



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105828878 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201480070292.4

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

(22)申请日 2014.10.27

有限公司 11262

(30)优先权数据

61/896,473 2013.10.28 US

代理人 郑霞

61/922,586 2013.12.31 US

(51)Int.Cl.

62/067,273 2014.10.22 US

A61P 3/10(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/062378 2014.10.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/065897 EN 2015.05.07

(71)申请人 恩格姆生物制药公司

地址 美国加利福尼亚州

权利要求书4页 说明书56页

(72)发明人 雷·灵

序列表18页 附图22页

(54)发明名称

癌症模型及相关方法

(57)摘要

提供了可用于确定具有降葡萄糖活性和/或抗肥胖症活性的成纤维细胞生长因子19的变体多肽是否也表现出有利的肿瘤学相关的特征的模型,以及与其相关联的方法和用途。还提供了拮抗对象体内FGF19的致癌活性的方法,并且在某些实施方式中,预防或治疗疾病、紊乱或病症(如FGF19依赖性疾病、紊乱或病症)或其症状的方法。

FGF19 (SEQ ID NO:42):

RPLAFSDAGPHVHYCNGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGIV
DCARGQSAHSLLIEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLNGADGKMQGLL
QYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKORQLYKNRGFL
PLSHFLPMLPMLPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSDNPFGLVTCLE
AVRSPSFKEKDYKDDDK

1. 一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选人的方法,该方法包括:

(a)向该具有代谢紊乱的测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及

(b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被观察到;

其中癌性病症的标记的缺乏表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

2. 一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选人的方法,该方法包括:

(a)提供具有癌性病症的标记的测试对象,该对象具有代谢紊乱;向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及

(b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强;

其中癌性病症标记增强的缺乏表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

3. 一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选人的方法,该方法包括:

(a)提供具有癌性病症的标记的测试对象,该对象具有代谢紊乱;向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及

(b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被减少;

其中癌性病症标记的减少表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

4. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中该癌性病症的标记是肿瘤。

5. 权利要求4所述的方法,其中该肿瘤是结肠肿瘤或肝脏肿瘤。

6. 权利要求3所述的方法,其中癌性病症标记的减少通过肿瘤数量、肿瘤大小或肿瘤重量的减少来确定。

7. 权利要求1到6的任一项所述的方法,其中该FGF19变体包括SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列或由其组成。

8. 权利要求1到6的任一项所述的方法,其中该FGF19变体包括SEQ ID NOS:5-29任一项中所述的氨基酸序列或子序列或其片段或者由其组成。

9. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中该对象是动物。

10. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中该对象是小鼠。

11. 权利要求10所述的方法,其中该小鼠是db/db小鼠。

12. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中候选FGF19变体多肽改善了选自如下的至少一种病症:高血糖病症、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良和代谢综合征。

13. 权利要求12所述的方法,其中该高血糖病症包括糖尿病。

14. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中该候选FGF19变体多肽改善了肥胖症或或不希望的身体质量。

15. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中相比样本总体中成熟FGF19的水平,该测试对象具有提高的成熟FGF19的水平。

16. 权利要求15所述的方法,其中该测试对象过表达FGF19。
17. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中对该FGF19或该FGF19替代品,以及该FGF19变体的至少一种进行标记。
18. 权利要求17所述的方法,其中该标记包括FLAG-标签。
19. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中确定步骤在共同施用步骤之后超过20周时进行。
20. 权利要求1到3的任一项所述的方法,其中共同施用FGF19与该FGF19变体。
21. 一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物的方法,该方法包括
 - (a)向该具有代谢紊乱的测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及该FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及
 - (b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被观察到;
其中癌性病症的标记的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物。
22. 一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物的方法,该方法包括:
 - (a)提供具有代谢紊乱的测试对象,该测试对象具有癌性病症的标记;向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中加剧癌性病症,以及
 - (b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强;
其中癌性病症标记加剧的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物。
23. 权利要求22所述的方法,其中癌性病症的标记在该测试对象中被减少。
24. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中癌性病症的标记是肿瘤。
25. 权利要求24所述的方法,其中该肿瘤是结肠肿瘤或肝脏肿瘤。
26. 权利要求23所述的方法,其中癌性病症标记的减少通过肿瘤数量、肿瘤大小或肿瘤重量的减少来确定。
27. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中该对象是动物。
28. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中该对象是小鼠。
29. 权利要求28所述的方法,其中该小鼠是db/db小鼠。
30. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中候选FGF19变体多肽改善了选自如下的至少一种病症:高血糖病症、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良和代谢综合征。
31. 权利要求30所述的方法,其中该高血糖病症包括糖尿病。
32. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中该候选FGF19变体多肽改善了肥胖症或或不希望的身体质量。
33. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中相比样本总体中成熟FGF19的水平,该测试对象具有提高的成熟FGF19的水平。
34. 权利要求33所述的方法,其中该测试对象过表达FGF19。
35. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中对该FGF19或该FGF19替代品,以及该FGF19变体的至少一种进行标记。

36. 权利要求35所述的方法,其中该标记包括FLAG-标签。
37. 权利要求21到23的任一项所述的方法,其中共同施用FGF19与该FGF19变体。
38. 权利要求21或22所述的方法,其中确定步骤在共同施用步骤之后超过20周时进行。
39. 权利要求21或22所述的方法,其中确定步骤在共同施用步骤之后超过9个月时进行。
40. 权利要求21或22所述的方法,其中确定步骤在共同施用步骤之后超过12个月时进行。
41. 一种治疗具有代谢紊乱的对象的方法,该方法包括:
- (a) 提供具有代谢紊乱的对象,其中该对象显示出FGF19诱导的癌性病症的标记,以及
- (b) 向该对象施用治疗有效量的在权利要求21到23的任一项中确认的FGF19变体;其中该对象中的该代谢紊乱有改善。
42. 权利要求41所述的方法,其中该对象是动物。
43. 权利要求42所述的方法,其中该对象是人。
44. 权利要求41所述的方法,其中该癌性病症是肿瘤。
45. 权利要求44所述的方法,其中该肿瘤是结肠肿瘤或肝脏肿瘤。
46. 权利要求41所述的方法,其中该代谢紊乱选自如下:高血糖病症、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良、肥胖症和代谢综合征。
47. 权利要求46所述的方法,其中该高血糖病症是糖尿病。
48. 权利要求41所述的方法,其中该对象中该代谢紊乱的该改善是血液葡萄糖的降低。
49. 权利要求41所述的方法,其中该对象中该代谢紊乱的该改善是体重的降低。
50. 权利要求41所述的方法,其中该对象中该代谢紊乱的该改善是胰岛素的降低。
51. 一种用于确定FGF19变体是否是用于预防具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型,该模型包括以下对象:
- i) 在有效量的FGF19或FGF19替代品的施用之前,没有表现出癌性病症的标记的;以及
- ii) 在FGF19或FGF19替代品的该施用之后,表现出癌性病症的标记的;
- 且其中在有效量的包含SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列或由其组成的多肽的施用之后,癌性病症的标记得以改善。
52. 一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型,该模型包括具有由FGF19或FGF19替代品的施用导致的癌症的至少一种标记的对象,其中在有效量的包含SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列或由其组成的多肽的施用之后,癌症的该标记得以改善。
53. 权利要求51或52所述的模型,其中该癌症的标记是肿瘤。
54. 权利要求53所述的模型,其中该肿瘤是结肠肿瘤或肝脏肿瘤。
55. 权利要求51到54的任一项所述的模型,其中该癌症的标记的改善通过肿瘤数量、肿瘤大小或肿瘤重量的减少来确定。
56. 权利要求51到55的任一项所述的模型,其中该对象是小鼠。
57. 权利要求56所述的模型,其中该小鼠是db/db小鼠。
58. 权利要求51到57的任一项所述的模型,其中对该FGF19或该FGF19替代品,以及该FGF19变体的至少一种进行标记。

59. 权利要求58所述的模型,其中该标记包括FLAG-标签。
60. 权利要求51或52所述的模型,其中该代谢紊乱选自如下:高血糖病症、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良、肥胖症和代谢综合征。
61. 权利要求60所述的模型,其中该高血糖病症是糖尿病。
62. 权利要求51到61的任一项所述的模型,其中步骤i)包括有效量的FGF19的施用。
63. 一种拮抗对象体内FGF19的致癌活性的方法,其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体,从而拮抗该对象体内FGF19的该致癌活性。
64. 一种治疗对象体内的FGF19依赖性癌症或肿瘤或其症状的方法,其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体,其中该对象体内的该癌症、肿瘤或其症状有改善。
65. 一种预防对象体内的FGF19依赖性癌症或肿瘤或其症状的方法,其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体,其中该对象体内的该癌症、肿瘤或其症状得以预防,从而预防了该对象体内的该FGF19依赖性癌症或肿瘤。
66. 权利要求64或65所述的方法,其中该FGF19依赖性癌症或肿瘤是肝细胞癌。
67. 权利要求64或65所述的方法,其中该FGF19依赖性癌症或肿瘤不是肝细胞癌。
68. 权利要求64或65所述的方法,其中该癌症或肿瘤是结肠癌症或肿瘤。
69. 权利要求64或65所述的方法,其中该癌症或肿瘤是前列腺癌症或肿瘤。
70. 权利要求64或65所述的方法,其中该癌症或肿瘤是肺癌或肿瘤。
71. 权利要求63到70的任一项所述的方法,其中该FGF19变体是包括SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列或由其组成的多肽。
72. 权利要求63到71的任一项所述的方法,其中该对象是需要其的对象。

癌症模型及相关方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月28日提交的美国序列号61/896,473;2013年12月31日提交的美国序列号61/922,586;和2014年10月22日提交的美国序列号62/067,273的权益,其中的每一个通过引用全部被并入本文。

技术领域

[0003] 除其他事项外,本发明涉及可用于确定具有降葡萄糖活性的成纤维细胞生长因子的多肽变体是否也显示出有利的肿瘤学相关的特征的模型,以及涉及前述的方法和用途。还提供了拮抗对象体内FGF19的致癌活性的方法,并且在某些实施方式中,预防或治疗疾病、紊乱或病症(如FGF19依赖性疾病、紊乱或病症)或其症状的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 糖尿病是制造和储存胰岛素以在饭后释放的胰脏 β -细胞、内分泌细胞没有产生胰岛素(1型);或胰岛素抗性或所产生的胰岛素不足(2型)所导致的一种使人衰弱的代谢性疾病。高血液葡萄糖水平刺激胰腺 β -细胞对胰岛素的分泌。胰岛素,反过来刺激葡萄糖进入肌肉和脂肪细胞,导致糖原和甘油三酯的存储和蛋白质的合成。胰岛素受体对多种细胞类型的激活通过增加葡萄糖摄取和利用,并通过减少肝葡萄糖输出而减少了循环葡萄糖水平。此调控网络内的中断可以导致糖尿病和相关的病理学病症。

[0006] 具有葡萄糖代谢紊乱的个体可能患有高血糖症、高胰岛素血症和/或葡萄糖不耐症,以及一大群相关病症。例如,胰岛素抗性,一种常与葡萄糖和/或胰岛素的异常水平相关的病症,其特征在于肝、脂肪和肌肉细胞失去了它们对正常血液胰岛素水平应答的能力。世界各地大量并且越来越多的个人受这样的葡萄糖代谢紊乱的不利影响。

[0007] 肥胖症最常是由过多的食物摄入量加上有限的能量消耗和/或缺乏体育锻炼引起的,常伴随各种的葡萄糖代谢紊乱。肥胖症增加了个体患各种疾病(如糖尿病、高血压、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、痛风、风湿病和关节炎)的可能性。此外,死亡风险直接与肥胖症相关,以至于,例如,超过40的身体质量指数导致平均预期寿命减少10年以上。

[0008] 某些药理学治疗方式已经在不同程度上证明葡萄糖稳态和抗肥胖活性。不幸的是,这种方式经常与严重,常常使人衰弱的不利影响有关。

[0009] 鉴于糖尿病、肥胖和相关的代谢和非代谢紊乱的患病率和严重程度,以及当前治疗方案选择的缺点,需要替代性治疗方式。

[0010] 发明概述

[0011] 减肥手术已经被提出作为替代性非药物糖尿病治疗法。已经假定的是,手术后胃肠激素分泌的变化负责解决糖尿病病症。人类成纤维细胞生长因子19(FGF19)的血清水平在胃旁路手术之后升高。FGF19在远端小肠中高度表达,并且FGF19的转基因过度表达改善了葡萄糖稳态(Tomlinson,E.(2002)Endocrinology 143(5):1741-47)。FGF19的增强表达和分泌至少可以部分地解释手术后观察到的糖尿病的缓解。

[0012] 尽管所需的代谢效应归因于FGF19(如血液葡萄糖降低),但是增加FGF19水平(通

过,例如,FGF19表达的增强或外源性FGF19的施用)的治疗与肝细胞癌(HCC)的诱导相关。因此,需要持续的努力,以确定具有FGF19的良好特性而不引起像HCC这样的癌性病症的药剂。本发明部分地基于动物模型和相关方法,以有助于准确和有效地确定候选药剂是否具有这样的属性以及对象是否是这种治疗的可行候选者。

[0013] 在进一步的实施方式中,治疗对象的用途或方法旨在或导致降低的葡萄糖水平;增加的胰岛素敏感性;降低的胰岛素抗性;降低的胰高血糖素;葡萄糖耐受的改善或葡萄糖代谢或稳态;改善的胰腺功能;或者降低的甘油三酯、胆固醇;中密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL)或极低密度脂蛋白(VLDL)水平;或血压的降低;血管内膜增厚的降低;或身体质量或体重增加的降低。

