRKYYLGKY	LQEVLKAYLI	DKVRIKGYA	FKLAEKSKP	RFGFFTSDFK
	960	970	980	990	1000
	AKSSIQFYNK	VISSRGFPFE	NSSSRCSQTQ	ENTECTVCLF	LVQKKPLIFL
	1010	1020	1030	1040	
	GCCFFSTLV	LLSIAIFQRQ	KRRKFWKAKN	LQHIPLKKGK	RVVS

[0052] 如本文所使用, β -Klotho (sKLB) 的胞外结构域对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基53-983。

[0053] 如本文所使用,术语“抗体”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,也可以是完整免疫球蛋白的免疫反应部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂,以及单链抗体和人源化抗体(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426)。

[0054] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分,并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体、scFv抗体、单结构域抗体诸如sdAb(VL或VH)诸如骆驼科动物抗体(Riechmann, 1999, J. Immunol. Meth. 231: 25-38)、骆驼科动物VHH域(由对靶标表现出足够亲和力的VL或VH结构域组成)、以及由抗体片段形成的多特异性抗体(抗体片段诸如二价片段,其包含两个在铰链区通过二硫桥连接的Fab片段),以及抗体的分离的CDR或其他表位结合片段。抗原结合片段也可以并入单结构域抗体、最大抗体(maxibody)、迷你抗体(minibody)、纳米抗体、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和bis-scFv(参见,如,Hollinger&Hudson, 2005, Nature Biotech. 23: 1126-1136)。抗原结合片段也可以基于诸如纤连蛋白III型(Fn3)之类的多肽被接枝到支架中(美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽迷你抗体)。抗体片段还包括人抗体或人源化抗体或人抗体或人源化抗体的一部分。

[0055] 如本文所用,术语“抗原”或“Ag”被定义为引起免疫反应的分子。这种免疫反应可能涉及抗体产生,或特定免疫活性细胞的激活,或两者。技术人员将理解,任何大分子,包括实际上所有的蛋白质或肽,都可以用作抗原。此外,抗原可以源自重组DNA或基因组DNA。本领域技术人员将理解,包含编码引起免疫反应的蛋白的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码如本文所用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见,本发明包括但不限于使用超过一个基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫反应。此外,技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见,抗原可以产生、合成或可以源自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0056] “反义”具体地是指编码多肽的双链DNA分子的非编码链的核酸序列,或与该非编码链基本上同源的序列。如本文所定义,反义序列与编码多肽的双链DNA分子的序列互补。反义序列不必仅与DNA分子的编码链的编码部分互补。反义序列可以与编码多肽的DNA分子的编码链上指定的调节序列互补,该调节序列控制编码序列的表达。

[0057] 如本文所用,术语“施用器”是指用于施用本发明的化合物和组合物的任何装置,包括但不限于皮下注射器、移液管等。

[0058] 如本文所使用,“适配体”是指可以与另一分子特异性结合的小分子。适配体通常是基于多核苷酸或肽的分子。多核苷酸适配体是通常包含几条核酸链的DNA或RNA分子,它们采用高度特异性的三维构象,旨在对特定的靶标分子(诸如,肽、蛋白质、药物、维生素等其他有机和无机分子)具有适当的结合亲和力和特异性。通过使用通过指数富集的配体的系统进化,可以从大量随机序列群中选择此类多核苷酸适配体。肽适配体通常是约10至约

20个氨基酸的环,该环附接到与特定配体结合的蛋白支架上。可以使用诸如酵母双杂交系统之类的方法从组合文库中鉴定并分离肽适配体。

[0059] 基因的“编码区”由该基因的编码链的核苷酸残基和该基因的非编码链的核苷酸组成,该基因的编码链的核苷酸残基和该基因的非编码链的核苷酸分别与由基因转录产生的mRNA分子的编码区同源或互补。mRNA分子的“编码区”也由该mRNA分子的核苷酸残基组成,所述核苷酸残基在mRNA分子的翻译期间中与转移RNA分子的反密码子区匹配或编码终止密码子。因此,编码区可以包括对应于不存在于由mRNA分子编码的成熟蛋白中的氨基酸残基(如,蛋白输出信号序列中的氨基酸残基)的核苷酸残基。

[0060] “组成型”启动子是核苷酸序列,当其与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地关联时,导致在细胞的大多数或全部生理条件下在细胞中产生该基因产物。

[0061] 如本文所使用,“疾病”是动物的健康状态,其中动物不能维持体内平衡,并且其中如果疾病没有得到改善,则动物的健康继续恶化。

[0062] 如本文所使用,动物中的“障碍”是健康状态,在该状态下动物能够维持体内平衡,但在该状态下与没有障碍的情况相比,动物的健康状态不太有利。如果不治疗,障碍不一定会导致动物健康状态进一步下降。

[0063] 如本文所使用,术语化合物的“有效量”或“治疗有效量”或“药物有效量”可互换使用,用来指足以施用化合物的受试者提供有益作用的化合物的量。

[0064] 如本文所使用,“编码”是指多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中特异性核苷酸序列的固有性质——用作在具有限定的核苷酸序列(即rRNA, tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列的生物过程中合成其他聚合物和大分子的模板,及其所产生的生物性质。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该基因编码该蛋白质。核苷酸序列与mRNA序列相同且通常在序列表中提供的编码链,以及用作基因或cDNA转录模板的非编码链都可以称为编码蛋白质或该基因或cDNA的其他产物。

[0065] 如本文所使用,“内源性”是指来自生物体、细胞、组织或系统内部或在其内部产生的任何物质。如本文所使用,术语“外源性”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或在其外部产生的任何物质。

[0066] 如本文所使用,术语“表位”定义为可引发免疫反应——包括B和/或T细胞反应——的抗原上的小化学分子。抗原可以具有一个或多个表位。大多数抗原具有许多表位;即它们是多价的。通常地,表位的大小约为5个氨基酸和/或糖。本领域技术人员理解,通常整个三维结构——而不是分子的特异性线性序列——是抗原特异性的主要标准并因此将一个表位与另一个表位区分开。

[0067] 如本文所使用,术语“表达”定义为由其启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0068] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作关联的表达控制序列。表达载体包含足够的顺式作用元件用于表达;表达的其他元件可以由宿主细胞供应或在体外表达系统中供应。表达载体包括本领域已知的所有载体,诸如黏粒、质粒(如,裸露的或包含在脂质体中)和病毒(如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒),其并入了重组多核苷酸。

[0069] 如本文所使用,术语“FGF19”是指SEQ ID NO:2的多肽:

	10	20	30	40	50
	MRS GCVVVHV	WILAGLWLAV	AGRPLAFSDA	GPHVHYGWD	PIRLRHLYTS
	60	70	80	90	100
[0070]	GPHGLSSCFL	RIRADGVVDC	ARGQSAHSL	EIKAVALLTV	AIKGVHSVRY
	110	120	130	140	150
	LCMGADGKMQ	GLLQYSEEDC	AFEEEIRPDG	YNVYRSEKHR	LPVSLSSAKQ
	160	170	180	190	200
	RQLYKNRGFL	PLSHFLPMLP	MVPEEPEDLR	GHLESDMFSS	PLETDSMDPF
[0071]	210				
	GLVTGLEAVR	SPSFKEK			

[0072] 如本文所使用,“FGF19_{CT}”是指对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基170-216的多肽。

[0073] 如本文所使用,术语“FGF21”是指SEQ ID NO:3的多肽。

	10	20	30	40	50
	MDSDETGFEH	SGLWVSVLAG	LLL GACQAHP	IPDSSPLLQF	GGQVRQRYLY
	60	70	80	90	100
	TDDAQTEAH	LEIREDGTVG	GAADQSPEL	LQLKALKPGV	IQILGVKTSR
	110	120	130	140	150
[0074]	FLCQRPDGAL	YGSLHFDPEA	CSFRELLLED	GYNVYQSEAH	GLPLHLPGNK
	160	170	180	190	200
	SPHRDPAPRG	PARFLPLPGL	PPALPEPPGI	LAPQPPDVGS	SDPLSMVGPS
	QGRSPSYAS				

[0075] 如本文所使用,“FGF21_{CT}”是指对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基169-209的多肽,其在某些实施方式中包含两个突变——P199G和A208E(参见US20120087920,其通过引用以其全部并入本文)。

[0076] 如本文所使用,术语“重链抗体”或“多个重链抗体”包括通过用抗原免疫并随后分离血清,或通过克隆和表达编码此类抗体的核酸序列,源自骆驼科动物物种的免疫球蛋白分子。术语“重链抗体”或“多个重链抗体”进一步涵盖从患有重链疾病的动物中分离出的,或通过克隆和表达来自动物的V_H(可变重链免疫球蛋白)基因制备的免疫球蛋白分子。

[0077] 如本文所用,“同源的”是指两个聚合物分子之间,如,两个核酸分子,诸如两个DNA分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中的亚基位置都被相同的单体亚基占据时;如,如果两个DNA分子中每个分子的位置被腺嘌呤占据,那么它们在那个位置是同源的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置数目的直接函数;如,如果两个序列中一半的位置(如,长度为十个亚基的聚合物中五个位置)是同源的,则两个序列是50%同源的;如果90%的位置(如,10个中有9个)是匹配或同源的,则两个序列是90%同源的。举例来说,DNA序列5'-ATTGCC-3'和5'-TATGGC-3'享有50%的同源性。

[0078] 如本文所使用,术语“免疫球蛋白”或“Ig”定义为起抗体功能的一类蛋白质。此类蛋白质中包含的五个成员是IgA、IgG、IgM、IgD和IgE。IgA是存在于身体分泌物——诸如唾液、眼泪、母乳、胃肠道分泌物以及呼吸道和生殖泌尿道的粘液分泌物——中的一级抗体。IgG是最常见的循环抗体。IgM是大多数哺乳动物在初次免疫反应中产生的主要免疫球蛋白。它是凝集、补体固定和其他抗体反应中最有效的免疫球蛋白,并且对防御细菌和病毒很

重要。IgD是没有已知抗体功能但可以用作抗原受体的免疫球蛋白。IgE是一种免疫球蛋白，其通过在暴露于变应原后引起肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介质，从而介导速发型超敏反应。

[0079] “诱导型”启动子是核苷酸序列，当与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地关联时，基本上仅当在细胞中存在与该启动子相对应的诱导物时，该核苷酸序列才在细胞中使该基因产物产生。

[0080] 如本文所用，术语“抑制”和“拮抗”是指减少分子、反应、相互作用、基因、mRNA和/或蛋白质的表达、稳定性、功能或活性可测量的量，或者完全阻止。抑制剂是如此化合物，其例如结合、部分或完全阻断刺激、减少、阻止、延迟激活、灭活、脱敏或下调蛋白质、基因和mRNA稳定性、表达、功能和活性，例如拮抗剂。

[0081] 如本文所用的术语，“指导材料”包括出版物、记录、图表或可用于传达试剂盒中本发明的组合物和/或化合物的有用性的任何其他表达介质。试剂盒的指导材料可以例如固定在容纳本发明的化合物和/或组合物的容器上，或者与包含该化合物和/或组合物的容器一起运输。可选地，指导材料可以与容器分开地运输，目的是使接收者协同使用指导材料和化合物。指导材料的递送可以例如通过出版物或其他传达试剂盒有用性的表达介质的物理递送，或者可以可选地通过电子传输，例如借助于计算机，诸如通过电子邮件，或从网站下载实现。

[0082] “分离的”是指从自然状态改变或移出。例如，在活体动物中天然存在的核酸或肽不是“分离的”，而与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在，或可以存在于非天然环境中，诸如例如宿主细胞。

[0083] “分离的核酸”是指已经与以天然存在的状态位于其侧翼的序列分开的核酸区段或片段，即已经从正常与该片段相邻的序列即与天然存在的基因组中的片段相邻的序列中移出的DNA片段。该术语还适用于已经从天然伴随核酸的其他组分——即在细胞中天然伴随核酸的RNA或DNA或蛋白质——基本上纯化的核酸。因此，该术语包括例如重组DNA，其被并入载体、自主复制质粒或病毒、或原核生物或真核生物的基因组DNA中，或作为独立于其他序列的单独分子存在（即，作为cDNA或通过PCR或限制性酶切消化产生的基因组或cDNA片段）。它还包括重组DNA，该重组DNA是编码另外多肽序列的杂合基因的一部分。

[0084] 如本文所用，术语“调制”意思是指生物学状态的任何变化，即增加，减少等。例如，术语“调制”可被解释为指正向或负向地调节靶蛋白的表达、稳定性或活性的能力，包括但不限于靶蛋白mRNA的转录、靶蛋白mRNA的稳定性、靶蛋白mRNA的翻译、靶蛋白稳定性、靶蛋白翻译后修饰、靶蛋白活性或其任意组合。此外，术语调制可用于指活性的增加、减少、掩蔽、改变、重迭 (overriding) 或恢复，包括但不限于靶蛋白活性。

[0085] 当应用于物体时，“天然存在”指该物体可以在自然界中被发现的事实。例如，生物体（包括病毒）中存在的、可以从自然界中的来源分离并且未被人有意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的序列。

[0086] 除非另有说明，“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此的简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可以包括内含子，其程度是编码蛋白质的核苷酸序列在某些版本中可以包含内含子（一个或多个）。

[0087] 术语“可操作地关联”是指调节序列和异源核酸序列之间的功能性连接,其导致后者表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地关联。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与编码序列可操作地关联。通常,可操作地关联的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,在同一阅读框中。

[0088] 组合物的“肠胃外”施用包括,如,皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0089] 如本文所使用,术语“药物组合物”是指在本发明中有用的至少一种化合物与其他化学组分(诸如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂)的混合物。该药物组合物促进该化合物施用至生物体。本领域中存在多种施用化合物的技术,包括但不限于:静脉内、口服、气溶胶、肠胃外、眼内、肺、颅内和局部施用。

[0090] 如本文所使用,术语“药学上可接受的”是指不消除组合物的生物活性或性质并且相对无毒的材料,诸如载体或稀释剂,即,可以将该材料施用于个体而不会引起不期望的生物作用或以有害的方式与其中所含的组合物的任何成分相互作用。

[0091] “药学上可接受的载体”包括参与在对象内运载或运输本发明的化合物(一种或多种)或运载或运输本发明的化合物(一种或多种)至对象以使其可以执行其预期功能的药学上可接受的盐,药学上可接受的材料,组合物或载体,诸如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。通常,此类化合物从身体的一个器官或部分被运载或运输到身体的另一器官或部分。从与制剂的其他成分相容的意义上讲,每种盐或载体必须是“可接受的”,并且是对对象无害的。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;黄芩粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;稀释剂;制粒剂;润滑剂;粘结剂;崩解剂;润湿剂;乳化剂;着色剂;脱模剂;涂层剂;甜味剂;调味剂;增香剂;防腐剂;抗氧化剂;增塑剂;凝胶剂;增稠剂;硬化剂;凝结剂(setting agent);悬浮剂;表面活性剂;湿润剂;载体;稳定剂;以及药物制剂中使用的其他无毒相容性物质,或其任何组合。如本文所用,“药学上可接受的载体”还包括与化合物的活性相容并且是对象生理上可接受的任何和所有包衣、抗细菌和抗真菌剂以及吸收延迟剂等。补充活性化合物也可并入组合物中。

[0092] 如本文所使用,语言“药学上可接受的盐”是指由药学上可接受的无毒性酸制备的施用的化合物的盐,该无毒性酸包括无机酸、有机酸、溶剂化物、水合物或其包合物。

[0093] “多肽”是指由氨基酸残基组成的聚合物、相关的天然存在的结构变体和通过肽键连接的其合成的非天然存在的类似物。可以例如使用自动化多肽合成器进行合成多肽的合成。术语“蛋白质”通常是指大多肽。术语“肽”通常是指短多肽。

[0094] 本文使用常规表示法来描绘多肽序列:多肽序列的左手端是氨基末端;多肽序列的右手端是羧基末端。如本文所用,“拟肽(peptidomimetic)”是包含能够模拟母肽的生物作用的非肽结构元件的化合物。拟肽可以包含或不包含肽键。

[0095] 如本文所使用,术语“预防”是指如果没有障碍或疾病发生,则没有障碍或疾病的发展,或者如果已经有了障碍或疾病的发展,则没有进一步的障碍或疾病的发展。还考虑一种预防与障碍或疾病相关的一些或全部症状的能力。疾病和障碍在本文可互换使用。

[0096] “引物”是指能够与指定的多核苷酸模板特异性杂交并提供用于合成互补多核苷酸的起始点的多核苷酸。当将多核苷酸引物置于诱导合成的条件下,即在存在核苷酸、互补的多核苷酸模板和用于聚合的试剂诸如DNA聚合酶的情况下,发生这种合成。引物通常是单链的,但也可以是双链的。引物通常是脱氧核糖核酸,但各种各样的合成引物和天然存在引物可用于许多应用。引物与被设计与之杂交的模板互补,从而充当合成起始位点,但无需反映模板的确切序列。在这种情况下,引物与模板的特异性杂交取决于杂交条件的严格性。引物可以用如生色、放射性或荧光部分标记,并用作可检测的部分。

[0097] “探针”是指能够与另一多核苷酸的指定序列特异性杂交的多核苷酸。探针与靶互补多核苷酸特异性杂交,但无需反映模板的确切互补序列。在这种情况下,探针与靶标的特异性杂交取决于杂交条件的严格性。探针可以用例如发色、放射性或荧光部分标记,并用作可检测的部分。

[0098] 如本文所用,术语“启动子”定义为引发多核苷酸序列的特异性转录所需的细胞的合成机器或引入的合成机器识别的DNA序列。

[0099] 如本文所用,术语“启动子/调节序列”是指表达与启动子/调节序列可操作地关联的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,而在其他情况下,该序列也可以包括表达基因产物所需的增强子序列和其他调节元件。启动子/调节序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0100] 如本文所用,术语“重组DNA”定义为通过连接来自不同来源的DNA片而产生的DNA。如本文所用,术语“重组多肽”定义为通过使用重组DNA方法产生的多肽。

[0101] 如本文所用,术语“RNA”定义为核糖核酸。

[0102] 如本文所用,术语“特异性结合”是指第一分子(如,抗体)优先结合第二分子(如,特定抗原表位),但不必须仅结合第二分子。

[0103] 如本文所使用,“对象”是指人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括,例如,牲畜和宠物,诸如绵羊、牛科、猪、犬科、猫科和鼠科哺乳动物。在某些实施方式中,对象是人。

[0104] 如本文所使用,术语“合成抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,诸如例如本文所描述的由噬菌体表达的抗体。该术语还应解释为意指通过合成编码抗体的DNA分子产生的抗体,并且该DNA分子表达抗体蛋白或规定该抗体的氨基酸序列,其中该DNA或氨基酸序列已经使用可获得的和本领域中已知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0105] “组织特异性”启动子是这样的核苷酸序列,当与基因编码或规定的多核苷酸可操作地关联时,基本上仅当该细胞是对应于启动子的组织类型的细胞时,该核苷酸序列才会在细胞中使基因产物产生。

[0106] 如本文所使用,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代对象细胞及其后代。

[0107] 如本文所使用,术语“治疗”定义为将治疗剂,即在本发明中有用的组合物(单独或与另一种药剂组合)施加或施用至对象,或向来自患有疾病或障碍、具有疾病或障碍的症状

或发展疾病或障碍的可能的对象(如,用于诊断或离体应用)的分离组织或细胞系施加或施用治疗剂,旨在治愈、痊愈、缓解、减轻、改变、补救、改善、改良或影响疾病或障碍、疾病或障碍的症状或发展疾病或障碍的可能。基于从药物基因组学领域获得的知识,可以具体地定制或修改这种治疗。本领域普通技术人员可以使用常规实验确定在任何单独情况下的适当治疗量。

[0108] 如本文所使用,短语“在转录控制下”或“可操作地关联”是指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0109] 如本文所使用,术语“变体”是在序列上分别不同于参考核酸序列或肽序列,但是保留了参考分子的基本性质的核酸序列或肽序列。核酸变体的序列变化可能不会改变参考核酸编码的肽的氨基酸序列,或者可能导致氨基酸取代、添加、缺失、融合和截短。肽变体的序列变化通常是有限的或保守的,以便参考肽和变体的序列总体上非常相似,并且在许多区域是相同的。变体和参考肽的氨基酸序列可以通过任何组合的一个或多个取代、添加或缺失而在氨基酸序列上不同。核酸或肽的变体可以是天然存在的,诸如等位基因变体,或者可以是未知天然存在的变体。核酸和肽的非天然存在的变体可以通过诱变技术或通过直接合成来制备。

[0110] “载体”是包含分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物相关联的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语也应解释为包括有助于核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,诸如例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0111] 本文使用的缩写包括:FGF,成纤维细胞生长因子;FGFR,成纤维细胞生长因子受体;GDNF,胶质细胞衍生神经营养因子;GH结构域,糖苷水解酶样结构域;HSPG,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖;MES,2-(N-吗啉代)乙磺酸;RMSD,均方根偏差;RTK,受体酪氨酸激酶;sKLB, β -Klotho的胞外结构域。

[0112] 贯穿本公开,可以以范围格式来呈现本发明的各个方面。应当理解,范围格式的描述仅是为了方便和简洁,而不应被解释为对本发明范围的不灵活的限制。因此,应该将范围的描述视为已明确公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,对范围从1到6的描述应视为已明确公开了子范围,诸如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的广度无关,均适用。

[0113] 公开内容

[0114] 在一个方面中,本发明提供在治疗内分泌FGF相关疾病或障碍中有用的组合物和方法。在某些实施方式中,本发明的组合物阻止或最小化FGF21(和/或FGF19和/或FGFR)与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho的结合。在其他实施方式中,本发明的组合物与野生型FGF19和/或FGF21相比更紧密地结合哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho。

[0115] 如本文所讨论,Klotho家族的两个成员在通过三种内分泌FGF介导信号传导中起着重要作用,这三种内分泌FGF充当循环激素来调节一系列代谢过程,包括降低血糖。因为内分泌FGF仅能在也表达 α -Klotho或 β -Klotho的细胞中激活FGFR,所以提议Klotho蛋白起FGFR激活的共受体的作用,类似于HSPG作为FGFR激活的共受体通过规范FGF所起到的作用。对于规范FGF,HSPG在FGFR激活中起两个主要但相互依赖的作用。首先,HSPG与FGF和FGFR二

者结合形成稳定的三元HSPG/FGF/FGFR复合物似乎补偿了规范FGF对FGFR的相对低(微摩尔范围)亲和力。规范FGF与其受体结合的 K_D 值比EGF或PDGF与其关联同源RTK的结合弱约1000倍。第二,HSPG,通过形成HSPG/FGF/FGFR三元复合物,稳定了由二价FGF结合两个FGFR分子诱导的受体二聚化。尽管明显的是所有三个内分泌FGF必须结合FGFR以便促进信号传导,但是FGF21对FGFR的亲和力甚至更低($>10-100\mu\text{M}$)。

