



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103415300 B

(45)授权公告日 2018.02.23

(21)申请号 201180045216.4

(22)申请日 2011.07.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103415300 A

(43)申请公布日 2013.11.27

(30)优先权数据

61/374072 2010.08.16 US

(66)本国优先权数据

PCT/CN2010/001087 2010.07.20 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.03.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/062238 2011.07.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/010553 EN 2012.01.26

(73)专利权人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 T.M.塔格莫塞 P.W.加里拜 X.张

H.托格森 P.K.尼尔森 B.安德森

J.王 K.S.巴克詹森 H.F.维迪科

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 徐晶 梁谋

(51)Int.Cl.

A61K 38/18(2006.01)

(56)对比文件

WO 2006050247 A2, 2006.05.11,

CN 1802386 A, 2006.07.12,

CN 101663046 A, 2010.03.03,

审查员 张蕊

权利要求书3页 说明书53页

序列表3页

(54)发明名称

N-末端修饰的FGF21化合物

(57)摘要

带有修饰、取代的亚乙基或苄基的FGF21的类似物可用于治疗或预防糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝(NAFLD)。

1. 一种FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中1或2个式A-B-C-D-的修饰基团共价连接于FGF21化合物的N-末端氨基酸的 α -氨基,其中A-为以下式I的要素:

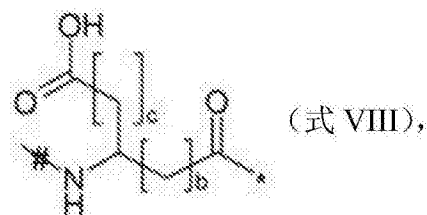


其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

-B-为-B2-,

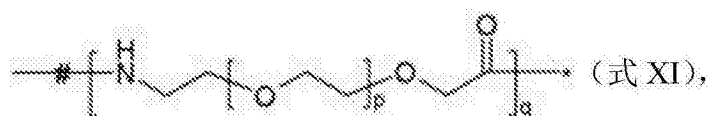
其中

-B2-为以下式VIII的要素



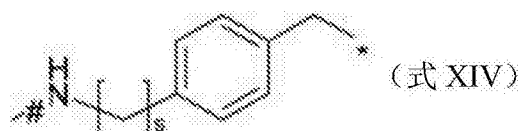
其中b为0、1或2,c为0、1或2,条件是当c为0时b为1或2,和当c为1或2时b为0,*为与-C-的连接点,和#为与A-的连接点;

-C-为以下式XI的要素:



其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-的连接点,和#为与-B-的连接点;

-D-为以下式XIV的要素:



其中s为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点;且其中所述衍生物的效力相对于Met-FGF21的效力为至少80%。

2. 依据权利要求1的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中n为12、14、16或18。

3. 依据权利要求1的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中n为14、16或18。

4. 依据权利要求1的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中n为14。

5. 依据权利要求1的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中c为0和b为2,或者c为0和b为1。

6. 依据权利要求1-5中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中q为0、1、2、3或4,和p为0、1、2、3、4、5或6。

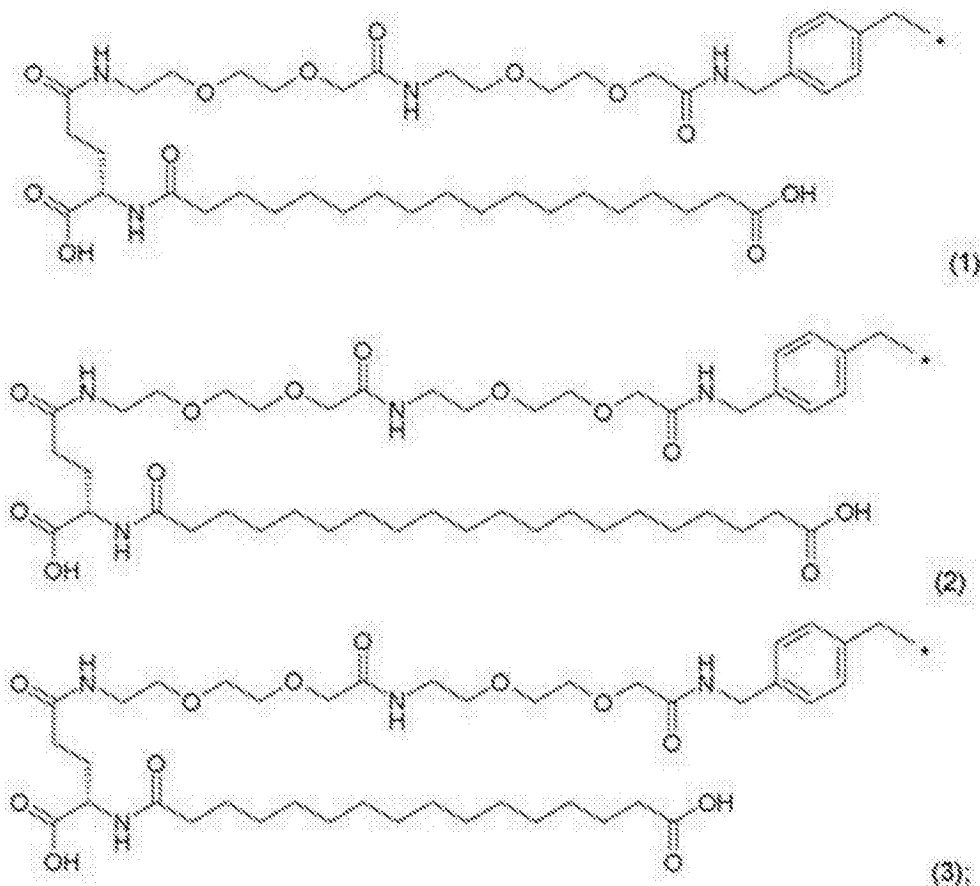
7. 依据权利要求1-5中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中p为1或2,和q为0、1、2、3、4、5或6。

8. 依据权利要求1-5中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中p

为1和q为1或2。

9. 依据权利要求1-5中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中s为0或1。

10. 依据权利要求1的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中式A-B-C-D-的修饰基团选自以下式(1)-(3):



其中*为与FGF21化合物的连接点。

11. 依据权利要求1-5和10中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其仅具有式A-B-C-D-的1个修饰基团。

12. 依据权利要求1-5和10中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其具有式A-B-C-D-的2个相同或不同的修饰基团。

13. 依据权利要求1的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,所述FGF21化合物的衍生物为选自以下的化合物:

化合物III: N- α -(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [K56R, K59R, K69R, D102T, D121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21; 和

化合物IV: N- α -(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21。

14. 依据权利要求1的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物为: 化合物IV: N- α -(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰

氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基)[S71C,N121Q,L166F,S167G,M168L,P171L,S172E,Q173A,G174V,Y179F,A180E,des181]Ala-FGF21。

15. 依据权利要求1-5和10中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含选自以下修饰的至少一种修饰:

-1G,-1A,-1S,-1F,-1M,R17A,17H,Q27E,A31E,R36A,R36H,S71C,D102E,D102N,D102T,N121Q,des121N,N121D,D159E,L166F,S167G,M168L,D169E,V169aT,des170,G170T,P171L,P171G,S172E,S172L,Q173E,173aA,Q173A,G174A,G174V,Y179F,A180E,des181,S181K和S181R。

16. 依据权利要求1-5和10中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含选自以下修饰的至少三种修饰:

-1G,-1A,-1S,-1F,-1M,R17A,17H,Q27E,A31E,R36A,R36H,S71C,D102E,D102N,D102T,N121Q,des121N,N121D,D159E,L166F,S167G,M168L,D169E,V169aT,des170,G170T,P171L,P171G,S172E,S172L,Q173E,173aA,Q173A,G174A,G174V,Y179F,A180E,des181,S181K和S181R。

17. 依据权利要求1-5和10的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较具有最多10个氨基酸的修饰。

18. 依据权利要求1-5和10中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中FGF21化合物包含N121Q修饰。

19. 依据权利要求1-5和10中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中FGF21化合物包含N121Q修饰,和N-末端氨基酸M、G、S、F或A。

20. 依据权利要求1-5和10中任一项的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中FGF21化合物选自[Q28R,K56R,K59R,K69R,D102T,D121Q,K122R,L166F,S167G,M168L,G170T]Ala-FGF21、[S71C,N121Q,L166F,S167G,M168L,P171L,S172E,Q173A,G174V,Y179F,A180E,des181]Ala-FGF21和[S71C,N121Q,L166F,S167G,M168L,des170,173aA,G174V,Y179F,A180E,des181]Ala-FGF21。

21. 一种组合物,所述组合物包含依据权利要求1-20中任一项中的FGF21化合物的衍生物和药学上可接受的载体。

22. 依据权利要求1-20中任一项的FGF21化合物的衍生物在制备治疗或预防糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)的药物中的用途。

N-末端修饰的FGF21化合物

发明领域

[0001] 本发明涉及成纤维细胞生长因子21 (FGF21),更具体地讲涉及具有共价连接的式A-B-C-D-的修饰基团的FGF21化合物的衍生物。本发明也涉及新的FGF21类似物,以及涉及这些FGF21衍生物和类似物特别是用于治疗或预防糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的药用用途。

[0002] 本发明的衍生物被延长,例如能够保持低血糖水平较长一段时间,能够增加FGF21的体内半衰期和/或导致较低的FGF21清除。

[0003] 发明背景

[0004] 成纤维细胞生长因子为在正在发育和成人组织中表达的多肽。它们参与包括例如代谢调节和细胞分化的几种生理机制。存在多于二十种成纤维细胞生长因子的整个家族 (FGF家族)。包括FGF19、FGF21和FGF23的FGF家族的3个成员形成起参与代谢调节的内分泌因子作用的亚家族。

[0005] 成纤维细胞生长因子21或FGF-21,本文对于短的FGF21,优先地在肝脏表达,并且已经显示发挥激素样的代谢作用。

[0006] 例如,FGF21已经被证实当在转基因小鼠中过度表达时,在小鼠脂肪细胞激活葡萄糖摄取,保护小鼠免于饮食诱导的肥胖,和当给予糖尿病的啮齿动物时,降低血糖和甘油三酯水平 (Kharitononkov *et al.*, *J. Clin. Invest.* (2005), 115:1627-1635)。

[0007] 在糖尿病的猴子中也已显示FGF21对血糖和甘油三酯的降低作用。FGF21在糖尿病的猴子中也能够显著降低LDL和增加HDL (Kharitononkov *et al.*, *Endocrinology* (2007), 148 (2):774-81)。

[0008] 在饮食诱导的肥胖小鼠和ob/ob小鼠中,FGF21另外显示主要通过增加能量消耗和减少脂肪来降低体重 (Coskun *et al.*, *Endocrinology* (2008), 149 (12): 6018-6027)。

[0009] 基于这些结果,FGF21已被提示作为具有治疗糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病和代谢综合征的潜力的药物。代谢综合征包括象胰岛素抵抗、血脂异常、内脏型肥胖和高血压方面,参见例如在Grundy *et al.*, *Circulation* (2004), (109): 433-438中的代谢综合征的定义。

[0010] FGF21另外可用作具有治疗非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的潜力的药物。参见以上引用的Coskun *et al.* *Endocrinology*, 2008,和Xu *et al.*, *Diabetes* (2009, 58 (1): 250-9)。NAFLD已由Erickson, *J. Lipid Res.* (2009, 50 (4月增刊), S412-16)定义。

[0011] Yie *et al.*研究FGF21的N-和C-末端在受体相互作用和激活中的作用,参见*FEBS Letters*, 583 (2009), 19-24。

[0012] 发明概述

[0013] 简言之,本发明如在以下权利要求1中那样定义。

[0014] 本发明涉及具有1或2个共价连接于FGF21化合物的修饰基团的FGF21化合物的衍生物,其中修饰基团具有式A-B-C-D-,其中组分A为脂肪酸或其衍生物。本发明也涉及本发明的衍生物在药用组合物中,特别是用于治疗糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢

综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的组合物中的用途。

[0015] 本发明的衍生物被延长,例如能够保持低血糖水平较长一段时间,能够增加FGF21的体内半衰期和/或导致较低的FGF21清除。所延长的FGF21衍生物保持令人满意的生物活性和可不太频繁地给药。此外衍生物优选地具有改善的氧化稳定性。

[0016] 定义

[0017] 本文使用的术语“FGF21化合物”指的是原生人FGF21及其类似物。

[0018] 原生人FGF21蛋白的序列可得自UNIPROT数据库,登记号Q9NSA1。209个氨基酸前体蛋白包括信号肽(氨基酸1-28)和成熟蛋白(氨基酸29-209)。成熟蛋白本文作为SEQ ID NO: 1 (氨基酸1-181)包括在内,和信号肽作为SEQ ID NO:2 (氨基酸1-28)包括在内。自i.a., US2001012628 A1 (在发表的US申请中的SEQ ID NO:2的残基号174)已知在本文SEQ ID NO:1的146位具有替代成熟蛋白中的Leu的Pro的原生人FGF21的同工型或等位形式(allelic form)。自WO 2003/011213已知具有较短的信号肽(其中缺少本文SEQ ID NO: 2的23位的Leu)的另一种同工型(参见具有27个氨基酸残基的信号肽的WO出版物的SEQ ID NO: 2)。因此,原生人FGF21的具体实例为:SEQ ID NO:1、具有取代L146P的SEQ ID NO:1、以及任何这些序列之前的以上所指的27或28个氨基酸的信号肽。原生人FGF21的优选实例为成熟部分,即SEQ ID NO:1及其L146P同工型。

[0019] 术语“类似物”,例如如同本文在FGF21,即FGF21类似物的情况下所指的那样,指的是引自或源自或可引自或源自原生FGF21、特别是通过修饰其氨基酸序列源自或源自SEQ ID NO:1的多肽。这种修饰、修改或变化可包括取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸。例如,可在氨基酸序列的C-末端、N-末端或内部增加和/或缺失氨基酸。优选地在C-和/或N-末端,更优选地在N-末端增加和/或缺失氨基酸。具有C-或N-末端缺失的氨基酸的氨基酸序列也可称为截短序列,如本领域已知的那样。同样地,在序列内部增加的氨基酸可称为插入。在本发明的一个实施方案中,得到FGF21类似物的SEQ ID NO:1的以上修饰的数目不多于11,并且优选地不多于9,更优选地不多于7,甚至更优选地不多于5,和甚至更优选地不多于3。术语“变体”或“突变蛋白”本文偶尔用于替代术语“类似物”。

[0020] FGF21类似物的一个实例为原生成熟FGF21的截短形式,其中去除成熟蛋白(HPIP)的4个N-末端氨基酸残基,并且在例如WO 2006/065582中被公开。这种截短形式据说以与野生型FGF21相同的水平在小鼠3T3-L1脂肪细胞中刺激葡萄糖摄取。这种蛋白具有本文SEQ ID NO:1的氨基酸5-181的氨基酸序列。

[0021] FGF21类似物的另一个实例为具有N-末端Met的SEQ ID NO:1的多肽(也命名为“Met-FGF21”或SEQ ID NO:1的取代-1M ((减1) M))。当FGF21化合物在大肠杆菌表达时增加N-末端Met,参见例如WO 2006/050247,表6。

[0022] FGF21类似物的其它实例为在例如WO 2003/061712、WO 2005/091944、WO 2006/028595、WO 2006/028714、WO 2006/065582和WO 2008/121563中公开的修饰的FGF21序列(通常称为突变蛋白)。FGF21类似物的还有的其它实例在本文的实验部分中以及在所附权利要求书中公开。

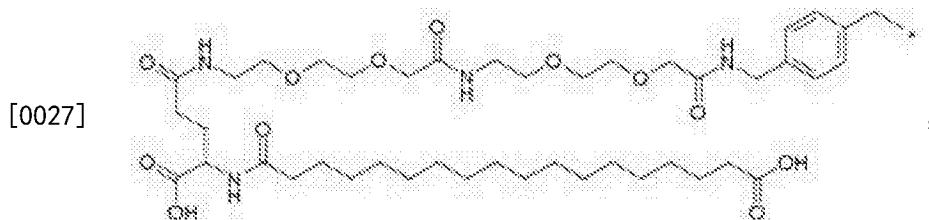
[0023] 术语“氨基酸”或“氨基酸残基”,如本文在FGF21修饰的情况下所指的那样,包括由细胞在蛋白质生物合成中使用的和由遗传密码指定的20种标准 α -氨基酸,即丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、

赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。术语也包括非标准氨基酸,例如也由遗传密码编码但是在蛋白中稀少的硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸(pyrrolysine)。在蛋白中发现的其它非标准氨基酸可通过翻译后修饰形成,例如 γ -羧基谷氨酸和羟基脯氨酸。不是由遗传密码编码的非标准或非天然氨基酸的另外实例为鸟氨酸和磷酸丝氨酸。非标准氨基酸的仍然其它实例为包括通过化学合成制备的氨基酸的合成氨基酸,例如由遗传密码编码的氨基酸的D-异构体,例如D-丙氨酸、D-谷氨酰胺、D-组氨酸和D-亮氨酸、Aib (α -氨基-异丁酸)、Abu (α -氨基丁酸)、Tle (甘氨酸叔丁酯)、 β -丙氨酸、3-氨基甲基苯甲酸、邻氨基苯甲酸、脱氨基组氨酸(缩写为脱氨基His (DesaminoHis), 另一种可供选择的名称咪唑并丙酸(imidazopropionic acid), 缩写为Impr)、氨基酸的 β 类似物例如 β -丙氨酸、2-氨基组氨酸、 β -羟基组氨酸、高组氨酸、Na-乙酰组氨酸、 α -氟甲基组氨酸、 α -甲基组氨酸、 α , α -二甲基谷氨酸、m-CF₃-苯基丙氨酸(缩写为m-CF₃-Phe)、 α , β -二氨基丙氨酸(缩写为Dap)、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸或4-吡啶基丙氨酸、(1-氨基环丙基)羧酸、(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸和(1-氨基环辛基)羧酸。