[0014] 在一个实施方式中,本披露考虑了一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选者的方法,该方法包括a)向该具有代谢紊乱的测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被观察到;其中癌性病症的标记的缺乏表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

[0015] 如本文所用,术语“FGF19替代品”意在包括能够引发与FGF19相同或可比效果的任何分子(如多肽),其中该效果通常是癌症相关的(例如,肿瘤形成的诱发或癌性病症的任何其他标记)。FGF19替代品经常是FGF19的变体,其包括相对本文所述的氨基酸序列之一的从约150个氨基酸到约160个氨基酸,从约160个氨基酸到约170个氨基酸,从约170个氨基酸到约180个氨基酸,从约180个氨基酸到约190个氨基酸或约194个氨基酸或更多的连续延伸片段(stretch),具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约93%、至少约95%的,至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%的氨基酸序列同一性的活性片段。

[0016] 在本披露中,短语“癌性病症的标记”广义是指癌性疾病、紊乱或病症已经形成,正在形成或很可能形成的任何迹象。大多数癌症的初始确认是由于迹象或症状的出现抑或通过筛选。除其他手段外,明确的诊断通常需要组织样本的病理检查、血液检查、x射线、CT扫描和内窥镜检查的一种或多种。癌性病症是指任何类型或分类的癌症,包括癌、肉瘤、淋巴瘤和白血病,以及母细胞瘤。

[0017] 癌症症状通常是由癌症对其正在形成的身体的部位的作用(如乳房上的异常肿块或皮肤上的摩尔变化)引起的,虽然癌性疾病、紊乱和/或病症可能会导致更一般的症状,如体重减轻或疲劳。在本文所述的方法和模型中,癌性病症(或紊乱或疾病)的标记经常是肿瘤(如结肠肿瘤或肝脏肿瘤)。肿瘤数量、肿瘤大小或肿瘤重量减少的观察和测定常常表明治疗方式具有积极的影响。

[0018] 在特定的实施方式中,癌性病症的标记与最常见的肝癌类型肝细胞癌(HCC,也被称为恶性肝癌)相关联。HCC可能存在黄疸、腹水肿胀、血液凝固异常造成易擦伤、食欲不振、体重减轻、腹痛、恶心、呕吐或疲劳。下文对肝癌做进一步讨论。

[0019] 在另一个实施方式中,本披露考虑了一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选者的方法,该方法包括a)提供具有癌性病症的标记的测试对象,该对象具有代谢紊乱,b)向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变

体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强;其中癌性病症标记增强的缺乏表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

[0020] 在进一步的实施方式中,本披露考虑了一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选者的方法,该方法包括a)提供具有癌性病症的标记的测试对象,该对象具有代谢紊乱,b)以及向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被减少;其中癌性病症标记的减少表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

[0021] 本披露还考虑了一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物的方法,该方法包括向该具有代谢紊乱的测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被观察到;其中癌性病症的标记的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物。

[0022] 本文所考虑的其他实施方式涉及一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物的方法,该方法包括提供具有代谢紊乱的测试对象,该测试对象具有癌性病症的标记;向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中加剧癌性病症,以及确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强;其中癌性病症标记加剧的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物。在特定的实施方式中,癌性病症的一种或多种标记在该测试对象被减少。

[0023] 在仍然进一步的实施方式中,本披露考虑了治疗(或在某些情况下,预防)具有代谢紊乱的对象的方法,该方法包括提供具有代谢紊乱的对象,其中该对象显示出FGF19诱导的癌性病症的标记,以及向该对象施用从如本文所述的候选GF19变体多肽池中确认的治疗有效量的FGF19变体;其中该对象中的该代谢紊乱有改善。

[0024] 如上面提到的,本披露还考虑了各种模型。一个实施方式涉及一种用于确定FGF19变体是否是用于预防具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型,该模型包括以下对象:i)在有效量的FGF19或FGF19替代品的施用之前,没有表现出癌性病症的标记的;以及ii)在FGF19或FGF19替代品的该施用之后,表现出癌性病症的标记的;且其中在有效量的包含SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列的多肽的施用之后,癌性病症的标记得以改善。在某些实施方式中,该多肽由SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列组成。

[0025] 本披露还考虑了一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型,该模型包括具有由FGF19或FGF19替代品的施用导致的癌症的至少一种标记的对象,其中在有效量的包含SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列的多肽的施用之后,癌症的该标记得以改善。在某些实施方式中,该多肽由SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列组成。

[0026] 虽然没有限制,但是在某些实施方式中,该FGF19变体在本披露的所述方法和模型中是M70(SEQ ID NO:1)。FGF19变体可以从候选FGF19变体多肽的池中确认,其中所确认的FGF19变体改善了以下至少一种病症:例如高血糖病症(如糖尿病)、胰岛素抗性、高胰岛素

血症、葡萄糖耐受不良、代谢综合征、肥胖症或不希望的身体质量。代谢紊乱、疾病和病症的其他例子在下文有描述。

[0027] 在本文所述的方法和模型的某些实施方式中，该对象(如测试对象)是动物(如啮齿动物或猴)，例如小鼠(如db/db小鼠)。根据使用该术语的上下文，对象还可以是人类。在一些实施方式中，相比样本总体中成熟FGF19的水平，该对象具有提高的成熟FGF19的水平，其中该样本总体可以是可用于基准、参考等的成员群体。在一些实施方式中，该提高的成熟FGF19的水平是由于过表达。

[0028] 在一些实施方式中，对该FGF19、FGF19替代品和/或FGF19变体进行标记，例如，以便于检测、纯化等。在某些实施方式中，该FGF19、FGF19替代品和/或FGF19变体通过共价键进行标记。熟练的技术人员熟悉不同类型的标记及其用途。标记最常实现在多肽的N-末端和/或C-末端，但它也可以在该多肽内发生。本披露考虑了使用可以在体内、体外等处进行的任何直接或间接标记技术。

[0029] 在本披露的方法和模型中，与确定癌性病症、紊乱或疾病的标记相关联的步骤可以在可允许该癌性病症、紊乱或疾病自动表现，从而被检测到的任何时间进行。通过举例的方式，该确定可发生在上述共同施用步骤后超过3个月、超过20周、超过6个月、超过9个月或超过12个月。在特定的实施方式中，FGF19与该FGF19变体共同施用。

[0030] 本披露还考虑了一种拮抗FGF19的致癌活性的方法。在某些实施方式中，本文提供一种拮抗对象体内FGF19的致癌活性的方法，其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体，从而拮抗该对象体内FGF19的该致癌活性。在某些实施方式中，该对象具有代谢紊乱和/或癌性病症的标记。

[0031] 本披露进一步考虑了一种预防或治疗对象体内的FGF19依赖性疾病、紊乱或病症；或其症状的方法，其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体，其中该对象体内的该疾病、紊乱或病症得以预防或治疗。在某些实施方式中，存在该对象体内的该疾病、紊乱、病症或其症状的改善。在某些实施方式中，该对象具有代谢紊乱和/或癌性病症的标记。在具体的实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是癌症或肿瘤。在一些实施方式中，该癌症或肿瘤是肝癌或肿瘤。在某些实施方式中，该癌症或肿瘤是结肠癌或肿瘤。在其他的实施方式中，该癌症或肿瘤是前列腺癌或肿瘤。在仍然其他的实施方式中，该癌症或肿瘤是肺癌或肿瘤。在某些实施方式中，该对象是需要其预防或治疗的对象。在具体的实施方式中，该FGF19变体是包括SEQ ID NO:1(M70)中所述的氨基酸序列或由其组成的多肽。

附图说明

[0032] 图1描绘了成熟的人FGF19的氨基酸序列。对应于标签表位的氨基酸残基有下划线。

[0033] 图2描绘了AAV介导的基因递送之后5周，db/db小鼠体内通过ELISA确定的血浆FGF19浓度(GFP作为对照物；FGF19；和/或M70)。

[0034] 图3描绘了AAV介导的基因递送之后24周，连续暴露至GFP；FGF19-标签；和/或M70之后，db/db小鼠体内全量肝脏肿瘤结节形成。

[0035] 图4描绘了AAV介导的基因递送之后，连续暴露至GFP；FGF19-标签；和/或M70之后，在db/db小鼠体内，在注射前和注射后3周、5周和23周，测得的对体重的影响。

[0036] 图5描绘了AAV介导的基因递送之后,连续暴露至GFP;FGF19-标签;和/或M70之后,在db/db小鼠体内,在注射前和注射后3周、5周和23周,测得的对葡萄糖浓度的影响。

[0037] 图6A-6E描绘了一种用于研究肝癌肿瘤发生的AAV介导的转基因系统。(A)实验记录示意图。小鼠在6-12周龄时,经尾静脉被给予AAV-FGF19的 3×10^{11} 基因组拷贝的单次注射。24或52周后将小鼠处死进行肝肿瘤分析。ITR、末端反向重复;EF1a,延伸因子1 α 启动子。(B)AAV-FGF19的施用24周后db/db小鼠的代表性肝。在表达FGF19的db/db小鼠中观察到突出肝脏表面的多个凸起大肿瘤。在该实验中,注射有对照病毒(AAV-GFP)的动物中没有观察到肝肿瘤。比例尺,10mm。(C)db/db小鼠($n=5$)中AAV施用之后1、4、12和24周,通过ELISA测得的FGF19的血清水平。所有值表示平均值±SEM。(D)表达FGF19转基因的db/db小鼠体内肝肿瘤多样性、大小和得分。对每个肝脏的肿瘤计数并测量最大的肿瘤尺寸。各组的平均值由水平线表示($n=$ 每组15,每个点表示动物个体)。所有值表示平均值±SEM。*** $p<0.001$,* $p<0.05$ 表示通过双尾t检验与对照组的显著差异。(E)db/db小鼠体内FGF19诱导的肝肿瘤的组织学和免疫组化特征。列从上到下为:肝脏切片的苏木精和伊红(H & E)染色;Ki-67、PCNA、谷氨酰胺合成酶和 β -连环蛋白的免疫组化检测。FGF19诱导的肿瘤细胞有很强的谷氨酰胺合成酶阳性。肿瘤(T)通过虚线描绘。比例尺,100 μ m。

[0038] 图7A-7H描绘了连续暴露24周后,在db/db小鼠体内,M70是无肿瘤的FGF19变体。(A)在N-末端区域M70和FGF19的蛋白质序列比对。被引入M70的突变用下划线表示。(B)-(F)24周表达FGF19或M70的db/db小鼠的每个肝脏的肿瘤数(B)、肝脏重量(C)和肝脏与体重的比率(每组 $n=5$)。生长曲线(E)和转基因表达(F)的血清水平也得以确定。(G)转基因表达24周后来自db/db小鼠的代表性肝脏切片。肝脏图片列从上到下是:肝组织切片的苏木精和曙红(H&E)染色;Ki-67和谷氨酰胺合成酶的免疫组化检测。肿瘤(T)通过虚线描绘。比例尺,100 μ m。(H)在研究结束之前测量肝酶(ALKP:碱性磷酸酶;ALT,丙氨酸转氨酶;AST,天冬氨酸转氨酶;每组 $n=5$)的血清水平。所有值表示平均值±SEM。* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$ 表示通过单向ANOVA,继之以Dunnett事后检定,相比对照组的显著差异。也见表3和4。

[0039] 图8A-8G描绘了用M70治疗52周的rash2小鼠无肝肿瘤的形成。(A)-(E)表达FGF19或M70转基因(每组 $n=9$)达52周的rash2小鼠的M70或FGF19(E)的生长曲线(A)、每个肝脏的肿瘤数(B)、肝脏重量(C)、肝脏与体重比率(D)和血清水平。(F)AAV施用52周后收集肝脏,并用H&E或抗谷氨酰胺合成酶,一种FGF19诱导的肝肿瘤标志物,染色。从用H&E染色的配对切片附近的区域取得切片进行谷氨酰胺合成酶染色并显示出相同的门(p)静脉和中央(c)静脉。肿瘤(T)通过虚线描绘。比例尺,100 μ m。(G)肝脏中Ki-67和AFP表达的qRT-PCR分析。将mRNA丰度归一化为GAPDH表达。所有值表示平均值±SEM。* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$ 表示通过单向ANOVA,继之以Dunnett事后检定,相比对照组的显著差异。

[0040] 图9A-9G描绘了体外FGFR4的M70结合和激活。(A)固定在流动池上的FGF19和FGFR4-Fc嵌合蛋白质之间的相互作用的Biacore SPR检测。左列显示了在一系列FGF19浓度(2倍稀释下15.62-2000nM)下获得的结合曲线,而右列显示了用于获得 K_D 值的数据的稳态拟合。(B)通过Biacore的M70与FGFR4的结合。使用与(A)类似的程序。(C)M70或FGF19与FGFR4-KLB受体复合物的固相结合。使用生物素化FGF19-特异性多克隆抗体检测结合的配体。(D)在KLB的存在或不存在下,用FGFR4瞬时转染的L6细胞中用M70或FGF19刺激后的相对荧光素酶活性。(E)M70诱导了Hep3B细胞中的ERK磷酸化。(F)M70抑制了小鼠、大鼠和人类来