[0116] 本文所述的研究揭示, β -Klotho并非简单地充当通过内分泌FGF的FGFR1c激活的替代共受体,而是实际上起着FGF21的主要高亲和力受体的作用。图8中呈现的方案描绘了非限制性模型,用于说明FGF21与 β -Klotho结合如何使其激活 β -Klotho/FGFR复合物以促进酪氨酸激酶激活和细胞信号传导。在该模型中,FGFR1c和 β -Klotho单体与FGFR/ β -Klotho异二聚体在膜中平衡存在。当FGFR1_{CD2D3}胞外区与sKLB的结合的 K_D 为约 $1\mu\text{M}$ (图6B),FGFR1c和 β -Klotho的大部分以每个细胞10,000个拷贝左右的水平相互关联。FGF21以高亲和力($K_D=43.5\text{nM}$,图6A)与 β -Klotho单体或预先存在的 β -Klotho/FGFR1c异二聚体结合。因此,当FGF21通过其C-末端尾部与 β -Klotho单体和/或 β -Klotho/FGFR1c异二聚体相连时,所有三个成分在膜处均减小为二维,并且FGF21的FGF-核心对FGFR1c的弱(但可证明的)亲和力通过对FGF与两个FGFR分子的二价结合的减小的维度效应,足以驱动激活的三元FGF21/FGFR1c/ β -Klotho复合物的形成。在该非限制性模型中, β -Klotho起到FGF21的主要高亲和力受体的作用,而FGFR1c起到介导受体二聚化和细胞内信号传导的催化亚基的作用。这种机制与对RET所见相似,RET是由胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)激活的RTK。GDNF及其相关物首先与表面蛋白的GDNF受体(GDNFR)家族的特定成员结合。然后,被配体占据的GDNFR与RET的胞外结构域形成三元复合物。在此非限制性上下文中, β -Klotho类似于GDNFR起作用,而FGFR1c则扮演RET的角色。

[0117] 与FGF21_{CT}结合的sKLB的晶体结构还提供了清晰的视图,说明如何在进化中使 β -Klotho的两个糖苷水解酶(GH)结构域“改变作用”以特异性地识别FGF21。将与底物结合的 β -葡萄糖苷酶的结构与FGF21_{CT}结合的 β -Klotho的第二个GH结构域进行比较,揭示了专门用于切割糖的酶的活性位点如何演变成为特异性和高亲和力的细胞表面受体,用于循环调节关键的新陈代谢过程——包括降低血糖——的激素。FGF21的C末端似乎表现出寡糖的结构模拟——以富含羟基的区域为中心,该区域含有S-P-S序列,在FGF19中也保守。FGF21和FGF19之间的相似性表明,这两种激素对 β -Klotho的特异性及其作用方式相似。细胞对这两种内分泌FGF的反应的差异可能由两种配体对不同FGFR的结合偏好的改变所决定,即分别针对FGF21或FGF19的FGFR1c或FGFR4。

[0118] 化合物和/或组合物

[0119] (a) 本发明提供了阻止或最小化在哺乳动物的细胞表面上 β -Klotho与FGF19和/或FGF21和/或FGFR的结合的构建体。

[0120] 在一个方面中,本发明提供了阻止或最小化FGF19和/或FGF21与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho的结合的构建体(诸如,但不限于抗体和/或重组肽)。

[0121] 在某些实施方式中,构建体识别与 β -Klotho结合的FGF19或FGF21的至少一个氨基酸残基和/或与其结合,由此阻止FGF19或FGF21与 β -Klotho结合。在其他实施方式中,构建体识别FGF21(SEQ ID NO:3)中的氨基酸残基169-209内的一个或多个氨基酸和/或与其结合。在又其他实施方式中,构建体识别SEQ ID NO:3中的氨基酸残基186-209(参见表1)内的

一个或多个氨基酸和/或与其结合。在又其他实施方式中,构建体识别FGF19(SEQ ID NO:2)中的氨基酸残基170-216内的一个或多个氨基酸和/或与其结合。

[0122] 在某些实施方式中,构建体识别与FGF19或FGF21结合的 β -Klotho的至少一个氨基酸残基,由此阻止 β -Klotho与FGF19或FGF21结合。在其他实施方式中,构建体识别 β -Klotho(SEQ ID NO:1)中的氨基酸残基379-942内的一个或多个氨基酸和/或与其结合。在又其他实施方式中,构建体识别选自SEQ ID NO:1中的氨基酸379-380、392-394、419-422、431、434-435、438、532、643-647、692-694、696-697、743、745、764、768、824、826、829、832、845、847-851、853、862、889、931-932、939-940和942(参见表1和图3D-3E)的一个或多个氨基酸和/或与其结合。

[0123] 在另一方面,本发明提供阻止或最小化哺乳动物的细胞表面上 β -Klotho与FGFR的结合的构建体。

[0124] 在某些实施方式中,构建体识别与FGFR结合的 β -Klotho的至少一个氨基酸残基,由此阻止 β -Klotho与FGFR结合。在其他实施方式中,构建体识别人 β -Klotho的胞外区(SEQ ID NO:1的氨基酸残基53-983)或其片段内一个或多个氨基酸和/或与其结合。在又其他实施方式中,构建体识别包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基533-575的人 β -Klotho的胞外区的片段内的一个或多个氨基酸和/或与其结合。

[0125] 表1.

[0126] 在晶体结构中发现FGF21_{CT}和sKLB之间的接触。列出来自sKLB的氨基酸残基,其含有来自FGF21_{CT}的氨基酸残基的5Å内的至少一个原子。参见图3A-3E。

[0127]

FGF21 _{CT}	sKLB
P186	V392, S393, L394
D187	
V188	F379, K380, V392, W419, F420
G189	K380, F420
S190	W419, F420
S191	W419, F420, T421, D422, T431, M435
D192	W419, T431, M435
P193	L394, W419, M435
L194	L394, M435, N438, I853
S195	
M196	T431, Y434, M435, F849, L850, Q851, I853
V197	T431, M832, Q848, F849, L850
G198	Q848, F849, L850
G199	I847, Q848, F849
S200	R829, F849
Q201	R696, H743, D745, F764, E768, R829, R845, F849
G202	R696
R203	H646, R696
S204	E693, R696, H743, F826

P205	H743,F826,L862,F931,F942
S206	Y643,P644,T645,N692,E693,N824,F826,A889,F931
Y207	P644,T645,H646,A647,N692,E693,P694,R696,L697
E208	H646,K939,P940
S209	S532,Y643,T645,F931,K932,K939

[0128] 通过非限制性实例,抗体被如下描述为阻止或最小化 β -Klotho与FGF19、FGF21和/或FGFR的结合的实例。本领域技术人员将理解,可以识别FGF19/FGF21/FGFR/ β -Klotho并且与其特异性结合的任何抗体可用于本发明。本发明不应被解释为限于已知或此前未知的任何一种类型的抗体,只要抗体可以与FGF19/FGF21/FGFR/ β -Klotho特异性结合,并且阻止或最小化 β -Klotho与FGF19、FGF21和/或FGFR的结合。制造和使用此类抗体的方法是在本领域内已知的。例如,可以通过用抗原接种期望动物并由其分离与抗原特异性结合的抗体完成多克隆抗体的产生。可以使用任何已知的单克隆抗体制备过程制备针对蛋白质或肽的全长或肽片段的单克隆抗体,单克隆抗体制备过程诸如在例如Harlow et al. (1989, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York) 和Tuszynski et al. (1988, Blood 72:109-115) 中描述的那些。还可以使用化学合成技术合成大量的期望肽。可选地,可以在适于产生大量肽的细胞中从合适的启动子序列中克隆并表达编码期望肽的DNA。使用本文提到的标准过程,由用该肽免疫的小鼠产生针对该肽的单克隆抗体。然而,本发明不应解释为仅限于包括这些抗体的方法和组合物,而应解释为包括其他抗体,如该术语在本文其它地方所定义的。

[0129] 在一些情况中,从各种哺乳动物宿主——诸如啮齿动物(如,小鼠)、灵长类动物(如,人)等——制备单克隆抗体是期望的。制备此类单克隆抗体的技术描述是众所周知的并且在例如Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, COLD SPRING HARBOR LABORATORY, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Harlow et al., USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Press, New York, 1998); Breitling et al., RECOMBINANT ANTIBODIES (Wiley-Spektrum, 1999); 和Kohler et al., 1997 Nature 256: 495-497; 美国专利序号5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 和6,180,370中进行描述。

[0130] 可以使用本领域中可得到的技术克隆和测序编码使用本文中描述的过程获得的抗体的核酸,这些技术在例如Wright et al. (Critical Rev. Immunol. 1992, 12:125-168) 和其中引用的参考文献中进行描述。此外,本发明的抗体可以使用在Wright et al. (同上) 和其中引用的参考文献以及Gu et al. (Thrombosis and Hematocyst 1997, 77:755-759) 中描述的技术进行“人源化”。

[0131] 可选地,可使用噬菌体展示技术产生抗体。为了产生噬菌体抗体文库,首先从分离自细胞(如,杂交瘤)的mRNA中获得cDNA文库,所述细胞表达待在噬菌体表面上表达的期望蛋白质,如,期望的抗体。使用逆转录酶产生mRNA的cDNA拷贝。通过PCR获得规定免疫球蛋白片段的cDNA,并将得到的DNA克隆到合适的噬菌体载体中以产生包含规定免疫球蛋白基因的DNA的噬菌体DNA文库。制备包含异源DNA的噬菌体文库的过程是本领域众所周知的,并且例如在Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York) 进行描述。

[0132] 可以对编码期望抗体的噬菌体进行工程改造,以使该蛋白质以可用于与其相应的

结合蛋白(如抗体所针对的抗原)结合的方式展示在其表面上。因此,当表达特异性抗体的噬菌体在表达相应抗原的细胞的存在下孵育时,噬菌体将与细胞结合。不表达抗体的噬菌体将不与细胞结合。这类淘选技术在本领域内是众所周知的,并且例如在Wright et al. (Critical Rev.Immunol.1992,12:125-168)中进行描述。

[0133] 已经开发了诸如本文描述的那些方法用于使用M13噬菌体展示来生产人抗体(Burton et al.,1994,Adv.Immunol.57:191-280)。本质上,cDNA文库是由从产生抗体的细胞群中获得的mRNA生成的。mRNA编码重排的免疫球蛋白基因,并因此cDNA对其进行编码。将扩增的cDNA克隆到M13表达载体中,产生在其表面上表达人Fab片段的噬菌体文库。通过抗原结合来选择展示目的抗体的噬菌体,并将其在细菌中繁殖以产生可溶性人Fab免疫球蛋白。因此,与常规的单克隆抗体合成相反,该过程使编码人免疫球蛋白的DNA永生,而不是使表达人免疫球蛋白的细胞永生。

[0134] 刚刚提出的过程描述了编码抗体分子的Fab部分的噬菌体的产生。然而,本发明不应被解释为仅限于产生编码Fab抗体的噬菌体。而是,编码单链抗体(scFv/噬菌体抗体文库)的噬菌体也包括在本发明中。Fab分子包含整个Ig轻链,也就是说,它们既包含轻链的可变区,也包含轻链的恒定区,但仅包含重链的可变区和第一恒定区结构域(CH1)。单链抗体分子包括包含Ig Fv片段的蛋白质的单链。Ig Fv片段仅包含抗体的重链和轻链的可变区,不具有其中含有的恒定区。包含scFv DNA的噬菌体文库可以按照Marks et al. (1991,J Mol Biol 222:581-597)中描述的过程产生。如此产生的用于分离期望抗体的噬菌体的淘选以与针对包含Fab DNA的噬菌体文库所描述的相似的方式进行。

[0135] 本发明还应该被解释为包括合成的噬菌体展示文库,其中可以合成重链和轻链可变区,使得它们包括几乎所有可能的特异性(Barbas,1995,Nature Medicine 1:837-839; de Kruif et al.,1995,J Mol Biol 248:97-105)。

[0136] 本发明包括多克隆抗体、单克隆抗体、合成抗体等。基于本文提供的公开内容,本领域技术人员将理解,本发明的抗体的关键特征是该抗体与FGF19/FGF21和/或 β -Klotho特异性结合。

[0137] 在又另一方面,本发明提供能够在哺乳动物的细胞表面上隔离 β -Klotho、FGF19和/或FGF21的可溶性构建体。

[0138] 在某些实施方式中,本发明提供了包括能够与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho结合并隔离其的FGF19和/或FGF21多肽的可溶性构建体。在某些实施方式中,FGF21多肽包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基169-209(FGF21_{CT})。在其他实施方式中,FGF19多肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸残基170-216(FGF19_{CT})。FGF21_{CT}或FGF19_{CT}可以与另一多肽融合,诸如但不限于稳定性增强结构域,诸如但不限于白蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、或抗体的Fc区。在某些实施方式中,FGF21_{CT}或FGF19_{CT}和稳定性增强结构域通过多肽关联,这些多肽包括约1-18个氨基酸、1-17个氨基酸、1-16个氨基酸、1-15个氨基酸、1-14个氨基酸、1-13个氨基酸、1-12个氨基酸、1-11个氨基酸、1-10个氨基酸、1-9个氨基酸、1-8个氨基酸、1-7个氨基酸、1-6个氨基酸、1-5个氨基酸、1-4个氨基酸、1-3个氨基酸、1-2个氨基酸、或单个氨基酸。

[0139] 在其他实施方式中,本发明提供包括能够与FGF19和/或FGF21结合并隔离FGF19和/或FGF21的 β -Klotho多肽的可溶性构建体。在某些实施方式中, β -Klotho多肽包括人 β -

Klotho的胞外区(SEQ ID NO:1的氨基酸残基53-983)或其片段。在其他实施方式中,人 β -Klotho的胞外区的片段包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基379-942。 β -Klotho多肽可以与另一种多肽融合,诸如但不限于稳定性增强结构域,诸如但不限于白蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、或抗体的Fc区。在某些实施方式中, β -Klotho多肽和稳定性增强结构域通过多肽关联,这些多肽包括1-18个氨基酸、1-17个氨基酸、1-16个氨基酸、1-15个氨基酸、1-14个氨基酸、1-13个氨基酸、1-12个氨基酸、1-11个氨基酸、1-10个氨基酸、1-9个氨基酸、1-8个氨基酸、1-7个氨基酸、1-6个氨基酸、1-5个氨基酸、1-4个氨基酸、1-3个氨基酸、1-2个氨基酸、或单个氨基酸。

[0140] 在又其他实施方式中,本发明提供了包括能够与FGFR结合的 β -Klotho多肽的可溶性构建体。在某些实施方式中, β -Klotho多肽包括人 β -Klotho的胞外区(SEQ ID NO:1的氨基酸残基53-983)或其片段。在其他实施方式中,人 β -Klotho的胞外区的片段包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基533-575。 β -Klotho多肽可以与另一种多肽融合,诸如但不限于稳定性增强结构域,诸如但不限于白蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、或抗体的Fc区。在某些实施方式中, β -Klotho多肽和稳定性增强结构域通过多肽关联,这些多肽包括1-18个氨基酸、1-16个氨基酸、1-14个氨基酸、1-12个氨基酸、1-10个氨基酸、1-8个氨基酸、1-6个氨基酸、1-5个氨基酸、1-4个氨基酸、1-3个氨基酸、1-2个氨基酸、或单个氨基酸。

[0141] (b) 本发明提供与野生型FGF19和/或FGF21相比更紧密地与 β -Klotho结合的组合物。

[0142] 在一个方面中,本发明提供包括FGF19和/或FGF21多肽的可溶性构建体,其与野生型FGF19和/或FGF21相比更紧密地与 β -Klotho结合。在某些实施方式中,FGF19多肽在其C末端结构域中具有突变。在某些实施方式中,FGF21多肽在其C末端结构域中具有突变,诸如但不限于残基V188、R203和/或L194。在其他实施方式中,FGF21多肽的突变包括V188。在又其他实施方式中,FGF21多肽的突变包括R203W。在又其他实施方式中,FGF21多肽的突变包括L194F。FGF19和/或FGF21多肽可以与另一种多肽融合,诸如但不限于稳定性增强结构域,诸如但不限于白蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶、或抗体的Fc区。在某些实施方式中,FGF19和/或FGF21多肽和稳定性增强结构域通过多肽关联,这些多肽包括1-18个氨基酸、1-16个氨基酸、1-14个氨基酸、1-12个氨基酸、1-10个氨基酸、1-8个氨基酸、1-6个氨基酸、1-5个氨基酸、1-4个氨基酸、1-3个氨基酸、1-2个氨基酸、或单个氨基酸。

[0143] 本发明的组合物中包括的化合物可以与酸形成盐,并且这些盐包括在本发明中。在某些实施方式中,这些盐是药学上可接受的盐。术语“盐”包括在本发明的方法中有用的游离酸的加成盐。术语“药学上可接受的盐”是指具有在药物应用中有用的范围内的毒性轮廓(toxicity profile)的盐。然而,药学上不可接受的盐可以具有诸如高结晶度的性质,其在本发明的实践中具有实用性,诸如例如在本发明方法中有用的化合物的合成、纯化或配制过程中的实用性。

[0144] 合适的药学上可接受的酸加成盐可以由无机酸或有机酸制备。无机酸的实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、碳酸、硫酸和磷酸。合适的有机酸可以选自脂肪族、脂环族、芳香族、芳脂族、杂环、羧酸和磺酸类的有机酸,其实例包括甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、葡萄糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、葡糖醛酸、马来酸、富马酸、丙酮酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯甲酸、邻氨基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、苯乙酸、扁桃酸、亚甲基双羟萘酸

(帕莫酸)、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、泛酸、三氟甲烷磺酸、2-羟基乙磺酸、对甲苯磺酸、磺胺酸、环己氨基磺酸、硬脂酸、藻酸、 β -羟基丁酸、水杨酸、半乳糖二酸和半乳糖醛酸。

[0145] 方法

[0146] 在一个方面中,本发明包括治疗或预防有需要的对象中疾病或障碍的方法。

[0147] 在某些实施方式中,方法包括向对象施用治疗有效量的构建体,该构建体阻止或最小化FGF19和/或FGF21和/或FGFR与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho的结合。由该方法治疗或预防的疾病或障碍的非限制性实例包括肝癌和结肠癌。

[0148] 在某些实施方式中,方法包括向对象施用治疗有效量的构建体,该构建体与野生型FGF19和/或FGF21结合相比更紧密地与哺乳动物的细胞表面上的 β -Klotho结合。由该方法治疗或预防的疾病或障碍的非限制性实例包括肥胖、糖尿病、胰腺炎、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)和非酒精性脂肪肝炎(NASH)。

[0149] 在某些实施方式中,构建体包含重组肽和/或抗体及其组合。在其他实施方式中,抗体包含选自多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、合成抗体、重链抗体、人抗体、抗体的生物活性片段及其组合的至少一种抗体。在又其他实施方式中,对象是哺乳动物。在又其他实施方式中,哺乳动物是人。在又其他实施方式中,构建体通过选自以下的施用途径施用:吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、颅内、局部、经皮、肺、鼻内、口腔、眼内、鞘内和静脉内。

[0150] 在某些实施方式中,进一步向对象施用至少一种治疗疾病和/或障碍的另外的药物。在其他实施方式中,将构建体与至少一种另外的药物共同施用。在又其他实施方式中,构建体和至少一种另外的药物是共同配制的。

[0151] 组合疗法

[0152] 使用本文描述的方法鉴定的化合物和组合物与一种或多种可用于治疗本文考虑的疾病或障碍的另外的化合物组合用于本发明的方法。这些另外的化合物可包含本文中鉴定的化合物或已知治疗、预防或减轻本文中考虑的疾病或障碍的症状的化合物,如,市售化合物。

[0153] 例如,可以使用合适的方法,诸如例如S型- E_{\max} 方程式(Holford&Scheiner,19981, Clin.Pharmacokinet.6:429-453)、Loewe可加性方程式(Loewe&Muischnek,1926, Arch.Exp.Pathol Pharmacol.114:313-326)和中值效应方程式(Chou&Talalay,1984, Adv.Enzyme Regul.22:27-55)计算协同效应。上面提到的每个方程式都可以应用于实验数据,以生成相应的图形,以帮助评估药物组合的效果。与上述提到的方程式相关的对应曲线分别是浓度-效果曲线、等效线图曲线和组合指数曲线。

[0154] 药物组合物和制剂

[0155] 本发明还包括本发明药物组合物用于实践本发明方法的用途。

[0156] 这样的药物组合物可以以适合于向对象施用的形式提供,并且可以包含一种或多种药学上可接受的载体、一种或多种另外的成分或这些的一些组合。如本领域中众所周知的,本发明的组合物可以包含生理上可接受的盐,诸如本发明中考虑的化合物,与生理上可接受的阳离子或阴离子结合。*

[0157] 在某些实施方式中,可以施用可用于实践本发明方法的药物组合物以递送1ng/kg/天和100mg/kg/天之间的剂量。在其他实施方式中,可以施用可用于实践本发明的药物组合物以递送1ng/kg/天和500mg/kg/天之间的剂量。

[0158] 本发明药物组合物中活性成分、药学上可接受的载体和任何另外的成分的相对量将取决于所治疗对象的身份、大小和状况,并进一步取决于施用组合物的途径而变化。举例来说,组合物可包含0.1%和100% (w/w) 之间的活性成分。

[0159] 可用于本发明方法的药物组合物可被适当地开发用于吸入、口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、颅内、经皮、肺、鼻内、口腔、眼内、鞘内、静脉内或另一种施用途径。其他考虑的制剂包括投射的(projected)纳米颗粒、脂质体制品、含有活性成分的重新密封的红细胞和基于免疫学的制剂。施用途径(一种或多种)对技术人员而言是显而易见的,并且将取决于许多因素,所述因素包括所治疗疾病的类型和严重性、所治疗兽医或人类患者的类型和年龄等。

[0160] 本文描述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。通常,这种制备方法包括以下步骤:使活性成分与载体或一种或多种其他辅助成分结合,然后,如果需要或期望,将产品成型或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0161] 如本文所使用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的离散量的药物组合物。活性成分的量通常等于将被施用于对象的活性成分的剂量或该剂量的便利部分,例如该剂量的二分之一或三分之一。单位剂型可以是单个日剂量或多个日剂量之一(如,每天约1-4次或更多次)。当使用多个日剂量时,每个剂量的单位剂型可以相同或不同。

[0162] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要针对适合于对人类进行伦理施用的药物组合物,但是本领域技术人员应理解,此类组合物通常适合施用于各种动物。修改适合于施用给人的药物组合物以便使组合物适合于向各种动物施用是众所周知的,并且普通技术的兽医药理师可以仅通过普通的实验——如果有一一来设计和进行这种修改。考虑施用本发明药物组合物的对象包括但不限于人和其他灵长类动物、哺乳动物,包括与商业相关的哺乳动物,诸如牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0163] 在某些实施方式中,使用一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体配制本发明的组合物。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含治疗有效量的至少一种本发明的化合物和药学上可接受的载体。

[0164] 制剂可以与常规赋形剂混合使用,所述常规赋形剂即适合于口服、肠胃外、鼻、静脉内、皮下、肠内或本领域已知的任何其他合适的施用模式的药学上可接受的有机或无机载体物质。可以对药物制品进行灭菌,并且如果期望,可以与辅助剂,如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压缓冲剂的盐、着色剂、调味剂和/或芳香族物质等混合。在期望时,它们也可以与其他活性剂,如其他镇痛剂组合。

[0165] 如本文所使用,“另外的成分”包括但不限于以下一种或多种:赋形剂;表面活性剂;分散剂;惰性稀释剂;制粒剂和崩解剂;粘结剂;润滑剂;甜味剂;调味剂;着色剂;防腐剂;生理可降解的组合物,诸如明胶;水性载体和溶剂;油性载体和溶剂;悬浮剂;分散剂或湿润剂;乳化剂、缓和剂;缓冲剂;盐;增稠剂;填料;乳化剂;抗氧化剂;抗生素;抗真菌剂;稳定剂;和药学上可接受的聚合或疏水材料。可以包括在本发明的药物组合物中的其他“另外的成分”是本领域已知的并且例如在Genaro, ed. (1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA) 中描述,其通过引用并入本文。