[0024] 对于本发明的目的,标准氨基酸的两种公认代码(1个字母和3个字母)可互换使用,或者有时氨基酸的名称被完全拼出。这些术语当然被考虑是完全等效的(例如S=Ser=丝氨酸)。

[0025] 术语“衍生物”，例如如本文在FGF21，例如本文使用的FGF21衍生物的情况中所指的那样，指的是通过加入本文指定的修饰基团A-B-C-D-例证性说明的共价修饰的FGF21化合物。术语不限于此，而是描述性的，因为其目的是标志对组成性FGF21多肽化合物如此进行的变化（“类似物”）与侧链共价键合于FGF21化合物的区别，由此使化合物“衍生化”。

[0026] 命名法:类似物和衍生物本文可互换地使用多肽命名法、有机化学命名法和化学式或其混合来命名,不管怎样认为最适合于易于理解所讨论的技术问题。例如,实施例3的衍生物可命名为N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21 (意味着[Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21在N-末端氨基酸Gly的 α -氨基用4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基修饰)。但是该化合物也可定义为在N-末端的N- α 用以下化合物衍化的[Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21:



[0028] 其中*为与N-末端氨基酸Gly的所述 α 氨基的连接点。

[0029] 变体命名法(类似物的命名法):FGF21的变体(或类似物)本文可互换地使用多肽命名法、有机化学命名法、化学式、氨基酸序列或其混合来命名,不管怎样被认为最适合于易于理解所讨论的技术问题。

[0030] 例如,变体中的取代可表示为“原来的氨基酸位置取代的氨基酸”。可使用3或1个字母的代码。因此,表示法“K122C”或“Lys122Cys”意指当变体和FGF21如以下进一步描述的那样比对(aligned) (“比对(alignment)”)时,变体在相应于FGF21 (SEQ ID NO:1)的122位的氨基酸的变体氨基酸位置包含用半胱氨酸取代赖氨酸。

[0031] 多个修饰例如取代可用逗号隔开(在逗号之后具有间隔),并且如果需要,用括号包围以明确表示它们属于相同的变体。在实施例3中衍化的类似物可例如命名为“K56R、K59R、K69R、K122R Gly-FGF21”或“(K56R、K59R、K69R、K122R) Gly-FGF21”,或者其可称为“具有K56R、K59R、K69R和K122R和N-末端G的SEQ ID NO:1”。命名该化合物的一种甚至更简单的方法为省去(leave out)已经被交换的氨基酸,以致名称变为“56R、59R、69R、122R Gly-FGF21”。参见化合物实施例2d,其用于具有以取代和插入的混合形式存在的多个修饰的变体的命名法。

[0032] 在给定位置的一种可供选择的修饰例如可供选择的取代基可用逗号隔开,如同例如在名称“S181K,R”中那样,其意指181位的Ser可用Lys或Arg取代。

[0033] 关于SEQ ID NO:1的延伸可通过增加位置编号(在C-末端继续正编号和在N-末端继续负编号),或者更简单地讲,通过对所讨论的化合物使用其正确的序列增加所讨论的延伸的氨基酸进行描述,其然后通常给出惯用名例如FGF21,此外为了易于理解相关的技术要点。作为实例,实施例2a的化合物指定在SEQ ID NO:1的1-位和突变K56R、K59R、K69R、K122R具有G的SEQ ID NO:1 (FGF21)的多肽。

[0034] 变体中的插入可表示为:“在插入-指数-插入的氨基酸之前的氨基酸位置编号”。在插入之前的氨基酸位置编号指的是就在空位之前的FGF21 (SEQ ID NO:1)中的氨基酸位置,这种空位在变体和FGF21如以下进一步描述的那样比对 (“比对”)时产生。对于氨基酸,可使用3或1个字母的代码。指数为按字母顺序排列的小写字母,例如如果适用的话,“a”用于第一个插入的氨基酸残基,“b”用于第二个插入的氨基酸残基等。因此,表示法“V169aT” (或“Val169aThr”)或简单地为“169aT” (或“169aThr”)全部意味着,当变体和FGF21如以下进一步描述的那样比对 (“比对”)时,变体在FGF21 (SEQ ID NO:1)的169位缬氨酸之后包含苏氨酸插入。

[0035] 对于本发明的目的,两个氨基酸序列的比对可使用来自EMBOSS程序包的Needle程序(<http://emboss.org>)进行。优选的版本为2.8.0。Needle程序实现了在Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453中描述的全面比对算法(global alignment algorithm)。所使用的取代矩阵为BLOSUM62,空位开放罚分为10,和空位延伸罚分为0.5。

[0036] 在本发明的FGF21类似物序列 (“发明序列”;例如具有K56R、K59R和K69R的 SEQ ID NO:1)与不同氨基酸序列 (“外来序列”;例如SEQ ID NO:1的FGF21序列)之间的同一性的程度或百分率,作为两个序列比对中的精确匹配数除以“发明序列”的长度或“外来序列”的长度(为最短的任何一个)来计算。结果以百分比同一性表示。

[0037] 当“发明序列”和“外来序列”在重叠的相同位置具有相同氨基酸残基时(在以下比对实施例中这用“*”代表)发生精确匹配。序列的长度为序列中的氨基酸残基数(例如SEQ ID NO:1的长度为181)。

[0038] 此为以上所指的“本发明序列”和“外来序列”的比对的实例:

```

FGF21_SEQ1  HPIPDSSPLLQFGGQVQRYLYTDDAQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKALRF
56_59_69R    HPIPDSSPLLQFGGQVQRYLYTDDAQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLRALRF
*****
FGF21_SEQ1  GVIQILGVKTSRFLCQFPDQALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
56_59_69R    GVIQILGVKTSRFLCQFPDQALYGSILHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPG
*****
[0039]
FGF21_SEQ1  NKSPHEDFAPRGFANFLPLPGLFFALFEPPGILAPQFFVVGSSDPLSMVGPSCGRSPSYA
56_59_69R    NKSPHEDFAPRGFANFLPLPGLFFALFEPPGILAPQFFVVGSSDPLSMVGPSCGRSPSYA
*****
FGF21_SEQ1  S
56_59_69R    S
*
```

[0040] 因此,该FGF21类似物与FGF21的同一性百分率为 $178/181 \times 100\% = 98.3\%$ 。

[0041] 在供替代的选择中,两种氨基酸序列之间的同一性程度可通过为Needleman-Wunsch比对(即总体比对)的程序“比对”来确定。这些序列通过使用默认的计分矩阵(default scoring matrix) BLOSUM50的程序进行比对。对空位(gap)的第一个残基的罚分为12,和对空位的其它残基的罚分为2。Needleman-Wunsch算法描述于Needleman, S.B. and Wunsch, CD., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453中,和比对程序由Myers和W. Miller描述于“Optimal Alignments in Linear Space” CABIOS (计算机在生物科学中的应用) (1988) 4:11-17中。“比对”为FASTA程序包版本v20u6的部分(参见W.R. Pearson and D.J. Lipman (1988), “用于生物序列分析的改进工具(Improved Tools for Biological Sequence Analysis)”, *PNAS* 85:2444-2448,和W.R. Pearson (1990) “用FASTP和FASTA的快速和灵敏的序列比较(Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA)”, *Methods in Enzymology* 183:63-98)。

[0042] 包含本发明的FGF21化合物或FGF21类似物的衍生物的药用组合物可进一步包含药学上可接受的载体。对于注射,载体可为(如果需要)用其它材料例如盐水,例如生理盐水补充的水。也可使用其它药学上可接受的试剂例如稀释剂和合适的缓冲剂。如果需要,也可使用另外药学上可接受的试剂例如乳化剂、助悬剂、溶剂、填料、填充剂、辅助剂、防腐剂、抗氧化剂、着色剂和/或矫味剂。FGF21化合物或FGF21类似物的衍生物可以纯化多肽或其衍生物的形式使用,或者使用如本领域已知的合适的药学上可接受的赋形剂配制。药用组合物可以如本领域已知的任何方式给予,例如静脉内(i.v.)或皮下(s.c.)注射。

[0043] FGF21化合物例如FGF21类似物的衍生物可以治疗或预防有效量包含在药用组合物中。所述量取决于治疗或预防目的,例如所讨论的指征、需要治疗的患者的病症、需要的给药途径等。熟练的开业医师可能必须如本领域例行的那样依这些因素而定调整剂量和修改给药。

[0044] 发明目的

[0045] 本发明的目的是克服或减轻先前技术的至少一种缺点,或者提供有用的供替代的选择。

[0046] 本发明的另一方面涉及提供与人FGF21相比较对治疗糖尿病具有改善的性质的FGF21的类似物或衍生物。

[0047] 本发明的另一方面涉及提供与人FGF21相比较对治疗肥胖症具有改善的性质的FGF21的类似物或衍生物。

[0048] 本发明的另一方面涉及提供与人FGF21相比较对治疗非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)具有改善的性质的FGF21的类似物或衍生物。

[0049] 本发明的另一方面涉及提供FGF21的类似物或衍生物,其可相对容易地在细菌例如大肠杆菌和在酵母菌例如酿酒酵母中制备重组。

[0050] 本发明的另一方面涉及提供被保护免于N-末端降解的FGF21的类似物或衍生物。

[0051] 本发明的另一方面涉及提供与人FGF21相比较对于3T3-L1细胞的葡萄糖摄取具有改善的效力的FGF21的类似物或衍生物。

[0052] 本发明的另一方面涉及提供与Met-FGF-21的平均半衰期时间相比较具有增加的平均半衰期时间的FGF21的类似物和衍生物,参见以下实施例40中的试验。

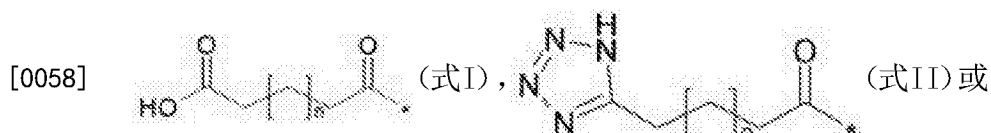
[0053] 本发明的其它目的为提供可有效地用于治疗以下疾病的化合物:高血压、重大疾病、代谢综合征、癫痫、癌症、肢端肥大症、血脂异常(高TG、高LDL和低HDL)和心血管疾病,例如动脉粥样硬化和高胆固醇血症。

[0054] 更具体地讲,目的是处理足够数目的以上方面。

[0055] 发明详述

[0056] 本发明涉及FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,所述衍生物具有1或2个共价连接于所述FGF21化合物中的N-末端 α 氨基的式A-B-C-D-的修饰基团,其中

[0057] A-为以下式I、II或III的要素:



[0060] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

[0061] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合,其中

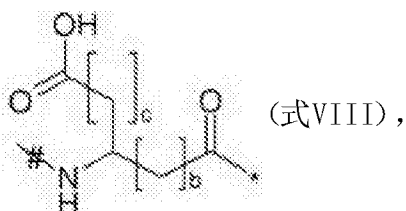
[0062] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:



[0065] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点;和

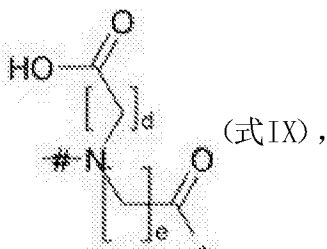
[0066] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:

[0067]



[0068] 其中b为0、1或2,c为0、1或2,条件是当c为0时b为1或2,和当c为1或2时b为0,*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;

[0069]



[0070] 其中d为1或2,e为0、1或2,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;
或

[0071] $\#-\text{NH}-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_u-\text{CO}-*$ (式X)

[0072] 其中u为2、3或4,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;

[0073] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:

[0074]



[0075] 其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点;或者

[0076]

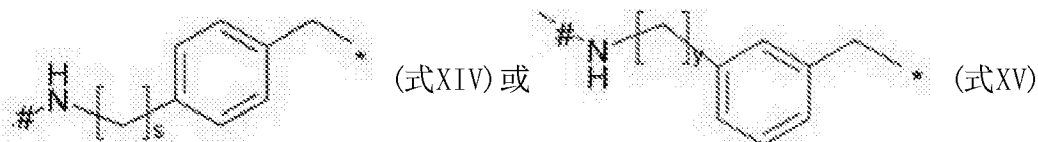


[0077] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23,m为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点;和#为与-B-的连接点;

[0078] -D-为以下式XIII、XIIIa、XIV或XV的要素或者这些要素中的两个一起:

[0079] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII), $\#-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-*$ (式XIIIa)

[0080]



[0081] 其中r为1-5范围内的整数,或者s为0-5范围内的整数,或者y为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

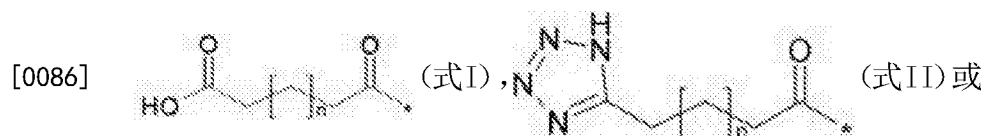
[0082] 在其中-D-为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的两个要素一起的那些情况中,那两个要素可为相同或不同的。在其中-D-为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的两个要素一起的那些情况中,其中那两个要素连接在一起的连接点为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的一个要素用符号#识别的一个连接点和用符号*识别的另一个要素的一个连接点,并且在这种连接要素中,*为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的一个要素与FGF21化合物的连接点,和#为另一个要素与-C-

的连接点。

[0083] 在其中提到第一部分连接于通过不存在的字母(例如A-, -B-或-C-)识别的第二部分的那些情况中,所述第一部分连接于存在的以下部分。举一个例子:如果提到,对于指定为-D-的部分,#为与-C-的连接点和-C-为不存在,那么由指定为-D-的部分的#识别的连接点连接于指定为-B-的部分。

[0084] 在一方面,本发明涉及FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,所述衍生物具有1或2个共价连接于所述FGF21化合物中的N-末端 α 氨基的式A-B-C-D-的修饰基团,其中

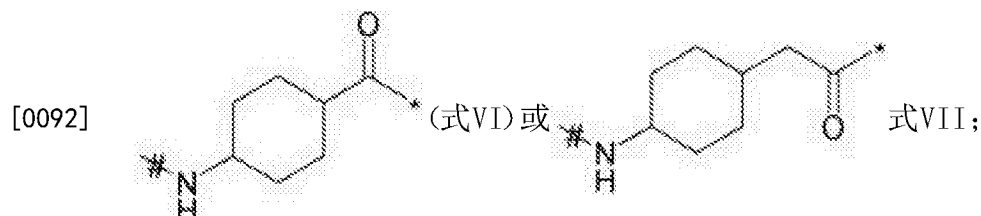
[0085] A-为以下式I、II或III的要素:



[0088] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

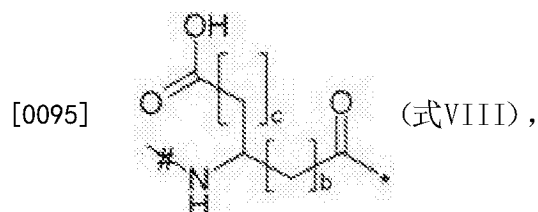
[0089] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合,其中

[0090] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:

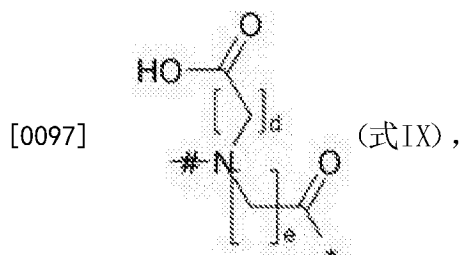


[0093] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点;和

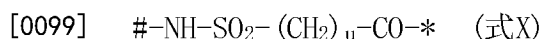
[0094] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:



[0096] 其中b为0、1或2,c为0、1或2,条件是当c为0时b为1或2,和当c为1或2时b为0,*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;

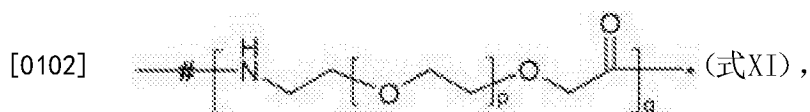


[0098] 其中d为1或2,e为0、1或2,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;
或



[0100] 其中u为2、3或4,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;

[0101] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:

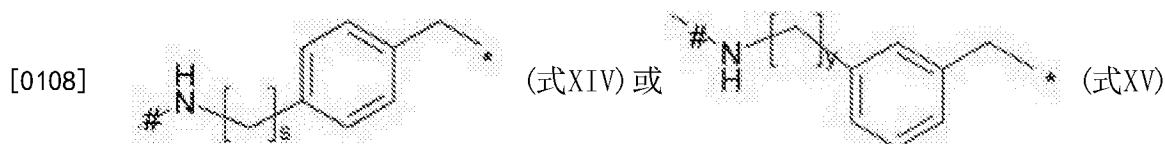
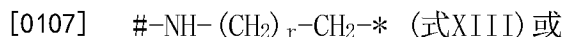