源的原代肝细胞的Cyp7a1表达。肝细胞中Cyp7a1 mRNA的相对表达通过qRT-PCR得以测定并被归一化为18S RNA(小鼠和大鼠)或肌动蛋白(人)mRNA水平。(G)小鼠中M70对肝Cyp7a1表达的抑制。对12周龄的db/db小鼠进行腹膜内重组M70或FGF19蛋白注射。给药后4小时对小鼠实施安乐死,以及肝Cyp7a1表达通过qRT-PCR得以评估并被归一化为18S RNA表达。显示小鼠内Cyp7a1抑制的剂量反应曲线。所有值表示平均值±SEM。

[0041] 图10A-10C描绘了活体内M70和FGF19对细胞信号传导途径的差别激活。(A)从腹膜内注射有盐水,注射后2小时1mg/kg FGF19或1mg/kg M70的db/db小鼠(每组n=6)中收获肝脏。通过Western印迹法对肝脏裂解物进行指定蛋白质的表达和磷酸化检查。每个泳道代表小鼠个体。Rab11用作上样对照。注意肝STAT3由FGF19,而不是M70激活。(B)用FGF19处理的小鼠表现出升高的IL-6(一种STAT3诱导剂)表达。如(A)从db/db小鼠中收获肝脏。肝脏中IL-6mRNA量通过qRT-PCR测得并被归一化为GAPDH表达。结果被表示为相对于经盐水处理的动物的倍表达。示出的结果针对每种条件下5个单独的小鼠。下部图片中显示了对来自同一动物的肝脏裂解物进行免疫印迹处理的STAT3磷酸化状态。(C)qPCR显示了施用表达FGF19或M70转基因的AAV载体之后52周,rash2小鼠中mRNA对STAT3靶基因(生存素、Bcl-XL和细胞周期蛋白D1)的表达。所有值表示平均值±SEM表示。**p<0.01,***p<0.001表示通过单向ANOVA,继之以Dunnett事后检定,相比对照组的显著差异。

[0042] 图11A-11J描绘了M70抑制db/db小鼠和异种移植模型中FGF19诱导的肿瘤生长。(A)-(D)在M70(3x 10¹¹基因组拷贝)的存在或不存在下,对11周龄的db/db小鼠注射AAV-FGF19(3x 10¹⁰基因组拷贝)。24周后测定肝肿瘤分数(A)、肝脏重量(B)、肝脏与体重的比率(C)和转基因表达的血清水平(D)。*p<0.05表示通过单向ANOVA,继之以Dunnett事后检定,相比对照组的显著差异;##p<0.01表示通过双尾t检验的显著差异。(E)表达FGF19或用M70共同处理的小鼠的肝脏的组织学。用H&E或抗谷氨酰胺合成酶,一种FGF19诱导的肝肿瘤标志物,将肝脏切片染色。肿瘤(T)通过虚线描绘。比例尺,100μm。(F)FGF19由人类癌细胞系产生和分泌。培养物上清液中FGF19水平通过ELISA测定。(G-J)M70抑制了活体内人癌异种移植肿瘤生长。对8周龄的无胸腺nu/nu小鼠皮下植入5x 10⁶Huh-7(n=10)(G)或HCT-116(n=5)(H-J)细胞。将负荷有已确定的等体积(~100mm³)肿瘤的小鼠随机分组并经由AAV介导的基因递送用M70处理。对照病毒(GFP)也被列入了本研究。肿瘤生长在15天处理期的过程中测得。图像示出了15天处理期(I)结束时切分的HCT-116实质性肿瘤。带有HCT-116肿瘤异种移植(J)的小鼠的体重增加也得以确定。***p<0.001表示通过双向ANOVA,继之以Bonferroni事后检定,相比对照组的显著差异。所有值表示平均值±SEM。

[0043] 图12A-12B描绘了一种开发用于治疗FGF19依赖性肿瘤的FGF19变体的模型。(A)慢性肝损伤(胆汁郁积、肝硬化等)导致肝脏内FGF19积聚。虽然对于调节胆汁酸合成很重要,但是FGF19也激活STAT3,一种促进肝癌发生的关键转录因子。这有助于肿瘤启动、促进并发展成HCC。(B)M70是FGF19的工程变体。把其他(即肿瘤)相对排除在外,M70作为选择性调节剂,显示出对某些FGFR4信号传导途径(即pERK和Cyp7a1)的偏爱。此外,M70可以抑制依赖于FGF19的肿瘤的生长。

[0044] 图13A-13B描绘了M70延迟了CT26结肠癌同系小鼠模型中的肿瘤生长。(A)在施用10mg/kg剂量之后,M70延迟了CT26肿瘤生长。(B)在施用3mg/kg剂量之后,M70延迟了CT26肿瘤生长。对比溶媒处理的小鼠,p值通过双向ANOVA得以测定。***p<0.001;**p<0.01。

[0045] 图14A-14B描绘了M70降低了CT26结肠癌同系小鼠模型中的体重。(A)在施用10mg/kg剂量之后,M70降低了体重。(B)在施用3mg/kg剂量之后,M70降低了体重。对比溶媒处理的小鼠,p值通过双向ANOVA得以测定。***p<0.001; **p<0.01。

[0046] 发明详述

[0047] 在进一步描述本披露之前,将理解的是,本披露并不限于本文所阐述的特定的实施方式,并且还将理解的是,本文所使用的术语只是用于描述特定的实施方式的目的,并且不旨在进行限制。

[0048] 概观

[0049] 本披露考虑了使用本文所述的模型和方法确认药剂及其组合物。该模型和相关联的方法提供用于确认不诱导癌性病症(如肝细胞癌)的药剂的准确的高效的方法论。在某些实施方式中,本文提供的模型和方法可用于确认拮抗FGF19的致癌活性的药剂。在某些实施方式中,这种药剂在涉及,如葡萄糖代谢紊乱和/或体重紊乱的各种疾病、紊乱和病症;和/或其症状的治疗和/或预防方面具有治疗效用。以举例而非限制的方式,该药剂及其组合物可用于以胰岛素抗性、减少的胰岛素产量、高血糖症、代谢综合征或肥胖症为特征的2型糖尿病、胰岛素抗性和疾病、紊乱和病症的治疗和/或预防。这种药剂也可用于FGF19依赖性疾病、紊乱或病症或其症状的预防或治疗。

[0050] 本文所述的模型和相关方法可用于确认既不诱导也不加剧FGF19的癌症相关的影响(如HCC)的药剂(如多肽和抗体)。如在下文详细描述的,特定的实施方式考虑了使用该模型和方法,以确定具有良好的代谢特征的FGF19变体多肽是否也会具有理想的“癌症相关的”特性。还提供了拮抗对象体内FGF19的致癌活性的方法,并且在某些实施方式中,预防或治疗FGF19依赖性疾病、紊乱或病症;或其症状的方法。在某些实施方式中,该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是癌症或肿瘤,如肝脏、结肠、前列腺或肺癌或肿瘤。

[0051] 定义

[0052] 术语“患者”或“对象”可互换使用,指的是人类或非人类动物(如哺乳动物)。

[0053] 术语“治疗”等是指在疾病、紊乱或病症;或其症状已被诊断,观察到等之后启动的行动过程(如多肽或包含多肽的药物组合物的施用),以便暂时或永久地消除、减少、抑制、减轻或改善困扰对象的疾病、紊乱或病症的至少一种潜在原因;或者与困扰对象的疾病、紊乱、病症相关的至少一种症状。因此,治疗包括抑制(即阻止该疾病、紊乱或病症或与其相关的临床症状的进展或进一步进展)活跃的疾病(例如,以便降低血液中的胰岛素和/或葡萄糖的水平,以增加葡萄糖耐受量,以便尽量减少葡萄糖水平的波动;和/或以便防止葡萄糖稳态的破坏引起的疾病)。

[0054] 如本文所使用的术语“需要治疗”是指由医师或其他医疗专业人员做出的对象需要治疗或将从中受益的判断。

[0055] 术语“预防”等是指一般地在对象易感染特定疾病、紊乱或病症的情况下,以某种方式(如疾病、紊乱、病症或其症状发作前)启动的行动过程(如多肽或包含多肽的药物组合物的施用),以便暂时或永久地防止、压制、抑制或降低对象患得疾病、紊乱、病症或类似物的风险(如通过,例如缺乏临床症状所测定的)或延迟其发作。在某些情况下,该术语也指减缓该疾病、紊乱或病症的进展或抑制其进展为有害的或其他方式的不期望的状态。

[0056] 如本文所使用的术语“需要预防”是指由医师或其他医疗专业人员做出的对象需

要预防保健或将从中受益的判断。

[0057] 短语“治疗有效量”是指单独或作为药物组合物的一部分或者以单一剂量或作为一系列剂量的一部分被施用至对象的药剂,当施用至患者时,其量能够对疾病、紊乱或病症的任何症状、方面或特征具有任何可检测的积极的作用。该治疗有效量可通过测量相关的生理效应来确定。在高血糖病症的情况下,血液葡萄糖的降低或减少或者葡萄糖耐量试验中的改进可以被用于确定药剂的量是否有效地治疗该高血糖病症。例如,治疗有效量是足以减小或降低任何空腹血浆葡萄糖(FPG)水平(如基线水平)的量,其中,例如,该量足以使FPG水平从大于200mg/dl减小至小于200mg/dl,其中该量足以使FPG水平从介于175mg/dl和200mg/dl之间减小至小于开始水平,其中该量足以使FPG水平从介于125mg/dl和150mg/dl之间减小至小于开始水平,等等(例如,使FPG水平减小到小于125mg/dl、到小于120mg/dl、到小于115mg/dl、到小于110mg/dl,等等)。此外,在HbA1c水平的情况下,该有效量是足以使水平减小或降低大于约10%至9%、大于约9%至8%、大于约8%至7%、大于约7%至6%、大于约6%至5%等等的量。更具体地说,本披露考虑了约0.1%、0.25%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、33%、35%、40%、45%、50%或更多的HbA1c水平的减小或降低。该治疗有效量可根据该对象病症的给药方案和诊断分析等进行调节。

[0058] 短语“以足以实现变化的量”意指特定的疗法施用之前(如基线水平)和之后测得的指标水平之间存在可检测的差异。指标包括任何客观的参数(如葡萄糖或胰岛素水平)或主观的参数(如对象的良好感觉)。

[0059] 如本文所用,短语“葡萄糖耐受”是指当葡萄糖摄取波动时,对象控制血浆葡萄糖和/或血浆胰岛素的水平的能力。例如,葡萄糖耐受包涵该对象在约120分钟内使血浆葡萄糖水平降回葡萄糖摄取之前确定的水平的能力。

[0060] 概括地说,术语“糖尿病”以及“糖尿病的”是指通常以高血糖症和糖尿为特征,涉及胰岛素的生产或利用率不足的碳水化合物代谢的一种进行性疾病。术语“前期糖尿病”和“前期糖尿病的”是指一种状态,其中对象没有通常在糖尿病中观察到的特征、症状等,但是确实具有如果不进行治疗,可进展为糖尿病的特征、症状等。这些病症的存在可以利用,例如空腹血浆葡萄糖(FPG)试验或口服葡萄糖耐量试验(OGTT)来确定。两者通常都需要对象在开始试验之前禁食至少8小时。在该FPG试验中,对象的血液葡萄糖在空腹结束后测得;通常,该对象禁食过夜以及该血液葡萄糖在早晨该对象用餐之前测得。健康的对象通常会有约90到约100mg/dl之间的FPG浓度,具有“前期糖尿病”的对象通常会有约100至约125mg/dl之间的FPG浓度,以及具有“糖尿病”的对象通常会有约126mg/dl以上的FPG水平。在该OGTT中,对象的血液葡萄糖在禁食后被测量以及在饮用富含葡萄糖的饮料之后两小时再次被测量。在消费该富含葡萄糖的饮料之后两小时,健康的对象通常具有约140mg/dl以下的血液葡萄糖浓度,前期糖尿病对象通常具有约140至约199mg/dl的血液葡萄糖浓度,以及糖尿病对象通常具有约200mg/dl或以上的血液葡萄糖浓度。虽然上述血糖值涉及人类对象,正常血糖症、中度高血糖症和明显的高血糖症在小鼠对象中进行不同缩减。四个小时禁食后健康的小鼠对象通常会有约100到约150mg/dl之间的FPG浓度,具有“前期糖尿病”的小鼠对象通常会有约175到约250mg/dl之间的FPG浓度以及具有“糖尿病”的小鼠对象通常会有约250mg/dl以上的FPG浓度。

[0061] 如本文所使用的术语“胰岛素抗性”是指一种病症，其中胰岛素的正常量无法产生正常的生理或分子反应。在一些情况下，胰岛素的超生理量，无论是内源产生或外源给药的，均能够全部或部分地克服胰岛素抗性，并产生生物反应。

[0062] 术语“代谢综合症”是指一群相关联的特征，其包括但不限于高胰岛素血症、葡萄糖耐量异常、肥胖症、脂肪再分配到腹部或上身隔室、高血压、纤维蛋白溶解异常和血脂异常，其特征在于高甘油三酯、低高密度脂蛋白(HDL)-胆固醇以及高小而密低密度脂蛋白(LDL)颗粒。具有代谢综合征的对象有患得2型糖尿病和/或其他紊乱(如动脉粥样硬化)的风险。