[0166] 可以使用常规方法制备液体悬浮液,以实现活性成分悬浮在水性或油性载体中。水性载体包括例如水和等渗盐水。油性载体包括例如杏仁油、油性酯、乙醇、植物油(诸如花

生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)、分馏的植物油以及矿物油(诸如液体石蜡)。液体悬浮液可进一步包含一种或多种另外的成分,包括但不限于悬浮剂、分散剂或湿润剂、乳化剂、缓和剂、防腐剂、缓冲剂、盐、调味剂、着色剂和甜味剂。油性悬浮液可进一步包含增稠剂。已知的悬浮剂包括但不限于山梨糖醇糖浆、氢化食用脂肪、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芩胶、阿拉伯树胶和纤维素衍生物(诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素)。已知的分散剂或湿润剂包括但不限于天然存在的磷脂(例如卵磷脂),环氧烷与脂肪酸、与长链脂族醇、与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯、或与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯(如分别为聚氧乙烯硬脂酸酯、七癸基乙烯氧鲸蜡醇、聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯和聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)的缩合产物。已知的乳化剂包括但不限于卵磷脂和阿拉伯胶。已知的防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸正丙酯、抗坏血酸和山梨酸。已知的甜味剂包括例如甘油、丙二醇、山梨糖醇、蔗糖和糖精。用于油性悬浮液的已知增稠剂包括例如蜂蜡、硬石蜡和鲸蜡醇。

[0167] 本发明药物制品的粉状和粒状制剂可以使用已知方法制备。这样的制剂可以直接施用于对象,例如用于形成片剂、填充胶囊或通过向其中添加水性或油性载体来制备水性或油性悬浮液或溶液。这些制剂中的每一种可进一步包含分散剂或湿润剂、悬浮剂和防腐剂中的一种或多种。这些制剂中还可以包括另外的赋形剂,诸如填料和甜味剂、调味剂或着色剂。

[0168] 本发明的药物组合物也可以以水包油乳剂或油包水乳剂的形式制备、包装或出售。油相可以是植物油(例如橄榄油或花生油)、矿物油(例如液体石蜡)或这些的组合。这样的组合物可以进一步包含一种或多种乳化剂,例如天然存在的胶(例如阿拉伯树胶或黄芪胶)、天然存在的磷脂(例如大豆或卵磷脂)、衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯(例如山梨聚糖单油酸酯)、以及此类偏酯与环氧乙烷的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)。这些乳液还可以包含另外的成分,其包括例如甜味剂或调味剂。

[0169] 用化学组合物浸渍或涂覆材料的方法在本领域中是已知的,并且包括但不限于将化学组合物沉积或结合到表面上的方法,在材料的合成期间将化学组合物并入到材料结构中的方法(即,例如使用生理上可降解的材料),以及在具有或不具有后续干燥的情况下将水性或油性溶液或悬浮液吸收到吸收性材料中的方法。

[0170] 施用/给药

[0171] 施用方案可能影响有效量。可以在与疾病或病症相关的症状表现之前或之后将治疗制剂施用于患者。此外,可以每天或顺序施用数个分开的剂量以及交错剂量,或者可以连续输注该剂量,或者可以弹丸注射(推注)该剂量。此外,治疗制剂的剂量可以根据治疗或预防情况的紧急程度所指示成比例地增加或减少。

[0172] 可以使用已知的方法,以有效治疗患者疾病或病症的剂量和时间段向患者,优选哺乳动物,更优选人,施用本发明的组合物。实现治疗效果所必需的治疗化合物的有效量可以根据多种因素而变化,诸如所使用的特定化合物的活性;施用的时间;化合物的排泄速率;治疗的持续时间;与该化合物结合使用的其他药物、化合物或材料;所治疗患者的疾病或障碍的状态、年龄、性别、体重、状况、一般健康状况以及既往病史;以及医学领域众所周知的类似因素。可以调整剂量方案以提供最佳的治疗反应。例如,可以每天施用数个分开的剂量或可以如治疗情况的紧急程度所指示成比例地减少剂量。本发明的治疗化合物的有效

剂量范围的非限制性实例是约0.01和50mg/kg体重/每天。本领域普通技术人员将能够研究相关因素并确定治疗化合物的有效量而无需过度实验。

[0173] 该化合物可以以每天几次的频率施用于动物,也可以不那么频繁地施用,例如每天一次、每周一次、每两周一次、每月一次或甚至更不频繁地施用,例如每几个月一次或甚至一年一次或更不频繁。应当理解,在非限制性实例中,每天给药的化合物的量可以每天、每隔一天、每2天、每3天、每4天或每5天施用。例如,每隔一天施用,可以在星期一开始每天5mg的剂量,在星期三施用每天5mg的第一随后剂量,在星期五施用每天5mg的第二随后剂量,依此类推。给药的频率对技术人员而言是显而易见的,并且将取决于任何许多因素,例如但不限于所治疗疾病的类型和严重性、动物的类型和年龄等。

[0174] 可以改变本发明药物组合中活性成分的实际剂量水平,以便获得有效实现特定患者、组合物和给药模式所需的治疗反应的活性成分的量,而对患者无毒。

[0175] 具有本领域普通技术的医生,例如医师或兽医,可以容易地确定所需药物组合物的有效量并对其开处方。例如,医师或兽医可以以低于实现所需治疗效果所需水平的药物组合物中使用的本发明化合物的剂量开始,并逐渐地增加剂量直到实现所需效果。

[0176] 在特定的实施方式中,以剂量单位形式配制化合物是特别有利的,以易于施用和均匀剂量。如本文所使用,剂量单位形式是指适合作为待治疗患者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位都包含预定量的治疗化合物,该化合物经计算可与所需的药物载体结合以产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式由(a)治疗化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果,以及(b)在配药/配制这种用于治疗患者癌症的治疗化合物的领域中固有的局限性决定并直接取决于它们。

[0177] 在某些实施方式中,本发明的组合物以范围为每天1-5次或更多的剂量施用于患者。在其他实施方式中,本发明的组合物以包括但不限于每天、每两天、每三天一次至每周一次和每两次一次的剂量范围施用至患者。对本领域技术人员而言显而易见的是,本发明的各种组合物的施用频率将因对象而异,这取决于许多因素,其包括但不限于年龄、待治疗的疾病或障碍、性别、整体健康状况和其他因素。因此,本发明不应被解释为限于任何特定的剂量方案,并且将通过考虑与患者有关的所有其他因素的主治医生来确定待施用于任何患者的精确剂量和组合物。

[0178] 用于施用的本发明的化合物可以在如下范围内:约1 μ g至约7,500mg、约20 μ g至约7,000mg、约40 μ g至约6,500mg、约80 μ g至约6,000mg、约100 μ g至约5,500mg、约200 μ g至约5,000mg、约400 μ g至约4,000mg、约800 μ g至约3,000mg、约1mg至约2,500mg、约2mg至约2,000mg、约5mg至约1,000mg、约10mg至约750mg、约20mg至约600mg、约30mg至约500mg、约40mg至约400mg、约50mg至约300mg、约60mg至约250mg、约70mg至约200mg、约80mg至约150mg,和这些之间的任何和所有整体或部分增量。

[0179] 在一些实施方式中,本发明化合物的剂量为约0.5 μ g至约5,000mg。在一些实施方式中,用于本文所述的组合物中的本发明化合物的剂量小于约5,000mg、或小于约4,000mg、或小于约3,000mg、或小于约2,000mg、或小于约1,000mg、或小于约800mg、或小于约600mg、或小于约500mg、或小于约200mg、或小于约50mg。类似地,在一些实施方式中,本文所述的第二化合物的剂量小于约1,000mg、或小于约800mg、或小于约600mg、或小于约500mg、或小于约400mg、或小于约300mg、或小于约200mg、或小于约100mg、或小于约50mg、或小于约40mg、

或小于约30mg、或小于约25mg、或小于约20mg、或小于约15mg、或小于约10mg、或小于约5mg、或小于约2mg、或小于约1mg、或小于约0.5mg,及其任何或所有整体或部分增量。

[0180] 在某些实施方式中,本发明涉及包装的药物组合物,其容纳治疗有效量的本发明化合物单独或与第二药物组合的容器;以及使用该化合物治疗、预防或减轻患者疾病或障碍的一种或多种症状的说明书。

[0181] 术语“容器”包括用于容纳药物组合物的任何受器(receptacle)。例如,在某些实施方式中,容器是包含药物组合物的包装。在其他实施方式中,容器不是包含药物组合物的包装,即容器是受器,例如包含包装的药物组合物或未包装的药物组合物的盒子或小瓶以及药物使用说明书。而且,包装技术是本领域众所周知的。应当理解,药物组合物的使用说明书可以包含在含有药物组合物的包装上,因此,说明书与包装的产品形成增加的功能关系。但是,应该理解,说明书可包含有关该化合物执行其预期功能的能力的信息,例如治疗、预防或减少患者的疾病或障碍的信息。

[0182] 施用途

[0183] 本发明的任何组合物的施用途包括:吸入、口服、鼻、直肠、肠胃外、舌下、经皮、经粘膜(如舌下、舌、(经)口腔、(经)尿道、阴道(如,经-和环阴道地)、鼻(内)、和(经)直肠)、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内、鞘内、皮下、肌内、皮内、动脉内、静脉内、支气管内、吸入、颅内和局部施用。

[0184] 合适的组合物和剂型包括例如片剂、胶囊剂、囊片、丸剂、软胶囊(gelcap)、含片、分散剂、悬浮剂、溶液、糖浆、颗粒剂、珠、经皮贴剂、凝胶、粉剂、粒剂、乳浆剂(magmas)、锭剂、乳膏剂、糊剂、膏药、洗剂、盘剂、栓剂、经鼻或口服施用的液体喷雾剂、用于吸入的干粉或气雾制剂、用于膀胱内施用的组合物和制剂等。应当理解,可用于本发明的制剂和组合物不限于本文所述的特定制剂和组合物。

[0185] 口服施用

[0186] 对于口服应用,特别合适的是片剂、糖衣丸、液体、滴剂、栓剂或胶囊、囊片和软胶囊。其他适合口服施用的制剂包括但不限于粉末或颗粒制剂、水性或油性悬浮液、水性或油性溶液、糊剂、凝胶剂、牙膏、漱口剂、包衣剂、口服冲洗剂或乳液。预期用于口服用途的组合物可以根据本领域已知的任何方法来制备,并且这种组合物可以包含一种或多种选自适合用于制造片剂的惰性、无毒的药物赋形剂的药剂。这样的赋形剂包括例如惰性稀释剂,例如乳糖;制粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉;粘结剂,例如淀粉;和润滑剂,例如硬脂酸镁。

[0187] 片剂可以是非包衣的,或其也可以使用已知的方法进行包衣,以实现在对象的胃肠道中延迟崩解,从而提供活性成分的缓释和吸收。举例来说,可以使用诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的材料来包衣片剂。进一步举例来说,片剂可以使用美国专利序号4,256,108;4,160,452;和4,265,874中所述的方法进行包衣,以形成渗透控制释放片剂。片剂可进一步包含甜味剂、调味剂、着色剂、防腐剂或这些的一些组合,以提供药学上简练且可口的制品。

[0188] 包含活性成分的硬胶囊可以使用生理上可降解的组合物例如明胶来制备。这种硬胶囊包含活性成分,并且可以进一步包含另外的成分,其包括例如惰性固体稀释剂,例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土。

[0189] 包含活性成分的软明胶胶囊可以使用生理上可降解的组合物例如明胶来制备。这

样的软胶囊包含活性成分,其可以与水或油介质如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0190] 对于口服施用,本发明的化合物可以通过常规方法与药学上可接受的赋形剂例如粘结剂;填料;润滑剂;崩解剂;或湿润剂制备的片剂或胶囊剂形式。如果期望,片剂可以使用合适的方法和包衣材料进行包衣,包衣材料诸如可从Colorcon, West Point, Pa. 获得的OPADRY™膜包衣系统(如,OPADRY™OY Type、OYC Type、Organic Enteric OY-PTYPE、Aqueous Enteric OY-A Type、OY-PM Type和OPADRY™White, 32K18400)。

[0191] 用于口服施用的液体制品可以是溶液、糖浆或悬浮液的形式。液体制品可以通过常规手段与药学上可接受的添加剂如悬浮剂(如,山梨糖醇糖浆、甲基纤维素或氢化食用脂肪);乳化剂(如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水性载体(如,杏仁油、油性酯或乙醇);和防腐剂(如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)制备。适用于口服施用的本发明药物组合物的液体制剂可以以液体形式或旨在使用前用水或另一种合适的载体重构的干燥产物的形式制备、包装和出售。

[0192] 包含活性成分的片剂可以例如通过将活性成分任选地与一种或多种其他成分一起压缩或模制来制备。可以通过在合适的装置中将自由流动形式的活性成分如粉末或颗粒制品任选地与一种或多种粘结剂、润滑剂、赋形剂、表面活性剂和分散剂一起压缩来制备。模制片剂可以通过在合适的装置中模制活性成分、药学上可接受的载体和至少足以润湿混合物的液体的混合物来制备。用于制造片剂的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、制粒剂和崩解剂、粘结剂和润滑剂。已知的分散剂包括但不限于马铃薯淀粉和淀粉羟乙酸钠。已知的表面活性剂包括但不限于月桂基硫酸钠。已知的稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、乳糖、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙和磷酸钠。已知的制粒剂和崩解剂包括但不限于玉米淀粉和藻酸。已知的粘结剂包括但不限于明胶、阿拉伯胶、预凝胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮和羟丙基甲基纤维素。已知的润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、二氧化硅和滑石。

[0193] 制粒技术在制药领域是众所周知的,用于改性活性成分的起始粉末或其他颗粒材料。通常将粉末与粘结剂材料混合成较大的永久性自由流动的附聚物或颗粒,称为“制粒”。例如,使用溶剂的“湿法”制粒工艺的特征通常在于,将粉末与粘结剂材料组合并在一定条件下用水或有机溶剂润湿,导致形成湿的颗粒状物质,然后必须将溶剂由其蒸发。

[0194] 熔融制粒通常在于使用在室温下为固体或半固体的材料(即具有相对较低的软化或熔点范围),以在基本上没有添加水或其他液体溶剂的情况下促进粉末或其他材料的制粒。当加热到熔点范围内的温度时,低熔点固体液化以充当粘结剂或制粒介质。液化的固体将其自身散布在与之接触的粉末状材料的表面上,并在冷却后形成固体颗粒状物质,其中将初始物质粘结在一起。然后将所得的熔融物制粒提供给压片机或将其封装以制备口服剂型。熔融制粒通过形成固体分散体或固溶体来改善活性物质(即药物)的溶解速率和生物利用度。

[0195] 美国专利号5,169,645公开了具有改善的流动性能的可直接压缩的含蜡颗粒。当蜡在熔融体中与某些流动改善添加剂混合,然后将混合物冷却并制粒时,可得到颗粒。在某些实施方式中,只有蜡本身在蜡(一种或多种)和添加剂(一种或多种)的熔融组合中熔融,而在其他情况下,蜡(一种或多种)和添加剂(一种或多种)都将熔融。

[0196] 本发明还包括多层片剂,其包括提供延迟释放一种或多种在本发明方法中有用的

化合物的层,和提供立即释放一种或多种在本发明方法中有用的化合物的进一步的层。使用蜡/pH敏感性的聚合物混合物,可以获得胃不溶性组合物,其中包埋了活性成分,这确保了其延迟释放。

[0197] 肠胃外施用

[0198] 如本文所使用,药物组合物的“肠胃外施用”包括特征在于物理破坏对象组织和通过组织中的破口 (breach) 来施用药物组合物的任何施用途径。因此,肠胃外施用包括但不限于通过注射组合物,通过手术切口施加组合物,通过穿透组织的非手术伤口施加组合物等施用药物组合物。特别地,考虑肠胃外施用包括但不限于皮下、静脉内、腹膜内、肌内、胸骨内注射和肾透析输注技术。

[0199] 适用于肠胃外施用的药物组合物的制剂包含与药学上可接受的载体例如无菌水或无菌等渗盐水组合的活性成分。这样的制剂可以以适合于弹丸施用或连续施用的形式制备、包装或出售。可注射制剂可以以单位剂型例如在含有防腐剂的安瓿或多剂量容器中制备、包装或出售。用于肠胃外施用的制剂包括但不限于悬浮液、溶液、在油性或水性载体中的乳剂、糊剂和可植入的缓释或可生物降解的制剂。这样的制剂可以进一步包含一种或多种另外的成分,其包括但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的制剂的一个实施方式中,以干燥(即粉末或颗粒)形式提供活性成分,以使用合适的载体(例如无菌无热原的水)进行重构,然后肠胃外施用该重构的组合物。

[0200] 药物组合物可以以无菌可注射的水性或油性悬浮液或溶液的形式制备、包装或出售。该悬浮液或溶液可以根据已知技术进行配制,并且除了活性成分之外,还可以包含另外的成分,例如本文所述的分散剂、湿润剂或悬浮剂。例如,可以使用无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(诸如水或1,3丁二醇)制备此类无菌可注射的制剂。其他可接受的稀释剂和溶剂包括但不限于林格氏溶液、等渗氯化钠溶液和固定油,例如合成甘油单酯或甘油二酯。有用的其他可肠胃外施用的制剂包括那些包含以微晶形式、在脂质体制品中或作为可生物降解的聚合物系统的组分的活性成分的制剂。用于缓释或植入的组合物可以包含药学上可接受的聚合物或疏水材料,例如乳液、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0201] 另外的施用形式

[0202] 本发明的另外的剂型包括如在美国专利号6,340,475、6,488,962、6,451,808、5,972,389、5,582,837和5,007,790中描述的剂型。本发明的另外的剂型还包括如在美国专利申请号20030147952、20030104062、20030104053、20030044466、20030039688和20020051820中描述的剂型。本发明的另外的剂型还包括如在PCT申请号WO 03/35041、WO 03/35040、WO 03/35029、WO 03/35177、WO 03/35039、WO 02/96404、WO 02/32416、WO 01/97783、WO 01/56544、WO 01/32217、WO 98/55107、WO 98/11879、WO 97/47285、WO 93/18755和WO 90/11757中描述的剂型。

[0203] 控释制剂和药物递送系统

[0204] 可以使用常规技术来制备本发明药物组合物的控释或缓释制剂。在一些情况下,待使用的剂型可以使用例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、凝胶、可渗透膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体或微球或其组合被提供为缓慢释放或控制释放其中一种或多种活性成分,从而以不同比例提供期望释放曲线。可以容易地选择本领域普通技术人员已知的合适的控释制剂,包括本文所述的那些,以与本发明的药物组合物一起使用。因此,本发

明包括适于口服施用的单一单位剂型,例如适于控释的片剂、胶囊、软胶囊和囊片。

[0205] 大多数控释药物产品的共同目标是改善药物疗法超过其非控制对应物所实现的。理想地,在医学治疗中使用最佳设计的控释制品的特征在于,在最短的时间内使用最少的药物来治愈或控制症状。控释制剂的优势包括药物活性延长、给药频率降低和患者依从性提高。另外,控释制剂可用于影响作用的开始时间或其他特征,例如药物的血液水平,因此可影响副作用的发生。

[0206] 大多数控释制剂被设计成最初释放立即产生期望治疗效果的一定量的药物,并逐渐和连续释放其他量的药物以在延长的时间段内保持该水平的治疗效果。为了维持药物在体内的这种恒定水平,必须以一定的速率从剂型中释放药物,其将替代被代谢和从体内排出的药物的量。

[0207] 活性成分的控制释放可以通过各种诱导物来刺激,例如pH、温度、酶、水或其他生理条件或化合物。在本发明的上下文中,术语“控释组分”在本文中定义为促进活性成分的控制释放的一种或多种化合物,并包括但不限于聚合物、聚合物基质、凝胶、可渗透膜、脂质体或微球或它们的组合。

[0208] 在某些实施方式中,本发明的制剂可以是但不限于短期、快速补偿以及受控的例如缓释、延迟释放和脉动释放制剂。

[0209] 术语缓释在其常规意义上使用,用来指在延长的时间段内逐渐释放药物的药物制剂,尽管不必须,但其可导致在延长的时间段内药物的血液水平基本恒定。该时间段可以长达一个月或更长,并且应该是比以弹丸形式施用的相同量的药剂更长地释放。

[0210] 为了缓释,可以将化合物与合适的聚合物或疏水材料一起配制,所述聚合物或疏水材料为化合物提供缓释性质。因此,用于本发明方法的化合物可以以微粒的形式施用,例如通过注射,或者以晶片或盘剂的形式通过植入施用。

[0211] 在本发明的优选实施方式中,使用缓释制剂将本发明的化合物单独或与另一种药剂组合施用至患者。

[0212] 术语延迟释放在本文中以其常规含义使用,用来指在药物施用后的一些延迟后提供药物的初始释放的药物制剂,并且尽管不必须,但其包括约10分钟上至约12小时的延迟。

[0213] 术语脉动释放在本文中以其常规含义使用,用来指以药物施用后产生药物脉冲血浆分布的方式提供药物释放的药物制剂。

[0214] 术语立即释放以其常规含义使用,用来指在药物施用后立即提供药物释放的药物制剂。

[0215] 如本文所使用,短期指药物施用后至多且包括约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟的任意时间段,以及药物施用后其任意或所有整个或部分增量。

[0216] 如本文所使用,快速补偿指药物施用后至多且包括约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟的任意时间段,以及其任意或所有整个或部分增量。

[0217] 仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到或能够确定与本文所述的具体过程、实施方式、权利要求和实施例的许多等同方案。这样的等同方案被认为在本发明的范围内,并由所附的权利要求书覆盖。例如,应该理解的是,利用本领域公认的替代方案并且仅使用

常规实验对反应和测定条件进行的修改在本申请的范围內。

[0218] 应当理解,本文中无论在何处提供数值和范围,这些数值和范围所涵盖的所有数值和范围都意在涵盖在本发明的范围内。此外,本申请还考虑了落入这些范围内的所有值以及该值范围的上限或下限。

[0219] 以下实施例进一步说明了本发明的方面。然而,它们决不是对本文所述的本发明的教导或公开内容的限制。

[0220] 实施例

[0221] 现在参考以下实施例描述本发明。提供这些实施例仅出于说明的目的,并且本发明不限于这些实施例,而是涵盖由于本文提供的教导而显而易见的所有变化。

[0222] 材料和方法:

[0223] 除非另有说明,否则所有起始原料均购自商业供应商且未经纯化使用。

[0224] 本文中使用的如下来源:

[0225] 抗体:抗-FGFR1抗体,兔多克隆抗体(Bae et al.,2009,Cell 138:514-524);抗- β -Klotho抗体,R&D Systems(Ref.AF5889);抗-磷酸酪氨酸4G10,Millipore,D5-1050。