[0103] 其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点;或者



[0105] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23,m为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点;和#为与-B-的连接点;

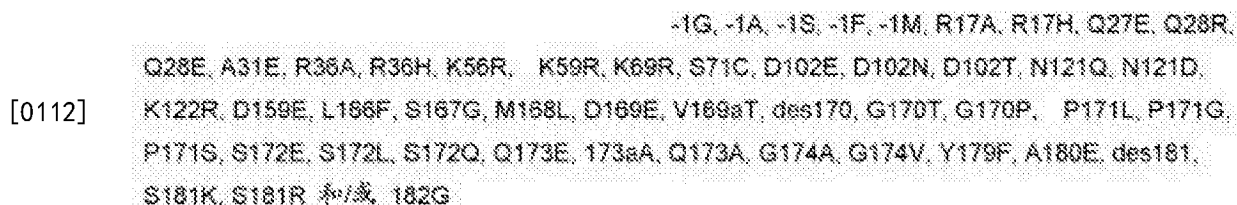
[0106] -D-为以下式XIII、XIV或XV的要素:



[0109] 其中r为1-5范围内的整数,或者s为0-5范围内的整数,或者y为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0110] 在本发明的一个实施方案中,-D-不为如本文定义的式XIII的要素。换句话说,-D-为如本文定义的式XIV或XV的要素。

[0111] FGF21化合物的实例为与SEQ ID NO:1相比较包含至少一个以下修饰的FGF21类似物:



[0113] 已经发现,本文定义的修饰基团具有一定的体外结合于人血清白蛋白的能力。

[0114] 此外,本发明涉及包含治疗有效量的本发明的类似物或衍生物及药学上可接受的载体的药用组合物;以及用于治疗呈现糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征

和/或非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的患者的方法,所述方法包括给予患者治疗有效量的本发明的类似物、衍生物或组合物。

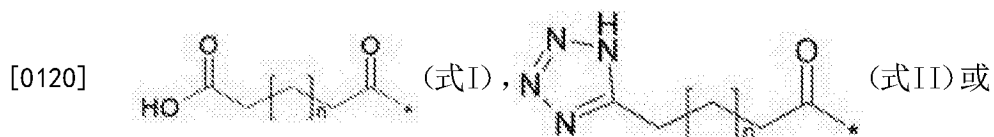
[0115] 本发明的衍生物具有1或2个共价连接于FGF21化合物的N-末端 α 氨基的式A-B-C-D-的修饰基团。

[0116] 本发明的衍生物和本发明的类似物例如在涉及降血糖作用、改善血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 方面,应具有与人FGF21相似或比人FGF21更好的生物效应。

[0117] 本发明的优选特征

[0118] 以下为本发明,特别是本发明第一个方面的衍生物的具体实施方案,其中仅有1个式A-B-C-D-的修饰基团共价连接于FGF21化合物的N-末端氨基酸的 α 氨基:

[0119] 在一个实施方案中,A-为以下式I、II或III的要素:



[0122] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

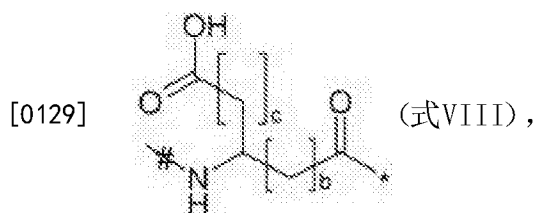
[0123] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合,其中

[0124] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:



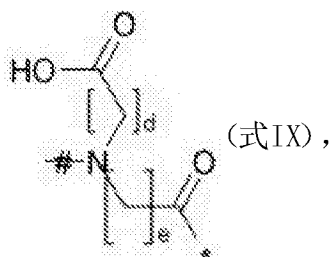
[0127] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点;和

[0128] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:



[0130] 其中b为0、1或2,c为0、1或2,条件是当c为0时b为1或2,和当c为1或2时b为0,*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;

[0131]



[0132] 其中d为1或2,e为0、1或2,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;
或

[0133] $\#-\text{NH}-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_u-\text{CO}-*$ (式X)

[0134] 其中u为2、3或4,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;

[0135] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:

[0136] (式XI),

[0137] 其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点;或者

[0138] (式XII),

[0139] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23,m为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点;和#为与-B-的连接点;

[0140] -D-为以下式XIII、XIIIa、XIV或XV的要素或者这些式中的两个一起:

[0141] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII), $\#-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-*$ (式XIIIa)

[0142] (式XIV) 或 (式XV)

[0143] 其中r为1-5范围内的整数,或者s为0-5范围内的整数,或者y为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点;

[0144] 或其药学上可接受的盐。

[0145] 在另一个实施方案中,A-为以下式I、II或III的要素:

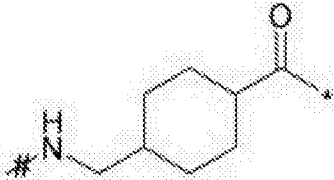
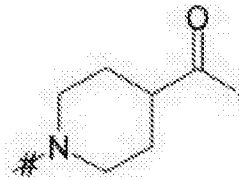
[0146] (式I), (式II) 或

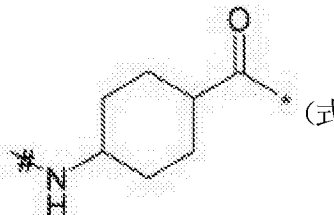
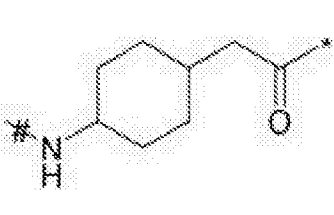
[0147] (式III);

[0148] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

[0149] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合,其中

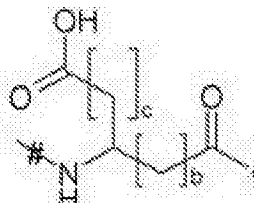
[0150] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:

[0151]  (式IV或Trx),  (式V或Inp),

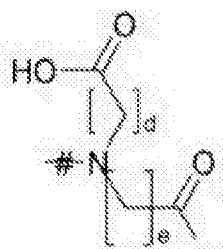
[0152]  (式VI) 或  (式VII);

[0153] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点;和

[0154] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:

[0155]  (式VIII),

[0156] 其中b为0、1或2,c为0、1或2,条件是当c为0时b为1或2,和当c为1或2时b为0,*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;

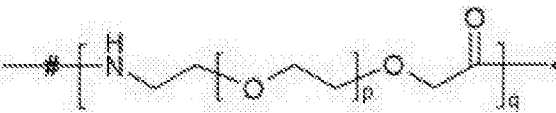
[0157]  (式IX),

[0158] 其中d为1或2,e为0、1或2,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;或

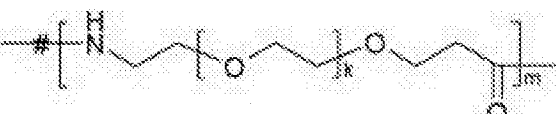
[0159] $\#-NH-SO_2-(CH_2)_u-CO-*$ (式X)

[0160] 其中u为2、3或4,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;

[0161] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:

[0162]  (式XI),

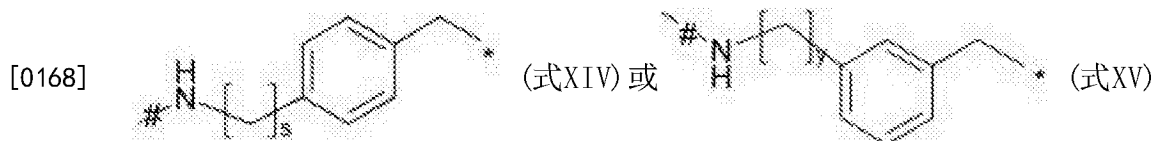
[0163] 其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点;或者

[0164]  (式XII),

[0165] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23,m为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点;和#为与-B-的连接点;

[0166] -D-为以下式XIII、XIV或XV的要素：

[0167] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII) 或



[0169] 其中r为1-5范围内的整数,或者s为0-5范围内的整数,或者y为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点,

[0170] 或其药学上可接受的盐。

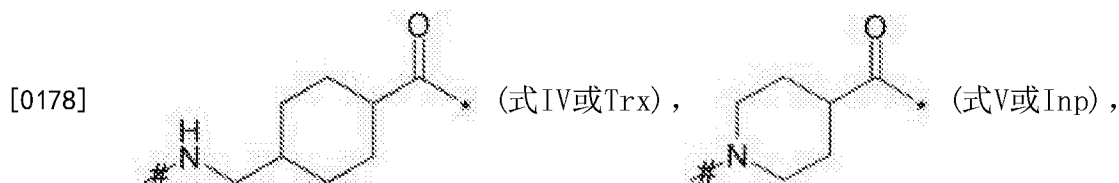
[0171] 在一个实施方案中,A-为以下式I的要素：



[0174] 在另一个实施方案中,A-为以下式I的要素：

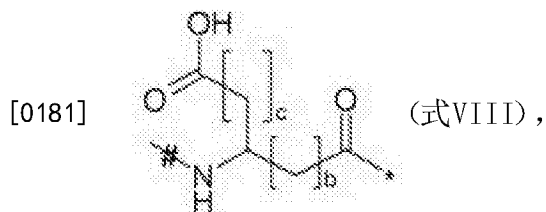


[0177] 在一个实施方案中,-B-包含-B1-,优选地为以下式IV或V的要素：

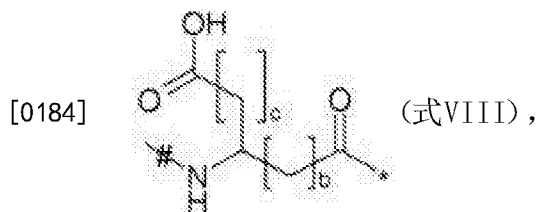


[0179] 并且其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点。

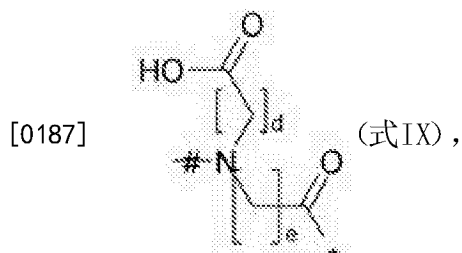
[0180] 在一个实施方案中,-B-包含-B2-,优选地为1或2个以下式VIII的要素：



[0183] 在一个实施方案中,-B-包含-B2-,优选地为4个以下式VIII的要素：



[0186] 在一个实施方案中, -B- 包含 -B2-, 优选地为 1 或 2 个以下式 IX 的要素:



[0188] 其中更优选地 d 为 1 和 e 为 2, 或者 d 为 2 和 e 为 1, 并且其中 * 为与 -C- 或 -B1- 的连接点, 和 # 为与 A- 或 -B1- 的连接点。

[0189] 在一个实施方案中, -B- 包含 -B2-, 优选地为 1 或 2 个以下式 X 的要素:

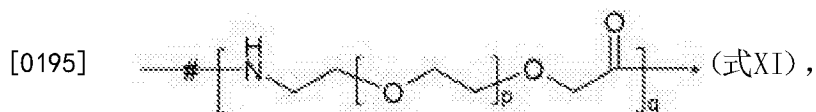
[0190] $\#-\text{NH}-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_u-\text{CO}-*$ (式 X), 其中更优选地 u 为 3, 并且其中 * 为与 -C- 或 -B1- 的连接点, 和 # 为与 A- 或 -B1- 的连接点。

[0191] 在一个实施方案中, -C- 为以下式 XI 的要素:



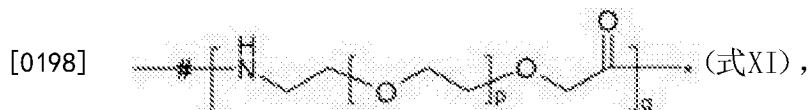
[0193] 其中优选地 q 为 0、1、2、3 或 4, 更优选地 q 为 1 或 2, 并且其中 * 为与 -D- 的连接点, 和 # 为与 -B- 的连接点。

[0194] 在一个实施方案中, -C- 为以下式 XI 的要素:



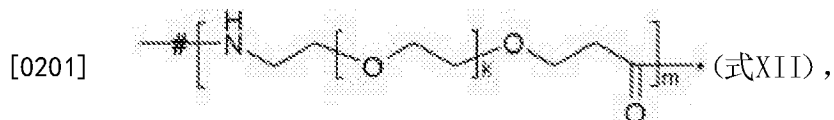
[0196] 其中优选地 p 为 1 或 2, 更优选地 p 为 1, 并且其中 * 为与 -D- 的连接点, 和 # 为与 -B- 的连接点。

[0197] 在一个实施方案中, -C- 为以下式 XI 的要素:



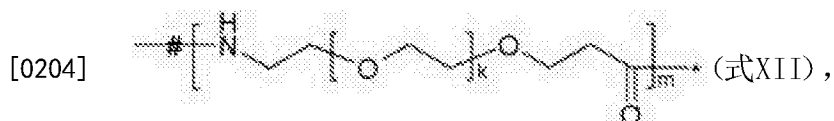
[0199] 其中 p 为 1 和 q 为 1 或 2, 优选地 p 为 1 和 q 为 2, 并且其中 * 为与 -D- 的连接点, 和 # 为与 -B- 的连接点。

[0200] 在一个实施方案中, -C- 为以下式 XII 的要素:



[0202] 其中优选地 m 为 0、1 或 2, 更优选地 m 为 1 或 2, 并且其中 * 为与 -D- 的连接点, 和 # 为与 -B- 的连接点。

[0203] 在一个实施方案中, -C- 为以下式 XII 的要素:

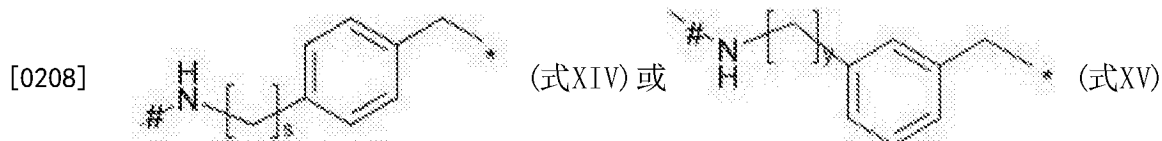


[0205] 其中优选地 k 为 1、2、3、4、5 或 11, 更优选地 k 为 5, 甚至更优选地 m 为 1 和 k 为 4、5 或 11,

或者最优选地m为1和k为5,并且其中*为与-D-的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0206] 在一个实施方案中,-D-为以下式XIII、XIIIa、XIV或者这些要素中的两个一起:

[0207] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII), $\#-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-*$ (式XIIIa) 或

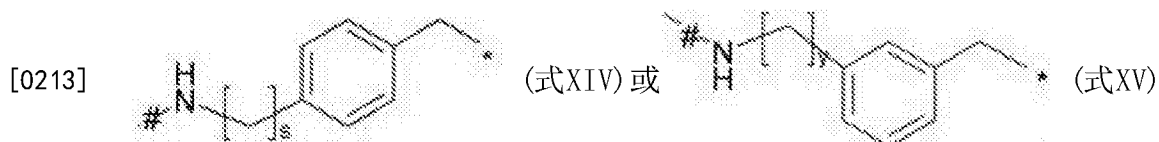


[0209] 其中r为1-5范围内的整数,或者s为0-5范围内的整数,或者y为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0210] 在其中-D-为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的两个要素一起的那些情况中,那两个要素可为相同或不同的。在其中-D-为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的两个要素一起的那些情况中,其中那两个要素连接在一起的连接点为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的一个要素用符号#识别的一个连接点和用符号*识别的另一个要素的一个连接点,并且在这种连接要素中,*为式XIII、XIIIa、XIV或XV中的一个要素与FGF21化合物的连接点,和#为另一个要素与-C-的连接点。

[0211] 在一个实施方案中,-D-为以下式XIII、XIV或XV的要素:

[0212] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII) 或



[0214] 其中r为1-5范围内的整数,或者s为0-5范围内的整数,或者y为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0215] 在本发明的一个实施方案中,-D-不为如本文定义的式XIII的要素。换句话说,-D-为如本文定义的式XIV或XV的要素。

[0216] 在一个实施方案中,-D-为以下式XIII的要素:

[0217] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII)

[0218] 其中优选地r为1、2或3,更优选地r为1,并且其中#为与-C-的连接点和*为与FGF21化合物的连接点。

[0219] 在一个实施方案中,-D-为以下式XIV的要素:



[0221] 其中优选地s为0或1,更优选地s为1,并且其中*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0222] 在一个实施方案中,-D-为以下式XV的要素:



[0224] 其中优选地y为0或1,更优选地y为1,并且其中*为与FGF21化合物的连接点,和#为

与-C-的连接点。

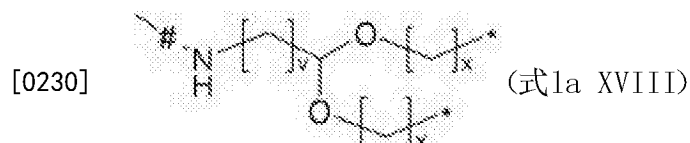
[0225] 在一个实施方案中，-D-为FGF21化合物与例如但是不限于以下式XVI或XVII的要素的醛的反应产物：

[0226] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_t-\text{CHO}$ (式XVI)