[0063] 短语“葡萄糖代谢紊乱”包涵特征在于如下的任何紊乱：与相对于健康个体，对象体内升高的葡萄糖水平和/或升高的胰岛素水平相关的临床症状或临床症状的组合。升高的葡萄糖和/或胰岛素水平可表现在下列疾病、紊乱和病症中：高血糖症、II型糖尿病、妊娠糖尿病、I型糖尿病、胰岛素抗性、葡萄糖耐量受损、高胰岛素血症、葡萄糖代谢受损、前期糖尿病、其他代谢紊乱(如代谢综合征，其也被称为X综合征)，以及肥胖症等。可以使用本披露的多肽及其组合物，例如，以实现和/或维持葡萄糖稳态，例如，以降低血液中的葡萄糖水平和/或以将胰岛素水平降低至健康对象中发现的范围。

[0064] 如本文所用，术语“高血糖症”是指一种病症，其中相对于健康个体，对象的血浆中循环着升高量的葡萄糖。可使用本领域中已知的方法(包括如本文所述的空腹血液葡萄糖水平测量)诊断高血糖症。

[0065] 如本文所用，术语“高胰岛素血症”是指一种病症，其中循环的胰岛素的水平升高，伴随着血液葡萄糖水平的升高或正常。高胰岛素血症可由与如下相关的胰岛素抗性引起：血脂异常，如高甘油三酯、高胆固醇、高低密度脂蛋白(LDL)和低高密度脂蛋白(HDL)；高尿酸水平；多囊卵巢综合征；II型糖尿病和肥胖症。高胰岛素血症可诊断为具有大于约 $2\mu\text{U}/\text{mL}$ 的血浆胰岛素水平。

[0066] [如本文所用，短语“体重紊乱”是指与体重超标和/或增强的食欲有关的病症。使用各种参数来确定与参考健康个体相比，对象是否超重，包括该对象的年龄，身高、性别和健康状况。例如，可以通过对象的身体质量指数(BMI)评估认为该对象超重或肥胖，该评估通过用以公斤计的对象体重除以以米计的该对象的身高再进行平方而算得。具有 ~ 18.5 至 $\sim 24.9\text{kg}/\text{m}^2$ 范围内的BMI的成人被认为具有正常体重；具有介于 ~ 25 和 $\sim 29.9\text{kg}/\text{m}^2$ 之间的BMI的成人可被认为是超重(肥胖前期)的；以及具有 $\sim 30\text{kg}/\text{m}^2$ 或更高的BMI的成人可被认为是肥胖的。增强的食欲通常促成了体重超标。有与增强的食欲相关的若干病症，包括，例如，夜间进食综合征，其特征是经常与失眠相关，但也可以与下丘脑损伤相关的早晨厌食和夜晚贪食。

[0067] 在本文中可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”指任何长度的聚合形式的氨基酸，其可以包括遗传编码和非遗传编码的氨基酸，化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸，以及具有修饰的多肽主链的多肽。该术语包括融合蛋白，包括但不限于，带有异源氨基酸序列的融合蛋白、带有异源和同源前导序列的融合蛋白，带有或不带有N末端蛋氨酸残基；免疫学标记的蛋白质；以及诸如此类。将理解的是，在整个本披露中，根据单字母或三字母代码参考氨基酸。

[0068] 如本文所用，术语“变体”包涵天然存在的变体(如同系物和等位基因变体)和非天

然存在的变体(如突变蛋白)。天然存在的变体包括同系物,即因物种而异,分别在核苷酸或氨基酸序列方面不同的核酸和多肽。天然存在的变体包括等位基因变体,即在一个物种内因个体而异,分别在核苷酸或氨基酸序列方面不同的核酸和多肽。非天然存在的变体包括分别含有核苷酸或氨基酸序列的改变的核酸和多肽,其中该序列的改变是人工引入,例如,该改变通过人类干预(“人手”)而在实验室或其他设施中生成。

[0069] 关于FGF19,术语“天然的”是指具有生物活性的,天然存在的FGF19,包括具有生物活性的,天然存在的FGF19变体。该术语包括194氨基酸人FGF19成熟序列。

[0070] 术语“标记”等,当在本披露的多肽或核酸(或适当时,抗体)的上下文中使用时,意在广泛地指任何可用于,例如多肽纯化、鉴定、分离和合成的手段。标记通常共价结合到相关的多肽并且可以以本领域中已知的任何方式被引入,包括附接至成熟多肽(通常在N末端或C末端),在固相肽合成期间掺入或通过重组手段。例子包括但不限于荧光、生物素化和放射性同位素。多肽和核酸分子可通过体外和体内两种方法进行标记。标记试剂和试剂盒可从许多商业来源处(例如,伊利诺伊州罗克福德的Thermo Fischer Scientific;以及纽约州大岛的Molecular Probes/Life Technologies)获得。

[0071] 如本文所用,术语“FLAG-标签”、“FLAG八肽”等是指可以利用重组DNA技术被添加到多肽的八个氨基酸(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:2)肽标签(标记)。多肽的FLAG组分的抗体可以被用于,例如,亲和色谱法以及通过免疫荧光的细胞定位研究或通过SDS PAGE蛋白电泳的检测。FLAG-标签可与其他亲和标签(如聚组氨酸标签(His-标签)或myc-标签)结合使用,并且它可以被融合到多肽的C末端或N末端。

[0072] 如本文所用的术语“突变蛋白”广泛地指突变的重组蛋白,即,包含人工引入的氨基酸序列的改变(如通过人类干预(“人类之手”)而在实验室或其他设施中生成的氨基酸序列的改变)的多肽。这些蛋白通常携带单个或多个氨基酸取代并且经常衍生自己已经受定点或随机诱变的克隆基因或衍生自完全合成的基因。

[0073] 如本文中关于天然的人FGF19或FGF19突变蛋白所使用的,术语“修饰的”、“修饰”等指的是增强人FGF19、天然存在的FGF19变体或FGF19突变蛋白的期望的性质的一种或多种改变,其中该一种或多种改变不更改该FGF19的一级氨基酸序列。这种期望的性质包括,例如,增强的溶解性,延长的循环半衰期,增加稳定性,降低清除率,改变免疫原性或变应原性,提高制造性的各方面(如成本和效率),以及启用用于检测检定的特定抗体的培育(如通过引入独特表位)。可进行的对人FGF19、天然存在的FGF19变体或FGF19突变蛋白的改变包括但不限于聚乙二醇化(聚乙二醇(PEG)的一种或多种分子或其衍生物的共价连接);糖基化(如N-糖基化)、聚唾液酸化和HES化;白蛋白融合;通过,例如共轭脂肪酸链(酰化)的白蛋白结合;Fc融合;以及利用PEG模拟物的融合。一些特定的实施方式必然伴有涉及聚乙二醇的修饰,其他特定的实施方式必然伴有涉及白蛋白的修饰,以及仍然其他的特定修饰必然伴有涉及糖基化的修饰。

[0074] 术语“DNA”、“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”等在本文中可互换使用,指任何长度的聚合形式的核苷酸,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸的非限制性例子包括直链和圆形核酸、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等。

[0075] 术语“探针”是指对应于相关基因或序列的DNA或RNA的片段,其中该片段已经被放

射性标记(例如,通过掺入³²P或³⁵S)或用一些其他可检测的分子,如生物素、地高辛(digoxigenin)或荧光素进行标记。由于具有互补序列的DNA或RNA的延伸片段会杂交,可以使用探针,例如,以将包含相关基因的病毒噬斑、细菌菌落或带标记在凝胶上。探针可以是被克隆的DNA或者它可以是合成的DNA链;后者可以被用来通过如下从分离的蛋白质中获得cDNA或基因组克隆:对该蛋白质的一部分微测序,推导编码该蛋白质的核酸序列,合成携带该序列的寡核苷酸,放射性标记该序列并将它用作探针来筛选cDNA文库或基因组文库。

[0076] 术语“异源”指的是两种组分由衍生自不同来源的结构定义。例如,在多肽的上下文中,“异源”多肽可以包括衍生自不同的多肽的可操作地连接的氨基酸序列。同样,在编码嵌合多肽的多核苷酸的上下文中,“异源”多核苷酸可以包括可以衍生自不同的基因的可操作地连接的核酸序列。示例性“异源”核酸包括这样的表达构建,其中包括编码序列的核酸可操作地连接至遗传来源不同于该编码序列的调控元件(如启动子)(例如,以在遗传来源不同于该启动子、该编码序列或两者的相关的宿主细胞中提供表达)。在重组细胞的上下文中,“异源”可以指遗传来源不同于其所处的宿主细胞的核酸(或基因产物,如多肽)的存在。

[0077] 术语“可操作地连接”是指分子之间的连接,以提供所需的功能。例如,在核酸的上下文中,“可操作地连接”是指核酸序列之间的功能性连接。通过举例的方式,核酸表达控制序列(如启动子、信号序列或转录因子结合位点阵列)可以可操作地连接到第二多核苷酸,其中该表达控制序列影响该第二多核苷酸的转录和/或翻译。在多肽的上下文中,“可操作地连接”指的是氨基酸序列(如不同的结构域)之间的功能性连接,以提供该多肽的所述活性。

[0078] 如在多肽结构的上下文中使用的,“N末端”(或“氨基末端”)和“C末端”(或“羧基末端”)分别指该多肽的氨基和羧基的最末端,而该术语“N末端”和“C末端”指该多肽的氨基酸序列中分别朝N末端和C末端的相对位置,并且可以分别包括N末端和C末端处的残基。“紧挨N末端”或“紧挨C末端”指第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,其中该第一氨基酸残基和第二氨基酸残基共价结合,以提供连续的氨基酸序列。

[0079] 在氨基酸序列或核苷酸序列的上下文中,“衍生自”(例如,氨基酸序列衍生自FGF19多肽)意在表示多肽或核酸具有的序列基于参考多肽或核酸(如天然存在的FGF19多肽或FGF19编码核酸)的序列,并且不意味着对蛋白质或核酸制造的来源或方法的限制。以举例的方式,该术语“衍生自”包括参考氨基酸或DNA序列的同系物或变体。

[0080] 在多肽的上下文中,术语“分离”指的是相关的多肽,如果是天然存在的,则是在与其天然存在的环境所不同的环境中。“分离”意在包括基本上富集该相关的多肽或其中该相关的多肽被部分地或基本上纯化的样本内的多肽。该多肽不是天然存在的情况下,“分离”表示该多肽已经从通过合成或重组手段将其制成的环境中分离。

[0081] “富集”指样本经非天然操作(例如,由科学家或临床医生),使得相关的多肽以如下浓度存在:a)比起始样本,例如生物样本(例如,其中该多肽天然存在或其中其在给药后存在的样本)中该多肽的浓度更高的浓度(例如,至少3倍以上、至少4倍以上、至少8倍以上、至少64倍以上或更高)或b)高于该多肽被制成的环境(例如,如在细菌细胞中的)的浓度。

[0082] “基本上纯的”表示组分(如多肽)构成组合物的总含量的大于约50%,以及一般大于总多肽含量的约60%。更典型地,“基本上纯的”是指这样的组合物,其中总组合物的至少75%、至少85%、至少90%或更多是相关的组分。在一些情况下,该多肽会构成组合物的总

含量的约90%以上或约95%以上。

[0083] 术语“检定”和“测量”及其语法变体在本文中可互换使用,是指定性或定量测定;或定性和定量测定两者。当关于检测使用该术语时,考虑了评估相对量的任何手段,包括本文所述和本领域中已知的各种方法。例如,可以通过Northern印迹法、Western印迹法、免疫沉淀检定;或通过测量所表达的蛋白质的活性、功能或量对基因表达进行检定或测量。

[0084] 术语“抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Igs)指具有相同结构特征的糖蛋白。虽然抗体显示出对特定抗原的结合特异性,但是免疫球蛋白包括抗体和其他缺乏抗原特异性的抗体样分子。

[0085] 术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,即包括该群的单个抗体,除了可以少量存在的可能天然存在的突变之外都是相同的。单克隆抗体针对单一抗原位点,是高度特异性的。与可以包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体只针对抗原上的单一决定簇。

[0086] 在抗体的上下文中,术语“分离”指的是抗体已被从其天然环境的污染性组分中分离和/或回收;这类污染性组分包括可能干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素和其他蛋白性或非蛋白性溶质。

[0087] 如本文所用,术语“FGF19依赖性”和类似的术语,如在疾病、紊乱或病症的上下文中所用,指的是全部或部分地由FGF19的表达引起的疾病、紊乱或其他病症。在某些实施方式中,FGF19的表达与对照相比被扩增。在一些实施方式中,FGF19的表达被扩增5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多;或其任何数值范围。在一些实施方式中,FGF19的扩增表达直接导致该疾病、紊乱或病症;或其症状。在其他的实施方式中,FGF19的扩增表达间接导致疾病、紊乱或病症;或其症状。

[0088] 成纤维细胞生长因子19(FGF19)

[0089] 成纤维细胞生长因子(FGF)是在细胞增殖和分化中起关键作用的生长因子家族。在人类中已经确认FGF家族的二十二个成员,其全部都是结构相关的信号传导分子。FGF的FGF19亚科由人FGF21、FGF23和FGF19和小鼠FGF15组成。

[0090] FGF家族成员的生理效应是肝素依赖性结合至FGF受体酪氨酸激酶(FGFR)家族的一个或多个成员的结果,该FGFR包括四个成员(FGFR1、FGFR2、FGFR3和FGFR4),每一个都具有酪氨酸激酶结构域。此外,FGFR1、FGFR2和FGFR3每个还具有命名为“b”和“c”变体(即FGFR1b、FGFR2b、FGFR3b、FGFR1c、FGFR2c和FGFR3c)的两种剪接变体。

[0091] FGF19靶向脂肪细胞和肝细胞两者并对其均有影响。用重组人FGF19处理的小鼠,尽管是高脂肪的饮食,显示的却是增加的代谢率、增加的脂质氧化、较低的呼吸商和减重。FGF19的代谢作用通过其结合至FGFR1c、FGFR2c和FGFR3c受体而发生,其结合至FGFR1c和FGFR2c是最重要的。FGF19结合至这些受体需要共受体Klotho-β(KLB)。

[0092] FGF19还显示出由肝脏来调节胆汁产生。因此,FGF19样药剂可以在胆汁酸稳态中起重要作用。结果表明,FGF19调节的肝脏胆汁酸代谢可能与其葡萄糖降低效果无关。

[0093] 正如本文别处提到的,使用胃旁路手术治疗糖尿病已经在大多数患者中显示出完全且持续治愈了II型糖尿病。这种“减肥效果”仅在手术后几天比较明显,而要达到显著的减肥时间较长。FGF19水平在减肥手术后升高,它可能是减肥效果的原由。

[0094] FGF19被表达为包含22个残基信号肽的216个氨基酸多肽(GenBank:AAQ88669.1)。成熟的人FGF19(野生型)是包含以下氨基酸序列的194个氨基酸多肽:

[0095]

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVR
YLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK (SEQ ID NO:3).