[0226] 细菌和病毒株:BL21-Gold(DE3)感受态细胞,Agilent Technologies(Ref.230132)。

[0227] 化学品、肽和重组蛋白质:DMEM,Thermo Fisher(Ref.11965092);胎牛血清,Thermo Fisher(Ref.10437-028);青霉素-链霉素,Thermo Fisher(Ref.15140-122);遗传霉素(Geneticin),G-418,AmericanBio(Ref.AB05058-00020);脂转染胺2000,Thermo Fisher(Ref.11668019);潮霉素B,Thermo Fisher(Ref.10687010);完整蛋白酶抑制剂混合物,Roche(Ref.11836145001);苦马豆素(Swainsonine),Cayman Chemical(Ref.16860);硫酸卡那霉素,Americanbio(Ref.AB01100-00010);氨苄青霉素,钠盐,Americanbio(Ref.AB00115-00010);异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),Americanbio(Ref.AB00841-00010);PEG 1,000,Hampton Research(Ref.HR2-523);PEG 4,000,Hampton Research(Ref.HR2-529)。

[0228] 细胞系:HEK293 EBNA,ATCC(Ref.CRL-10852);表达WT-FGFR1的L6成肌细胞(Bae et al.,2009,Cell 138:514-524);表达WT-FGFR1的L6成肌细胞(Bae et al.,2009,Cell138:514-524)。

[0229] 重组DNA:pCEP4载体,Thermo Fisher(Ref.V04450);pBabe载体,AddGene;pET28b载体,Novagen(Ref.69864-3);pGEX-4T-1载体,GE Healthcare(Ref.28-9545-49)。

[0230] 软件和算法:HKL2000;Otwinowski&Minor,1997,Methods Enzymol.276:307-326(www dot hklxray dot com);XDS,Kabsch,2010,Xds.Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66:125-132(xds dot mpimfheidelberg dot mpg dot de);Phenix,Adams et al.,2010,Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66:213-221(www dot phenixonline dot org);PHASER,McCoy et al.,2007,J.Appl.Crystallogr.40:658-674(www dot ccp4 dot ac dot uk);Coot,Emsley et al.,2010,Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66:486-501(www2 dot mrcmb dot cam dot ac dot uk/personal/pemsley/coot);PyMol,Schrödinger LLC(www dot pymol dot org);MO.Affinity Analysis,NanoTemper(Ref.MO-S001A)。

[0231] 其他:Hyperflask M, Corning (Ref.10030);EmultiFlex-C3, Avestin (Ref.EmultiFlex-C3);Ni-NTA琼脂糖, Qiagen (Ref.30210);谷胱甘肽琼脂糖凝胶4B, GE Healthcare (Ref.17-0756-01);Rec-蛋白A-琼脂糖凝胶4B, Thermo Fisher (Ref.101142);MonolithNT.115Pico Instrument, NanoTemper (Ref.M0-G006);Mosquito Crystal, TTP Labtech (Ref.Mosquito Crystal);Rock Imager 1000, Formulatrix (Ref.Rock Imager 1000)。

[0232] 质粒构建:

[0233] 编码人 β -Klotho (KLB) 的氨基酸残基30-983 (sKLB) 的cDNA区域与烟草蚀刻病毒 (TEV) 蛋白酶切割位点和四个Gly残基的连接体一起扩增。将得到的序列亚克隆到修饰的pCEP4载体 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 中, 该载体包含人IgG1的Fc区的序列。通过将全长KLB的基因与HA标签序列一起亚克隆到pBABE载体中, 生成了C末端HA标签的KLB的表达载体。通过以下标准定点诱变方案, 使用含有WT C末端HA标签的KLB的质粒, 生成KLB突变体的所有质粒。

[0234] 使用哺乳动物细胞表达系统的蛋白质表达:

[0235] 将HEK293-EBNA细胞在含5%CO₂的潮湿培养箱中于37℃下在含有10%胎牛血清 (FBS)、100U/mL青霉素-链霉素和250μg/mL G-418的DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) 中培养。用脂转染胺2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 将质粒转染到HEK293-EBNA细胞中, 并用200μg/mL潮霉素B (Thermo Fisher Scientific Inc.) 处理2-3周进行选择。在Hyperflasks (Corning Inc.) 中扩展稳定表达sKLB-Fc的细胞, 当细胞融合度达到约70%时, 将培养基改为含5%FBS的DMEM。7天后, 以5,000×g离心并通过0.2μm膜过滤后收集培养基。此外, 将15μM苦马豆素 (Cayman Chemical) 添加到用于制备蛋白质以进行结晶的培养的细胞的培养基中。

[0236] sKLB和KLB_{DI}的纯化:

[0237] 从表达sKLB-Fc的细胞中收获的培养基与重组蛋白A琼脂糖凝胶4B (Thermo Fisher Scientific Inc.) 在4℃下孵育过夜。用50倍柱体积的PBS洗涤树脂, 并用pH为3.5的0.1M甘氨酸-HCl从树脂上洗脱蛋白, 并立即用pH为7.4的0.1M Tris中和。将洗脱的蛋白质与重组TEV蛋白酶在室温下孵育2小时, 以裂解C末端Fc标签, 然后与重组蛋白A琼脂糖凝胶4B在4℃下孵育30分钟, 以去除Fc标签和未消化的蛋白质。然后使用20mM磷酸钠缓冲液 (pH 7.0 (对于sKLB) 或pH 6.5 (对于KLB_{DI})) 将蛋白质进行阳离子交换色谱分析 (Mono S 5/50GL, GE Healthcare), 并使用线性盐梯度纯化。

[0238] 汇集含有sKLB的洗脱级分, 浓缩, 并经历用20mM HEPES、150mM NaCl, pH 7.0预平衡的Superdex 200Increase 10/300GL (GE Healthcare) 尺寸排阻色谱柱。汇集含有sKLB的洗脱级分, 浓缩, 快速冷冻, 并保存在-80℃下直至进一步使用。为了使sKLB结晶, 将两个潜在的N-糖基化位点Asn308和Asn611突变为谷氨酰胺。通过标准的QuikChange定点诱变将突变引入sKLB-Fc质粒。突变体sKLB的表达和纯化与用于WT sKLB的那些相同。

[0239] 重组FGF21、GST-FGF21_{CT}和FGFR_{1c, D2D3}的表达和纯化:

[0240] 编码具有三个突变L126R、P199G和A208E的人FGF21氨基酸29-209的DNA序列经过密码子优化进行大肠杆菌表达并合成 (Blue Heron Biotech, LLC.)。克隆到pET28a载体 (Novagen) 中后, 将质粒转化到BL21-Gold (DE3) 感受态细胞中。使转化体在含有50μg/mL卡

那霉素的LB培养基中生长,并在37℃下以240rpm震荡。当样品的 A_{600} 达到0.6时,在37℃下用1mM IPTG诱导细菌4小时。通过在4℃下以 $5,000 \times g$ 离心收集的细菌细胞沉淀,使用EmulsiFlex-C3匀浆器(Avestin, Inc.)在pH 7.8的20mM磷酸钠缓冲液、500mM NaCl、5%甘油中裂解,然后在4℃下以 $20,000 \times g$ 离心30分钟。在含N末端带有 H_{is6} 标签的FGF21的上清液中补充10mM咪唑,并在4℃下用Ni-NTA琼脂糖(Qiagen)孵育1小时。用20倍柱体积的含有10mM咪唑的裂解缓冲液洗涤树脂,并用含有300mM咪唑的裂解缓冲液从树脂上洗脱蛋白质。将蛋白质溶液注入用pH 7.5的20mM HEPES、900mM NaCl平衡的HiLoad 26/600Superdex 200(GE Healthcare)尺寸排阻色谱柱中。汇集含有FGF21的洗脱级分,浓缩至约1.5mg/mL,快速冷冻,并保存在-80℃直至进一步研究。

[0241] 为了生成GST-FGF21_{CT},将编码FGF21的氨基酸残基169-209的DNA序列克隆到pGEX-4T-1载体(GE Healthcare)中,并将该质粒转化到BL21-Gold(DE3)感受态细胞(Agilent Technologies)中。使转化体在37℃的含100μg/mL氨苄青霉素的LB培养基中生长,直到 A_{600} 达到0.6,然后在37℃下用1mM IPTG诱导4小时。收集细菌细胞,使用EmulsiFlex-C3匀浆器(Avestin, Inc.)在PBS中裂解,并在 $20,000 \times g$ 下于4℃下离心30分钟。将含有GST-FGF21_{CT}的上清液用PBS预平衡的谷胱甘肽琼脂糖凝胶4B(GE Healthcare)在4℃下孵育1小时。用50倍柱体积的PBS洗涤珠,并用pH 7.3的20mM HEPES、150mM NaCl、10mM还原型谷胱甘肽洗脱蛋白质。然后将含有GST-FGF21_{CT}的蛋白质溶液在20mM HEPES、150mM NaCl中进行透析,然后进行快速冷冻并于-80℃下储存。由塔夫茨大学核心实验室(Tufts University Core Facility)合成并纯化了与FGF21的C端区域相对应的肽FGF21_{CT},该肽包含带有两个取代基P199G和A208E的氨基酸残基174-209。FGFR1c的配体结合区在大肠杆菌中表达为不溶级分。如先前所述(Plotnikov et al., 2000, Cell 101:413-424),将蛋白质重折叠和纯化。

[0242] 结晶、X射线衍射数据收集和结构确定:

[0243] 将sKLB与等体积的含14%的PEG4000、0.1M MES, pH 6.0的孔溶液(well solution)混合并使用悬滴蒸汽扩散法平衡10-15天,即可得到棒状晶体。通过将晶体逐渐转移到补充有30%葡萄糖的母液中,然后在液氮中快速冷冻,将晶体冷冻保存。对于与FGF21_{CT}复合的sKLB,将FGF21_{CT}溶于14%的PEG4000、0.1M MES, pH 6.0中,并添加至包含sKLB晶体的液滴中。FGF21_{CT}的添加立即导致大多数晶体变形。

[0244] 将保持完整的晶体逐渐转移到补充有30%葡萄糖和50μM FGF21_{CT}的人工母液中,然后在液氮中快速冷冻。收集X射线衍射数据,(对于sKLB)在加利福尼亚州SLAC国家加速器实验室斯坦福同步加速器辐射光源(Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, CA)的光束线BL-14上和(对于与FGF21_{CT}复合的sKLB)在伊利诺伊州阿贡大学的先进光子源(Advanced Photon Source, Argonne, IL)的24-ID-E下。使用HKL2000(Otwinowski&Minor, 1997, Methods Enzymol. 276:307-326)和XDS(Kabsch, 2010, Xds. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66:125-132)处理衍射数据集。通过用PHASER进行分子置换来计算KLB数据集的初始相(McCoy et al., 2007, J. Appl. Crystallogr. 40:658-674)。

[0245] 使用PHENIX(Adams et al., 2010, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66:213-221)迭代进行精炼,然后使用COOT(Emsley et al., 2010, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66:486-501)进行手动模型建立。至于与FGF21_{CT}复合的sKLB的数据集,

使用sKLB的最终坐标通过分子置换获得初始相信息。sKLB模型的精炼和重建的迭代循环改善了相,这导致FGF21_{CT}的显著电子密度。随后,基于|Fo| - |Fc|图,手动建立FGF21_{CT}模型,然后进行最终的精炼循环。所有包含结构的图都使用PyMOL Molecular Graphics System, Version1.8 (Schrödinger, LLC.) 生成。

[0246] 微尺度热泳 (MST) 测量:

[0247] 所有的MST测量均使用配备Monolith NT.115MST优质涂层毛细管 (Premium Coated Capillary) 的Monolith NT.115Pico仪器 (NanoTemper Technologies) 进行。根据制造商提供的说明,使用Monolith蛋白质标记试剂盒RED-NHS (NanoTemper Technologies) 对纯化的FGF21进行荧光标记。通过在20mM HEPES、150mM NaCl (pH 7.0)、0.05% Tween-20、1mg/mL BSA中,将35nM荧光标记的FGF21 (f1-FGF21) 与一系列浓度范围在0.03nM至1000nM的纯化的sKLB混合,制备FGF21与sKLB的结合亲和力测量的样品。监测每个样品中f1-FGF21的热泳运动 (LED 20%, IR激光器20%), 并针对sKLB的浓度,绘制每个样品的归一化荧光强度 (F_{Norm}) 图,其定义为 $F_{\text{热}}/F_{\text{冷}}$ (其中 $F_{\text{冷}}$ 和 $F_{\text{热}}$ 分别指在IR激光器打开前1s时期和IR激光器打开后29s内平均的荧光强度)。对于竞争性测定,对样品测量了f1-FGF21的热泳,其中f1-FGF21和sKLB混合物的浓度保持恒定,而GST-FGF21_{CT}的浓度在2.1nM至35000nM之间变化。使用制造商提供的MO. 亲和力分析软件 (NanoTemper Technologies) 分析所有数据。

[0248] 基于细胞的活性测定:

[0249] 使稳定共表达WT FGFR1c连同WT β -Klotho或多种 β -Klotho突变体的L6细胞在补充有10% FBS、100U/mL青霉素-链霉素、0.1mg/ml潮霉素和1 μ g/ml嘌呤霉素的DMEM中生长。将细胞在含0.5% FBS的DMEM中饥饿过夜,并在37°C下分别用浓度为5nM和25nM的FGF1或FGF21刺激10分钟。然后将细胞裂解,并用抗-FGFR1抗体进行免疫沉淀,然后进行SDS-PAGE。然后将样品用抗-磷酸酪氨酸 (pTyr) 抗体、抗- β -Klotho抗体或抗-FGFR1抗体进行免疫印迹。

[0250] 量化和统计分析:

[0251] 每次结合亲和力测量均使用独立样品进行三次。

[0252] 实施例1: β -Klotho胞外区的结构

[0253] sKLB的整体结构特征在于两个串联的GH结构域;D1 (氨基酸残基53-507) 和D2 (氨基酸残基521-968), 它们通过非结构化且柔性的连接体连接 (图1A)。由于电子密度低,不能建模包含潜在N-糖基化位点的sKLB结构中的四个环区域:H0和S1之间的环 (残基63-73)、H1b和H1c之间的环 (残基119-125)、S9和H9a之间的环 (残基538-574) 和蛋白质的C末端 (残基968-983)。除C末端外,这些环在sKLB结构中以虚线表示 (图1A)。

[0254] 将人胞质 β -葡萄糖苷酶 (PDB: 2ZOX) 的结构叠加在sKLB结构域的两个GH结构域的每个的结构上,得出D1的C α RMSD为1.08Å, D2的C α RMSD为1.39Å (Krissinel&Henrick, 2004, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60:2256-2268), 这证明了D1和D2都与酶的糖苷水解酶家族1 (GH1) 有很强的相似性 (图2A-2E)。蛋白质的GH1家族通常是通过位于其活性位点的两个保守的谷氨酸介导的双替代机制水解碳水化合物部分之间的糖苷键的酶。在每个sKLB结构域中,两个催化谷氨酸之一被另一个氨基酸替代 (图2C-2E)。D1中的第一个谷氨酸被N241替代,而D2中的第二个谷氨酸被A889替代,这表明 β -Klotho中的GH结构域都不能充当活性糖苷水解酶。每个GH结构域要么丢失其亲核残基 (在D2中), 要么丢失酸/碱催化剂 (在D1中), 使D2成为真正的假糖苷酶,但允许D1可保留与特异性底物形成共价中间体的能力,例

如当用谷氨酰胺代替酸/碱谷氨酸时,在PDB ID 2Z0X中可以看到。使用Dali服务器(Holm&Rosenstrom,2010,Nucleic Acids Res.38:W545-549)的结构比对表明GH1和GH5成员展示与sKLB的每个GH结构域的高结构相似性,这暗示了共同的进化起源。

[0255] 尽管sKLB中GH结构域的整体结构与GH1家族酶非常相似,但两个sKLB GH结构域显示出重要的结构特征,使它们与GH1酶家族区分开。

[0256] D1假底物结合口袋.如本文其它地方所述,除了具有被天冬酰胺替代的酶活性所需的两个谷氨酸之一之外,D1中与GH1家族酶的底物结合区相对应的口袋在很大程度上被短螺旋H6a封闭(图2A和2B)。此外,此区域中对 β -Klotho D1有特异性的螺旋-转角-链(helix-turn-strand)元件(H6a-转角-S6b)(图2A中的绿色)提供了FGF21结合位点的一部分,并且与胞质 β -葡萄糖苷酶的相应区域中的链-螺旋-链元件(图2A中的灰色)非常不同。K-Klotho特有的其他特征包括短螺旋H0(图2A),其从sKLB信号序列(F53)后的第一个氨基酸开始。该螺旋主要通过疏水相互作用与H5a、H6b和S5b相互作用,并且先于无序环,该无序环后是(β/α)8折叠的核心结构元件。E416,D1中剩余的“催化”残基位于底物结合口袋的底部,并且E416的侧链的取向与人胞质 β -葡萄糖苷酶的相应亲核E373残基的侧链的取向相同。

[0257] D2假底物结合口袋.D2中与GH1家族酶中的底物结合口袋相对应的口袋并没有被D2结构域中的 α -螺旋封闭,而是由结晶缓冲液中的MES分子可接近和占据。MES的咪唑环与三个苯丙氨酸F931、F826和F942的芳香环相互作用,这三个苯丙氨酸还在sKLB与其配体的相互作用中起作用。部分由于在S9和H9a之间(氨基酸残基538-574)存在无序区,因此可接近D2口袋,这导致在该结构域中形成了更凹槽状特征,而不是在容纳GH1家族成员的活性位点中的底物的口袋中。GH1家族成员之间的氨基酸序列和该区的长度显著变化。此外,sKLB的有限蛋白水解产生两个大约75kDa和50kDa的片段,这些片段不能通过任何尝试的纯化方法分离。两种降解产物的N末端序列分析表明,切割位点位于S9和H9a之间的无序区内。

[0258] 实施例2:与FGF21_{CT}复合的sKLB的结构

[0259] FGF19和FGF21的C末端尾部(CT)与 β -Klotho结合,而FGF23的CT与 α -Klotho结合。使用各种实验方法来确认FGF21_{CT}与sKLB结合,并采用定量结合研究来确定该结合的解离常数(KD)为43nM。FGF21_{CT}与sKLB的这种高亲和力结合促使与FGF21_{CT}结合的sKLB的晶体结构的确定。合成对应于FGF21氨基酸175-209的FGF21_{CT}肽,其具有P199G和A208E突变以防止降解。将该肽浸入sKLB:Nb914复合物的晶体中,并收集衍射数据至2.6 Å分辨率。

[0260] 使用sKLB的结构作为搜索模型,通过分子置换解出(solve)了该结构(图3A-3E),并显示了对应于横跨sKLB中间的FGF21_{CT}肽的清晰电子密度。精炼后,最终模型(R_{work}/R_{free} 为0.19/0.23)包含来自结合到sKLB的FGF21_{CT}的氨基酸P186至S209(图3C-3E)。FGF21_{CT}结合到跨越sKLB的D1和D2的细长界面上,而对单个结构域的结构没有影响,如覆盖在未配体(unliganded)的sKLB结构上时D1和D2的 α -碳RMSD分别为0.33和0.49Å所判断的。FGF21_{CT}:sKLB结构显示了肽的两个不同区域的两个不同的结合位点。一个(位点1)位于sKLB D1上,另一个(位点2)位于D2中。两个位点的中心之间的距离约为30Å。

[0261] FGF21_{CT}结合位点1.sKLB D1上的位点1主要通过疏水相互作用与FGF21_{CT}的氨基酸P186-V197接合(图3D和4B)。位点1包括由H6a、H7、S6b和H6b之间的环以及S7和H7之间的环在D1上产生的表面。最引人注目的是,与位点1相关联的结合肽配体的区域通过形成数个明确定义的转角(图4B)而采取异常紧凑和刚性的结构,如下所示:

[0262] • D187-V188-G189-S190通过D187的羧基氧与G189的主链氮的氢键以及D176的主链羰基与S190的主链酰胺的氢键形成I型 β -转角(图4B中的橙色)。

[0263] • S190-S191-D192通过S190羟基与D192的主链酰胺的氢键形成ST转角(图4B中的黄色)。

[0264] • D192-P193-L194-S195(图4B中的浅蓝色)通过D192的侧链羧基与M196和V197主链酰胺的氢键和D192主链羰基与S195的主链酰胺的氢键形成I型 β -转角(或类似于Schellman环的Asx转角)。

[0265] 这些连续的转角还支持D187主链酰胺和P193羰基之间的长范围氢键。这些分子内相互作用配合形成了明确限定的结构元件,该结构元件与sKLB进行了多次特异性接触,掩埋了 606 \AA^2 的较大表面积。对于FGF21_{CT}:sKLB相互作用的这一部分,FGF21氨基酸序列似乎限定了如此结构元件,该结构元件停靠在D1表面上,靠近D1和D2相互作用的位置。

[0266] FGF21_{CT}结合位点2.位点2相互作用的性质与位点1形成鲜明对比,其包括通常在蛋白质和短肽之间观察到的一类分子间相互作用的网络(图4C)。在图3D-3E中显示的Ligplot图中总结了各个相互作用。但是,FGF21_{CT}肽的残基200-209伸出到将被糖苷所占据的底物结合位点(如果它是活性的GH1酶,则sKLB的D2将水解其)(图5A-5E)。FGF21_{CT}的这部分(S-Q-G-R-S-P-S-Y-A-S)的序列富含(50%)带有侧链羟基的残基,这表明FGF21的这一区域确实可模仿糖苷底物的可能性。考虑到这些特征,位点2的特征是sKLB中E693的侧链羧基与FGF21_{CT}中S204和S206的羟基之间的相互作用(图5D)。E693对应于两个保守的“催化”谷氨酸之一,并且将在糖苷水解酶的Koshland双置换反应中起一般酸/碱催化剂的作用(而D2中潜在的亲核谷氨酸被丙氨酸替代)。

[0267] FGF21_{CT}的氨基酸198-200,其连接位点1和位点2的配体结合区,与sKLB没有显著接触。因为FGF21的该区域是柔性的,并且即使FGF21结合至sKLB也可能易于进行蛋白水解,所以在非限制性实施方式中,位点1和位点2结合区之间的切割可以代表通过靶向蛋白水解终止FGF21信号传导的机制。

[0268] 实施例3:具有糖苷水解酶活性的酶到内分泌FGF的受体的进化

[0269] 与FGF21_{CT}结合的sKLB的晶体结构揭示了糖苷水解酶的基本框架如何演变成为内分泌FGF的特异性受体。 β -葡萄糖苷酶家族的糖苷水解酶催化二糖以及更长的寡糖的水解,并且与寡糖底物如纤维四糖(*P.polymyxa* BglB, PDB:2Z1S)或纤维戊糖(*O.sativa* BGlu1, PDB:3F5K)复合的 β -葡萄糖苷酶的数种晶体结构已被确定。底物结合的 β -葡萄糖苷酶的晶体结构与FGF21_{CT}复合的sKLB的结构重叠表明,FGF21_{CT}的残基200-209的主链与占据 β -葡萄糖苷酶的催化口袋的寡糖的位置很好的对准(图5A-5C)。如本文其它地方所述,FGF21_{CT}的S204和S206的羟基与sKLB的D2中的催化谷氨酸之间的相互作用方式,以及涉及P205的疏水相互作用,非常让人联想到糖苷水解酶可见的底物相互作用,这表明是假底物类似相互作用(图5D)。在 β -葡萄糖苷酶活性位点上与该催化谷氨酸结合的寡糖底物与结合sKLB的位点2的FGF21的S204-P205-S206基序精确地位于相同位置。另外,与FGF21的P205形成疏水相互作用的sKLB中的残基,即F826、F931和F942,与 β -葡萄糖苷酶中的相应疏水残基很好地对齐。这些出乎意料的相似性表明,糖苷水解酶的底物结合区进化以识别FGF21中模拟S-P-S基序的糖(图5E)。FGF19特异性结合 β -Klotho,并在其C末端含有S211-P212-S213基序,而FGF23(其不结合 β -Klotho)没有这样的序列。