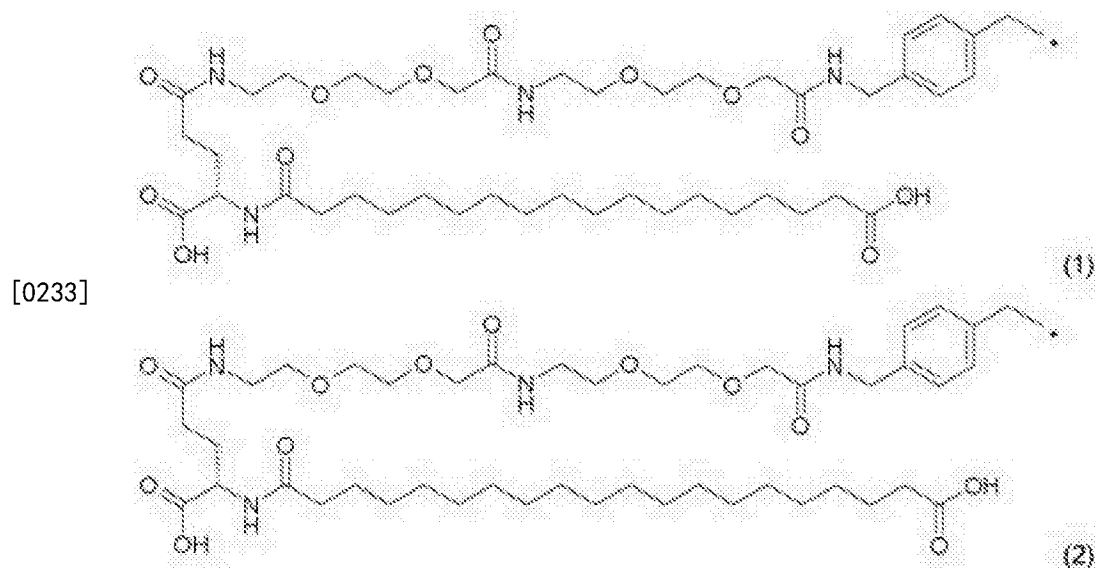
[0228] 其中#为与-C-或-B-的连接点，t为1、2、3、4或5，更优选地t为1、2或3，或者最优选地t为1，或者优选地u为0或1，更优选地u为1。

[0229] 在一个实施方案中，-D-为FGF21化合物与就地活化，例如但是不限于以下式XVIII的要素的醛前体的反应产物：



[0231] #为与-C-或-B-的连接点，v为1、2、3、4或5，和优选地x为1或2，更优选地v为1、2或3和更优选地x为1，或者最优选地v为1和x为1，并且其中*为与FGF21化合物的连接点。

[0232] 在一个实施方案中，部分A-B-C-D-选自以下式(1-2)：

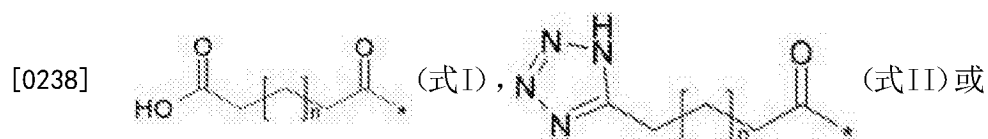


[0234] 其中*为与FGF21化合物的连接点，

[0235] 或相应衍生物的药学上可接受的盐。

[0236] 以下为本发明，特别是本发明第二个方面的衍生物的具体实施方案，其中2个式A-B-C-D-的修饰基团共价连接于FGF21化合物的N-末端氨基酸的α氨基：

[0237] 在一个实施方案中，A-为以下式I、II或III的要素：

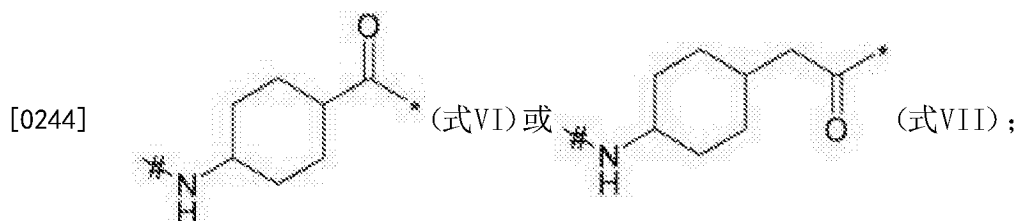
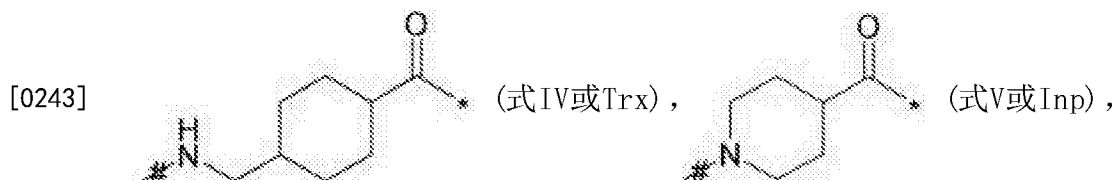




[0240] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

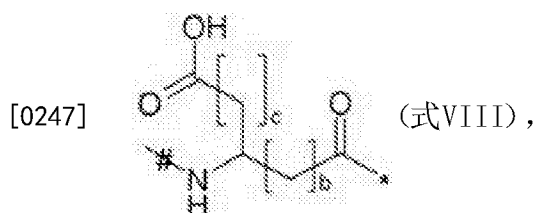
[0241] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合,其中

[0242] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:

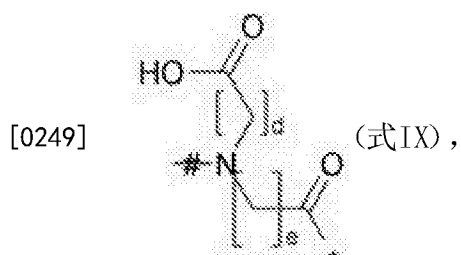


[0245] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点;和

[0246] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:



[0248] 其中b为0、1或2,c为0、1或2,条件是当c为0时b为1或2,和当c为1或2时b为0,*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;

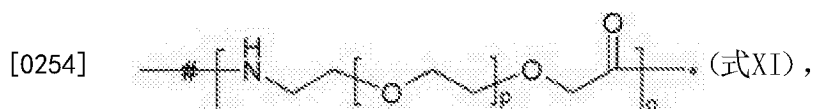


[0250] 其中d为1或2,e为0、1或2,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;或

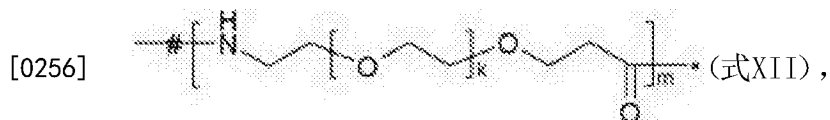
[0251] #-NH-SO₂-(CH₂)_u-CO-* (式X)

[0252] 其中u为2、3或4,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;

[0253] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:



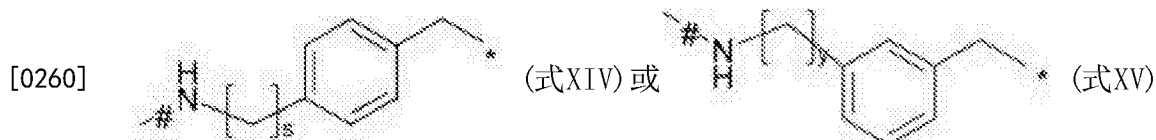
[0255] 其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点;或者



[0257] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23, m为0、1、2、3、4、5或6, *为与-D-或FGF21化合物的连接点;和#为与-B-的连接点;

[0258] -D-为以下式XIII、XIIIa、XIV或XV的要素或者这些要素中的两个一起:

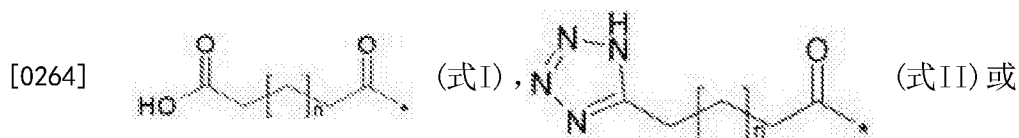
[0259] #NH-(CH₂)_r-CH₂-* (式XIII), #NH-CH(CH₃)₂-CH₂-* (式XIIIa)



[0261] 其中r为1-5范围内的整数, s为0-5范围内的整数, y为0-5范围内的整数, *为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点;

[0262] 或其药学上可接受的盐。

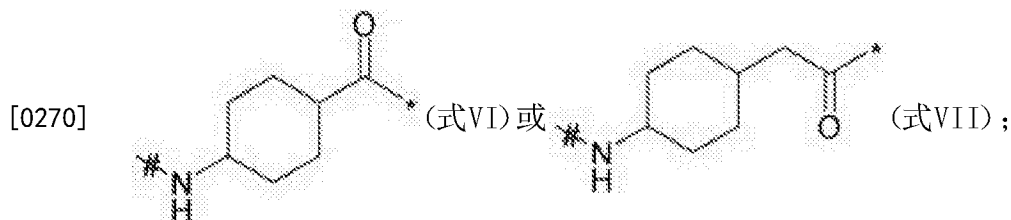
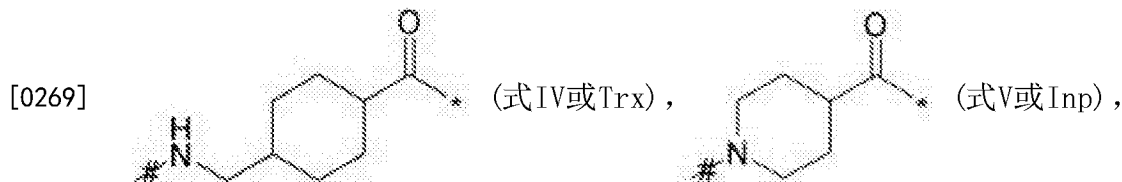
[0263] 在另一个实施方案中, A-为以下式I、II或III的要素:



[0266] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

[0267] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合,其中

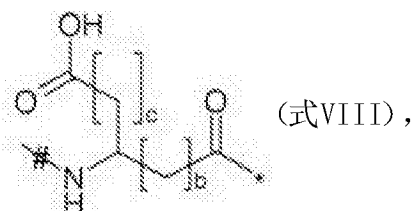
[0268] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:



[0271] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点;和

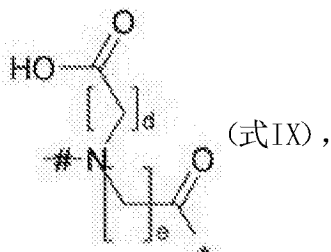
[0272] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:

[0273]



[0274] 其中b为0、1或2, c为0、1或2, 条件是当c为0时b为1或2, 和当c为1或2时b为0, *为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点, 和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;

[0275]



[0276] 其中d为1或2, e为0、1或2, *为与-C-或-B1-的连接点, 和#为与A-或-B1-的连接点;
或

[0277] $\#-NH-SO_2-(CH_2)_u-CO-*$ (式X)

[0278] 其中u为2、3或4, *为与-C-或-B1-的连接点, 和#为与A-或-B1-的连接点;

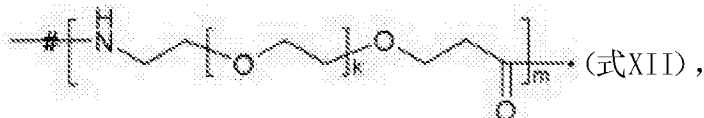
[0279] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:

[0280]



[0281] 其中p为0、1、2、3、4、5或6, q为0、1、2、3、4、5或6, *为与-D-或FGF21化合物的连接点, 和#为与-B-的连接点; 或者

[0282]

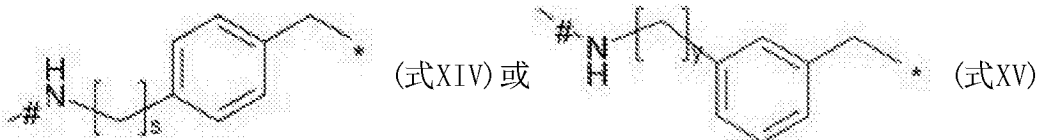


[0283] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23, m为0、1、2、3、4、5或6, *为与-D-或FGF21化合物的连接点; 和#为与-B-的连接点;

[0284] -D-为以下式XIII、XIV或XV的要素:

[0285] $\#-NH-(CH_2)_r-CH_2-*$ (式XIII) 或

[0286]



[0287] 其中r为1-5范围内的整数, 或者s为0-5范围内的整数, 或者y为0-5范围内的整数, *为与FGF21化合物的连接点, 和#为与-C-的连接点,

[0288] 或其药学上可接受的盐。

[0289] 在一个实施方案中, A-为以下式I的要素:

[0290]



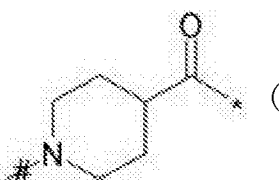
[0291] 其中n优选地为12、14、16或18, 更优选地为12、14或16, 其中*为与-B-的连接点。

[0292] 在另一个实施方案中,A-为以下式I的要素:

[0293]  (式I),

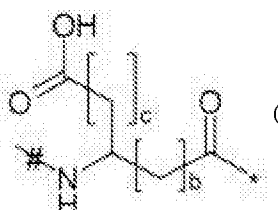
[0294] 其中n优选地为14、16或18,其中*为与-B-的连接点。

[0295] 在一个实施方案中,-B-包含-B1-,优选地为以下式IV或V的要素:

[0296]  (式IV或Trx),  (式V或Inp),

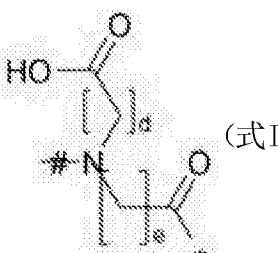
[0297] 并且其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点。

[0298] 在一个实施方案中,-B-包含-B2-,优选地为1或2个以下式VIII的要素:

[0299]  (式VIII),

[0300] 其中更优选地c为0和b为2 (γ -Glu),或者c为0和b为1 (β -Asp),并且其中*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点。

[0301] 在一个实施方案中,-B-包含-B2-,优选地为1或2个以下式IX的要素:

[0302]  (式IX),

[0303] 其中更优选地d为1和e为2,或者d为2和e为1,并且其中*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点。

[0304] 在一个实施方案中,-B-包含-B2-,优选地为1或2个以下式X的要素:

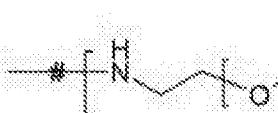
[0305] $\#-NH-SO_2-(CH_2)_u-CO-*$ (式X),其中更优选地u为3,并且其中*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点。

[0306] 在一个实施方案中,-C-为以下式XI的要素:

[0307]  (式XI),

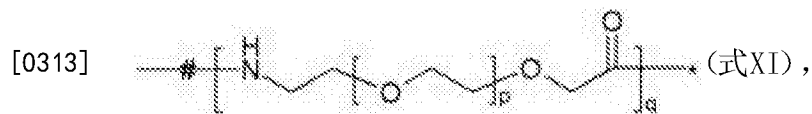
[0308] 其中优选地q为0、1、2、3或4,更优选地q为1或2,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0309] 在一个实施方案中,-C-为以下式XI的要素:

[0310]  (式XI),

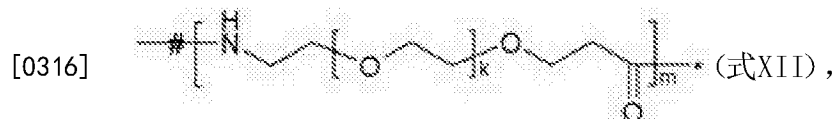
[0311] 其中优选地p为1或2,更优选地p为1,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0312] 在一个实施方案中,-C-为以下式XI的要素:



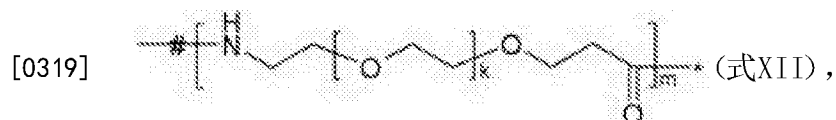
[0314] 其中p为1和q为1或2,优选地p为1和q为2,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0315] 在一个实施方案中,-C-为以下式XII的要素:



[0317] 其中优选地m为0、1或2,更优选地m为1或2,并且其中*为与-D-的连接点,和#为与-B-的连接点。

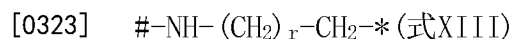
[0318] 在一个实施方案中,-C-为以下式XII的要素:



[0320] 其中优选地k为1、2、3、4、5或11,更优选地k为5,甚至更优选地m为1和k为4、5或11,或者最优选地m为1和k为5,并且其中*为与-D-的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0321] 在本发明的一个实施方案中,-D-不为如本文定义的式XIII的要素。换句话说,-D-为如本文定义的式XIV或XV的要素。

[0322] 在一个实施方案中,-D-为以下式XIII的要素:



[0324] 其中优选地r为1、2或3,更优选地r为1,并且其中*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0325] 在一个实施方案中,-D-为以下式XIV的要素:



[0327] 其中优选地s为0或1,更优选地s为1,并且其中*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0328] 在一个实施方案中,-D-为以下式XV的要素:



[0330] 其中优选地y为1、2或3,更优选地y为1,并且其中*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0331] 在一个实施方案中,-D-为FGF21化合物与例如但是不限于以下式XV或XVI的要素

L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21 (化合物III); N- α (4- {[2- (2- {2- [2- (2- {2- [(S)-4-羧基-4- (17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙氧基] 乙氧基} 乙氧基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21 (化合物IV); 或相应衍生物的药学上可接受的盐。

[0344] 以下为其特征为组成性FGF21化合物的结构的本发明衍生物的另外的具体实施方案:

[0345] 优选地, FGF21化合物与SEQ ID NO:1具有至少80%, 优选地至少85%, 更优选地至少90%, 甚至更优选地至少95%的同一性。

[0346] 优选地, FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较具有最多36个氨基酸的变化(修饰), 优选地具有最多30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸的变化; 更优选地具有最多15、14、13、12、11或10个氨基酸修饰; 甚至更优选地具有最多9、8、7、6或5个氨基酸修饰; 或者最优选地具有最多4、3、2或1个氨基酸修饰。

[0347] 在一个实施方案中, FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含至少一个以下修饰:

-1G, -1A, -1S, -1F, -1M, R17A, R17H, Q27E, Q28E,

A31E, R36A, R36H, K56R, K59R, K69R, S71C, D102E, D102N, D102T, N121Q, N121D, K122R,

[0348] D159E, L166F, S167G, M168L, D169E, V169aT, des170, G170T, G170P, P171L, P171G, P171S, S172E, S172L, S172Q, Q173E, Q173aA, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, des181, S181K, S181R 和/或 182G.