[0096] FGF19和肝细胞癌

[0097] 如本文中所述,FGF19与癌症,特别是最常见类型的肝癌HCC的诱导有关。根据某些方面,提供了确认具有所需的代谢活性(如葡萄糖降低活性),但缺乏或没有实质HCC活性,如本文所阐述的,多肽或子序列、变体或其修饰形式的方法和模型。各种代谢紊乱和相关方法(如测量葡萄糖水平的方法),连同检测癌症的方法,在本文别处进行描述并且为本领域所公知。

[0098] 各种方法论可以被用于HCC的筛查和诊断,并为本领域技术人员所公知。HCC的指标包括但不限于肿瘤标记物(例如升高的甲胎蛋白(AFP)或脱- γ -羧基凝血酶(DCP)水平)的检测。许多不同的扫描和成像技术也是可用的,包括超声波、CT扫描和MRI。关于本文所提供的方法和模型的某些实施方式,对多肽(如候选多肽)是否显示出诱导HCC的迹象的评价通过,例如相比于野生型FGF19诱导的HCC结节形成,对施用多肽的动物模型(如db/db小鼠模型)中HCC结节形成进行量化而在体内得以测定。宏观上,HCC可呈结节状,而肿瘤结节(其经常是灰色或绿色的圆形到椭圆形,边界清楚但未包封)看起来是一个大肿块或多个较小的肿块。可替代地,HCC可以呈现为扩散且边界不清以及经常渗入门静脉的浸润肿瘤。HCC风险因素包括2型糖尿病(通常因肥胖加剧)。依据糖尿病的持续时间和治疗方案,2型糖尿病的HCC风险更大(是非糖尿病风险的~2.5至~7倍)。

[0099] 上述一种或多种方法论的结果表明HCC可能存在之后,通常进行肝组织样本的病理评估。因此,本文提供的方法的某些实施方式进一步包括评估来自可用于HCC研究的体内动物模型的肝组织样本,以确定多肽序列是否表现出诱导HCC的迹象。在某些实施方式中,该体内动物模型是db/db小鼠模型。通过显微评估,病理学家可以确定是否存在HCC的四种一般架构和细胞学类型(模式)(即纤维板层、假腺样(腺样)、多形性(巨细胞)和透明细胞)之一。

[0100] 用于确认具有所需特性的FGF19变体的方法和模型.

[0101] 科学和专利文献中均描述了至少在某些方面,模拟FGF19的活性的FGF19变体多肽和其他药剂。见,例如,Wu等人,PLoS One,6:e17868(2001年3月11日);美国专利号8,324,160;以及美国公开号2011/0195895;2011/0207912和2011/0104152。虽然并非旨在以任何方式进行限制,候选FGF19变体序列包括具有对应于FGF19的第16-20个氨基酸的WGDP序列(SEQ ID NO:3)的WGDP(SEQ ID NO:4)序列基序的多肽。本文所考虑的特定的多肽具有下列氨基酸序列:

[0102]

MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVR
YLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHLRVLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR
GHLESMDMFSSPLETDSDMPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M70, SEQ ID NO:1)。

[0103] 在其他的实施方式中,FGF19变体包括如下阐述的氨基酸序列或由其组成:

[0104]

RHIPDPSSPLLQFGGQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M5, SEQ ID NO:5);

[0105]

RDSSPLLQFGGQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHL
ESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M6, SEQ ID NO:6);

[0106]

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYL
CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED
LRGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M7, SEQ ID NO:7);

[0107]

RHIPDSSPHVHYGGQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M14, SEQ ID NO:8);

[0108]

RPLAFSDAGPHVHYGGQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYL
CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED
LRGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M15, SEQ ID NO:9);

[0109]

RHIPDSSPLLQFGDQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M32, SEQ ID NO:10);

[0110]

RHIPDSSPLLQFGGNVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M36, SEQ ID NO:11);

[0111]

RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYL
CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED
LRGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M43, SEQ ID NO:12);

[0112]

RHIPDSSPLLQFGDQVRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLC
MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL
RGHLESDMFSSPLETDSDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(M50, SEQ ID NO:13);

[0113]

RDSSPLLQWGDPIRLRHYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGAD
GKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHL

ESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M52, SEQ ID NO:14);

[0114]

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M53, SEQ ID NO:15);

[0115]

RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M67, SEQ ID NO:16);

[0116]

RPLAFSDAGPHVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M68, SEQ ID NO:17);

[0117]

RDSSPLVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M69, SEQ ID NO:18);

[0118]

MRDSSPLVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M70, SEQ ID NO:1 or 19);

[0119]

RVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M75, SEQ ID NO:20);

[0120]

RGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M76, SEQ ID NO:21);

[0121]

RRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEE DCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETD SMDPFGLEAVRSPSFEK(M77, SEQ ID NO:22);

[0122]

RPLAFSDAAPHVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP EDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M83, SEQ ID NO:23);

[0123]

RPLAFSDAGAHVHYWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP

EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M84, SEQ ID NO:24);

[0124]

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVR
YLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIREDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M140, SEQ ID NO:25);

[0125]

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR
GHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M144(M5-R), SEQ ID NO:26);

[0126]

DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADG
KMQGLLQYSEEDCAFEEEIRPDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE
SDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M145(M6-R), SEQ ID NO:27);

[0127]

HPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR
GHLESDFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M146(M50-R), SEQ ID NO:28);

[0128]

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRQRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVR
YLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEILEDGYNVRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEP
EDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLEAVRSPSFEK(M160, SEQ ID NO:29);

[0129] 或任何前述肽序列的子序列或其片段。在任何上述肽序列的某些实施方式中，删除了N端R残基。

[0130] 如前所述，本披露的一个方面考虑了一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选者的方法，该方法包括：(a)提供具有癌性病症的标记的测试对象，该对象具有代谢紊乱，(b)向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品，以及FGF19变体，其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症，以及(c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强；其中癌性病症标记增强的缺乏表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

[0131] 本披露的另一个方面考虑了一种用于确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选者的方法，该方法包括：(a)提供具有癌性病症的标记的测试对象，该对象具有代谢紊乱，(b)向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品，以及FGF19变体，其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症，以及(c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被减少；其中癌性病症标记的减少表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者。

[0132] 本披露还考虑了一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物的方法，该方法包括：(a)向该具有代谢紊乱的测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品，以及FGF19变体，其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症，以及(b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被观察到；其中

癌性病症的标记的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物。

[0133] 本文所考虑的另一实施方式涉及一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物的方法,该方法包括:(a)提供具有代谢紊乱的测试对象,该测试对象具有癌性病症的标记;(b)向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中加剧癌性病症,以及(c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强;其中癌性病症标记加剧的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物。在特定的实施方式中,癌性病症的一种或多种标记在该测试对象被减少。

[0134] 在本文提供的方法的某些实施方式中,该FGF19变体选自如下:M5、M6、M7、M14、M15、M32、M36、M43、M52、M53、M67、M68、M69、M70、M75、M76、M77、M83、M84、M140、M144、M145、M146以及M160。在一个实施方式中,该FGF19变体是M5。在另一实施方式中,该FGF19变体是M6。在一些实施方式中,该FGF19变体是M7。在一个实施方式中,该FGF19变体是M14。在另一实施方式中,该FGF19变体是M15。在其他的实施方式中,该FGF19变体是M32。在一个实施方式中,该FGF19变体是M36。在另一实施方式中,该FGF19变体是M43。在其他的实施方式中,该FGF19变体是M52。在仍然其他的实施方式中,该FGF19变体是M53。在一些实施方式中,该FGF19变体是M67。在一个实施方式中,该FGF19变体是M68。在另一实施方式中,该FGF19变体是M69。在一些实施方式中,该FGF19变体是M70。在一个实施方式中,该FGF19变体是M75。在另一实施方式中,该FGF19变体是M76。在其他的实施方式中,该FGF19变体是M77。在仍然其他的实施方式中,该FGF19变体是M83。在一个实施方式中,该FGF19变体是M84。在另一实施方式中,该FGF19变体是M140。在其他的实施方式中,该FGF19变体是M144。在仍然其他的实施方式中,该FGF19变体是M145。在一个实施方式中,该FGF19变体是M146。在一些实施方式中该FGF19变体是M160。在其他的实施方式中,也考虑了两种或更多前述FGF19变体的任意组合。

[0135] 在本文提供的方法的某些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NOS:5-29任一项中所述的氨基酸序列;或子序列或其片段。在某些实施方式中,该N末端R残基被删除。在一些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:5。在其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:6。在一个实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:7。在其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:8。在另一实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:9。在一些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:10。在其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:11。在另一实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:12。在一些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:13。在其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:14。在一个实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:15。在另一实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:16。在一些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:17。在其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:18。在仍然其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:19。在一些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:20。在一个实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:21。在一些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:22。在其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:23。在另一实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:24。在一些实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:25。在其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:26。在仍然其他的实施方式中,该FGF19变体包括SEQ ID NO:27。在一些实施方式中,该

FGF19变体包括SEQ ID NO:28。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:29。在某些实施方式中，该FGF19变体包括前述序列的任一项，其中该N末端R残基被删除。在一些实施方式中，该FGF19变体包括任何前述序列的序列。在其他的实施方式中，也考虑了两种或更多前述FGF19变体的任意组合。

[0136] 在本文提供的方法的某些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NOS:5-29任一项中所述的氨基酸序列；或子序列或其片段组成。在某些实施方式中，该N末端R残基被删除。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQID NO:5组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:6组成。在一个实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:7组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:8组成。在另一实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:9组成。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:10组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:11组成。在另一实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:12组成。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:13组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:14组成。在一个实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:15组成。在另一实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:16组成。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:17组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:18组成。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:19组成。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:20组成。在一个实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:21组成。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:22组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:23组成。在另一实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:24组成。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:25组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:26组成。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:27组成。在一些实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:28组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NO:29组成。在某些实施方式中，该FGF19变体由前述序列的任一项组成，其中该N末端R残基被删除。在一些实施方式中，该FGF19变体由任何前述序列的序列组成。在其他的实施方式中，也考虑了两种或更多前述FGF19变体的任意组合。

[0137] 如上面提到的，本披露还考虑了各种模型。可以使用任何提供可靠的，可重复的结果的模型。熟练的技术人员熟悉可以结合本披露的主题使用的模型。在一些实施方式中，使用啮齿动物模型，特别是小鼠模型。除了在实验部分的实施例中使用该ob/ob小鼠模型之外，在实施本披露的各方面还可以使用db/db、db/ob和DIO模型。

[0138] 一个这类实施方式涉及一种用于确定FGF19变体是否是用于预防具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型，该模型包括以下对象：(i)在有效量的FGF19或FGF19替代品的施用之前，没有表现出癌性病症的标记的；以及(ii)在该FGF19或该FGF19替代品的该施用之后，表现出癌性病症的标记的；且其中在有效量的包含SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列的多肽的施用之后，癌性病症的标记得以改善。在某些实施方式中，该多肽由SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列组成。

[0139] 本披露还考虑了一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型，该模型包括具有由FGF19或FGF19替代品的施用导致的癌症的至少一种标记的对象，其中在有效量的包含SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列的多肽的施用之后，癌症的该标记得以改善。在某些实施方式中，该多肽由SEQ ID NO:1

中所述的氨基酸序列组成。

[0140] 在一些实施方式中，本文提供一种用于确定FGF19变体是否是用于预防具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型，该模型包括以下对象：i)在有效量的FGF19或FGF19替代品的施用之前，没有表现出癌性病症的标记的；以及ii)在该FGF19或FGF19替代品的该施用之后，表现出癌性病症的标记的；且其中在有效量的FGF19变体的施用之后，癌性病症的标记得以改善。

[0141] 在其他实施方式中，本文提供一种用于确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的对象体内癌性疾病、紊乱或病症的候选物的模型，该模型包括具有由FGF19或FGF19替代品的施用导致的癌症的至少一种标记的对象，其中在有效量的FGF19变体的施用之后，癌症的标记得以改善。