[0270] 实施例4: FGF21/sKLB和sKLB/FGFR1的高亲和力成对形成,但不形成FGF21/FGFR1复合物。

[0271] 使用微尺度热泳或MST(Seidel et al., 2013, methods 59:301-315) 测量FGF21对sKLB的亲和力,其中在sKLB结合后监测溶液中荧光标记的FGF21(f1-FGF21)的热泳运动。拟合归一化的荧光强度产生43.5nM的FGF21与sKLB结合的解离常数(K_D) (图6A)。

[0272] 为了测量FGF21的C末端片段(FGF21_{CT})与sKLB的结合,使用了基于MST的竞争测定法,其中将GST融合的FGF21_{CT}(GST-FGF21_{CT})滴定到恒定的sKLB/f1-FGF21混合物中(图6C)。使用Hill方程拟合由GST-FGF21_{CT}竞争产生的热泳变化,得到IC₅₀值为704nM。sKLB与固定在传感器芯片上的GST-FGF21_{CT}——使用抗GST——结合的基于SPR的测量也得出253nM的 K_D 值,证实FGF21的C末端区域主要负责配体与sKLB的高亲和力结合。

[0273] 然后,使用MST来测量FGF21诱导的FGFR1c刺激所必需的其他相互作用的结合亲和力。使用荧光标记的FGFR1_{CD2D3}获得的MST数据显示,sKLB以约1 μ M的 K_D 值结合FGFR1_{CD2D3}(图6B)。相比之下,即使经典的FGF1以大约1 μ M的 K_D 结合相同的FGFR1_{CD2D3}蛋白,FGF21与FGFR1_{CD2D3}的结合对于使用MST进行精确的 K_D 测定来说仍然太弱($K_D > 10-100\mu$ M)。

[0274] 实施例5: β -Klotho结合能沿FGF21_{CT}的长度分布

[0275] 为了确定FGF21_{CT}与sKLB的结合是由停靠在位点1(D1)的多转角元件还是结合位点2(D2)的假底物决定,在这两个区域均产生突变,并在本文其它地方描述的基于MST的竞争测定中评估了它们对GST-FGF21_{CT}与sKLB结合的影响。首先,测试了预期会破坏FGF21_{CT}中多转角元件的内部结构稳定性的突变(图4B),特别是D192A和P193A突变,这些突变破坏了稳定D192-P193-L194-S195 β -转角的分子内氢键。如所预期的,针对D192A或P193A突变的GSTFGF21_{CT}变体测量的IC₅₀值比针对野生型的IC₅₀值高10-20倍(图6C)。其次,测试了应该破坏FGF21_{CT}的S-P-S假底物区域与 β -Klotho的位点2(D2)之间的中心分子间相互作用的突变(图5D)。如图6D所示,用丙氨酸替代GST-FGF21_{CT}中的S204或S206或Y207导致IC₅₀升高8-10倍。

[0276] 这些数据表明FGF21_{CT}与 β -Klotho的结合涉及FGF21_{CT}中的两个元件,并且通过它们与 β -Klotho中的位点1和位点2的协同结合而介导。此外,结果表明位点1和位点2都必须被占据以维持FGF21_{CT}和 β -Klotho之间的稳定相互作用。晶体结构也表明了这一结论。同时,SPR和/或MST研究表明,由FGF21失去10个C末端氨基酸消除其与 β -Klotho的结合,而由 β -Klotho失去D2消除其与野生型FGF21的结合。因此,仅与位点1或位点2都不结合的FGF21足以稳定与 β -Klotho结合,这表明FGF21/ β -Klotho复合物形成是由多个弱结合事件(主要是与位点1和位点2)的协作介导的。

[0277] 实施例6:使 β -Klotho的FGF21结合界面突变损害受体激活,但不会损害Klotho/FGFR1相互作用

[0278] 研究了 β -Klotho的两个FGF21_{CT}结合位点的突变对转染的L6成肌细胞中FGF21刺激FGFR1激活的能力的影响(图6E-6G)。L6细胞缺乏内源性FGFR和 β -Klotho,但经过工程改造以单独异位表达人FGFR1c或 β -Klotho,或共表达FGFR1c和 β -Klotho(处于匹配水平)。正如预期的,FGF21仅在共表达FGFR1c和 β -Klotho的细胞中刺激FGFR1c酪氨酸磷酸化,而FGF1则将FGFR1c激活至相似水平,而与 β -Klotho的存在无关。D1上的位点1的三个独立突变,独立地用 α -Klotho(其不结合FGF21)中的相应残基代替V392、T431和M435,导致FGFR1c(图6F)酪

氨酸磷酸化的FGF21刺激大大降低。类似地,在D2或位点2的假底物结合位点(Y643、H646、E693、R696、R829或R845)中突变关键氨基酸几乎完全消除了FGFR1c的FGF21诱导的刺激,而使相同细胞中受体的FGF1诱导的刺激未受影响(图6G)。相比之下,突变与FGF21_{CT}配体的两个部分之间的连接体邻接的F849(图6E),对FGF21诱导的受体激活的影响相对较小(图6G),这与本文其它地方讨论的界面的二分性一致。 β -Klotho突变不影响FGFR1c和 β -Klotho之间的相互作用,如通过抗-FGFR1c免疫沉淀物中的其水平评估的(图6F-6G),这表明FGF21必定激活预先存在的FGFR1c/ β -Klotho复合物。

[0279] 实施例7:具有改进的结合和活性的FGF21变体的结构指导工程化

[0280] 由于内分泌FGF在代谢过程的控制中起着重要作用,因此已采用多种方法来开发新的疗法,其保留(并在功效上超过)FGF19和/或FGF21的有益刺激反应,同时将这两种激素引起的副作用最小化。sKLB/FGF21_{CT}复合物结构的检查,连同FGFR1c/ β -Klotho复合物的FGF21激活的分子机制的阐明,为具有优异激素活性的新型内分泌FGF类似物的结构引导工程化提供了新的机会。在某些非限制性实施方式中,可以通过将突变引入FGF21的C末端尾部——这加强与 β -Klotho的相互作用——来增强FGF21的效力。引入L194F突变,以增加与 β -Klotho的位点1中相邻氨基酸的疏水性相互作用。FGF21中的R203也突变为色氨酸,以用 β -Klotho位点2上的 π - π 相互作用代替R203和H646之间的阳离子- π 相互作用。在MST研究中,R203W/L194F突变的FGF21(FGF21_{WF})与sKLB的结合比与野生型FGF21更紧密10倍以上, K_D 为 3.4 ± 1.2 nM(图7A)。此外,FGF21_{WF}显示在共表达 β -Klotho和FGFR1c的L6细胞中同等增强的刺激FGFR1c自磷酸化的能力(图7B)。

[0281] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容通过引用整体并入本文。

[0282] 尽管已经参考特定实施方式公开了本发明,但是显然,本领域的其他技术人员可以设想本发明的其他实施方式和变型而不脱离本发明的真实精神和范围。所附权利要求旨在被解释为包括所有这样的实施方式和等同变型。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 耶鲁大学
 [0003] <120> 治疗或预防内分泌FGF-关联疾病的组合物和方法
 [0004] <130> 047162-7124W01 (00755)
 [0005] <150> US 62/529,215
 [0006] <151> 2017-07-06
 [0007] <160> 3
 [0008] <170> PatentIn version 3.5
 [0009] <210> 1
 [0010] <211> 1044
 [0011] <212> PRT
 [0012] <213> 人工序列
 [0013] <220>
 [0014] <223> β -Klotho
 [0015] <400> 1
 [0016] Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn
 [0019] 20 25 30
 [0020] Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg
 [0021] 35 40 45
 [0022] Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn
 [0023] 50 55 60
 [0024] Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr
 [0025] 65 70 75 80
 [0026] Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val
 [0027] 85 90 95
 [0028] Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His
 [0029] 100 105 110
 [0030] Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser
 [0031] 115 120 125
 [0032] Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile
 [0033] 130 135 140
 [0034] Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro
 [0035] 145 150 155 160
 [0036] Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser
 [0037] 165 170 175
 [0038] Thr Leu Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr

[0039]	180							185							190													
[0040]	Leu	Tyr	His	Trp	Asp	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly												
[0041]	195							200							205													
[0042]	Trp	Lys	Asn	Asp	Thr	Ile	Ile	Asp	Ile	Phe	Asn	Asp	Tyr	Ala	Thr	Tyr												
[0043]	210							215							220													
[0044]	Cys	Phe	Gln	Met	Phe	Gly	Asp	Arg	Val	Lys	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ile	His												
[0045]	225							230							235							240						
[0046]	Asn	Pro	Tyr	Leu	Val	Ala	Trp	His	Gly	Tyr	Gly	Thr	Gly	Met	His	Ala												
[0047]	245							250							255													
[0048]	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Ala	Ala	Val	Tyr	Thr	Val	Gly	His	Asn												
[0049]	260							265							270													
[0050]	Leu	Ile	Lys	Ala	His	Ser	Lys	Val	Trp	His	Asn	Tyr	Asn	Thr	His	Phe												
[0051]	275							280							285													
[0052]	Arg	Pro	His	Gln	Lys	Gly	Trp	Leu	Ser	Ile	Thr	Leu	Gly	Ser	His	Trp												
[0053]	290							295							300													
[0054]	Ile	Glu	Pro	Asn	Arg	Ser	Glu	Asn	Thr	Met	Asp	Ile	Phe	Lys	Cys	Gln												
[0055]	305							310							315							320						
[0056]	Gln	Ser	Met	Val	Ser	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Ala	Asn	Pro	Ile	His	Gly												
[0057]	325							330							335													
[0058]	Asp	Gly	Asp	Tyr	Pro	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Lys	Leu	Phe	Ser	Val	Leu												
[0059]	340							345							350													
[0060]	Pro	Ile	Phe	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	His	Glu	Met	Arg	Gly	Thr	Ala	Asp												
[0061]	355							360							365													
[0062]	Phe	Phe	Ala	Phe	Ser	Phe	Gly	Pro	Asn	Asn	Phe	Lys	Pro	Leu	Asn	Thr												
[0063]	370							375							380													
[0064]	Met	Ala	Lys	Met	Gly	Gln	Asn	Val	Ser	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ala	Leu												
[0065]	385							390							395							400						
[0066]	Asn	Trp	Ile	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Asn	Pro	Arg	Ile	Leu	Ile	Ala	Glu												
[0067]	405							410							415													
[0068]	Asn	Gly	Trp	Phe	Thr	Asp	Ser	Arg	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Thr	Ala												
[0069]	420							425							430													
[0070]	Ile	Tyr	Met	Met	Lys	Asn	Phe	Leu	Ser	Gln	Val	Leu	Gln	Ala	Ile	Arg												
[0071]	435							440							445													
[0072]	Leu	Asp	Glu	Ile	Arg	Val	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ala	Trp	Ser	Leu	Leu	Asp												
[0073]	450							455							460													
[0074]	Gly	Phe	Glu	Trp	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Ile	Arg	Arg	Gly	Leu	Phe	Tyr												
[0075]	465							470							475							480						
[0076]	Val	Asp	Phe	Asn	Ser	Lys	Gln	Lys	Glu	Arg	Lys	Pro	Lys	Ser	Ser	Ala												
[0077]	485							490							495													

[0078]	His	Tyr	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ile	Arg	Glu	Asn	Gly	Phe	Ser	Leu	Lys	Glu
[0079]				500					505					510		
[0080]	Ser	Thr	Pro	Asp	Val	Gln	Gly	Gln	Phe	Pro	Cys	Asp	Phe	Ser	Trp	Gly
[0081]				515				520						525		
[0082]	Val	Thr	Glu	Ser	Val	Leu	Lys	Pro	Glu	Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Pro	Gln
[0083]				530				535						540		
[0084]	Phe	Ser	Asp	Pro	His	Leu	Tyr	Val	Trp	Asn	Ala	Thr	Gly	Asn	Arg	Leu
[0085]	545					550					555					560
[0086]	Leu	His	Arg	Val	Glu	Gly	Val	Arg	Leu	Lys	Thr	Arg	Pro	Ala	Gln	Cys
[0087]					565					570						575
[0088]	Thr	Asp	Phe	Val	Asn	Ile	Lys	Lys	Gln	Leu	Glu	Met	Leu	Ala	Arg	Met
[0089]				580					585						590	
[0090]	Lys	Val	Thr	His	Tyr	Arg	Phe	Ala	Leu	Asp	Trp	Ala	Ser	Val	Leu	Pro
[0091]				595				600						605		
[0092]	Thr	Gly	Asn	Leu	Ser	Ala	Val	Asn	Arg	Gln	Ala	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Arg
[0093]				610				615						620		
[0094]	Cys	Val	Val	Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Ser	Ala	Met	Val	Thr
[0095]	625					630					635					640
[0096]	Leu	Tyr	Tyr	Pro	Thr	His	Ala	His	Leu	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Leu
[0097]					645					650					655	
[0098]	His	Ala	Asp	Gly	Trp	Leu	Asn	Pro	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Phe	Gln	Ala
[0099]				660					665						670	
[0100]	Tyr	Ala	Gly	Leu	Cys	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Trp
[0101]				675				680						685		
[0102]	Ile	Thr	Ile	Asn	Glu	Pro	Asn	Arg	Leu	Ser	Asp	Ile	Tyr	Asn	Arg	Ser
[0103]				690				695						700		
[0104]	Gly	Asn	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ala	Ala	His	Asn	Leu	Leu	Val	Ala	His	Ala
[0105]	705					710					715					720
[0106]	Leu	Ala	Trp	Arg	Leu	Tyr	Asp	Arg	Gln	Phe	Arg	Pro	Ser	Gln	Arg	Gly
[0107]					725					730					735	
[0108]	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Leu	His	Ala	Asp	Trp	Ala	Glu	Pro	Ala	Asn	Pro
[0109]				740					745						750	
[0110]	Tyr	Ala	Asp	Ser	His	Trp	Arg	Ala	Ala	Glu	Arg	Phe	Leu	Gln	Phe	Glu
[0111]				755				760						765		
[0112]	Ile	Ala	Trp	Phe	Ala	Glu	Pro	Leu	Phe	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Pro	Ala
[0113]				770				775						780		
[0114]	Ala	Met	Arg	Glu	Tyr	Ile	Ala	Ser	Lys	His	Arg	Arg	Gly	Leu	Ser	Ser
[0115]	785					790					795					800
[0116]	Ser	Ala	Leu	Pro	Arg	Leu	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Arg	Leu	Leu	Lys	Gly

[0117]		805		810		815
[0118]	Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met					
[0119]		820		825		830
[0120]	His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln					
[0121]		835		840		845
[0122]	Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val					
[0123]		850		855		860
[0124]	Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr					
[0125]	865		870		875	880
[0126]	Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala					
[0127]		885		890		895
[0128]	Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln					
[0129]		900		905		910
[0130]	Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr					
[0131]		915		920		925
[0132]	Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe					
[0133]		930		935		940
[0134]	Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys					
[0135]	945		950		955	960
[0136]	Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys					
[0137]		965		970		975
[0138]	Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val					
[0139]		980		985		990
[0140]	Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu					
[0141]		995		1000		1005
[0142]	Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg					
[0143]		1010		1015		1020
[0144]	Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys					
[0145]		1025		1030		1035
[0146]	Gly Lys Arg Val Val Ser					
[0147]		1040				
[0148]	<210> 2					
[0149]	<211> 216					
[0150]	<212> PRT					
[0151]	<213> 人工序列					
[0152]	<220>					
[0153]	<223> FGF19					
[0154]	<400> 2					
[0155]	Met Arg Ser Gly Cys Val Val Val His Val Trp Ile Leu Ala Gly Leu					

[0156]	1	5	10	15
[0157]	Trp Leu Ala Val	Ala Gly Arg Pro	Leu Ala Phe Ser	Asp Ala Gly Pro
[0158]	20	25	30	
[0159]	His Val His Tyr	Gly Trp Gly Asp	Pro Ile Arg Leu	Arg His Leu Tyr
[0160]	35	40	45	
[0161]	Thr Ser Gly Pro	His Gly Leu Ser	Ser Cys Phe Leu	Arg Ile Arg Ala
[0162]	50	55	60	
[0163]	Asp Gly Val Val	Asp Cys Ala Arg	Gly Gln Ser Ala	His Ser Leu Leu
[0164]	65	70	75	80
[0165]	Glu Ile Lys Ala	Val Ala Leu Arg	Thr Val Ala Ile	Lys Gly Val His
[0166]	85	90	95	
[0167]	Ser Val Arg Tyr	Leu Cys Met Gly	Ala Asp Gly Lys	Met Gln Gly Leu
[0168]	100	105	110	
[0169]	Leu Gln Tyr Ser	Glu Glu Asp Cys	Ala Phe Glu Glu	Glu Ile Arg Pro
[0170]	115	120	125	
[0171]	Asp Gly Tyr Asn	Val Tyr Arg Ser	Glu Lys His Arg	Leu Pro Val Ser
[0172]	130	135	140	
[0173]	Leu Ser Ser Ala	Lys Gln Arg Gln	Leu Tyr Lys Asn	Arg Gly Phe Leu
[0174]	145	150	155	160
[0175]	Pro Leu Ser His	Phe Leu Pro Met	Leu Pro Met Val	Pro Glu Glu Pro
[0176]	165	170	175	
[0177]	Glu Asp Leu Arg	Gly His Leu Glu	Ser Asp Met Phe	Ser Ser Pro Leu
[0178]	180	185	190	
[0179]	Glu Thr Asp Ser	Met Asp Pro Phe	Gly Leu Val Thr	Gly Leu Glu Ala
[0180]	195	200	205	
[0181]	Val Arg Ser Pro	Ser Phe Glu Lys		
[0182]	210	215		
[0183]	<210> 3			
[0184]	<211> 209			
[0185]	<212> PRT			
[0186]	<213> 人工序列			
[0187]	<220>			
[0188]	<223> FGF21			
[0189]	<400> 3			
[0190]	Met Asp Ser Asp	Glu Thr Gly Phe	Glu His Ser Gly	Leu Trp Val Ser
[0191]	1	5	10	15
[0192]	Val Leu Ala Gly	Leu Leu Leu Gly	Ala Cys Gln Ala	His Pro Ile Pro
[0193]	20	25	30	
[0194]	Asp Ser Ser Pro	Leu Leu Gln Phe	Gly Gly Gln Val	Arg Gln Arg Tyr

[0195]	35	40	45
[0196]	Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg		
[0197]	50	55	60
[0198]	Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu		
[0199]	65	70	75
[0200]	Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val		
[0201]	85	90	95
[0202]	Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly		
[0203]	100	105	110
[0204]	Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu		
[0205]	115	120	125
[0206]	Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu		
[0207]	130	135	140
[0208]	His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly		
[0209]	145	150	155
[0210]	Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu		
[0211]	165	170	175
[0212]	Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp		
[0213]	180	185	190
[0214]	Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala		
[0215]	195	200	205
[0216]	Ser		

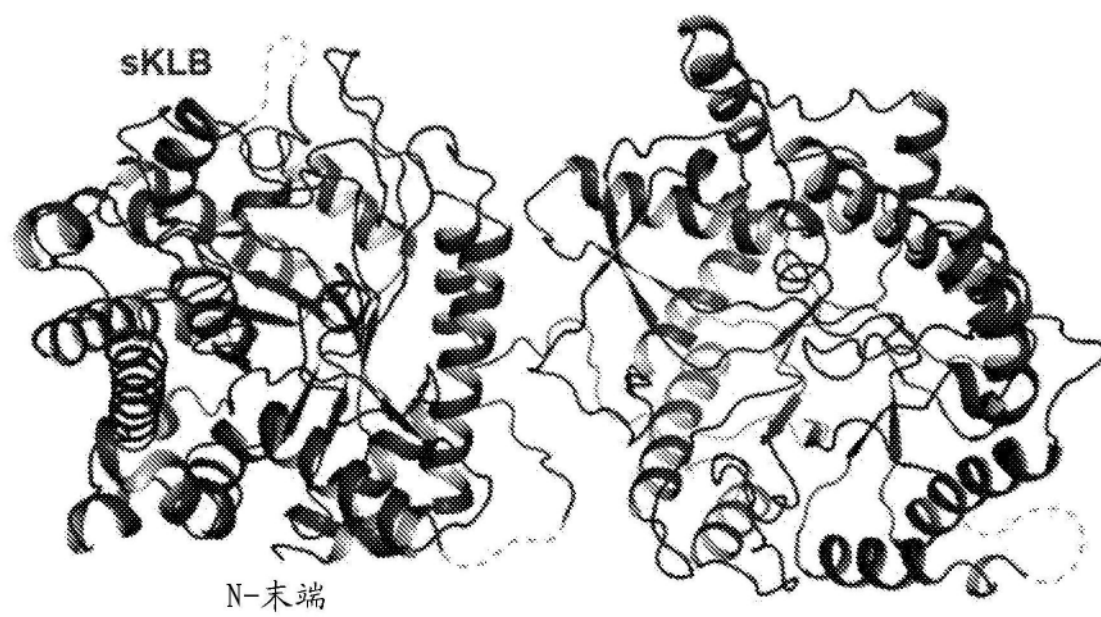


图1A

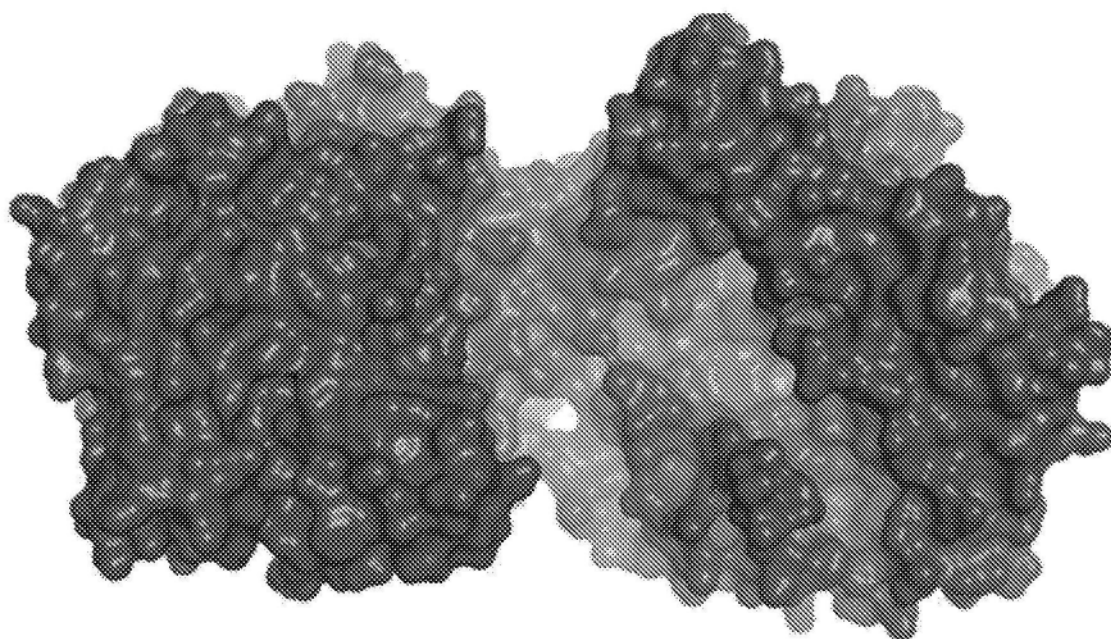


图1B

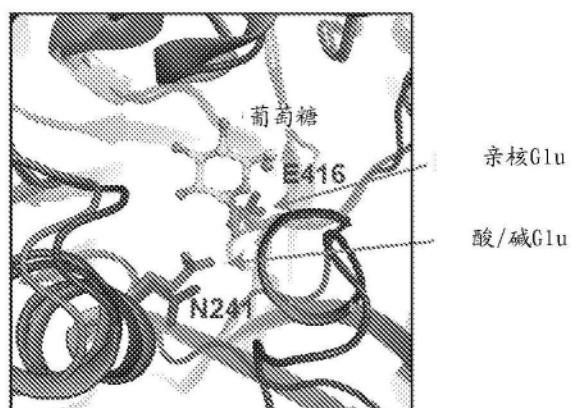
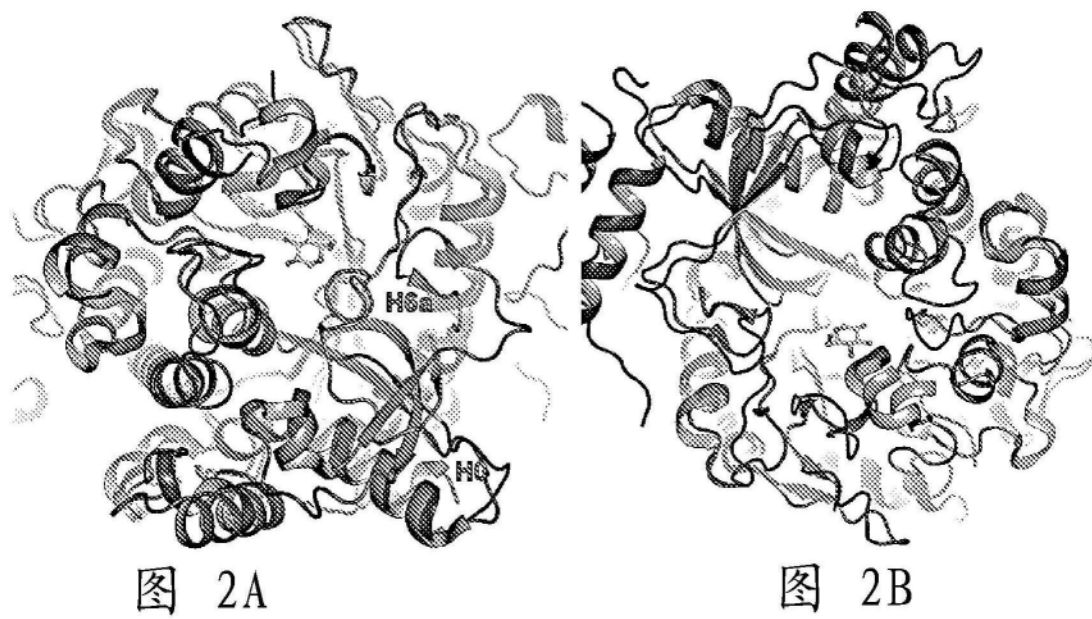