[0349] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含Y179F、A180E和des 181 (i); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (ii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iii); 最优选地其包含(i)、(ii)和(iii)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0350] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含S71C (i), 优选地其另外包含Y179F、A180E和des 181 (ii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0351] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含N121Q (i); Y179F、A180E和des 181 (Ii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii) (iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0352] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含S71C (i); N121Q (ii); 优选地其另外包含Y179F、A180E和des 181 (iii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iv); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (v); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0353] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含N121Q (i); Y179F、A180E和des 181 (ii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0354] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含S71C (i); N121Q (ii); Y179F、A180E和des

181 (iii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iv); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (v); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(v)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0355] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含Y179F、A180E和des 181 (i); 优选地其另外包含des170、173aA和G174V (ii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iii); 最优选地其包含(i)、(ii)和(iii)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0356] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含S71C (i); 优选地其另外包含Y179F、A180E和des 181 (ii); 优选地其另外包含des170、173aA和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0357] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含N121Q (i); Y179F、A180E和des 181 (ii); 优选地其另外包含des170、173aA和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0358] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含S71C (i); N121Q (ii); Y179F、A180E和des 181 (iii); 优选地其另外包含des170、173aA和G174V (iv); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (v); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(v)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0359] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含Y179F和A180E (i); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (ii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iii); 最优选地其包含(i)、(ii)和(iii)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0360] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含S71C (i); 优选地其另外包含Y179F和A180E (ii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0361] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含N121Q (i); Y179F和A180E (ii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0362] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含S71C (i); N121Q (ii); 优选地其另外包含Y179F和A180E (iii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iv); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (v); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0363] 在一个实施方案中, FGF21化合物包含N121Q (i); Y179F和A180E (ii); 优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii); 更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv); 最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0364] 在一个实施方案中,FGF21化合物包含S71C (i);N121Q (ii);Y179F和A180E (iii);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iv);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (v);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(v)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0365] 在一个实施方案中,FGF21化合物包含Y179F和A180E (i);优选地其另外包含des170、173aA和G174V (ii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iii);最优选地其包含(i)、(ii)和(iii)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0366] 在一个实施方案中,FGF21化合物包含S71C (i);优选地其另外包含Y179F和A180E (ii);优选地其另外包含des170、173aA和G174V (iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0367] 在一个实施方案中,FGF21化合物包含N121Q (i);Y179F和A180E (ii);优选地其另外包含des170、173aA和G174V (iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0368] 在一个实施方案中,FGF21化合物包含S71C (i);N121Q (ii);Y179F和A180E (iii);优选地其另外包含des170、173aA和G174V (iv);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (v);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(v)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A (例如-1A)。

[0369] 在一个实施方案中,FGF21化合物在146位具有脯氨酸,其中位置编号指的是SEQ ID NO:1,后者为先前技术已知的FGF21的等位基因的野生型形式。

[0370] 以下为其特征为生物和化学性质的本发明衍生物的另外具体的实施方案:

[0371] 在一个实施方案中,本发明的衍生物被延长。

[0372] 本发明的衍生物优选地具有可接受的效力,参见本文实验部分的实施例38。

[0373] 在一个实施方案中,本发明衍生物的效力为Met-FGF21的效力的至少1%,优选地为至少5%,更优选地为至少10%,甚至更优选地为至少20%,或者最优选地为至少30%,其中所述效力通过测量3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖摄取进行测定,参见实施例38。

[0374] 在一个实施方案中,本发明衍生物的效力为相对于Met-FGF21的效力的至少40%,优选地为至少50%,更优选地为至少60%,甚至更优选地为至少70%。

[0375] 在一个实施方案中,本发明衍生物的效力相对于Met-FGF21的效力可能甚至为至少80%,优选地为至少90%,更优选地为至少100%,甚至更优选地为至少110%,或者最优选地为至少120%,参见以下实施例38。

[0376] 对于这些实施方案中的每一个,本发明衍生物的效力优选地通过测量3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖摄取进行测定。

[0377] 本发明衍生物的效力作为相对于Met-FGF21的EC₅₀的衍生物的EC₅₀来计算。

[0378] 3T3-L1脂肪细胞源于小鼠3T3-L1成纤维细胞,优选地为ATCC CL-173。

[0379] 本发明衍生物在3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖摄取可如在实施例38中概述的那样测量。

[0380] 在一个实施方案中,本发明的FGF21类似物具有相对于Met-FGF21的效力至少1%的效力,其中所述效力通过测量3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖摄取进行测定,参见实施例38。

[0381] 在一个实施方案中,本发明的FGF21类似物具有相对于Met-FGF21的效力至少5%,优选地至少10%,更优选地至少20%,甚至更优选地至少30%,或者最优选地至少40%的效力。

[0382] 在一个实施方案中,本发明的FGF21类似物具有相对于Met-FGF21的效力至少50%,优选地至少60%,更优选地至少70%,甚至更优选地至少80%,或者最优选地至少90%的效力。

[0383] 在一个实施方案中,本发明的FGF21类似物具有相对于Met-FGF21的效力至少100%,优选地至少120%,更优选地至少140%,甚至更优选地至少160%,或者最优选地至少180%的效力。

[0384] 在一个实施方案中,本发明的FGF21类似物具有相对于Met-FGF21的效力至少200%,优选地至少250%,更优选地至少300%,甚至更优选地至少350%,或者最优选地至少400%,并且甚至更优选地至少500%或者甚至至少600%,特别是至少1000的效力。

[0385] 效力如本文对FGF21衍生物描述的那样进行测定。

[0386] 本发明的FGF21类似物能够相对于媒介物对照组在db/db小鼠中降低血糖。

[0387] 在一个实施方案中,基于以mM表示的平均血糖测量和相对于相应的媒介物对照组,本发明衍生物的血糖被降低至少1%,优选地至少2%,更优选地至少3%,甚至更优选地至少4%,或者最优选地至少5%。

[0388] 在一个实施方案中,本发明的FGF21衍生物具有pERK-HEK293- β -klotho,并且HSA [EC₅₀ (nM)]值不低于10 nM,优选地不低于5 nM,并且尤其优选地不低于2 nM,并且甚至更优选地不低于约1 nM,参见以下描述的试验(实施例39)。

[0389] 在一个实施方案中,当皮下给予小鼠时,本发明的衍生物具有至少1.5小时,优选地至少2小时,更优选地至少4小时,甚至更优选地至少5小时,或者最优选地至少6小时的T_{1/2},参见以下实施例40。

[0390] 在一个实施方案中,当皮下给予小鼠时,本发明的衍生物具有至少10小时,优选地至少15小时,更优选地至少24小时,或者最优选地至少48小时的T_{1/2}。小鼠为db/db小鼠,优选地为缺乏瘦素(leptin)受体的小鼠。

[0391] 在一个实施方案中,本发明衍生物的剂量为0.5 mg/kg,尽管也可使用0.1-1.0 mg/kg范围内的剂量。

[0392] 在另一个实施方案中,当在小型猪静脉内给予时,本发明的衍生物具有至少15小时,优选地至少20小时,更优选地至少30小时,甚至更优选地至少40小时,或者最优选地至少50小时的T_{1/2}。

[0393] 当在小型猪静脉内给予时,本发明的衍生物可能甚至具有至少60小时,优选地至少70小时,更优选地至少75小时的T_{1/2}。小型猪优选地为正常的雄性Göttingen小型猪。在每个治疗组中的猪数目优选地为n=3-4。猪优选地为12-15个月龄,并且更优选地具有约25 kg的体重。猪优选地被给予优选为0.1 mg/kg (约5 nmol/kg)的单静脉剂量。

[0394] 本发明的衍生物和类似物以及比较性FGF21化合物的血浆浓度可通过本领域已知的任何合适的方法测定。优选的试验为可得自BioVendor,具有目录号RD191108200R的成纤维细胞生长因子-21人ELISA (例如BioVendor GmbH, Im Neuenheimer Feld 583, D-69120 Heidelberg, 德国)。

[0395] 本发明的衍生物对db/db小鼠的血糖水平具有体内作用,参见以下实施例41。

[0396] 本发明的衍生物相对于媒介物对照组能够降低db/db小鼠体内的血糖。

[0397] 在一个实施方案中,在已经给予最后剂量的衍生物之后,本发明衍生物的血糖值被降低24小时,优选地为48小时。

[0398] 在一个实施方案中,基于以mM表示的平均血糖测量和相对于相应的媒介物对照组,本发明衍生物的血糖值被降低至少10%,优选地至少15%,更优选地至少20%,甚至更优选地至少25%,或者最优选地至少30%。

[0399] 在一个实施方案中,本发明衍生物的血糖值被降低至少35%,优选地至少40%,更优选地至少45%,或者最优选地至少50%。

[0400] 本发明的衍生物优选地具有可接受的效力和延长的半衰期。

[0401] 在一个实施方案中,当皮下给予小鼠时,本发明的衍生物具有至少1.5小时,优选地至少2小时,更优选地至少4小时,甚至更优选地至少5小时,或者最优选地至少6小时的 $T_{1/2}$ -并且同时效力如在本文的任何一个实施方案中描述的那样,参见实施例40。

[0402] 在一个实施方案中,当皮下给予小鼠时,本发明的衍生物具有至少10小时,优选地至少15小时,更优选地至少24小时,或者最优选地至少48小时的 $T_{1/2}$ -并且同时效力如在本文的任何一个实施方案中描述的那样。

[0403] 在一个实施方案中,当在小型猪静脉内给予时,本发明的衍生物具有至少15小时,优选地至少20小时,更优选地至少30小时,甚至更优选地至少40小时,或者最优选地至少50小时的 $T_{1/2}$ -并且同时效力如在本文的任何一个实施方案中描述的那样。

[0404] 在一个实施方案中,当在小型猪静脉内给予时,本发明的衍生物具有至少60小时,优选地至少70小时,更优选地至少75小时的 $T_{1/2}$ -并且同时效力如在本文的任何一个实施方案中描述的那样。

[0405] 术语“稳定的”或稳定性指的是如本文描述的那样测定的效力。

[0406] 在一个实施方案中,本发明的类似物在用 H_2O_2 温育后效力为至少15%,优选地为至少20%,更优选地为至少30%,甚至更优选地为至少40%,或者最优选地为至少50%,其中效力为相对于以相同方式然而没有 H_2O_2 处理的Met-FGF21。

[0407] 包括本发明的FGF21类似物和FGF21化合物的衍生物的FGF21化合物可如对类似化合物描述的那样类似地进行制备。更具体地讲,参照以下具体操作实施例以及描述此类化合物的制备的其它出版物。

[0408] 以下实施例1和2描述FGF21和FGF21类似物在大肠杆菌中的克隆和表达。或者,任选地具有N-末端延伸的FGF21和FGF21类似物可如下在酵母菌中表达。

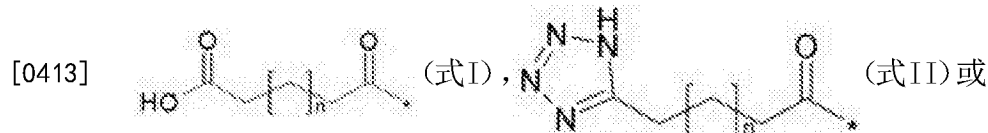
[0409] 具有N-末端氨基酸延伸的FGF21可在酿酒酵母中表达。在一个实施方案中,这需要其中产生在PMT2、PEP4和YPS1中破坏的菌株的菌株设计。这种菌株可使用依赖于同源重组的典型技术进行设计,使得各位置具有N-末端延伸的FGF21的位点特异性整合在可保持在酿酒酵母中的酿酒酵母表达载体上编码。为了把FGF21类似物引向分泌途径,可在重组表达载体中提供包括信号肽的pre-pro序列(例如MFa pre-pro前导序列)。该序列结合于以正确的阅读框架编码FGF21类似物的DNA。这种信号肽确保分泌到介质。在上游和邻近FGF21类似物放置序列,一种氨基二羧酸(dibasic amino acid)序列,确保pre-pro序列在分泌到介质之前自FGF21类似物裂解。这种裂解很可能是由KEX2活性引起的。可自介质收获FGF21类似

物。

[0410] 如果需要, FGF化合物的衍生物和FGF21类似物可与其它药物例如胰岛素一起配制。

[0411] 概括地说并补充以上陈述, 本发明的某些实施方案如下:

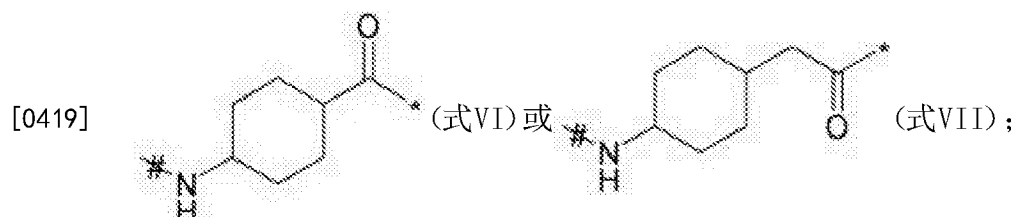
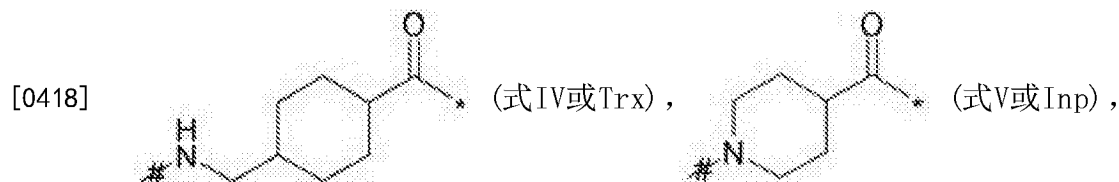
[0412] 1. 一种FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐, 其中式A-B-C-D-的修饰基团共价连接于FGF21化合物的N-末端氨基酸的 α 氨基, 其中A-为以下式I、II或III的要素:



[0415] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19, 和*为与-B-的连接点;

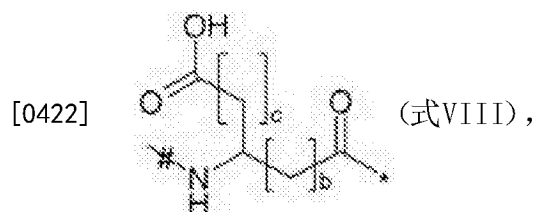
[0416] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合, 其中

[0417] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:

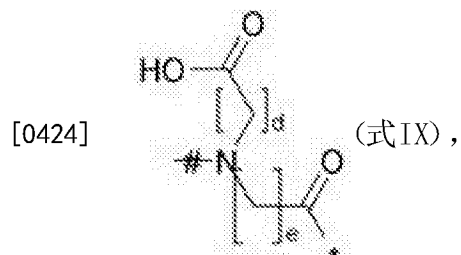


[0420] 其中*为与-B2-或-C-的连接点, 和#为与A-或-B2-的连接点; 和

[0421] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:



[0423] 其中b为0、1或2, c为0、1或2, 条件是当c为0时b为1或2, 和当c为1或2时b为0, *为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点, 和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;



[0425] 其中d为1或2,e为0、1或2,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;
或

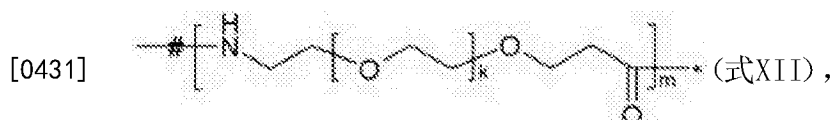
[0426] $\#-\text{NH}-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_u-\text{CO}-*$ (式X)

[0427] 其中u为2、3或4,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;

[0428] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:



[0430] 其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点;或者



[0432] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23,m为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点;和#为与-B-的连接点;

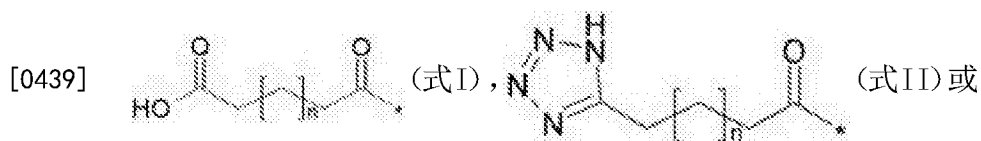
[0433] -D-为以下式XIII、XIIIa、XIV或XV的要素或者这些要素中的两个一起:

[0434] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII), $\#-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-*$ (式XIIIa)



[0437] 其中r为1-5范围内的整数,y为0-5范围内的整数,和s为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

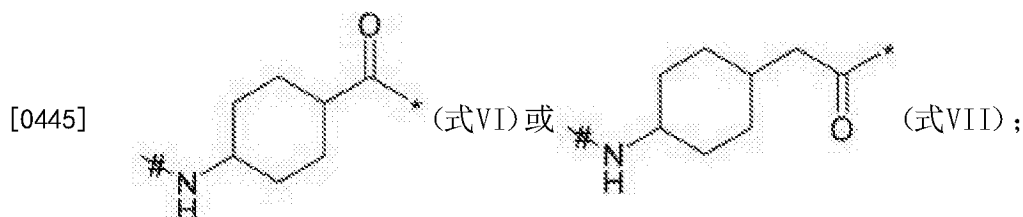
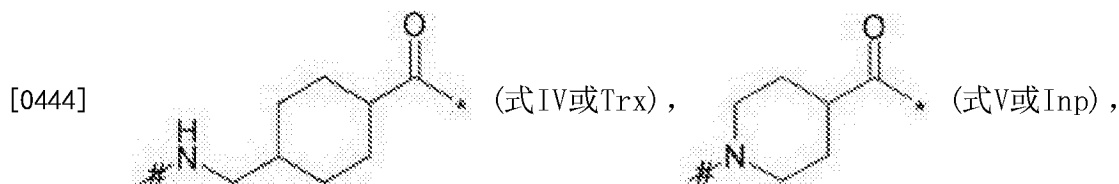
[0438] 2. 一种依据前述实施方案的FGF21化合物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中式A-B-C-D-的修饰基团共价连接于FGF21化合物的N-末端氨基酸的 α 氨基,其中A-为以下式I、II或III的要素:



[0441] 其中n为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19,和*为与-B-的连接点;

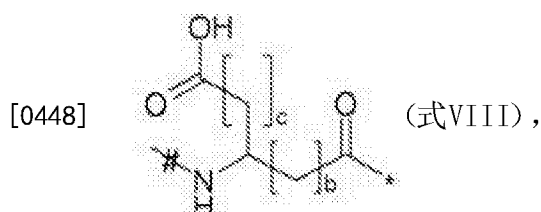
[0442] -B-为不存在、代表键或者选自-B1-、-B2-或其组合,其中

[0443] -B1-为以下式IV、V、VI或VII的要素:

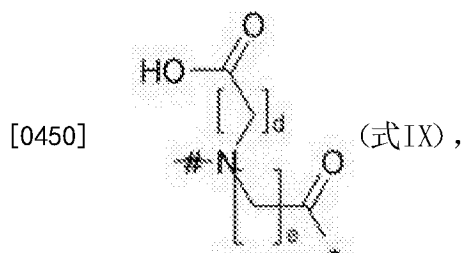


[0446] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点;和

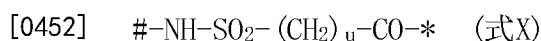
[0447] -B2-为以下式VIII、IX或X的要素或者式VIII和/或式IX和/或式X中最多4个要素的组合:



[0449] 其中b为0、1或2,c为0、1或2,条件是当c为0时b为1或2,和当c为1或2时b为0,*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点;

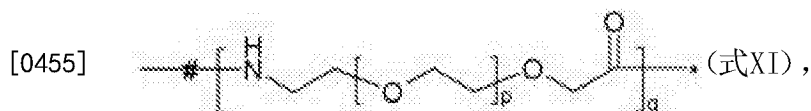


[0451] 其中d为1或2,e为0、1或2,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;
或



[0453] 其中u为2、3或4,*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点;

[0454] -C-为不存在、代表键或者为以下式XI或XII的要素:



[0456] 其中p为0、1、2、3、4、5或6,q为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点;或者



[0458] 其中k为0、1、2、3、4、5、11或23,m为0、1、2、3、4、5或6,*为与-D-或FGF21化合物的连接点;和#为与-B-的连接点;

[0459] -D-为以下式XIII、XIV或XV的要素：

[0460] $\#-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{CH}_2-*$ (式XIII) 或

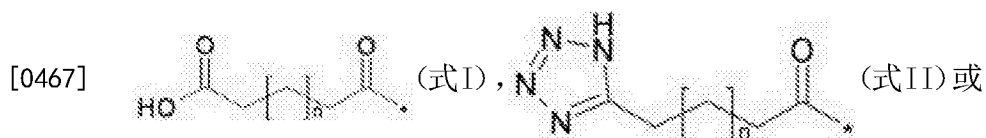


[0463] 其中r为1-5范围内的整数,y为0-5范围内的整数,和s为0-5范围内的整数,*为与FGF21化合物的连接点,和#为与-C-的连接点。

[0464] 3. 实施方案1的衍生物,其中如果A为式(III)的要素,那么-B-和-C-中的至少一个存在和/或不代表键。

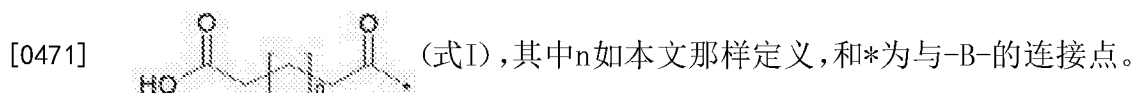
[0465] 4. 前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中存在-B-和-C-并且不代表键。

[0466] 5. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中A-为以下式I、II或III的要素:



[0469] 其中n为12、14或16,和*为与-B-的连接点。

[0470] 6. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-A-为以下式I的要素:

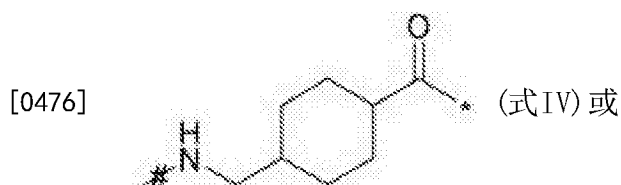


[0472] 7. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中n为12、14、16或18,优选地为12、14或16。

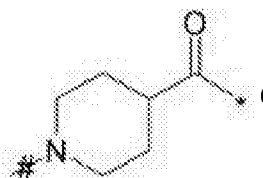
[0473] 8. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中n为14、16或18,优选地为14或16。

[0474] 9. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中A-为式I的要素,优选地为其中n为13的要素。

[0475] 10. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-B-包含-B1-,优选地为以下式IV 或V的要素:



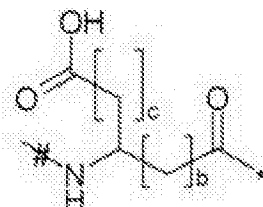
[0477] (式V),



[0478] 其中*为与-B2-或-C-的连接点,和#为与A-或-B2-的连接点。

[0479] 11. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-B-为-B2-,优选地为1或2个以下式VIII的要素:

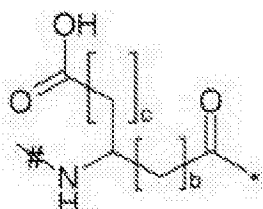
[0480] (式VIII),



[0481] 其中更优选地c为0和b为2,或者c为0和b为1,并且其中*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点。

[0482] 12. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-B-为-B2-,优选地为4个以下式VIII的要素:

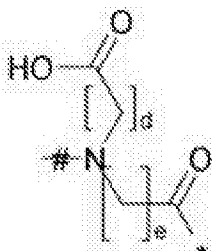
[0483] (式VIII),



[0484] 其中更优选地c为0和b为2,并且其中*为与-C-、-B1-或另一个-B2-的连接点,和#为与A-、-B1-或另一个-B2-的连接点。

[0485] 13. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-B-为-B2-,更准确地讲为以下式IX的要素:

[0486] (式IX),



[0487] 优选地为其中d为1和e为2,并且其中*为与-C-或-B1-的连接点,和#为与A-或-B1-的连接点的要素。

[0488] 14. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-B-为键。

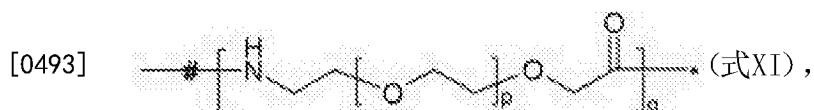
[0489] 15. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-C-为以下式XI的要素:

[0490] (式XI),



[0491] 其中优选地q为0、1、2、3或4,更优选地q为1或2,并且甚至更优选地q为2,和p如本文那样定义,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0492] 16. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-C-为以下式XI的要素:



[0494] 其中优选地p为1或2,更优选地p为1,和q如本文那样定义,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

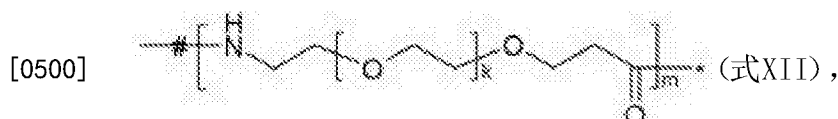
[0495] 17. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中p为1和q为1或2,优选地p为1和q为2。

[0496] 18. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-C-为以下式XII的要素:



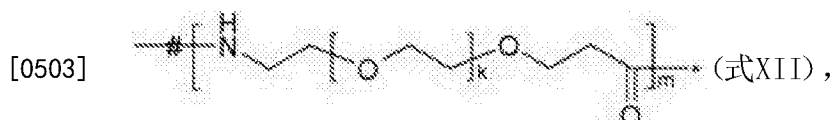
[0498] 其中优选地m为0、1或2,更优选地m为1或2,和k如本文那样定义,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0499] 19. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-C-为以下式XII的要素:



[0501] 其中优选地k为1、2、3、4、5或11,更优选地k为5,和m如本文那样定义,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0502] 20. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-C-为以下式XII的要素:

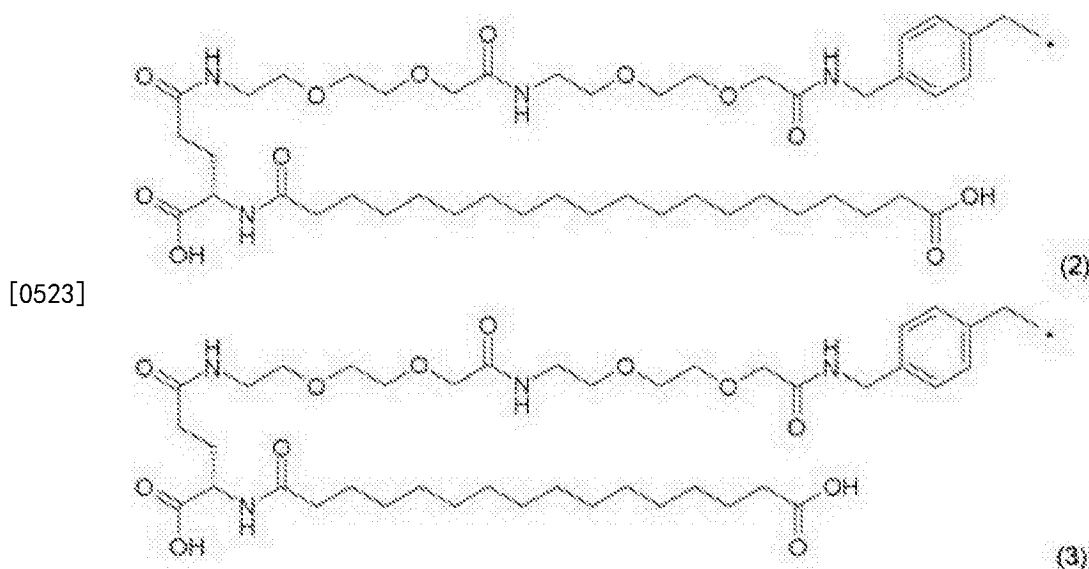


[0504] 其中m为1和k为4、5或11,优选地m为1和k为5,和m如本文那样定义,并且其中*为与-D-或FGF21化合物的连接点,和#为与-B-的连接点。

[0505] 21. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中-D-为以下式XIII、XIIIa、XIV或XV的要素或者这些要素中的两个一起:



[0509] 其中r为1-5范围内的整数,y为0-5范围内的整数,和s为0-5范围内的整数,*为与



[0524] 其中*为与FGF21化合物的连接点。

[0525] 27. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其仅具有1个修饰基团(A-B-C-D-)。

[0526] 28. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其具有2个相同或不同的修饰基团(A-B-C-D-)。

[0527] 29. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其具有1或2个修饰基团(A-B-C-D-)。

[0528] 30. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,所述衍生物为选自本文的实施例3、4、5和6中的衍生物的化合物,优选地为以下化合物:N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21 (化合物I); N- α -双-(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21 (化合物II); N- α -(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [K56R, K59R, K69R, D102T, D121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21 (化合物III); N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21 (化合物IV); 或相应衍生物的药学上可接受的盐。

[0529] 31. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,所述衍生物为选自本文的实施例3、4、5和6中的衍生物的化合物,优选地为以下化合物:N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21 (化合物I); N- α -双-(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21 (化合物II); N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-

(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基)[S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21 (化合物IV);或相应衍生物的药学上可接受的盐。

[0530] 32. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1具有至少80%,优选地至少85%,更优选地至少90%,甚至更优选地至少95%的同一性。

[0531] 33. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较具有最多36个氨基酸的修饰,优选地最多30、25、20、15、10或5个氨基酸的变化,或者最多30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸的变化;更优选地具有最多15、14、13、12、11或10个氨基酸的修饰;甚至更优选地具有最多9、8、7、6或5个氨基酸的修饰;或者最优选地具有最多4、3、2或1个氨基酸的修饰。

[0532] 34. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0533] 35. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含以下修饰中的至少一种:

[0534] -1G, -1A, -1S, -1F, -1M, R17A, 17H, Q27E, A31E, R36A, R36H, S71C, D102E, D102N, D102T, N121Q, des121N, N121D, D159E, L166F, S167G, M168L, D169E, V169aT, des170, G170T, P171L, P171G, S172E, S172L, Q173E, 173aA, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, des181, S181K 和/或 S181R

[0535] 并且优选地所述FGF21化合物包含所述修饰中的至少3种,更优选地包含所述修饰中的至少5种。

[0536] 36. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含以下修饰中的至少一种:

[0537] -1G, -1A, -1S, -1F, -1M, R17A, 17H, Q27E, A31E, R36A, R36H, S71C, D102E, D102N, D102T, N121Q, des121N, N121D, D159E, L166F, S167G, M168L, D169E, V169aT, des170, G170T, P171L, P171G, S172E, S172L, Q173E, 173aA, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, S181K

[0538] 和/或S181R,并且优选地所述FGF21化合物包含所述修饰中的至少3种,更优选地包含所述修饰中的至少5种,并且甚至更优选地包含至少7种修饰。

[0539] 37. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含以下修饰中的至少一种:

[0540] -1G, -1A, -1S, -1F, -1M, R17A, 17H, Q27E, A31E, R36A, R36H, K56R, K59R, K69R, S71C, D102E, D102N, D102T, N121Q, des121N, N121D, K122R, D159E, L166F, S167G, M168L, D169E, V169aT, des170, G170T, P171L, P171G, S172E, S172L, Q173E, 173aA, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, des181, S181K 和/或 S181R

[0541] 并且优选地所述FGF21化合物包含所述修饰中的至少3种,更优选地包含所述修饰中的至少5种,并且甚至更优选地包含至少7种修饰。

[0542] 38. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含以下修饰中的至少一种:

[0543] -1G, -1A, -1S, -1F, -1M, R17A, 17H, Q27E, A31E, R36A, R38H, K56R, K59R, K69R, S71C, D102E, D102N, D102T, N121Q, des121N, N121D, K122R, D159E, L166F, S167G, M168L, D169E, V169aT, des170, G170T, P171L, P171G, S172E, S172L, Q173E, 173aA, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, des181, S181K, S181R 和/或 182G。

[0544] 并且优选地所述FGF21化合物包含所述修饰中的至少3种,更优选地包含所述修饰中的至少5种,并且甚至更优选地包含至少7种修饰。

[0545] 39. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含Y179F、A180E和des 181 (i);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (ii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iii);最优选地其包含(i)、(ii)和(iii)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0546] 40. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含S71C (i);优选地其另外包含Y179F、A180E和des 181 (ii);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0547] 41. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含N121Q (i);Y179F、A180E和des 181 (ii);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0548] 42. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含S71C (i);N121Q (ii);Y179F、A180E和des 181 (iii);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iv);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (v);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(v)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0549] 43. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含Y179F和A180E (i);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (ii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iii);最优选地其包含(i)、(ii)和(iii)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0550] 44. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含S71C (i);优选地其另外包含Y179F和A180E (ii);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0551] 45. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含N121Q (i);Y179F和A180E (ii);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V (iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L (iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0552] 46. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含S71C(i);N121Q(ii);Y179F和A180E(iii);优选地其另外包含P171L、S172E、Q173A和G174V(iv);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L(v);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(v)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0553] 47. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含Y179F、A180E和des 181(i);优选地其另外包含des170、173aA和G174V(ii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L(iii);最优选地其包含(i)、(ii)和(iii)。这些实施方案(i)-(iii)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0554] 48. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含S71C(i);优选地其另外包含Y179F、A180E和des 181(ii);优选地其另外包含des170、173aA和G174V(iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L(iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0555] 49. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含N121Q(i);Y179F、A180E和des 181(ii);优选地其另外包含des170、173aA和G174V(iii);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L(iv);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)和(iv)。这些实施方案(i)-(iv)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0556] 50. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含S71C(i);N121Q(ii);Y179F、A180E和des 181(iii);优选地其另外包含des170、173aA和G174V(iv);更优选地其另外包含L166F、S167G和M168L(v);最优选地其包含(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)。这些实施方案(i)-(v)中的每一个任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0557] 51. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含以下修饰中的至少一种:

-1G, -1A, -1S, -1F, -1M, R17A, 17H, Q27E, A31E, R36A, R36H, S71C, D102E, D102N,

[0558] D102T, N121Q, des121N, N121D, D159E, L166F, S167G, M168L, D169E, V169aT, des170, G170T, P171L, P171G, S172E, S172L, Q173E, 173aA, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, des181,

[0559] S181K和/或S181R,并且优选地所述FGF21化合物包含所述修饰中的至少3种,更优选地包含所述修饰中的至少5种,并且甚至更优选地包含至少7种修饰。

[0560] 52. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物与SEQ ID NO:1相比较包含以下修饰中的至少一种:

-1G, -1A, -1S, -1F, -1M, R17A, 17H, Q27E, A31E, R36A, R36H, S71C, D102E, D102N,

[0561] D102T, N121Q, des121N, N121D, D159E, L166F, S167G, M168L, D169E, V169aT, des170, G170T, P171L, P171G, S172E, S172L, Q173E, 173aA, Q173A, G174A, G174V, Y179F, A180E, S181K

[0562] 和/或S181R,并且优选地所述FGF21化合物包含所述修饰中的至少3种,更优选地包含所述修饰中的至少5种,并且甚至更优选地包含至少7种修饰。

[0563] 53. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含N121Q,并且任选地包括N-末端氨基酸M、G、S、F或A(例如-1A)。

[0564] 54. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0565] 55. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21化合物在146位具有脯氨酸,其中位置编号指的是SEQ ID NO:1。

[0566] 56. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,当皮下给予小鼠时,所述衍生物具有至少1.5小时,优选地至少2小时,更优选地至少4小时,甚至更优选地至少5小时,或者最优选地至少6小时的 $T_{1/2}$,

[0567] 57. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,当皮下给予小鼠时,所述衍生物具有至少10小时,优选地至少15小时,更优选地至少24小时,或者最优选地至少48小时的 $T_{1/2}$ 。

[0568] 58. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,所述衍生物具有相对于Met-FGF21的效力至少1%,优选地为至少5%,更优选地为至少10%,甚至更优选地为至少20%,或者最优选地为至少30%的效力,并且所述效力可通过测量3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖摄取进行测定。

[0569] 59. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,所述衍生物具有相对于Met-FGF21的效力至少40%,优选地为至少50%,更优选地为至少60%,甚至更优选地为至少70%的效力。

[0570] 60. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,所述衍生物具有相对于Met-FGF21的效力至少80%,优选地为至少90%,更优选地为至少100%,甚至更优选地为至少110%,或者最优选地为至少120%的效力。

[0571] 61. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中所述效力相对于Met-FGF21的效力为至少80%,优选地为至少90%,更优选地为至少100%,甚至更优选地为至少110%,或者最优选地为至少120%。

[0572] 62. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中所述效力相对于Met-FGF21的效力为至少100%,优选地至少120%,更优选地至少140%,甚至更优选地至少160%,或者最优选地至少180%。

[0573] 63. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中所述效力相对于Met-FGF21的效力为至少200%,优选地至少250%,更优选地至少300%,甚至更优选地至少350%,或者最优选地至少400%,并且甚至更优选地至少500%或者甚至至少600%,尤其是至少1000%。

[0574] 64. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中效力作为相对于Met-FGF21的 EC_{50} 的衍生物的 EC_{50} 来计算。

[0575] 65. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中3T3-L1脂肪细胞源于小鼠3T3-L1成纤维细胞,优选地为ATCC CL-173。

[0576] 66. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中在3T3-L1脂肪细胞中的葡萄糖摄取如在本文实施例38中概述的那样测量。

[0577] 67. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中FGF21衍生物具有pERK-HEK293- β -klotho,并且HSA [EC_{50} (nM)]值不低于约10 nM,优选地不低于约5 nM,并且尤其优选地不低于约2 nM,并且甚至更优选地不低于约1 nM,参见本文实施例39

中描述的试验。

[0578] 68. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,所述衍生物相对于媒介物对照组能够降低db/db小鼠体内的血糖。

[0579] 69. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中在已经给予最后剂量的衍生物之后,血糖被降低24小时,优选地为48小时。

[0580] 70. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中基于以mM表示的平均血糖测量和相对于相应的媒介物对照组,血糖被降低至少约10%,优选地至少约15%,更优选地至少约20%,甚至更优选地至少约25%,或者最优选地至少约30%。

[0581] 71. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中血糖被降低至少35%,优选地至少40%,更优选地至少45%,或者最优选地至少50%。

[0582] 72. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中(i) db/db小鼠为雄性和9-11周龄,(ii) 衍生物被皮下给予,(iii) 衍生物剂量在0.2-1.0 mg/kg的范围内,优选地为0.2、0.4、0.6、0.8或1.0 mg/kg,(iv) 衍生物被溶解于PBS中,(v) 衍生物被每天给予一次,优选地在第1天、第2天和第3天,(vi) 媒介物对照组用PBS处理,优选地为250 μ l/50 g小鼠,和/或(vii) 血糖使用葡萄糖氧化酶法,优选地使用葡萄糖分析仪例如Biosen 5040进行测量。

[0583] 73. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中媒介物对照组用Met-FGF21替代。

[0584] 74. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其中(i) 衍生物和Met-FGF21两者被溶解于PBS, pH 7.2中,和/或(ii) 衍生物和Met-FGF21的浓度为1 mg/mL。

[0585] 75. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,所述衍生物为在实施例3、4和5中提及的具体衍生物中的任何一种。

[0586] 76. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的FGF21衍生物,所述衍生物相对于媒介物对照组能够降低db/db小鼠的血糖。

[0587] 77. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的FGF21衍生物,当给予人时,基于以mM表示的平均血糖测量和相对于相应的媒介物对照组,所述衍生物导致血糖降低至少1%,优选地至少2%,更优选地至少3%,甚至更优选地至少4%,或者最优选地至少5%。

[0588] 78. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的FGF21衍生物,当测定血糖降低作用时可使用以下特征:(i) db/db小鼠为雄性和9-11周龄,(ii) 类似物被皮下给予,(iii) 类似物剂量在0.1-1.0 mg/kg的范围内,优选地为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8或1.0 mg/kg,(iv) 类似物被每天给予一次,优选地在第1天、第2天和第3天,和/或(v) 血糖使用葡萄糖氧化酶法,优选地使用葡萄糖分析仪例如Biosen 5040进行测量。

[0589] 79. 依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的FGF21衍生物,其中FGF化合物为在以上实施例2(即2a-2d)中提及的具体类似物中的任何一种。

[0590] 80. 一种组合物,所述组合物包含依据以上实施方案中的任何一个的衍生物和药学上可接受的载体。

[0591] 81. 一种依据前述实施方案中的任何一个在可能程度上的衍生物,其用作药物。

[0592] 82. 一种依据以上实施方案中的任何一个的衍生物,所述衍生物用作治疗或预防

糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的药物。

[0593] 83. 一种依据前述实施方案中的任何一个的衍生物,所述衍生物用于制备治疗或预防糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的药物。

[0594] 84. 一种用于治疗呈现糖尿病、血脂异常、肥胖症、心血管疾病、代谢综合征和/或非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 的患者的方法,所述方法包括给予患者治疗有效量的依据前述实施方案中的任何一个的衍生物。

[0595] 85. 一种用于治疗需要重症监护的患者的方法,所述方法包括给予患者治疗有效量的依据前述实施方案中的任何一个的衍生物。

[0596] 86. 本文描述的实施方案、特征和权利要求的任何一种新的组合。

[0597] 各种参考文献在本文被引用,其公开通过引用以其全部结合到本文中。

[0598] 本文描述的一个或多个条款和实施方案的组合,也任选地与一项或更多项以下的权利要求组合,导致其它的实施方案,并且本发明涉及所述条款、实施方案和权利要求的所有可能的组合。

[0599] 以下实施例通过非限制性的说明提供。

实施例

[0600] 以下实施例用于说明本发明。

[0601] 缩写

[0602] 以下缩写在以下按字母顺序使用:AcOH为乙酸, CV为柱体积, DCM为二氯甲烷, DIPEA为二异丙基乙胺, DPBS为杜尔贝科 (Dulbecco) 磷酸盐缓冲盐水, DVB为二乙烯基苯, EtOH为乙醇, EtOAc为乙酸乙酯, HEPES为4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸, HPBCD为羟丙基β环糊精, HPLC为高效液相色谱法, IBMX为3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, Inp为异哌啶酸, IPTG为异丙基-β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷 (thiogalactopyranoside) 检查, LCMS为液相色谱-质谱法, MALDI-TOF MS为基质辅助激光解吸 (Matrix-Assisted Laser Desorption) /电离飞行时间质谱, NaAc为乙酸钠, OtBu为叔丁基酯, PBS为磷酸盐缓冲盐水, RT为室温, TFA为三氟乙酸, THF为四氢呋喃, Tris为三(羟基甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-羟基甲基丙-1,3-二醇, Trx为氨甲环酸, TSTU为O-(N-琥珀酰亚胺基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐和UPLC为超高效液相色谱法。

[0603] 通用方法

[0604] LCMS法1 (LCMS1)

[0605] Agilent Technologies LC/MSD TOF (G1969A) 质谱仪用于在自Agilent 1200系列HPLC系统洗脱之后确定样品的质量。蛋白质光谱的反褶积用Agilent的蛋白质确认软件计算。

[0606] A:在水中的0.1%三氟乙酸

[0607] B:在乙腈中的0.1%三氟乙酸

[0608] 柱:Zorbax 5u, 300SB-C3, 4.8 x 50 mm

[0609] 梯度:25%-95%乙腈经15分钟

[0610] LCMS法2 (LCMS2)

[0611] Waters Micromass ZQ质谱仪用于在自Waters Alliance HT HPLC系统洗脱之后确定样品的质量。

[0612] 洗脱剂:

[0613] A:在水中的0.1%三氟乙酸

[0614] B:在乙腈中的0.1%三氟乙酸

[0615] 柱:Phenomenex, Kinetex C18 50 X 4.60 mm id 2.6 μ m, 100AA

[0616] 梯度:10%-90% B经7.5分钟,以1.0 ml/分钟

[0617] 实施例1:FGF21的克隆和表达

[0618] 人FGF21的DNA和氨基酸序列已经由例如Nishimura等在Biochim. Biophys. Acta 1492 (1):203-206 (2000)中公开。所述序列也可得自公用数据库,登记号分别为EMBL:AB021975和UNIPROT:Q9NSA1。

[0619] 原生多肽用于分泌的28个氨基酸的信号肽合成。

1 MDSDETGFEH SGLWVSVLAG LLLGACQ4HP IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY

[0620] 51 TDDAQQTEAH LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR

101 FLCQRPD GAL YGSLHFDPEA CSFRELLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK

151 SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI LAQPPDVGS SDPLSMVGPS

[0621] 201 QGRSPSYAS

[0622] 以上以斜体显示的信号肽包含在作为SEQ ID NO:2列出的附属序列中。由剩余的181个氨基酸组成的成熟FGF21多肽包含在作为SEQ ID NO:1列出的序列中。

[0623] 成熟FGF21多肽作为胞内蛋白在大肠杆菌中被克隆和表达,不含信号肽,但是具有增加的N-末端蛋氨酸或N-末端Met-Ala,其在大肠杆菌中被处理导致形成N-末端Ala (-1Ala)。更具体地讲,分别在Met的3'-末端ATG密码子的550 bp编码区以及3'-和5'-末端上的NdeI和BamHI限制性位点,在噬菌体T7启动子控制下被插入在NdeI-BamHI中的表达载体pET 11c,并且转变成大肠杆菌B BL21 (DE3)。将细胞在LB amp 100 μ g/mL中生长至OD₄₅₀ 0.5,并且用0.3 mM IPTG于37°C诱导表达4小时。通过声波处理制备细胞的粗提取物用于FGF21表达的分析。

[0624] 考马斯染色的SDS-PAGE显示成功表达FGF21,其被鉴定主要在可溶性的上清液部分中,而极少在不溶性的颗粒中。尽管如此表达的FGF21 (Met-FGF21) (化合物A)的理论分子量为19.5 kD,它作为25 kD蛋白质在凝胶上迁移,其可能是由于高含量的脯氨酸,延迟了蛋白的移动。

[0625] 实施例2:FGF21类似物的克隆、表达和纯化

[0626] Met-FGF21的以下类似物如本领域已知的那样被设计,并如在实施例1中一般性描述的那样在大肠杆菌中表达。

2a) [K56R, K59R, K69R, K122R] Gly-FGF21.
2b) [Q28R, K56R, K59R, K69R, D102T, D121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21.
2c) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21.
2d) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21.
[0627] 2e) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21.
2f) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21.
2g) [N121Q] Met-FGF21.
2h) [N121Q] Ala-FGF21.
2i) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Phe-FGF21.

[0628] 可通过本身已知并适合于这种生物体的方法在酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达和制备相同的类似物。

[0629] 如在实施例1-2中描述的那样制备的FGF21多肽及其类似物如下或使用类似的技术进一步纯化:

[0630] 对大肠杆菌在10 mM磷酸钾缓冲液pH 7.5中的浆状物(20% w/v)进行声处理(3秒开/关间隔,在冰上5分钟)。多肽经离心(10000 x g, 30分钟)成丸状,经声波处理再次溶解于50 mM Tris pH 8.0中,并经离心(10000 x g, 30分钟)去除碎片。在所生成的上清液中的多肽如在蛋白质纯化。原理和实践系列: 施普林格在化学领域的先进文本(Protein Purification. Principles and Practice Series: Springer Advanced Texts in Chemistry Scopes), Robert K. 第3版, 1994中一般性描述的那样,经使用Q Sepharose Fast Flow树脂(GE Healthcare)的阴离子交换色谱法(50 mM Tris pH 8.0, 50-250 mM NaCl)纯化。在一些情况下,通过使用用50 mM Tris pH 8.0和200 mM NaCl操作的HiLoad 26/60 Superdex pg 75柱(GE Healthcare)的尺寸排阻色谱法进行进一步纯化。为了储存,把多肽转移至DPBSS,并冷冻贮藏。

[0631] 实施例3:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0632] 含有醛的修饰基团可如在以下描述的那样合成,并且FGF21及其类似物可用这样的修饰基团也如在下文描述的那样衍化。

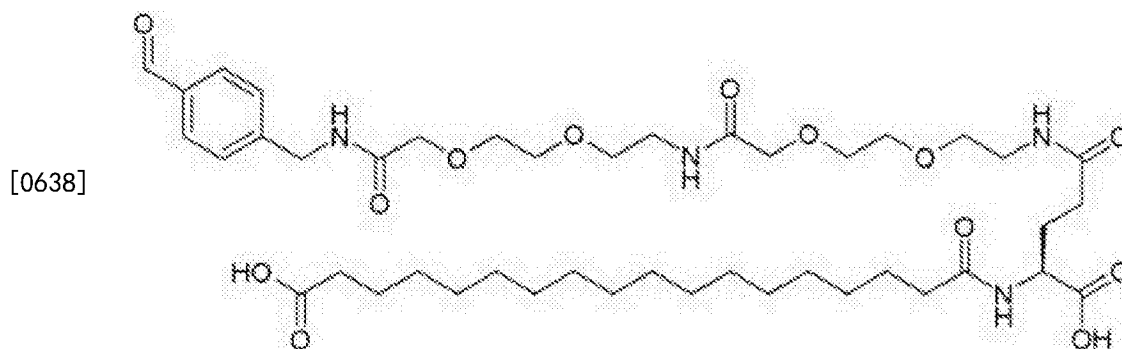
[0633] 17-[(S)-1-羧基-3-(2-{2-[(2-{2-[(4-甲酰基苄基氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙基氨基甲酰基]十七烷酸的制备

[0634] 把N-(4-甲酰基苄基)氨基甲酸叔丁基酯(100 mg)用TFA/DCM (1:1)处理1小时。真空浓缩混合物,并用甲苯一起浓缩(两次)。把残余物溶于THF (2.5 ml)中,并加入17-((S)-1-羧基-3-{2-[(2-{2-[(2,5-二氧代吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十七烷酸(320 mg, 如先前在W02009/083549中描述的那样制备)在THF (5 ml)中的溶液。缓慢加入DIPEA (0.5 ml)。在130分钟后,真空浓缩混合物。把残余物溶于EtOAc 和1N HCl中。用1N HCl和盐水提取有机层。干燥(Na₂SO₄)有机层并真空浓缩,得到为白色固体的标题化合物,其无需进一步纯化即可使用。产量234 mg (72%)。

[0635] LCMS2: 理论质量: 851.0;实测值: 851.5 (M+1)。

[0636] (K56R, K59R, K69R, K122R) Gly-FGF21衍生物N- α -(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21 (化合物I)的制备

[0637] 如在实施例1和2中一般性描述的那样制备的K56R, K59R, K69R, K122R Gly-FGF21类似物(具有K56R, K59R, K69R和K122R及N-末端G的SEQ ID NO:1)中的N-末端Gly残基,在 α -氨基用以下试剂修饰:



[0639] 向K56R, K59R, K69R, K122R Gly-FGF21在PBS-缓冲液中的6.3 mg/ml溶液(2 mg, 0.32 ml, 102 nmol)中,加入所制备的17-[(S)-1-羧基-3-(2-{2-[(2-{2-[(4-甲酰基-苄基-氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙基氨基甲酰基]-十七烷酸在1M NaAc中的20 mg/ml溶液(6.1 μ l, 1.5 eq)。把pH用10% AcOH调节至6.0。在15分钟后,加入1M NaCNBH₃ (7 μ l)。把混合物在室温下放置0.5小时,然后在5℃下储存过夜。混合物用20 mM Tris, 5% EtOH, pH 7.5稀释,并经阴离子交换色谱法在MonoQ 5/50 GL上纯化,流量2 ml,含有A-缓冲液:20 mM Tris, 5% EtOH, pH 7.5和B-缓冲液:20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 5% EtOH, pH 7.5,使用梯度为5CV的0-20% B,60 CV的20-80% B。化合物在HiPrep 26/10脱盐柱上进行缓冲液更换为DPBS-缓冲液。所收集的部分在viva自旋超滤装置MWCO 10.000 Da,以3000g进行浓缩。

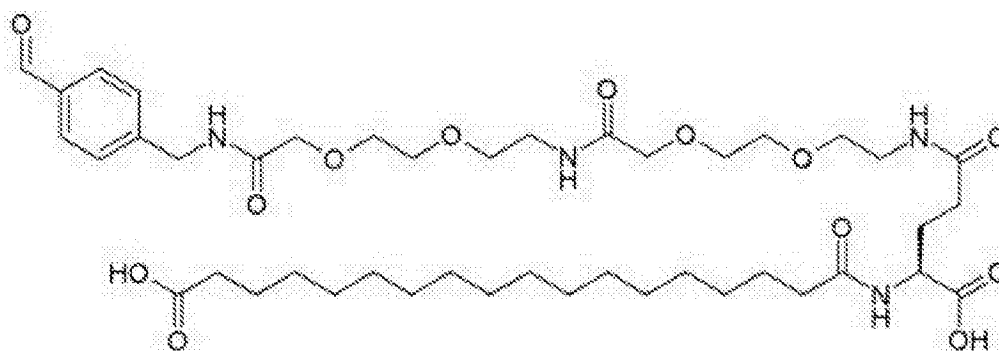
[0640] LCMS1: 理论质量 = 20413.1;实测值: 20413.4。

[0641] 实施例4:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0642] (K56R, K59R, K69R, K122R) Gly-FGF21衍生物N- α -双-(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [Arg56, Arg59, Arg69, Arg122] Gly-FGF21 (化合物II)的制备

[0643] 如在实施例1和2中一般性描述的那样制备的K56R, K59R, K69R, K122R Gly-FGF21类似物(具有K56R, K59R, K69R和K122R及N-末端G的SEQ ID NO:1)中的N-末端Gly残基,在 α -氨基用以下试剂修饰:

[0644]



[0645] 化合物如在实施例3中描述的那样,使用5当量的17-[(S)-1-羧基-3-(2-{2-[(2-{2-[(4-甲酰基苄基氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙基氨基甲酰基]十七烷酸进行制备。

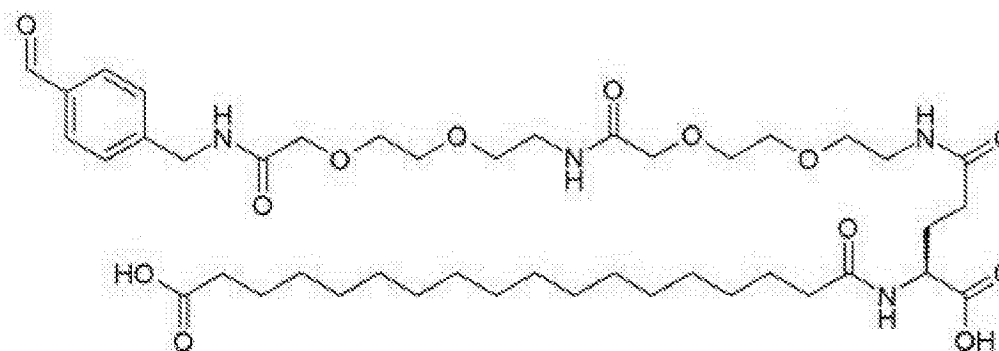
[0646] LCMS1: 理论质量 = 21248.2;实测值: 21248.9。

[0647] 实施例5:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0648] (K56R, K59R, K69R, D102T, D121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T) Ala-FGF21衍生物N- α -(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [K56R, K59R, K69R, D102T, D121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T] Ala-FGF21 (化合物III)的制备

[0649] 如在实施例1和2中一般性描述的那样制备的K56R, K59R, K69R, D102T, D121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T Ala-FGF21类似物(具有K56R, K59R, K69R, D102T, D121Q, K122R, L166F, S167G, M168L, G170T和N-末端A的SEQ ID NO:1)中的N-末端Ala残基,在 α -氨基用以下试剂修饰:

[0650]



[0651] 化合物如在实施例3中描述的那样,使用5当量的17-[(S)-1-羧基-3-(2-{2-[(2-{2-[(4-甲酰基苄基氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙基氨基甲酰基]十七烷酸进行制备。

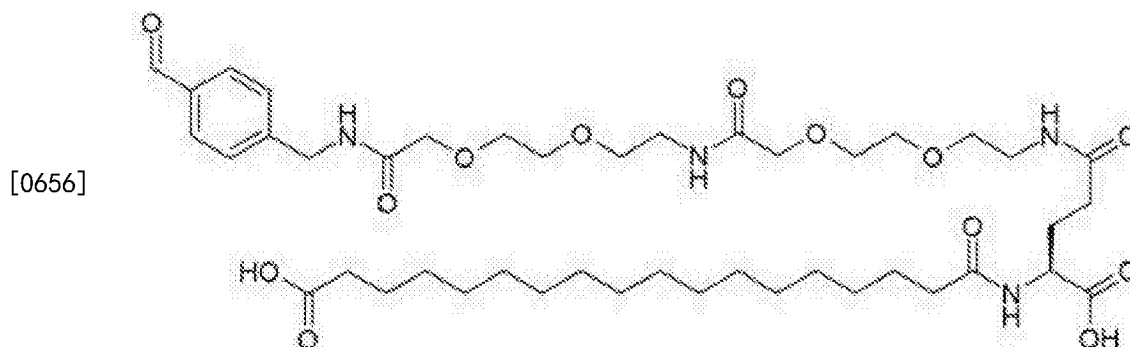
[0652] LCMS1: 理论质量 = 20485.2;实测值: 20485.5。

[0653] 实施例6:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0654] N- α -(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21 (化合物IV)

[0655] 如在实施例1和2中一般性描述的那样制备的S71C, N121Q, L166F, S167G,

M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181 Ala-FGF21类似物(具有S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181和N-末端A的SEQ ID NO:1)中的N-末端Ala残基,在 α -氨基用以下试剂修饰:



[0657] 化合物如在实施例3中描述的那样,使用5当量的17-[(S)-1-羧基-3-(2-{2-[2-(2-[4-甲酰基苄基氨基甲酰基]甲氧基]乙基氨基甲酰基]甲氧基]乙氧基}乙基氨基甲酰基)丙基氨基甲酰基]十七烷酸在pH 6.0下进行制备。

[0658] LCMS1: 理论质量 = 20329.14;实测值: 20329.14

[0659] 可类似地制备以下实施例中的本发明FGF21衍生物:

[0660] 实施例7:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0661] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基]乙氧基}乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物V)。

[0662] 实施例8:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0663] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基]乙氧基}乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物VI)。

[0664] 实施例9:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0665] N- α -双(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基]乙氧基}乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物VII)。

[0666] 实施例10:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0667] N- α -双(4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基]乙氧基}乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物VIII)。

[0668] 实施例11:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0669] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基)丁酰氨基]乙氧基]乙氧基}乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q, L166F,

S167G, M168L, des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物 IX)。

[0670] 实施例12:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0671] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物X)。

[0672] 实施例13:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0673] N- α -双 (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物 XI)。

[0674] 实施例14:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0675] N- α -双 (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Gly-FGF21 (化合物XII)。

[0676] 实施例15:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0677] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21 (化合物XIII)。

[0678] 实施例16:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0679] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21 (化合物 XIV)。

[0680] 实施例17:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0681] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21 (化合物 XV)。

[0682] 实施例18:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0683] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ser-FGF21 (化合物XVI)。

[0684] 实施例19:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0685] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F,

S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ser-FGF21 (化合物XVII)。

[0686] 实施例20:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0687] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ser-FGF21 (化合物XVIII)。

[0688] 实施例21:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0689] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ser-FGF21 (化合物XIX)。

[0690] 实施例22:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0691] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Phe-FGF21 (化合物XX)。

[0692] 实施例23:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0693] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Phe-FGF21 (化合物XXI)。

[0694] 实施例24:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0695] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Phe-FGF21 (化合物XXII)。

[0696] 实施例25:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0697] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Phe-FGF21 (化合物XXIII)。

[0698] 实施例26:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0699] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 乙氧基} 乙氧基) 乙酰氨基] 甲基} 苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Met-FGF21 (化合物XXIV)。

[0700] 实施例27:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0701] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]

乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Met-FGF21 (化合物XXV)。

[0702] 实施例28:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0703] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q, L166F, S167G, M168L, des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Met-FGF21 (化合物XXVI)。

[0704] 实施例29:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0705] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L des170, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Met-FGF21 (化合物XXVII)。

[0706] 实施例30:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0707] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q] Gly-FGF21 (化合物XXVIII)。

[0708] 实施例31:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0709] N- α -双 (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q] Gly-FGF21 (化合物XXIX)。

[0710] 实施例32:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0711] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q] Ala-FGF21 (化合物XXX)。

[0712] 实施例33:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0713] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q] Ser-FGF21 (化合物XXXI)。

[0714] 实施例34:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0715] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q] Phe-FGF21 (化合物XXXII)。

[0716] 实施例35:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0717] N- α (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十七烷酰氨基) 丁酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰氨基]甲基}苄基) [N121Q] Met-FGF21 (化合物XXXIII)。

[0718] 实施例36:FGF21化合物在N-末端用修饰基团的衍化

[0719] Met-FGF21衍生物N- α -双- (4-{[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S) -4-羧基-4-(17-羧基十

例如Novo Nordisk A/S)的基础培养基。

[0733] 细胞在开始分化之后被使用7-14天,优选地使用7-10天。细胞用增加基础培养基中本发明的FGF21多肽或衍生物的浓度(0-300 nM)刺激20小时。在加入3H-脱氧葡萄糖(在下文中:示踪剂)之前,细胞用温热的(约37℃)分析缓冲液(含有1 mM MgCl₂和2 mM CaCl₂的PBS)、HEPES和0.1%人血清白蛋白)冲洗,并把细胞与示踪剂一起培养1小时。通过用冰冷的分析缓冲液洗涤两次终止该培养。细胞用Triton X-100溶胞,并把溶胞产物转移至96孔板,加入microscint-40 (可市售得自例如Perkin Elmer),并以TOP-计数器(例如得自Perkin Elmer的Packard顶部计数器(top-counter))把示踪剂的量计数。计算所讨论的多肽的EC₅₀。显示在以下表1中的结果表明本发明的FGF21化合物相对于Met-FGF21的EC₅₀ (效力)。

[0734] 表1:FGF21化合物的效力

化合物的 实施例号	化合物	葡萄糖摄取 3T3-L1 相对于 Met-FGF21 的效力(%)
1		100
2a		66
2b		416
2c		672
2d		663
[0735] 3	I	n.a.
4	II	8.5
5	III	180
6	IV	352
	[N121Q] Met-FGF21	119
	[S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21	394
	[N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21	1593
	[N121Q] Ala-FGF21	116

[0736] 实施例39:HEK293/β-klotho Erk磷酸化测定

[0737] 在用人β-klotho稳定转染的HEK293细胞中实施Erk磷酸化测定。把HEK293T/β-klotho稳定细胞以30000细胞/孔接种于96孔板上。两天后加入新鲜介质,并在另外2小时后加入FGF21蛋白。把板温育12分钟。并且使用AlphaScreen SureFire Phospho-ERK1/2 Assay Kit (分析试剂盒) (Perkin Elmer, Waltham, MA),按照制造商的用法说明评价总的ERK磷酸化作用,并且使用具有AlphaScreen HTS Turbo选项的EnVision Multilabel Microplate Reader Model 2103 (EnVision多标记微量培养板读出仪2103型) (Perkin Elmer)进行信号检测。数据表示为平均值± S.E.M.。EC₅₀值使用GraphPad Prism版本5.02自4-参数对数非线性回归分析测定。参考文献:Yie, J. *et al.*: FGF21 N-和C-末端在受体相互作用和激活中起着不同的作用 (FGF21 N- and C-termini play different roles

in receptor interaction and activation), *FEBS Letters* 583 (2009) 19-24, 和 Micanovic R. *et al.*: N-和C-末端在FGF21的功能活性中的不同作用 (Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21). *J. Cell. Physiol.* 2009 May; 219 (2):227-34。

[0738] 表2:ERK磷酸化作用

[0739]

化合物 的实施例号	化合物	pERK-HEK293- β-klotho 不含 HSA [EC ₅₀ (nM)] 的平均值
1		1.6
2a		8.3
2b		0.8
2c		0.6
2d		1.8
3	I	n.a.
4	II	4.6
5	III	1.0
6	IV	0.4
	[N121Q] Met-FGF21	1.0
	[S71C, N121Q, L166F, S167G, M168L, 173aA, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21	0.4
	[N121Q, L166F, S167G, M168L, P171L, S172E, Q173A, G174V, Y179F, A180E, des181] Ala-FGF21	0.7
	[N121Q] Ala-FGF21	2.3

[0740] 实施例40:FGF21化合物的体内试验-药代动力学

[0741] 小型猪

[0742] Met-FGF21的药代动力学性质可在正常的雄性Göttingen小型猪中测试, n = 4 (8-15个月龄, 体重约18-30 kg)。要测试的化合物的血浆浓度被监测14天。Met-FGF21作为0.1 mg/kg (约5 nmol/kg)的单静脉剂量给予。

[0743] 比较化合物Met-FGF21的平均半衰期 (T_{1/2}) 已被测定为10.8小时, 标准偏差为2.7小时。

[0744] 本发明的FGF21化合物的药代动力学性质在正常的雄性Göttingen小型猪中测试, n = 4 (8-15个月龄, 体重约18-30 kg)。血浆浓度被监测19天。化合物作为0.01-0.5 mg/kg的单静脉剂量给予。

[0745] 测定要测试的化合物的平均半衰期 (T_{1/2})。

[0746] FGF21化合物的血浆水平可使用成纤维细胞生长因子-21人ELISA (可得自BioVendor, 目录号RD191108200R) 测定。基于PC的软件, 得自Pharsight Corporation, Cary N.C.的WinNonLin版本5.2可用于药代动力学计算。

[0747] 该测试将证实本发明的FGF21衍生物的延长效应。

[0748] 实施例41:FGF21化合物的体内试验-药效学

[0749] db/db小鼠为用于2型糖尿病的小鼠模型。小鼠缺乏瘦素受体并且它们特征为高血糖、胰岛素抵抗、摄食过量和肥胖症。

[0750] 雄性db/db小鼠(9-10周龄)可用于测量本发明的FGF21类似物和衍生物对血糖的作用。

[0751] 可每天一次皮下给予在50 mM磷酸盐, 145 mM NaCl, 0.05% Tween-80, pH=7.4 (2 ml/kg)中的0.1 mg/kg化合物,共7天(n=7-9)。各媒介物处理组(对照组)用每天一次皮下给予50 mM磷酸盐, 145 mM NaCl, 0.05% Tween-80, pH=7.4 (2 ml/kg)处理7天。可在给予之前和在第7天给予之后2小时再次测量非空腹血糖。血糖可使用基于葡萄糖氧化酶法的葡萄糖分析仪(Biosen 5040)测量。

[0752] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,通过引用以其全部结合到本文中并且与好像每一篇参考文献被单独和特别表明通过引用结合,并且本文以其全文阐述的相同程度(法律允许的最大程度)结合到本文中。

[0753] 本文专利文件的引用和结合仅为了便利起见,并且不反映这样的专利文件的有效性、可专利性和/或强制性的任何观点。本文提及的参考文献并不承认其构成现有技术。

[0754] 所有的标题和副标题本文仅为了便利而使用,并且不应以任何方式视为限制本发明。

[0755] 本文提供的任何和全部实施例或者示例性的语言(例如“例如”)的使用,仅打算更好地说明本发明,并且不造成对本发明范围的限制,除非另外要求。说明书中的语言不应视为表明任何非要求的要素对本发明的实践是必要的。

[0756] 在此,单词“包含”应广泛解释为意指“包括”、“含有”或“由…组成”(参见EPO指南C, III, 4.13)。

[0757] 本发明包括在对此所附权利要求和条款中列举的主题的所有修饰和等价物,如由适用法律所允许的。

<110> Novo Nordisk A/S

<120> N-末端修饰的 FGF21 化合物

<130> 8042.204-W0

<160> 2

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> mat_肽

<222> (1).. (181)

[0001]

<220>

<221> 二硫化物(DISULFID)

<222> (75).. (93)

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly 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

[0002] Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 信号(SIGNAL)

<222> (1)..(28)

<400> 2

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

[0003]

Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Gln	Ala
			20				25				