[0142] 在本文提供的模型的某些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NOS:5-29任一项中所述的氨基酸序列；或子序列或其片段。在本文提供的模型的其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NOS:5-29任一项中所述的氨基酸序列；或子序列或其片段组成。在某些实施方式中，该N末端R残基被删除。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:5或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:6或由其组成。在一个实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:7或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:8或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:10或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:11或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:12或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:13或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一个实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:15或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:16或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:17或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:18或由其组成。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:19或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:20或由其组成。在一个实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:21或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:22或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:23或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:24或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:25或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:26或由其组成。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:27或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:28或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:29或由其组成。在某些实施方式中，该FGF19变体包括前述序列的任一项或由其组成，其中该N末端R残基被删除。在一些实施方式中，该FGF19变体包括任何前述序列的序列或由其组成。在其他的实施方式中，也考虑了两种或更多前述FGF19变体的任意组合。

[0143] FGF19与FGF19变体共同施用的效果评价

[0144] 在实验部分阐述的例子中，对FGF19单独施用或与FGF19变体M70共同施用对db/db小鼠的影响进行了评估。将腺相关病毒(AAV)用作溶媒以递送和表达小鼠内的有关外源基因，并使连续、持续且全身性暴露于由转基因编码的蛋白质成为可能。

[0145] 图2描绘了GFP(对照物);FGF19(两种单独的剂量);以及FGF19和FGF19变体M70(各自有两种单独的剂量)的AAV介导的基因递送之后5周,db/db小鼠体内通过ELISA确定的血浆FGF19浓度。继该FGF19和M70转基因的共同施用之后所观察到的高FGF19浓度反映了来自FGF19变体M70和FGF19两者的表达的贡献。在实施例中使用FGF19-标签,以便于对实验结果的量化;如在实验部分所阐述的,c-标签组分并未影响FGF19的肿瘤发生效果,尽管它可以对FGF19的抗糖尿病效果产生影响。

[0146] 对FGF19和FGF19变体M70的共同施用,相比FGF19的单独施用,对HCC的潜在影响进行了评价。如图3中描绘的,该db/db小鼠模型中FGF19的异位表达促进了突出肝脏表面的多个凸起大肿瘤结节的形成,而从表达FGF19和M70两者的小鼠中分离的肝脏完全没有(在所采用的条件下)的肝结节。此外,当共表达该FGF19和M70转基因时,肝损伤的外观所证实的FGF19诱导的肿瘤发生完全受到抑制。这些数据是在令人惊奇的,因为它们暗示,经工程化的FGF19变体M70不仅缺乏与野生型蛋白质相关的小鼠致瘤潜力,而且它可以有效地干扰野生型蛋白质的增殖作用。虽然实践本发明并不需要精确了解与这种现象相关联的基本动作机制,但是这可能至少部分地是由于在FGF19结合位点,M70与野生型FGF19的竞争。

[0147] 实施例4阐述了在所指定的转基因注射前初始测量的以及注射后3周、5周和23周随后确定的对小鼠体重的影响。如图4中所描绘的,共表达该FGF19变体M70和FGF19的转基因db/db小鼠,与对照物给药的动物相比,表现出显著的体重减少,而在仅表达FGF19转基因的小鼠中观察到对体重的影响不太显著。共表达FGF19和M70转基因的小鼠中观察到的体重变化也反映在了肝脏重量与从对照组中的动物收获的肝脏重量相比有所减小。

[0148] 在转基因注射之前以及注射后3周、5周和23周还以类似于体重测定的方式评估了转基因表达对血液葡萄糖的影响。图5中所阐述的结果表明共表达该FGF19变体M70和FGF19的转基因db/db小鼠显示了与对照动物相比,血液葡萄糖的显著减少。

[0149] 作为对上述研究和日期的扩展,以及如实验部分的实施例6-11中所提供的,在小鼠中建立了体内致瘤模型,以评估FGF19诱导的肝癌发生,试图在肿瘤发生中靶向FGF19而不损害其例如,在胆汁酸稳态中的重要作用。实施例7阐述了用于评价体内肝细胞肿瘤发生的AAV介导的转基因系统。使用AAV介导的基因递送方法引入FGF19转基因表达(Zhang等人,2009, *Hum. Gene Ther.* 20, 922-929)。如实施例8中所阐述,对一组FGF19变体进行体内评估,并确认了无肿瘤变体,包括M70。值得注意的是,如实施例8和9中所提供,M70显示出保留了调节胆汁酸稳态的有益活性;以及M70也显示结合并激活FGFR4,假定其介导FGF19相关的致瘤性(French等人,2012, *PLoS one* 7, e36713; Wu等人,2010, *J. Biol. Chem.* 285, 5165-5170)。如实施例10中所提供之,FGF19显示通过激活STAT3途径而机械地刺激肿瘤进展,这是一种在M70被消除的活性。此外,如实施例11中所提供之,M70显示抑制了多种肿瘤模型中FGF19依赖性肿瘤生长。此外,如实施例12中所提供之,M70显示抑制了同系小鼠模型中结肠肿瘤生长。

[0150] 因此,在本文所提供的实施例中,天然激素经工程化以选择性地消除潜在的有害活性(即致瘤性),同时使有益的功能(即胆汁酸代谢)不变。通过广泛的结构活性分析,M70被确认为结合并选择性激活FGFR4受体复合物来维持胆汁酸稳态的无肿瘤FGF19变体。长时间暴露于超生理水平的M70的小鼠(db/db小鼠24周,rash2小鼠52周)没有肝脏肿瘤(实施例8;图7和8)。M70也被证明阻断了小鼠和人癌异种移植物中FGF19相关的致瘤性(实施例11,

图11)。虽然先前确认了无肿瘤的FGF19变体(Wu等人,2011,PloS one 6,e17868;Wu等人,2010a,PNAS,107,14158–14163),这些变体还是经专门设计以消除FGFR4结合,以及引申开来,在调节胆汁酸代谢方面受损。与此相反,M70显示出结合FGFR4和调节FGFR4的下游Cyp7a1和pERK途径的类似效力和功效(实施例9和10;图9和10)。这些结果提供了FGFR4/KLB受体复合物的选择性激活(这不会导致肝细胞肿瘤发生)的体内证据。

[0151] M70和FGF19之间的主要区别在于蛋白质的N末端。每种FGF家族蛋白质由结构保守的中央球状结构域,以及结构上灵活而基本序列发散的侧翼N末端和C末端片段组成(Beenken和Mohammadi,2009,Nat.Rev.Drug Discov.8,235–253)。在多个FGF/FGFR复合物的X射线晶体结构中,FGF分子的N末端片段与该FGFR特异性接触,并且被认为在确定FGF-FGFR相互作用的特异性方面发挥重要作用(Beenken和Mohammadi,2009,Nat.Rev.Drug Discov.8,235–253)。通过我们的系统性体内筛查的努力,改变N末端的3个氨基酸再加上5-aa删除显示除去了致瘤性而不损害其激活FGFR4依赖性过程(如胆汁酸调节)的活性。

[0152] 不希望受到理论的束缚,一些证据表明,M70显示出“偏向配位体”或选择性调节剂的药理特性。例如,如实施例9和图9中所提供,M70结合FGFR4的胞外域,其效力和功效与野生型FGF19类似。M70激活用FGFR4-KLB或内源性表达FGFR4-KLB的FGFR4转染的细胞中的ERK磷酸化。M70像FGF19的是有力地抑制了原代肝细胞和小鼠中的Cyp7a1。M70不像FGF19的是并没有促进肝脏肿瘤形成。再次不希望受理论的束缚,M70致瘤性的缺乏可以通过其缺乏pSTAT3(肝细胞致癌途径中的一种关键信号传导分子)的激活来解释。

[0153] 如实施例10和图10中所提供,FGF19而非M70显示激活了肝脏中的STAT3。STAT3是肝癌肿瘤发生中的主要参与者(He和Karin,2011,Cell Res.21,159–168)。在近60%的人HCC中发现了磷酸化(即激活)的STAT3(He等人,2010,Cancer Cell 17,286–297)。STAT3激活也与HCC患者的预后较差相关(Calvisi等人,2006,Gastroenterol.130,1117–1128)。组成型活性STAT3在细胞转化中充当癌基因(Bromberg等人,1999,Cell 98,295–303)。STAT3的肝细胞特异性消融预防了小鼠体内HCC进展(He等人,2010,Cancer cell 17,286–297)。STAT3激活的抑制剂阻断了人癌细胞的生长并且在临幊上正被测试用于治疗包括HCC的各种癌症(Chen等人,2010,Clin.Cancer Res.,16,5189–5199;Karras等人,2000,Cellular immunol.202,124–135;Lin等人,2009,Oncogene 28,961–972)。在其他炎症细胞因子中,推測IL-6是肝脏中主要的STAT3激活剂(He等人,2010,Cancer cell 17,286–297)。已显示IL-6信号传导刺激了肝癌祖细胞的恶性进展(He等人,2013,Cell 155,384–396)。原发性胆汁性肝硬化(一种与增加的HCC的风险相关的胆汁淤积病症)患者中观察到增加的IL-6产量(Kakumu等人,1993,Gastroenterologia Japonica 28,18–24)。实施例10和图10中还示出,FGF19激活了体内STAT3信号传导。这种效果可以通过FGFR4受体复合物直接诱导;或通过细胞因子或生长因子间接诱导。实际上,在我们的研究中经FGF19处理的动物的肝脏中IL-6的表达升高了(实施例10;图10)。

[0154] M70可以结合FGFR4上的正构位点,因为M70能够取代或干扰FGF19结合并抑制FGF19相关的致瘤性。然而,M70并不非歧视性地在相同的程度上阻断所有的途径。如针对某些变构调节剂所观察到的,把其他(即肿瘤)相对排除在外,M70显示出对某些FGFR4信号传导途径(即Cyp7a1、pERK)的偏爱(图12)。

[0155] 从治疗的角度来看,我们的研究也为M70在慢性肝病和癌症中的用途提供实验性支持。M70可以用作用于治疗FGF19依赖性肿瘤的抗癌剂(见,如实施例8和11;图7、8和11)。特别真实的是,FGF19在~15%人HCC中被扩增以及在肝硬化和胆汁淤积病症中被上调,这常常导致肿瘤进展。而现有的报告显示证实了异种移植模型中的抗肿瘤活性的中和性抗FGF19单克隆抗体的开发(Desnoyers等人,2008,Oncogene 27,85–97),这样的策略造成了严重的不利影响。由于内源性FGF19的预定目标的抑制,这种抗体对食蟹猴施用导致剂量相关的肝脏毒性,并伴有严重的腹泻,导致了肝胆汁酸合成增加,血清胆汁酸增加,对肠肝循环的扰动,以及腹泻恶化和肝毒性(Pai等人,2012,Toxicological sciences,126,446–456)。

[0156] 如实验部分所提供的,以及与中和抗体相反,我们的研究显示,M70保留了FGF19对胆汁酸调节的活性,同时消除了致瘤性(见,如实施例8、9和11;图8、9和11)。这确保了作为抗癌剂使用时,胆汁酸稳态的保持。重要的是,本文提供的实验数据显示,M70不仅缺乏致瘤潜力,而且它也可以有效地干扰与野生型FGF19相关联的致瘤性作用。此外,除了FGF19诱导的HCC之外,M70还抑制结肠癌异种移植肿瘤的生长。M70也抑制同系小鼠模型中结肠癌的生长(见,如实施例12和图13)。这些结果证实,作为选择性FGFR4调节剂,M70拮抗FGF19的致癌活性。

[0157] 如实验部分所提供的,还建立了强大的高通量系统以使用AAV介导的基因递送,评估成年小鼠中肝细胞肿瘤发生中的多种蛋白质。显示正位位点(肝)上的FGF19的过表达导致了多株小鼠中肝脏发育不良以及HCC的进展。这消除了传统的转基因小鼠方法中胚胎形成和发展的干扰因素。肿瘤启动或促进无需化学肿瘤促进剂,如二乙基亚硝胺(DEN)或苯巴比妥。同样的方法可以适于评估其他致癌基因、信号传导蛋白质以及天然蛋白质的变体。

[0158] FGF19证实有一系列的生物效应。FGF19的治疗潜力包括慢性肝病,以及肥胖和糖尿病的治疗,但其对肝细胞增殖和致瘤潜力的促进是开发FGF19用于慢性病用途的挑战。然而,将M70确认为缺乏致瘤性,同时保留其有力的代谢特性的经工程化的FGF19变体,可以实现治疗益处,而没有不希望的副作用。我们的结果不仅证实FGFR4-KLB受体复合物的选择性激活不诱导肝脏肿瘤形成,而且还为利用这一途径来治疗癌症、胆汁酸反调节疾病,2型糖尿病和其他代谢紊乱提供了新的途径。

[0159] 多肽和核酸分子

[0160] 本披露还考虑了含有衍生自本文所述的多肽的序列的连续的氨基酸残基的多肽的活性片段(如子序列)。肽或多肽子序列的连续的氨基酸残基的长度因该子序列衍生来源的特定天然存在的氨基酸序列的不同而不同。在某些实施方式中,肽和多肽是约5个氨基酸至约10个氨基酸、约10个氨基酸至约15个氨基酸、约15个氨基酸至约20个氨基酸、约20个氨基酸至约25个氨基酸、约25个氨基酸至约30个氨基酸、约30个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约75个氨基酸、约75个氨基酸到约100个氨基酸或约100个氨基酸直至全长多肽。