图2C

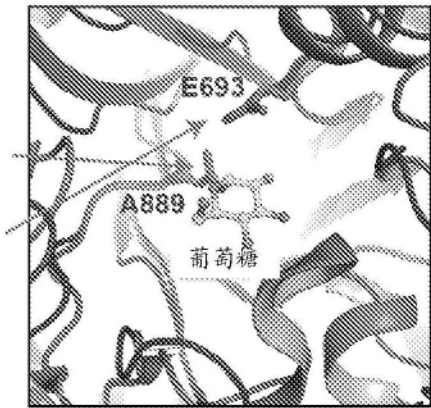


图2D

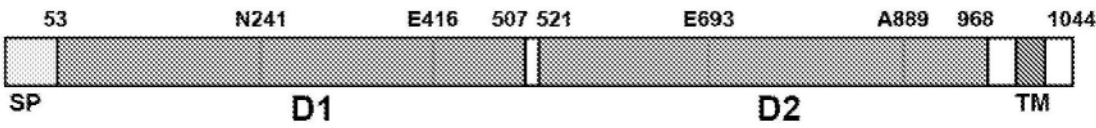


图2E

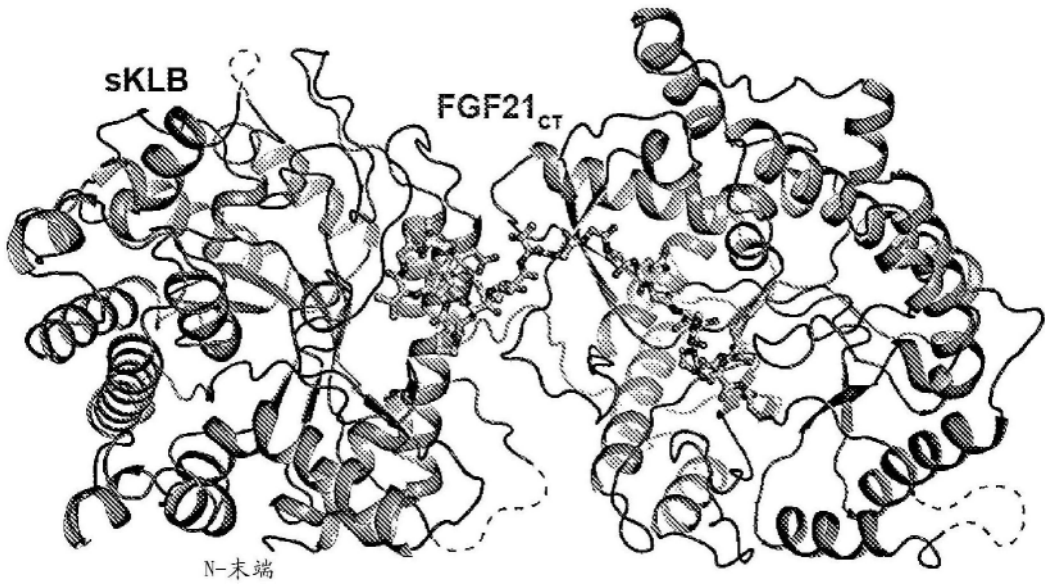


图3A

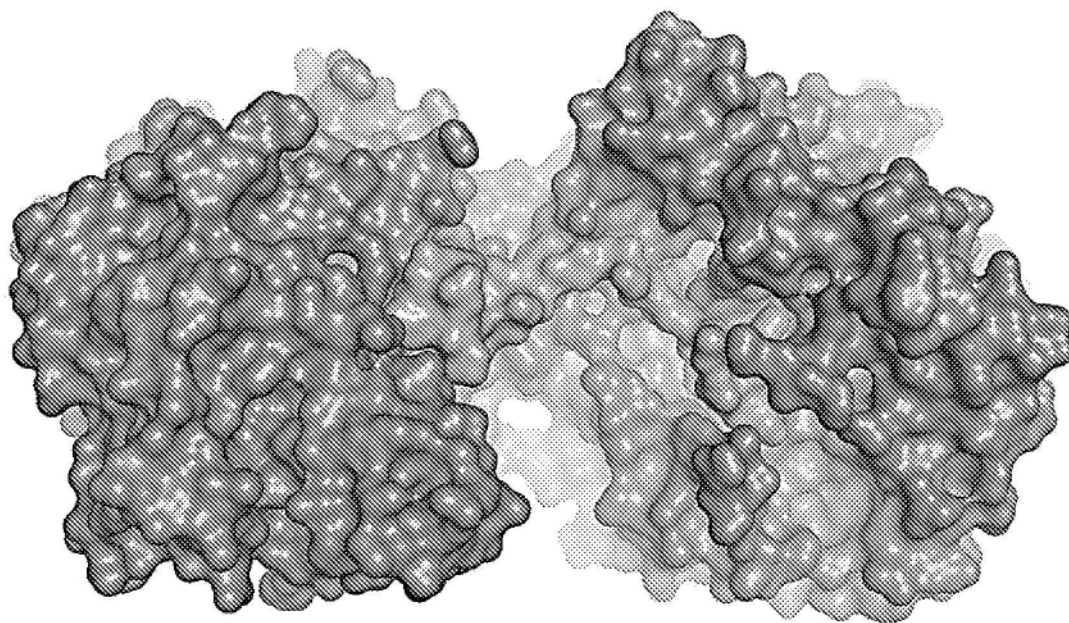


图3B

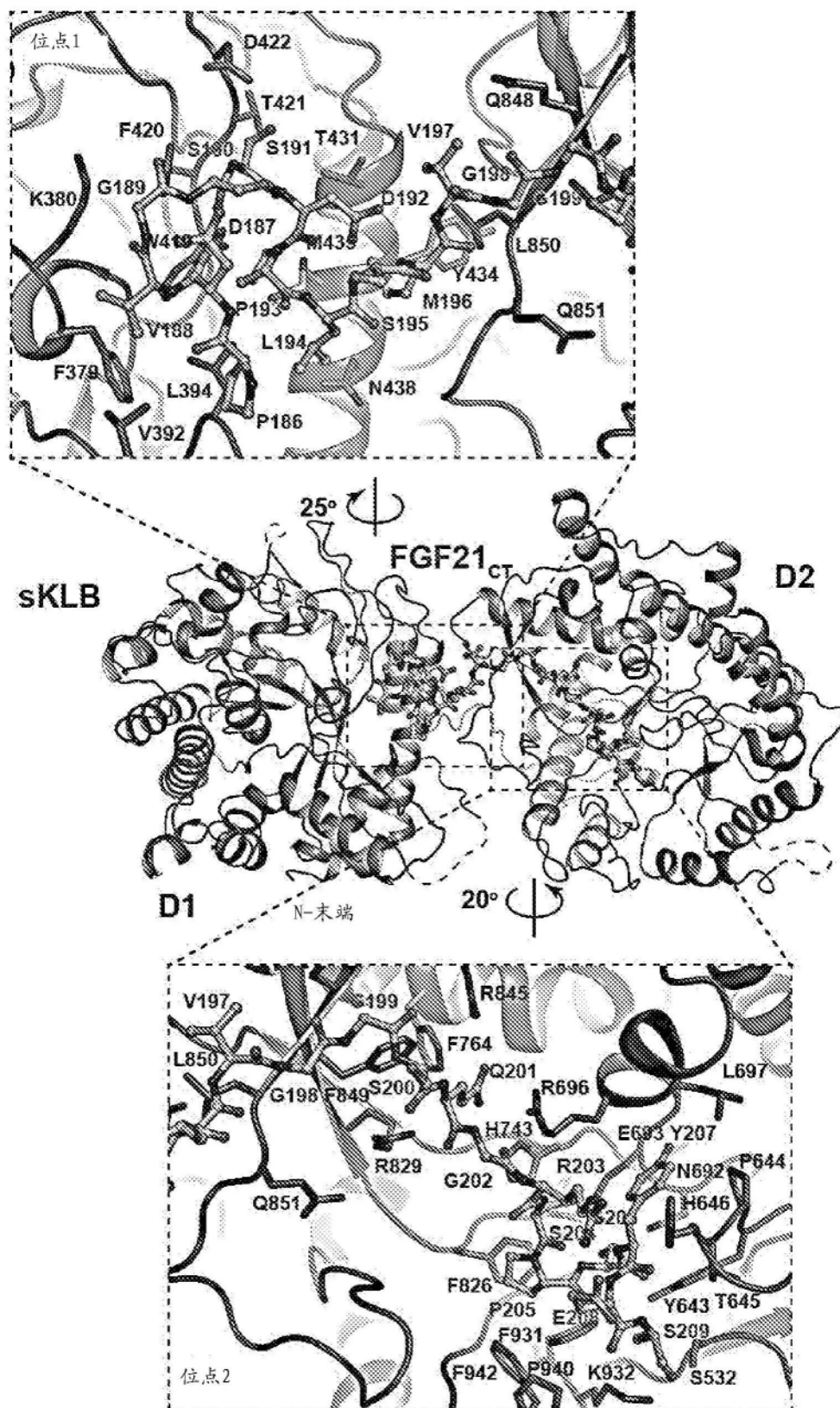


图3C

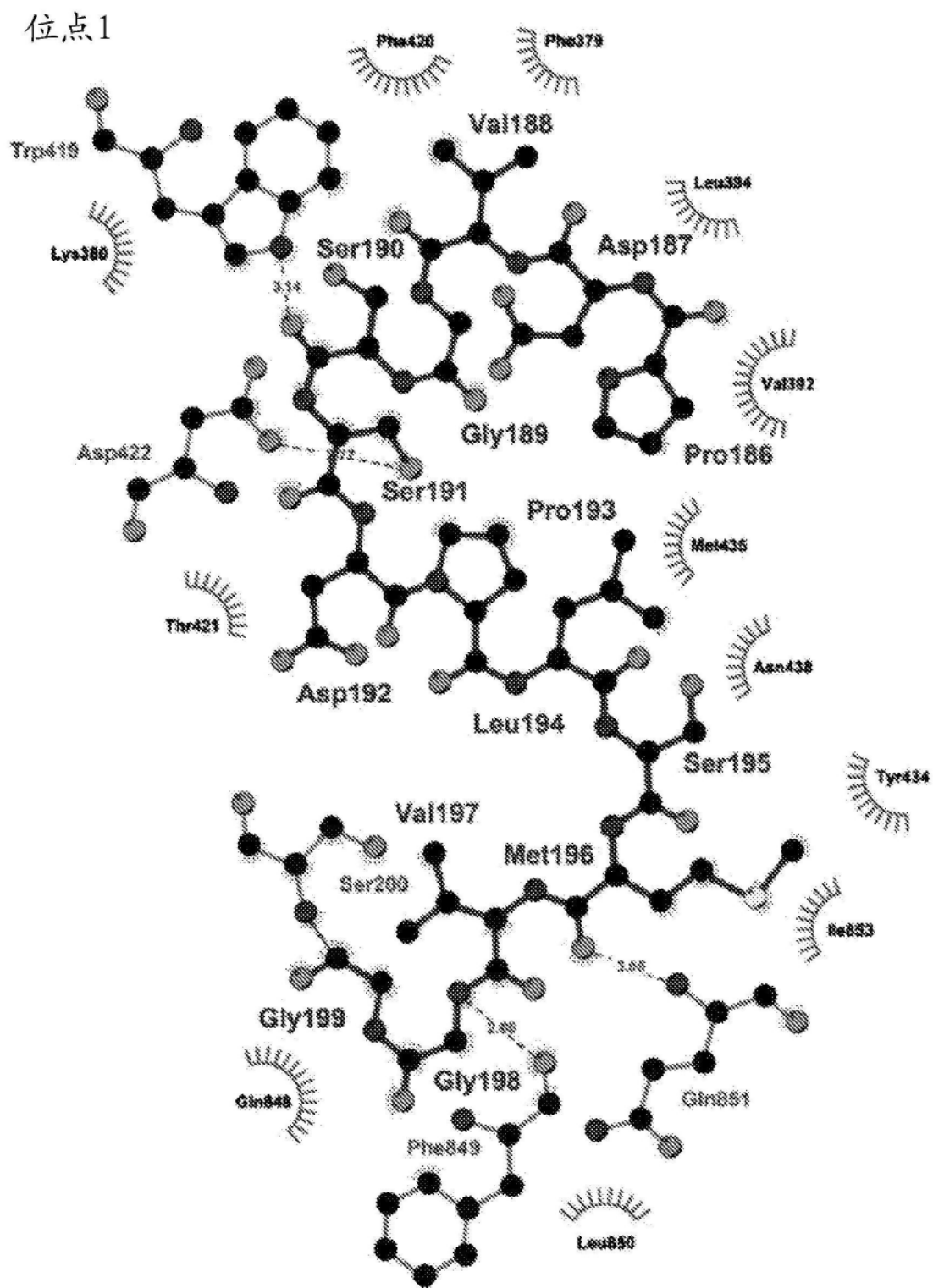


图3D

位点2

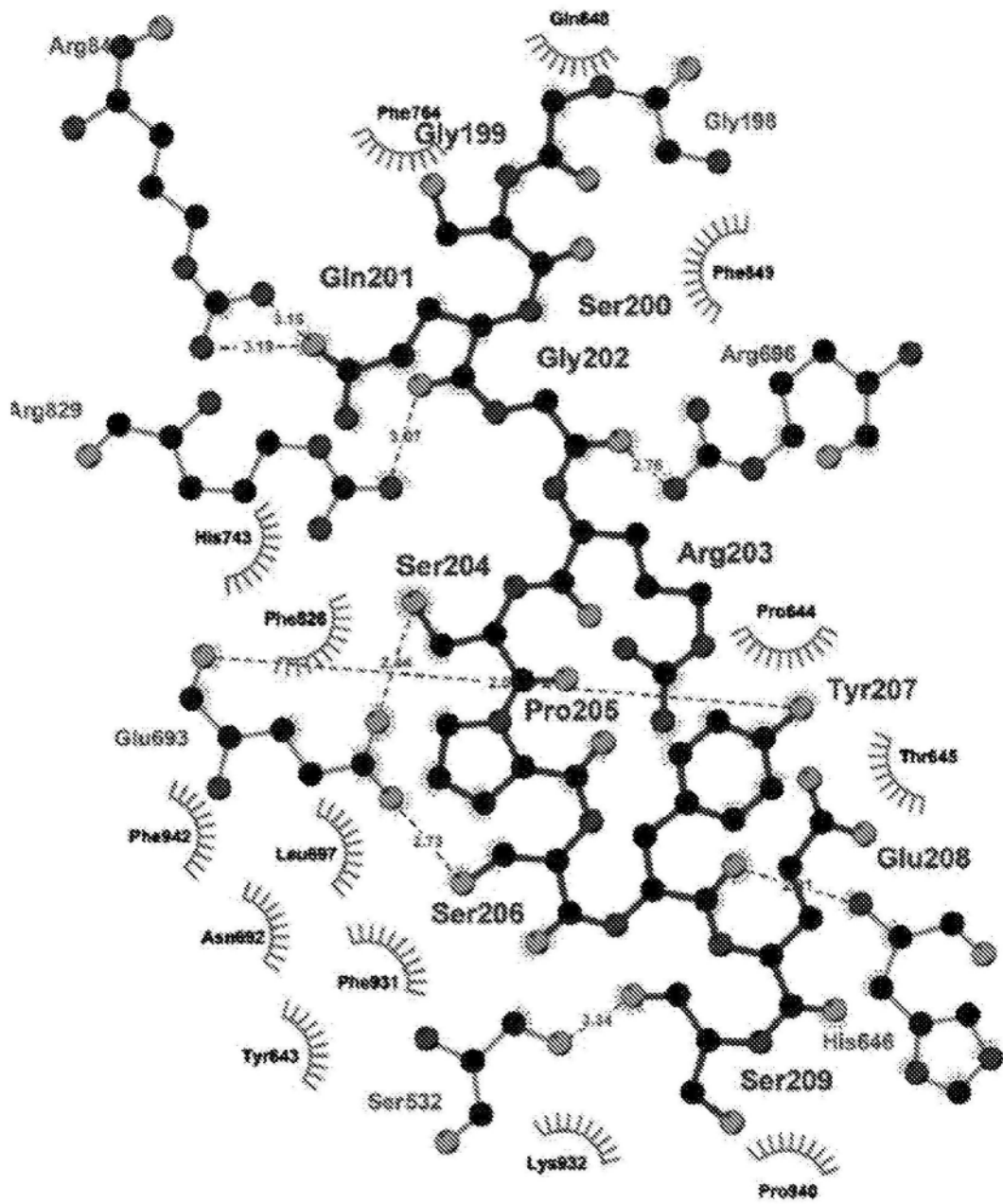


图3E

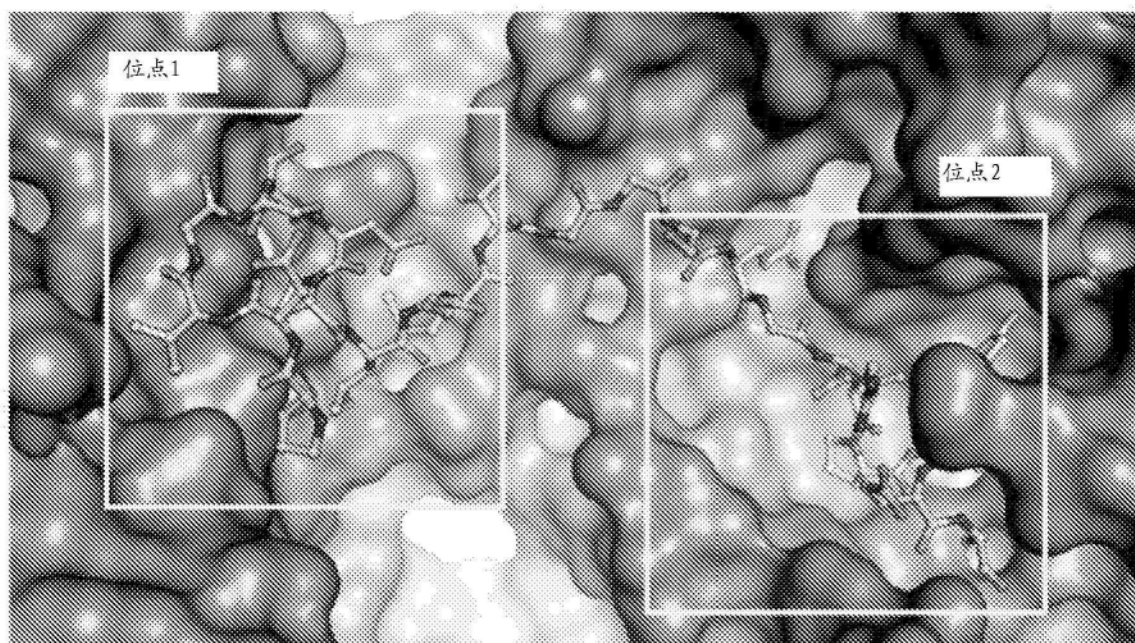


图4A

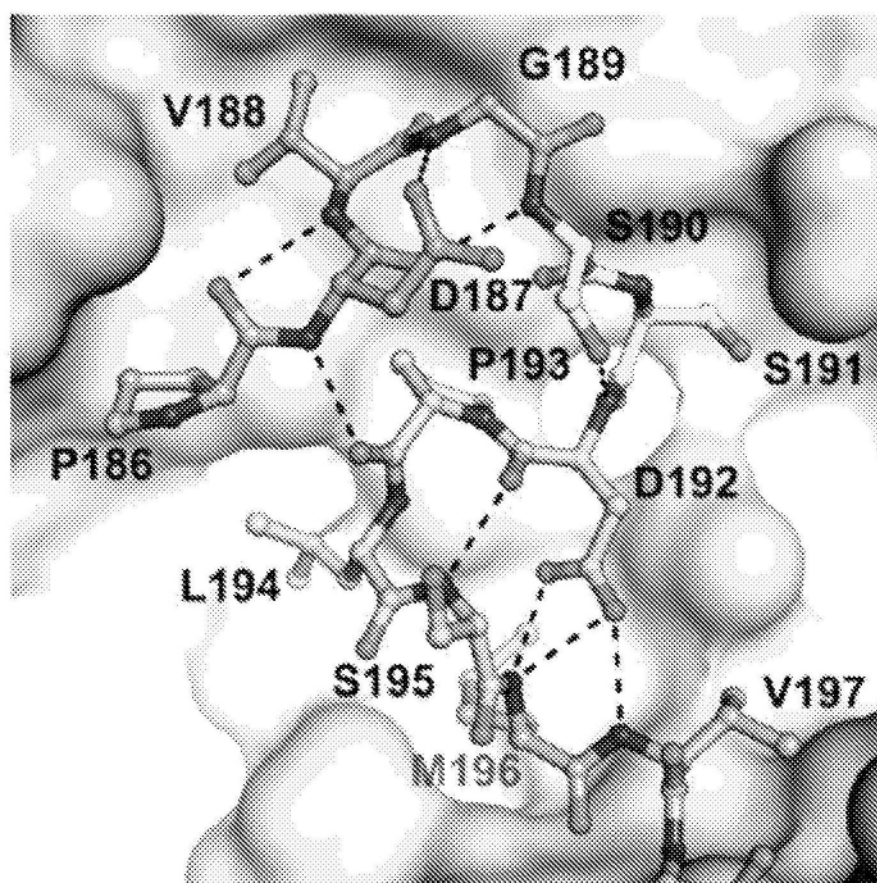


图4B

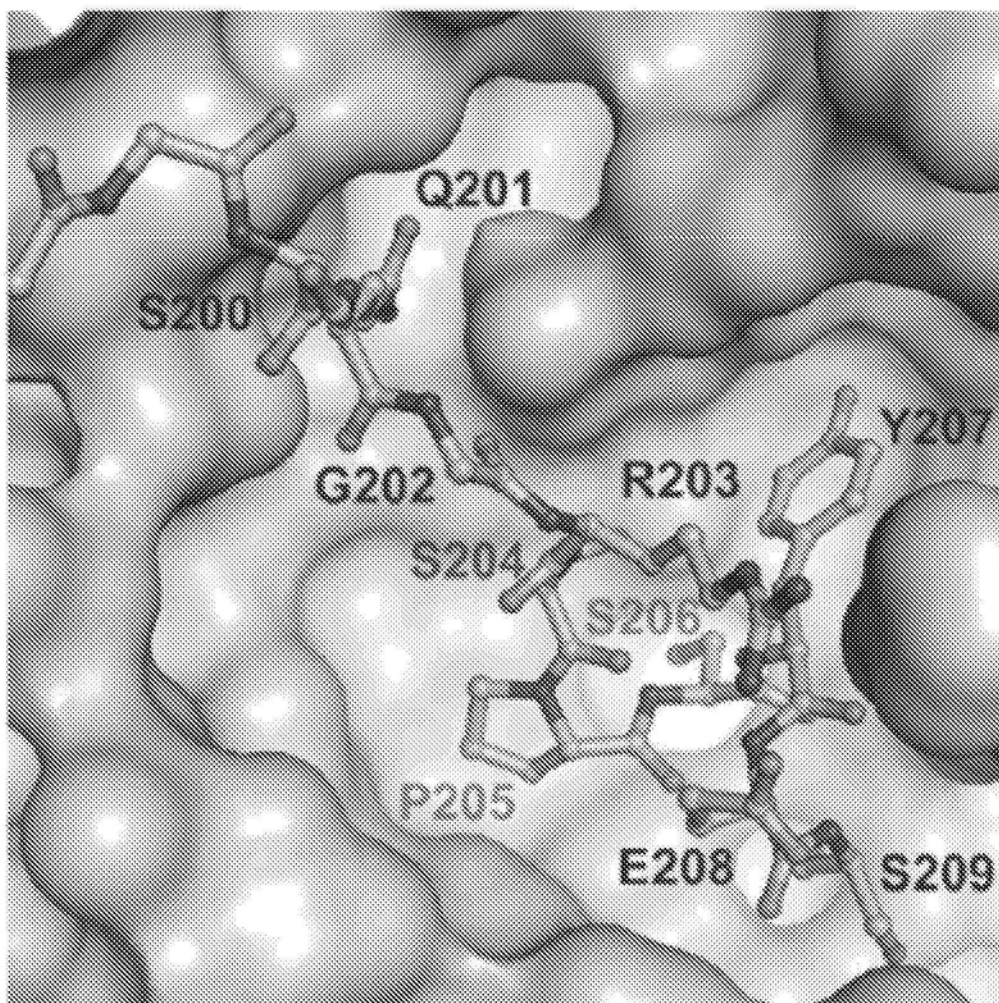


图4C

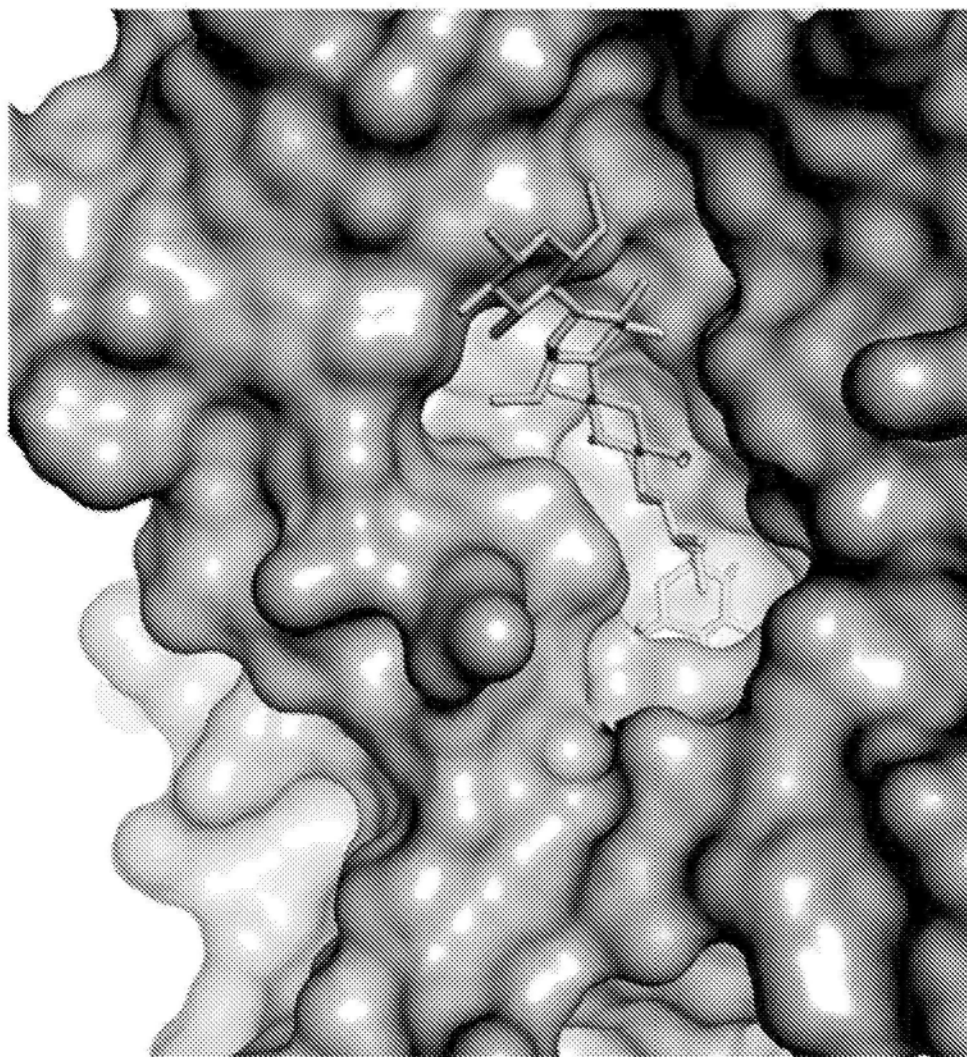


图5A

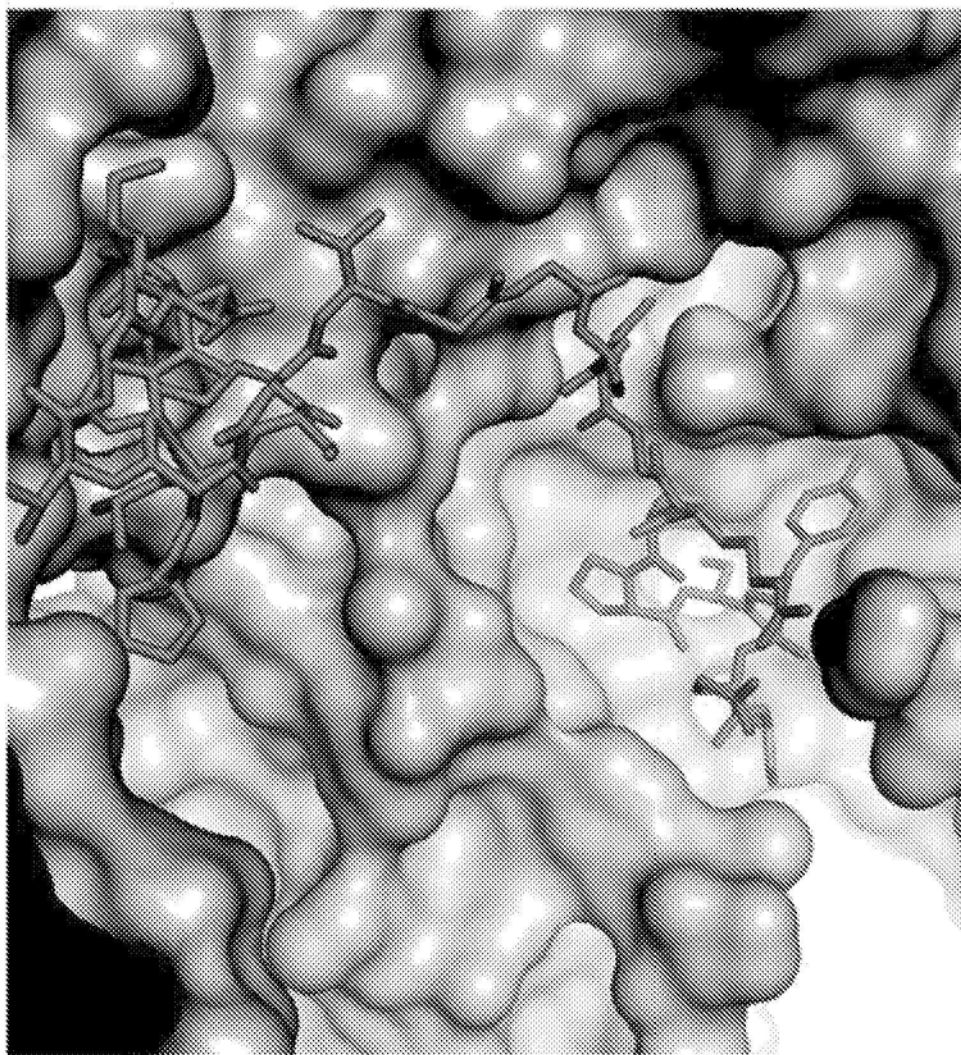


图5B

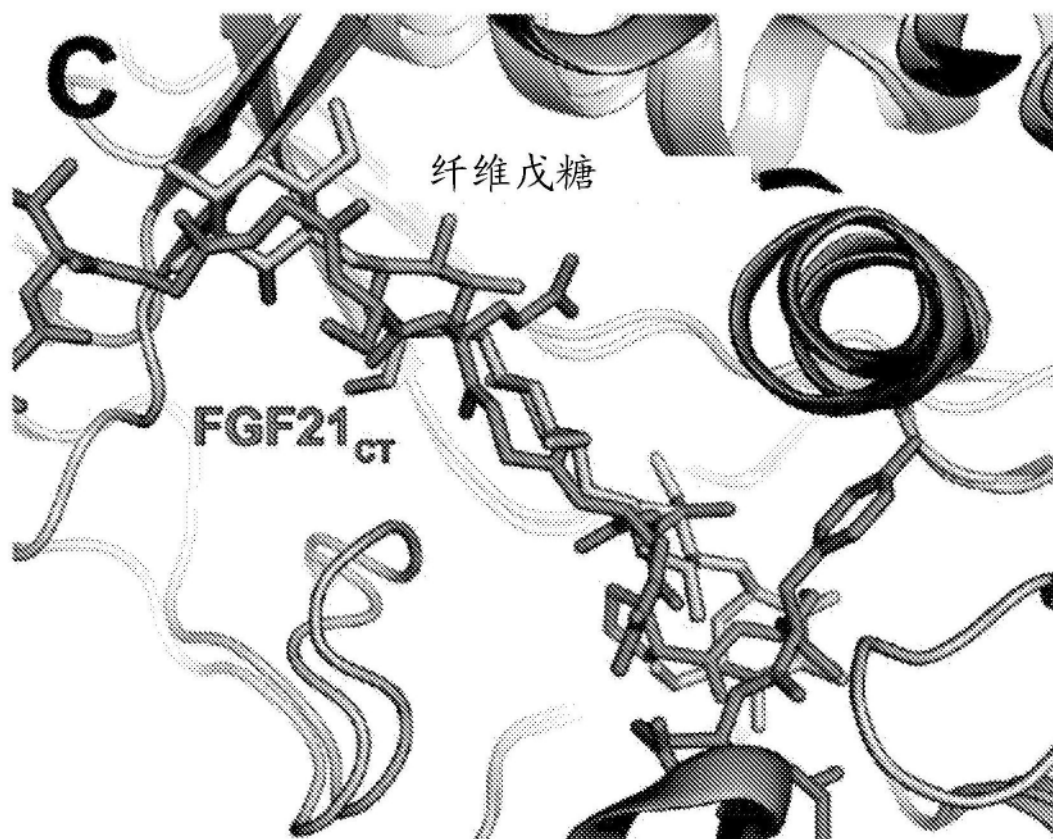


图5C

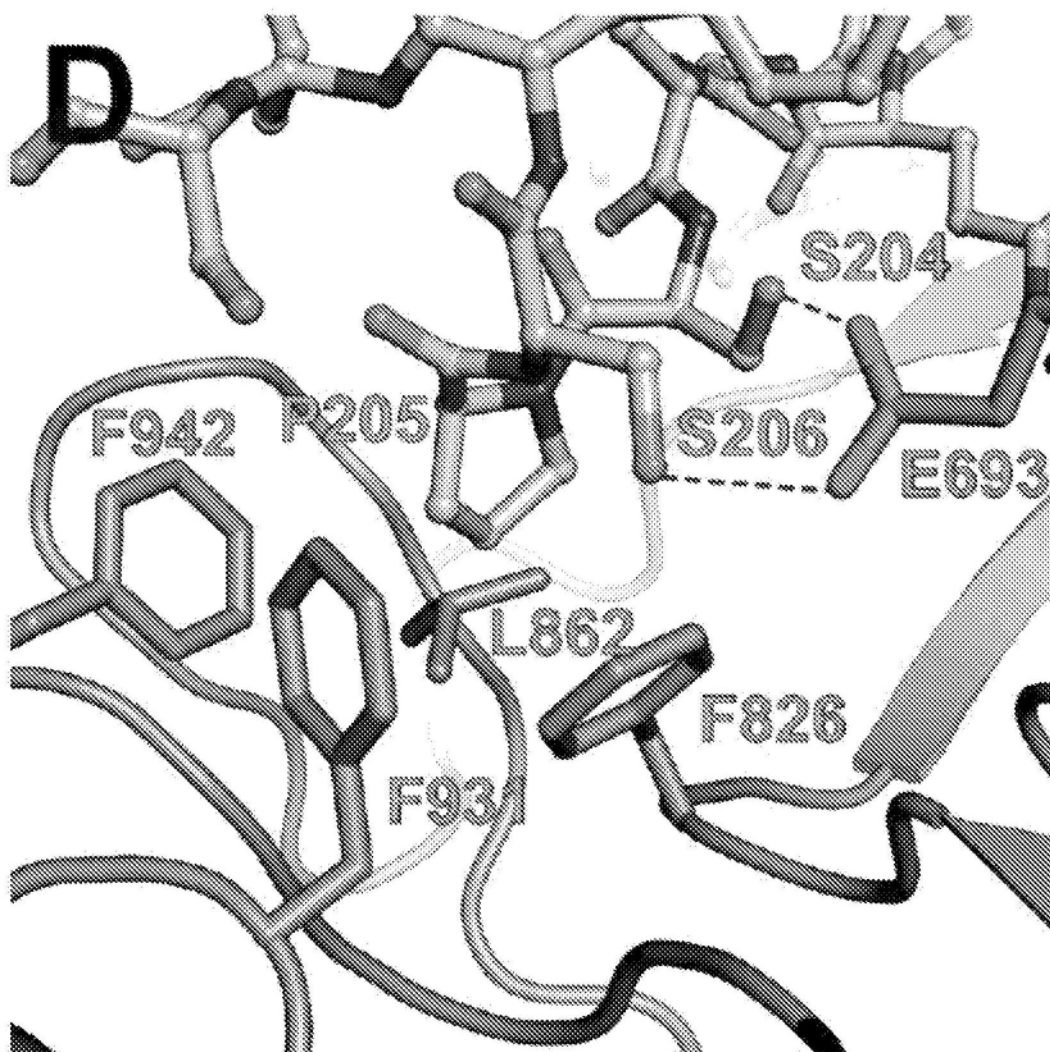


图5D

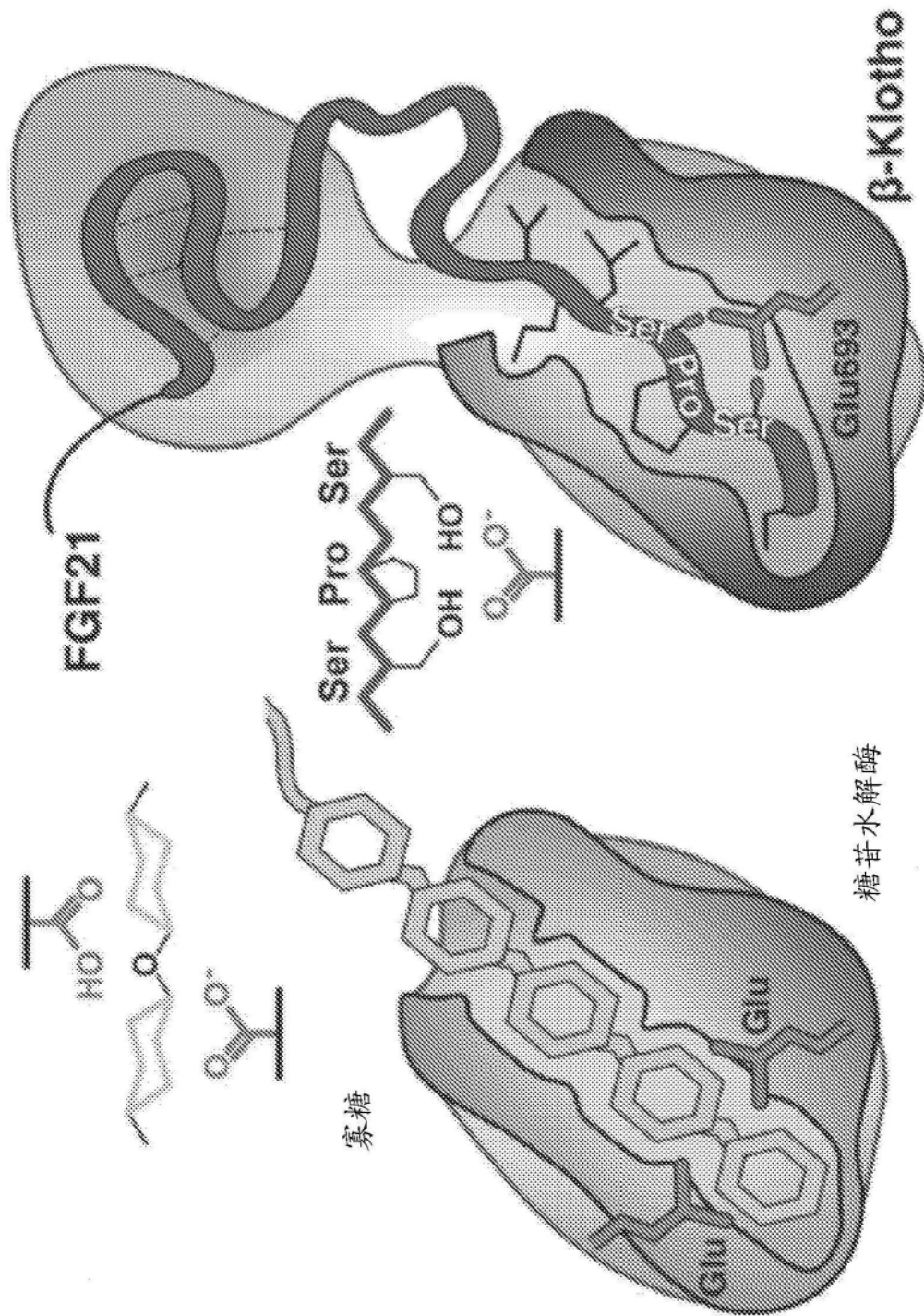


图5E

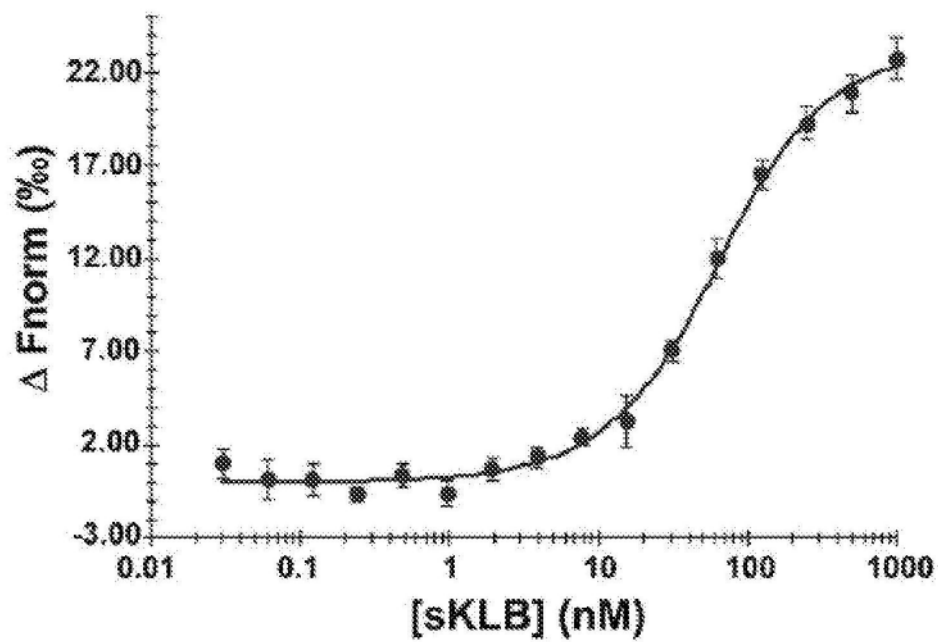


图6A

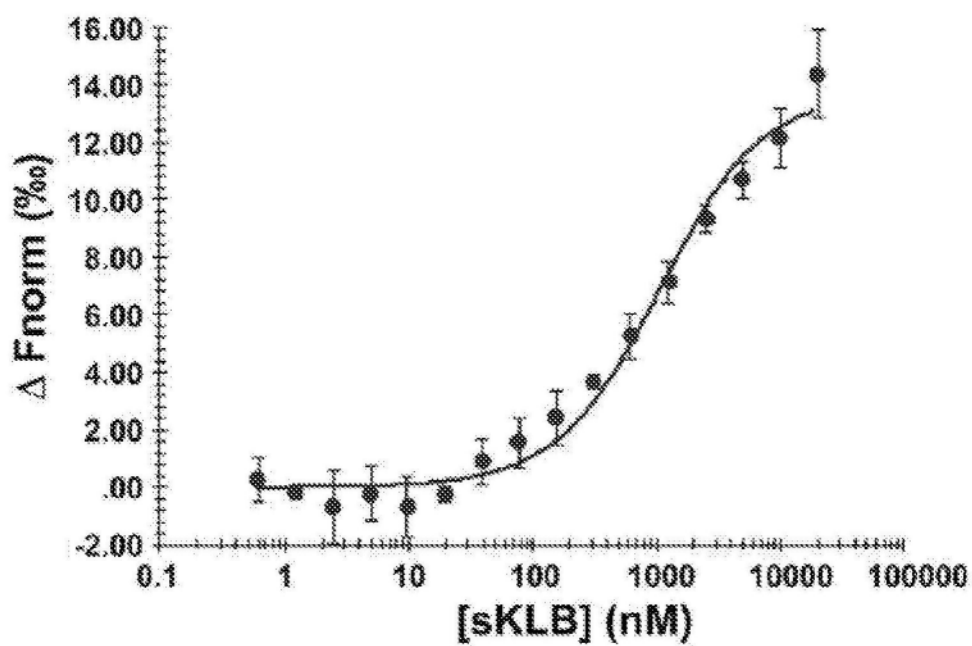


图6B