[0161] 在本文提供的FGF19变体多肽的某些实施方式中,氨基酸残基(或其模拟物)的总数少于约250。在其他实施方式中,氨基酸残基的数量范围为约190至约230、约200至约225或约210至约220个残基。在更进一步的实施方式中,氨基酸残基的数量为大于180、大于185、大于190、大于195、大于200、大于205、大于210、大于215、大于220或大于225个残基。

[0162] 附加地,在某些实施方式中,相比超过连续氨基酸的限定长度的参照序列(如“比较窗”),多肽具有限定的序列同一性。用于比较的序列比对方法为本领域所公知。用于比较的最佳序列比对可以,例如通过Smith & Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法,通过Needleman & Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson & Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性搜索方法,通过这些算法的计算机化执行(威斯康星州麦迪逊威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或通过手工比对和目测(见,如Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人.,eds.1995supplement))进行。

[0163] 作为例子,在一些实施方式中,合适的多肽包括相对本文所述的氨基酸序列之一的从约5个氨基酸到约10个氨基酸,从约10个氨基酸到约12个氨基酸,从约12个氨基酸到约15个氨基酸,从约15个氨基酸到约20个氨基酸,从约20个氨基酸到约25个氨基酸,从约25个氨基酸到约30个氨基酸,从约30个氨基酸到约35个氨基酸,从约35个氨基酸到约40个氨基酸,从约40个氨基酸到约45个氨基酸,从约45个氨基酸到约50个氨基酸,从约50个氨基酸到约60个氨基酸,从约60个氨基酸到约70个氨基酸,从约70个氨基酸到约80个氨基酸,从约80个氨基酸到约90个氨基酸,从约90个氨基酸到约100个氨基酸,从约100个氨基酸到约110个氨基酸,从约110个氨基酸到约120个氨基酸,从约120个氨基酸到约130个氨基酸,从约130个氨基酸到约140个氨基酸,从约140个氨基酸到约150个氨基酸,从约150个氨基酸到约160个氨基酸,从约160个氨基酸到约170个氨基酸,从约170个氨基酸到约180个氨基酸,从约180个氨基酸到约190个氨基酸;或约194个氨基酸的连续延伸片段,具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0164] 在某些实施方式中,该多肽从天然来源(例如,非其天然存在的环境的其他的环境)中分离,并且还可以重组制备(例如,于遗传修饰的宿主细胞,如细菌;酵母;毕赤;昆虫细胞;以及诸如此类中),其中该遗传修饰的宿主细胞用包括编码该多肽的核苷酸序列的核酸加以修饰。该多肽还可以合成产生(例如,通过无细胞化学合成)。制作的方法在下文中更详细地进行描述。

[0165] 在一些实施方式中,使用重组技术来操作本领域已知的不同的FGF19相关的核酸,以提供能够编码多肽的构建体而生成该多肽。将理解的是,当提供特定的氨基酸序列时,普通的技术人员鉴于其在,例如分子生物学中的背景和经验,将识别编码这样的氨基酸序列的各种不同的核酸分子。

[0166] 在一些实施方式中,本披露也提供了与参考序列(例如,相应的野生型序列)相比,在氨基酸残基(例如,在变体或物种中非保守位置)方面具有一种或多种改变的多肽。这类多肽经常保留物种中保守的以及与天然存在的多肽具有相同的生物活性的结构域。这类多肽常常还具有一种或多种保守的氨基酸取代。短语“保守的氨基酸取代”一般是指以下基团内的氨基酸残基取代:1)L、I、M、V、F;2)R、K;3)F、Y、H、W、R;4)G、A、T、S;5)Q、N;以及6)D、E。保守的氨基酸取代通过用具有侧链的相似酸性、碱性、电荷、极性或大小的侧链的氨基酸替换蛋白质中的一种(或多种)氨基酸而保持蛋白质的活性。取代、插入或删除的指导可基于来自不同物种的不同变体蛋白或蛋白质的氨基酸序列的比对。

[0167] 在特定的实施方式中,考虑了对FGF19的环8区域的修饰。在本文中,FGF19残基

127-129(SEQ ID NO:3)被定义为构成该环8区域,虽然在文献中,该环8区域有时被定义为包括其他残基(如残基125-129)或由其组成。FGF19框架中R127L和P128E取代的某些组合对HCC形成具有意想不到的积极效果。在FGF19核心区域R127L和P128E取代的组合以及用Gln(Q)取代Leu(L)也对防止HCC形成具有显著的影响。

[0168] 因此,包含FGF19环8区域的变体,因为它们可以减少或消除显著的、可测量或可检测的HCC形成。此外,减少HCC形成的效果可通过对该环8区域以外的氨基酸残基的修饰(例如,核心区域,如对应于SEQ ID NO:3的第21-29个氨基酸的区域中氨基酸残基的取代)来增强。

[0169] 在一些实施方式中,环8修饰的变体是M70:MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLIKEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDS16MDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(SEQ ID NO:70),包括FGF19环8区域(下划线)中的取代。在某些实施方式中,环8修饰的M70变体包括FGF19环8区域(下划线)中对应于(i)R127L取代,(ii)P128E取代或(iii)R127L取代和P128E取代的取代。在某些实施方式中,环8修饰的M70变体进一步包括FGF19核心区域的取代。在一些实施方式中,环8修饰的M70变体包括L18Q取代。

[0170] 在其他实施方式中,环8修饰的变体是M5(SEQ ID NO:5)、M6(SEQ ID NO:6)、M7(SEQ ID NO:7)、M14(SEQ ID NO:8)、M15(SEQ ID NO:9)、M32(SEQ ID NO:10)、M36(SEQ ID NO:11)、M43(SEQ ID NO:12)、M50(SEQ ID NO:13)、M52(SEQ ID NO:14)、M53(SEQ ID NO:15)、M67(SEQ ID NO:16)、M68(SEQ ID NO:17)、M69(SEQ ID NO:18)、M70(SEQ ID NO:1或19)、M75(SEQ ID NO:20)、M76(SEQ ID NO:21)、M77(SEQ ID NO:22)、M83(SEQ ID NO:23)、M84(SEQ ID NO:24)、M140(SEQ ID NO:25)、M5-R(SEQ ID NO:26)、M6-R(SEQ ID NO:27)、M50-R(SEQ ID NO:28)或M160(SEQ ID NO:29)。在一些实施方式中,环8修饰的变体包括对应于SEQ ID NO:3的第127-129个氨基酸的FGF19环8区域中的取代。在某些实施方式中,环8修饰的变体包括FGF19环8区域中对应于(i)R127L取代,(ii)P128E取代或(iii)R127L取代和P128E取代的取代。在一些实施方式中,FGF19变体包括或进一步包括对应于SEQ ID NO:3的第21-29个氨基酸的核心区域中的取代。在某些实施方式中,FGF19变体包括或进一步包括核心区域中对应于L22Q取代的取代。

[0171] 本披露考虑了编码本文所述的多肽的核酸分子,包括其天然存在的和非天然存在的同种型、等位基因变体和剪接变体。本披露还包涵氨基酸序列,其在一种或多种碱基方面不同于天然存在的DNA序列,但由于遗传密码的简并性,仍翻译成对应于多肽的核酸序列。

[0172] 酰胺键取代

[0173] 在一些情况下,多肽包括一种或多种非肽键的键合,例如至少两个相邻氨基酸经由非酰胺键的键合连接。例如,为了减少或消除不希望的蛋白质水解或其他降解手段;和/或增加血清稳定性;和/或限制或增加构象柔性,多肽的主链内的一种或多种酰胺键可被取代。

[0174] 在另一个例子中,多肽中的一种或多种酰胺键合(-CO-NH-)可以替换为键合,其是酰胺键合的同电子排列体,如-CH₂NH-、CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-(顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-或-CH₂SO-。多肽中的一种或多种酰胺键合也可以替换为,例如减小的同电子排

列体假肽键。见Couder等人(1993)Int.J.Peptide Protein Res.41:181-184。这样的替换以及如何实现为本领域中的普通技术人员所知。

[0175] 氨基酸取代

[0176] 在某些实施方式中,在多肽中进行一种或多种氨基酸取代。以下是非限制性例子:

[0177] a)烷基取代的疏水氨基酸(包含由来自C₁-C₁₀碳的脂族侧链取代的丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸、(S)-2-氨基丁酸、(S)-丙氨酸环己酯或其他简单的α-氨基酸)的取代,包含支链、环状和直链烷基、烯基或炔取代;

[0178] b)芳族取代的疏水氨基酸(包含苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、磺酸基酪氨酸、联苯基丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、2-苯并噻吩基丙氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、组氨酸)的取代,包含氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氮杂、卤代(氟代、氯代、溴代或碘代)或烷氨基(从C₁至C₄)取代形式的以上所列的芳族氨基酸,其示例性例子是:2-,3-或4-氨基苯丙氨酸;2-,3-或4-氯苯丙氨酸;2-,3-或4-甲基苯基丙氨酸;2-,3-或4-甲氧基苯丙氨酸;5-氨基-、5-氯代-、5-甲基-或5-甲氧基色氨酸;2'-、3'-或4'-氨基-,2'-、3'-或4'-氯代-,2,3或4联苯基丙氨酸;2'-、3'-或4'-甲基-,2-,3-或4-联苯基丙氨酸;以及2-或3-吡啶基丙氨酸;

[0179] c)含有碱性侧链的氨基酸(包含精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、2,3-二氨基丙酸、高精氨酸)的取代,包含前述氨基酸的烷基、烯基或芳基取代的(从C₁至C₁₀支链的,直链的或环状的)衍生物,不论取代基是否在杂原子上(如α氮或一种或多种远端氮;或在α碳上,例如在前R位置)。充当示例性例子的化合物包括:N-ε-异丙基-赖氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-甘氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-丙氨酸、N,N-γ,γ'-二乙基-高精氨酸。还包括如下化合物:α-甲基-精氨酸、α-甲基-2,3-二氨基丙酸、α-甲基-组氨酸、α-甲基-鸟氨酸,其中烷基占据α-碳的前R位置。还包括从烷基、芳族、杂芳族(其中该杂芳基基团具有单独或组合的一种或多种氮、氧或硫原子)羧酸或任何众多公知的激活衍生物(如酰基氯、活性酯类、活性偶氮化物(azolides)和相关的衍生物)以及赖氨酸、鸟氨酸或2,3-二氨基丙酸形成的酰胺类;

[0180] d)酸性氨基酸(包含天冬氨酸、谷氨酸、高谷氨酸、酪氨酸、烷基、芳基、芳烷基;以及2,4-二氨基丙酸、鸟氨酸或赖氨酸和四唑-取代的烷基氨基酸的杂芳基磺酰胺)的取代;

[0181] e)侧链酰胺残基(包含天冬酰胺、谷氨酰胺以及天冬酰胺或谷氨酰胺的烷基或芳族取代衍生物)的取代;和/或

[0182] f)含有羟基的氨基酸(包括丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、2,3-二氨基丙酸;以及丝氨酸或苏氨酸的烷基或芳族取代的衍生物)的取代。

[0183] 在一些实施方式中,多肽包括一种或多种天然存在的非遗传编码的L-氨基酸,合成的L-氨基酸或氨基酸的D-对映体。例如,多肽可以仅包括D-氨基酸。例如,在某些实施方式中,多肽包括一种或多种下列残基:羟脯氨酸、β-丙氨酸、邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、2,3-二氨基丙酸、α-氨基异丁酸、N-甲基甘氨酸(肌氨酸)、鸟氨酸、瓜氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、萘基丙氨酸、吡啶基丙氨酸3-苯并噻吩基丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、青霉胺、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、β-2-噻吩基丙氨酸、蛋氨酸亚砜、高精氨酸、N-乙酰基赖氨酸、2,4-二氨基丁酸、rho-氨基苯丙氨酸、N-甲基缬氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、ε-氨基己酸、ω-氨基己酸、ω-氨基庚酸、ω-氨基辛酸、ω-氨基癸酸、ω-氨基十四烷酸、环己基丙氨酸、α,γ-二氨基丁酸、α,β-二氨基丙酸、δ-

氨基戊酸以及2,3-二氨基丁酸。

[0184] 附加的修饰

[0185] 在一些实施方式中,半胱氨酸残基或半胱氨酸类似物被引入多肽以通过二硫键提供与另一种肽的键合或以提供对该多肽的环化。引入半胱氨酸或半胱氨酸类似物的方法为本领域所知;见,例如,美国专利号8,067,532。

[0186] 在其他实施方式中,多肽被环化。例如,一种或多种半胱氨酸或半胱氨酸类似物可以被引入多肽,其中所引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物可以与第二引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物形成二硫键。其他环化手段包括肟接头或羊毛硫氨酸接头的引入;见,例如,美国专利号8,044,175。可以使用和/或引入可以形成环化键的任何组合的氨基酸(或者非氨基酸部分)。可以用任何组合的具有允许引入桥的官能团的氨基酸(或用氨基酸和-(CH₂)_n-CO-or-(CH₂)_n-C₆H₄-CO-)生成环化键。一些例子是二硫化物、二硫化物模拟物,如-(CH₂)_n-碳酰桥、硫缩醛、硫醚桥(胱硫醚或羊毛硫氨酸)和含有酯类和醚类的桥。在这些例子中,n可以是任何,但经常是小于十的整数。

[0187] 其他示例性修饰包括,例如N-烷基(或芳基)取代([CONR])或主链交联以构建内酰胺和其他环状结构。本披露的调节剂化合物的其他衍生物包括C-末端羟甲基衍生物;O-修饰的衍生物(例如,C-末端羟甲基苄基醚衍生物);N-末端修饰的衍生物,其包含被取代的酰胺类(如烷基酰胺类和肼类)。