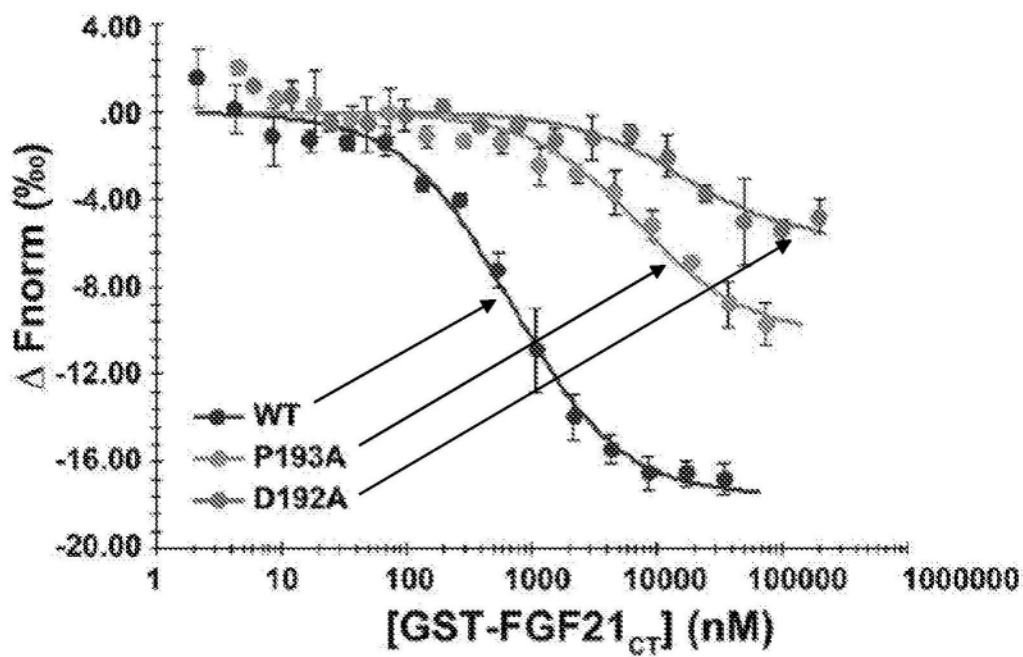


图6C

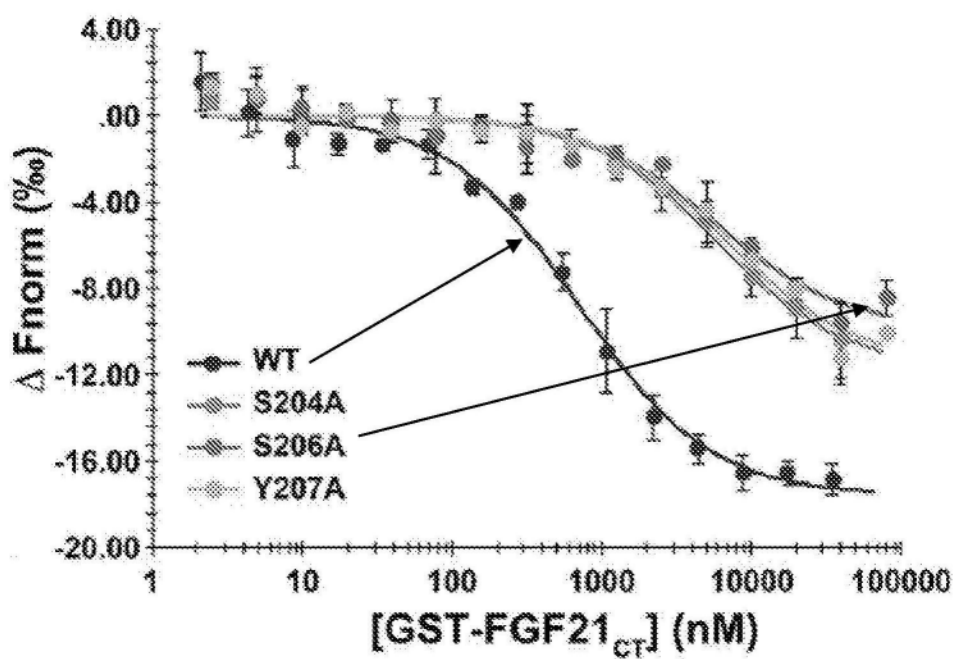


图6D

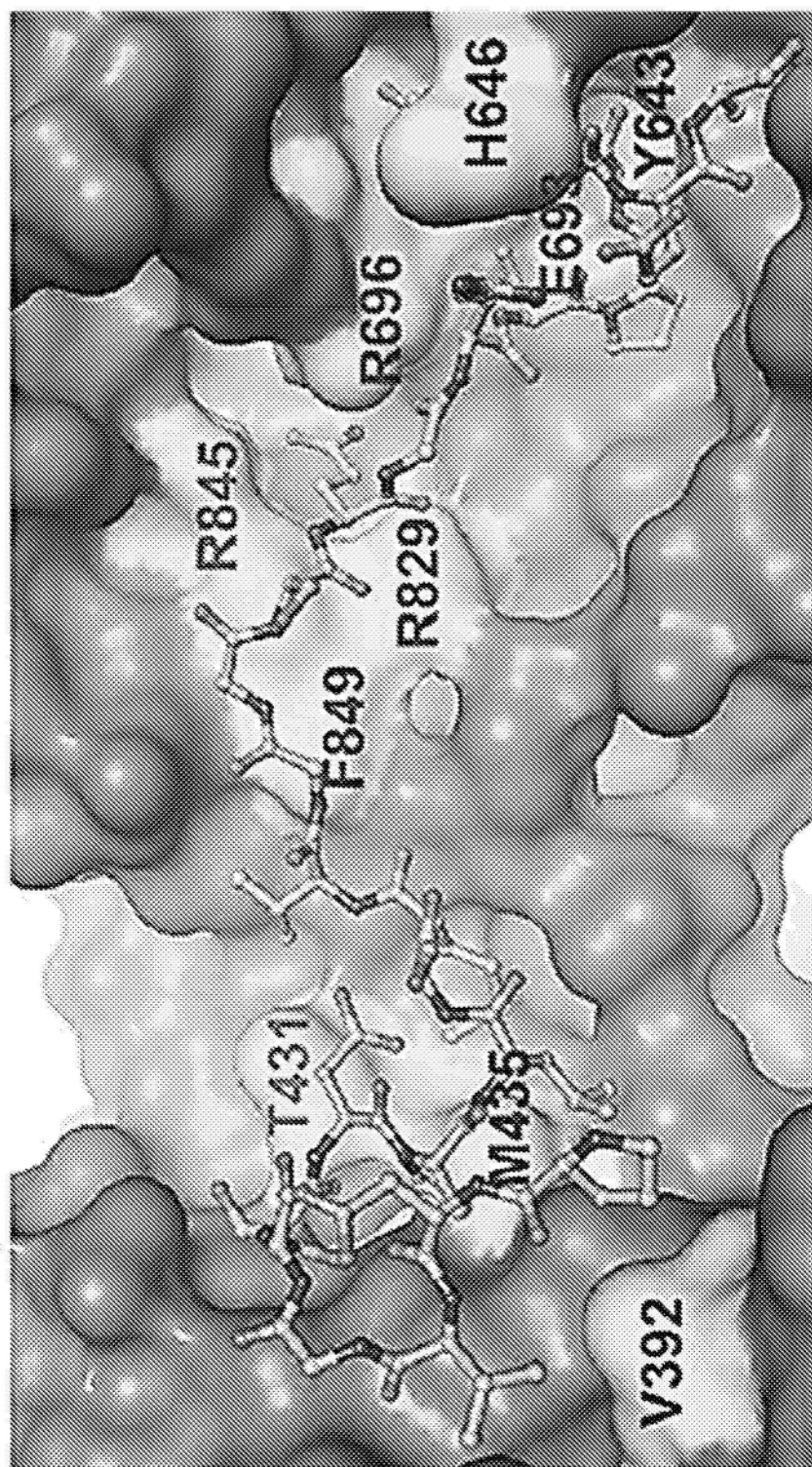


图6E

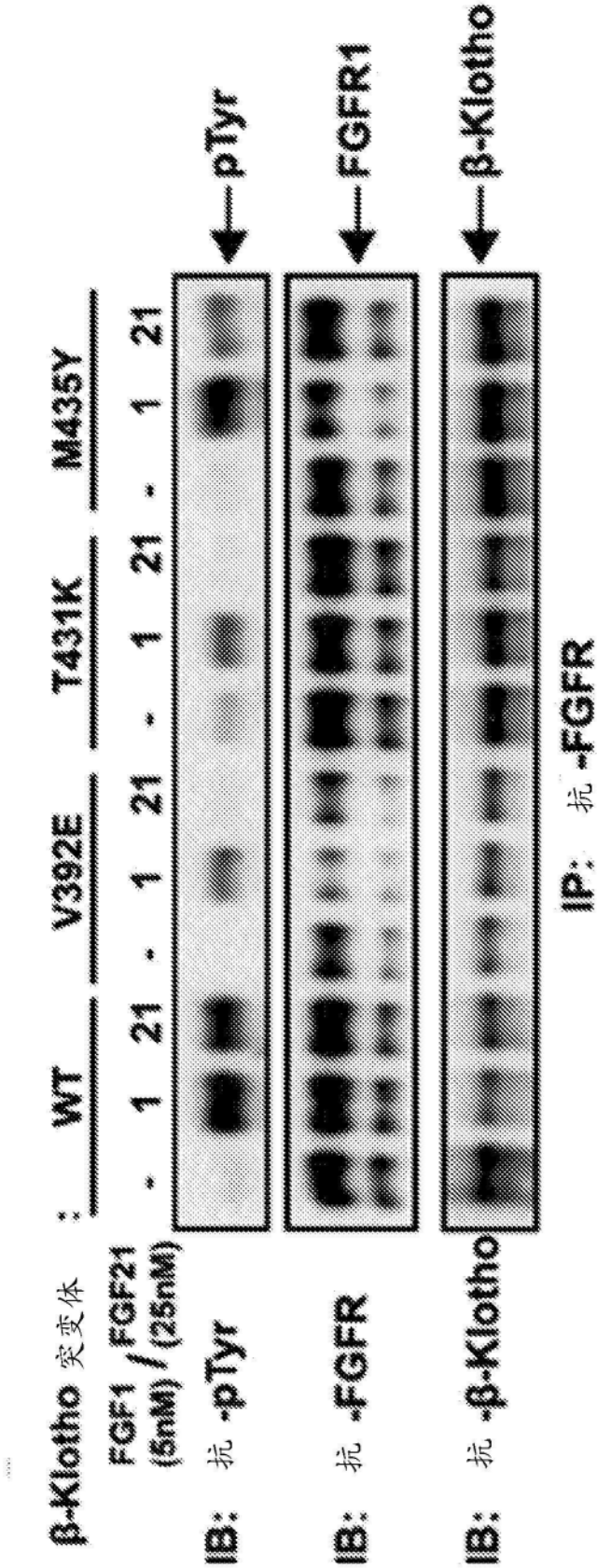
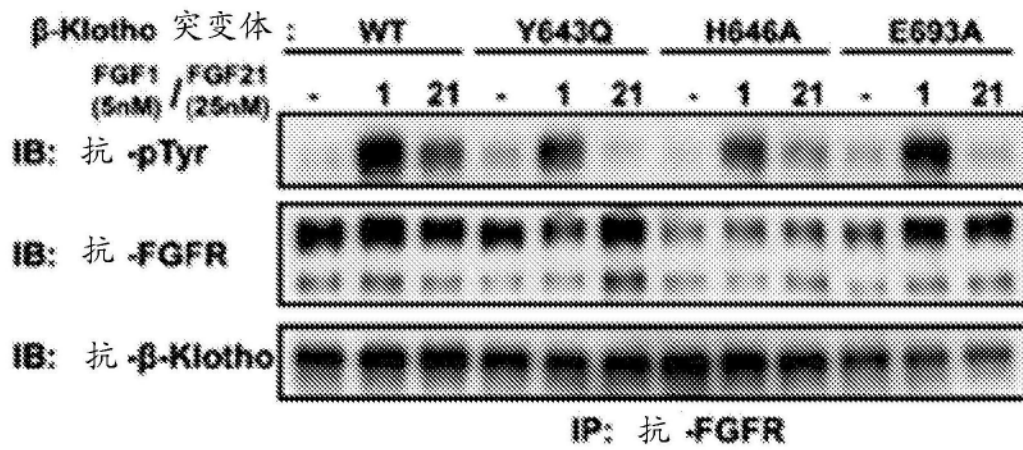


图6F

(左面板)



(右面板)

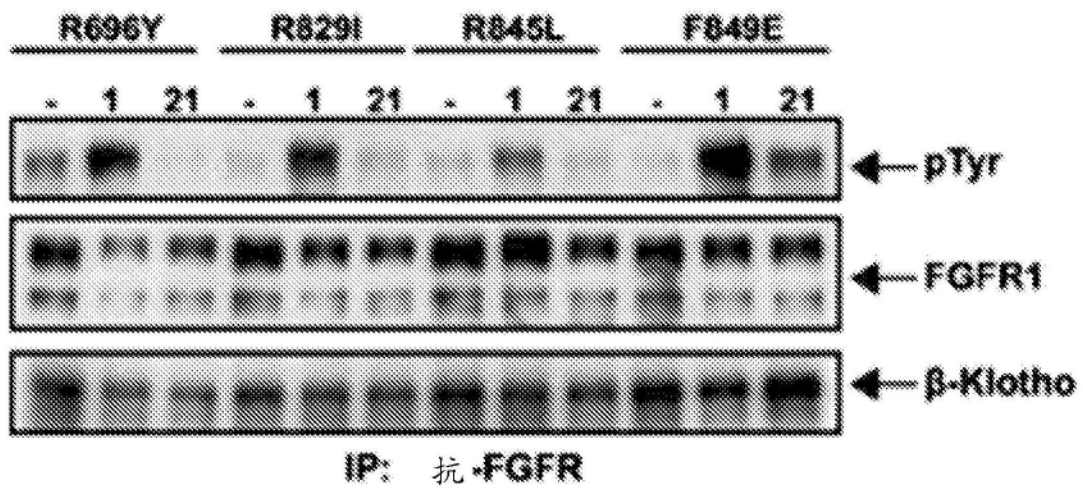


图6G

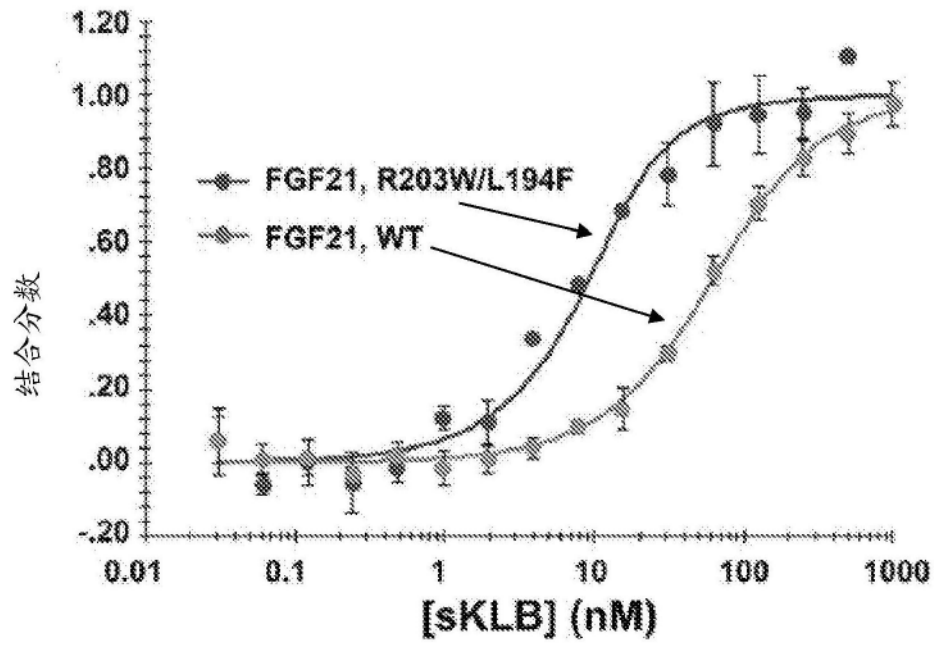


图7A

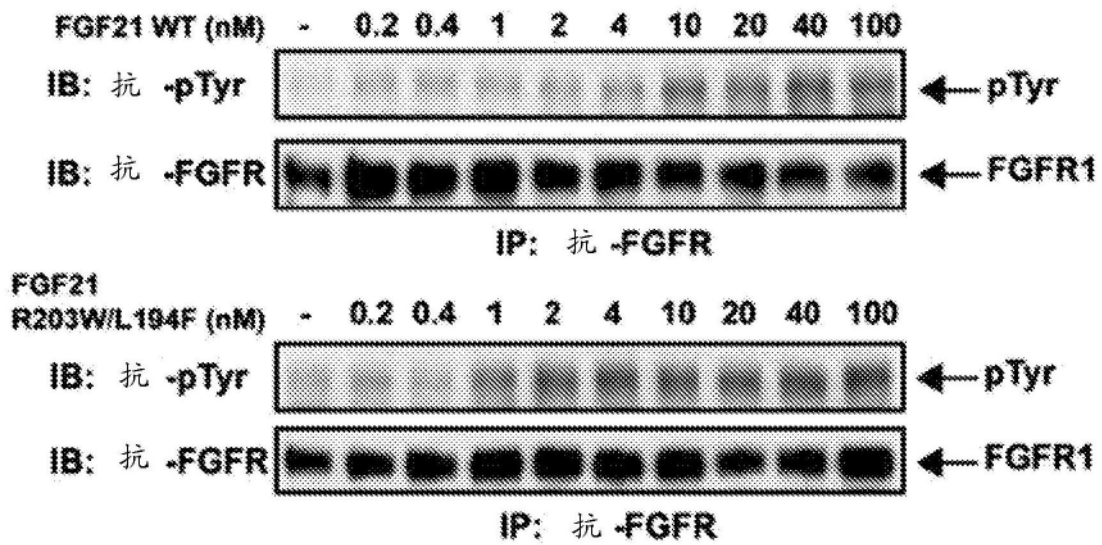


图7B

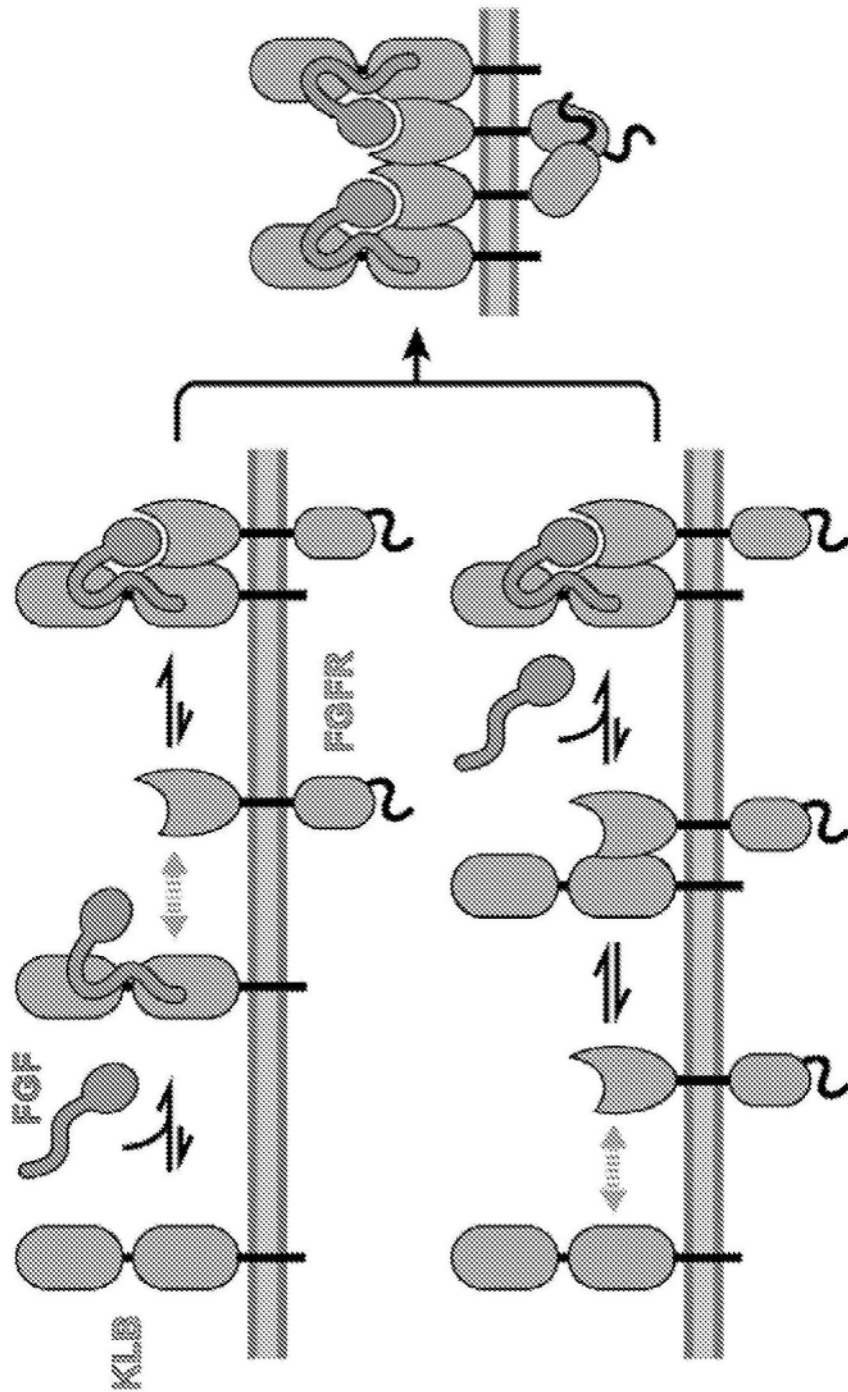


图8