[0188] 在一些情况下,多肽中的一种或多种L-氨基酸被替换为D-氨基酸。

[0189] 在一些情况下,多肽是逆反式类似物(Sela和Zisman(1997)FASEB J.11:449)。逆反式肽类似物是线性多肽的异构体,其中氨基酸序列的方向是反向(逆行)的以及其中一种或多种氨基酸的手性(D-或L-)是倒转(倒位)的,例如,用D-氨基酸而非L-氨基酸。见,例如Jameson等人(1994)Nature 368:744;以及Brady等人(1994)Nature 368:692。

[0190] 多肽可以包含“蛋白转导域”(PTD),这指的是便于穿过脂质双层、胶束、细胞膜、细胞器膜或小泡膜的多肽、多核苷酸、碳水化合物或有机或无机化合物。连接到另一分子的PTD便于分子穿过膜,例如,从细胞外空间到细胞内空间;或胞液到细胞器内。在一些实施方式中,PTD共价连接到多肽的氨基末端,而在其他实施方式中,PTD共价连接到多肽的羧基末端。示例性蛋白转导域包括但不限于最小的十一肽蛋白转导域(对应于HIV-1TAT的第47-57个残基,包括YGRKKRRQRRR;SEQ ID NO:30);聚精氨酸序列,其包括多个足以引导进入细胞的精氨酸(例如,3、4、5、6、7、8、9、10或10-50个精氨酸);VP22域(Zender等人(2002)Cancer Gene Ther.9(6):489-96);果蝇触角基因蛋白转导域(Noguchi等人(2003)Diabetes52(7):1732-1737);截短的人降钙素肽(Trehin等人(2004)Pharm. Research21:1248-1256);聚赖氨酸(Wender等人(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR(SEQ ID NO:31);运输蛋白GWTLNSAGYL LGKINLKALAA LAKKIL(SEQ ID NO:32);KALAWEA KLA KALAKHLAKALAKALKCEA(SEQ ID NO:33);以及RQIKIWFQNRRM WKKK(SEQ ID NO:34)。示例性PTD包括但不限于YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:30),RKKRRQRRR(SEQ ID NO:35);从3个精氨酸残基至50个精氨酸残基的精氨酸均聚物。示例性的PTD域氨基酸序列包括但不限于如下任意项:YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:30);RKKRRQRR(SEQ ID NO:36);YARA AARQARA(SEQ ID NO:37);THRLP RRRRRR(SEQ ID NO:38);以及GGRRARRRRR(SEQ ID NO:39)。

[0191] 多肽C-末端上的氨基酸的羧基基团COR₃可以以游离形式(R₃=OH)或以生理学上耐受的碱或碱土盐(如钠、钾或钙盐)的形式存在。羧基也可以用伯醇、仲醇或叔醇(作为举例,如甲醇)、支链或无支链的C₁-C₆-烷基醇(如乙醇或叔丁醇)酯化。羧基也可以用伯胺或仲胺(如氨)、支链或无支链的C₁-C₆-烷基胺或C₁-C₆-二烷基胺(如甲胺或二甲胺)酰胺化。

[0192] 多肽的N末端上的氨基酸NR₁R₂的氨基基团可以以游离形式(R₁=H和R₂=H)或以生理学上耐受的盐(作为举例,如氯化物或醋酸盐)的形式存在。氨基基团也可以用酸进行乙酰化,使得R₁=H以及R₂=乙酰基、三氟乙酰基或金刚烷基。氨基可以以受肽化学中常规使用的氨基保护基(作为举例,如Fmoc、苄氧基-羰基(Z)、Boc或Alloc)保护的形式存在。氨基可以是N-烷基化的,其中R₁和/或R₂=C₁-C₆烷基或C₂-C₈烯基或C₇-C₉芳烷基。烷基残基可以是直链、支链或环状的(如分别是乙基、异丙基和环己基)。生产多肽的方法

[0193] 本披露的多肽可以通过任何合适的方法,包括重组和非重组方法(如化学合成)生产。

[0194] A. 化学合成

[0195] 当化学合成多肽时,合成可以通过液相或者固相进行。固相肽合成(SPPS)允许非天然氨基酸和/或肽/蛋白质骨架修饰的掺入。各种形式的SPPS(例如Fmoc和Boc)可用于合成本披露的多肽。化学合成的细节为本领域已知(例如,Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10;以及Camarero J.A.等人,2005 Protein Pept Lett. 12:723-8)。

[0196] 固相肽合成可以如下文所述来进行。 α 功能(N α)和任何反应性侧链用酸不稳定或碱不稳定性基团保护。保护基在连接酰胺键的条件下是稳定的,但可以容易地切割,而不损害已形成的肽链。合适的 α -氨基功能保护基包括但不限于以下:叔丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基(Z)、邻氯苄氧基羰基、双苯基异丙基氧羰基、叔戊氧羰基(Amoc)、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基-苄氧基羰基、邻硝基亚氧硫基、2-氰基-叔-丁氧基羰基、9-芴基甲氧羰基(Fmoc)、1-(4,4-二甲基-2,6-二噁环亚己-1-基)乙基(Dde)以及诸如此类。

[0197] 合适的侧链保护基包括但不限于:乙酰基、烯丙基(Allyl)、烯丙基氧羰基(Alloc)、苄基(Bz1)、苄氧羰基(Z)、叔丁氧羰基(Boc)、苄氧基甲基(Bom)、邻溴苄基氧羰基、叔丁基(tBu)、叔丁基二甲基硅烷基、2-氯苄基、2-氯苄基氧羰基(2-CIZ)、2,6-二氯苄基、环己基、环戊基、1-(4,4-二甲基-2,6-二噁环亚己-1-基)乙基(Dde)、异丙基、4-甲氧基-2,3-6-三甲苄磺酰基(Mtr)、2,3,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(Pmc)、新戊酰基、四氢吡喃-2-基、甲苯磺酰基(Tos)、2,4,6-三甲氧基苄基、三甲基硅烷基和三苯甲基(Trt)。

[0198] 在固相合成中,C-末端氨基酸被偶联到合适的载体材料。合适的载体材料是那些对用于合成过程的逐步缩合和裂解反应的试剂和反应条件具有惰性并且不会溶解在所使用的反应介质中的材料。市售的载体材料的例子包括已经用反应性基团和/或聚乙二醇修饰的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;氯甲基化的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;羟甲基化或氨基甲基化的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物等等。如果要制备肽酸,可以使用用4-苄氧基苄基-醇(Wang-锚栓)或2-氯三苯甲基氯衍生的聚苯乙烯(1%)-二乙烯基苯或TentaGel®。在肽酰胺的情况下,可以使用用5-(4'-氨基甲基)-3',5'-二甲氧基苯氧基)戊酸(PAL-锚栓)或对-(2,4-二甲氧基苯基-氨基甲基)-苯氧基团(Rink amide锚栓)衍生的聚苯乙烯(1%)二乙烯基苯或TentaGel®。

[0199] 可以通过在室温或升高的温度(如40℃和60℃之间)下,将激活试剂加入乙醇、乙

腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮或类似的溶剂中,使C-末端Fmoc-保护的氨基酸与载体材料反应(反应时间为,如2至72个小时)而达到与聚合物载体的连接。

[0200] Na-保护的氨基酸(如Fmoc氨基酸)与PAL、Wang或Rink锚栓的偶联可以,例如,在存在抑或不存在1-羟基苯并三唑或1-羟基-7-氮杂苯并三唑时,在偶联试剂(如N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)或其他碳二亚胺;2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)或其他脲盐;邻-酰基-脲;苯并三唑-1-基-三-吡咯烷基-六氟磷酸盐或其他磷盐;N-羟基琥珀酰亚胺;其他N-羟基酰亚胺或肟类)的帮助下,例如,在TBTU的帮助下,加入HOt,添加或不添加碱(作为举例,如二异丙基乙胺(DIEA)、三乙胺或N-甲基吗啉),如二异丙基乙胺,反应2至72个小时的时间(在溶剂,如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮或二氯甲烷,如二甲基甲酰胺中,于约10°C和50°C之间(如25°C)的温度下在1.5到3倍过量,如2倍过量的氨基酸和偶联试剂中反应,例如3小时)来进行。

[0201] 在上述条件下,也可能使用活性酯(如五氟苯基、对硝基苯基或诸如此类)、Na-Fmoc-氨基酸的对称酸酐、其酰基氯或酰基氟来替代偶合试剂。

[0202] Na-保护的氨基酸(如Fmoc氨基酸)可以通过加入DIEA,反应10至120分钟(如20分钟)的时间被偶联到二氯甲烷中的2-氯三苯甲基树脂(但并不限于使用这种溶剂和这种基料)。

[0203] 受保护的氨基酸的连续偶联可以根据肽合成的常规方法,通常在自动肽合成仪中进行。通过用,如含于二甲基甲酰胺的哌啶(10%至50%)处理5至20分钟(如用含于DMF的50%哌啶处理2x 2分钟,用含于DMF的20%哌啶处理1x 15分钟)裂解固相上经偶联的氨基酸的Na-Fmoc保护基之后,在约10°C和50°C之间(如25°C)的温度下将3至10倍过量(如10倍过量)的下一受保护的氨基酸偶联到含于惰性的非水性极性溶剂(如二氯甲烷、DMF或两者的混合物)的前一氨基酸。前面提到的用于将第一Na-Fmoc氨基酸偶联到PAL、Wang或Rink锚栓的试剂适于作为偶联试剂。受保护的氨基酸的活性酯或其氯化物或氟化物或对称酸酐也可以作为一种选择。

[0204] 在固相合成结束时,从载体材料中裂解得到肽,同时裂解侧链保护基团。可以用三氟乙酸或其他强酸性介质,通过在0.5至3小时内(如2小时)添加5%-20%V/V清除剂,如二甲基硫醚、甲基乙基硫醚、茴香硫醚、甲苯硫酚、间甲酚、茴香醚乙二硫醇、酚或水,如15%v/v二甲基硫醚/乙二硫醇/间甲酚1:1:1,而进行裂解。通过用冰醋酸/三氟乙醇/二氯甲烷2:2:6裂解2-氯三苯甲基锚栓而获得具有完全受保护的侧链的肽。受保护的肽可以通过硅胶上色谱法纯化。如果肽经由Wang锚栓而连接到固相上并且如果意在获得带有C末端烷基酰胺化的肽,该裂解可以通过利用烷基胺或氟烷基胺的氨解进行。该氨解在介于约-10°C和50°C之间(如约25°C)的温度下进行,以及反应时间介于约12和24小时(如约18小时)之间。此外,可以通过再酯化(如用甲醇)从载体裂解得到肽。

[0205] 获得的酸性溶液可以与3至20倍量的冷醚或正己烷,如10倍过量的二乙醚混合,以析出肽并因此分离清除剂和残留在该醚中被裂解的保护基团。可以通过使肽从冰醋酸中再析出几次而进行进一步的纯化。所获得的沉淀物可以溶于水或叔丁醇或这两种溶剂的混合物,如叔丁醇/水的1:1混合物,并冷冻干燥。

[0206] 可以通过各种色谱方法,包括在乙酸形式的弱碱性树脂之上的离子交换;非衍生

的聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物(如Amberlite® XAD)上的疏水吸附色谱法;硅胶上的吸附色谱法;离子交换色谱法,如羧甲基纤维素上的离子交换色谱法;分配色谱法,如Sephadex® G-25上的分配色谱法;逆流分配色谱法;或高压液相色谱法(HPLC),如辛基或十八烷基硅烷硅胶(ODS)相上的反相HPLC纯化获得的肽。

[0207] B. 重组生产

[0208] 当使用重组技术生产多肽时,可以使用任何合适的构建体和任何合适的宿主细胞,其分别可以是原核或真核细胞,如细菌(如大肠杆菌)或酵母宿主细胞将该多肽制造为细胞内蛋白质或分泌蛋白质。可以用作宿主细胞的真核细胞的其他例子包括昆虫细胞、哺乳动物细胞和/或植物细胞。当使用哺乳动物宿主细胞时,它们可以包括人细胞(如HeLa、293、H9和Jurkat细胞);小鼠细胞(如NIH3T3、L细胞和C127细胞);灵长类动物细胞(如Cos 1、Cos 7和CV1)和仓鼠细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。

[0209] 可以根据本领域已知的标准程序使用适于多肽表达的多种宿主-载体系统。见,例如,Sambrook等人.,1989*Current Protocols in Molecular Biology* Cold Spring Harbor Press, New York;以及Ausubel等人1995*Current Protocols in Molecular Biology*,Eds. Wiley and Sons。用于将遗传物质引入宿主细胞的方法包括,例如,转化、电穿孔、接合、磷酸钙方法等等。可以选择传输方法,以便提供对所引入的多肽编码核酸的稳定表达。该多肽编码核酸可被提供为可继承的游离型元件(如质粒)或可以进行基因组整合。各种用于生产相关多肽的适当载体是市售的。

[0210] 载体可以在宿主细胞中提供染色体外维护或可以提供整合到宿主细胞基因组中。表达载体提供转录和翻译调节序列,并且可以提供诱导型或组成型表达,其中编码区在转录起始区,以及转录和翻译终止区的转录控制下进行操作性连接。在一般情况下,该转录和翻译调节序列可包括但不限于启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列,以及增强子或激活序列。启动子可以是组成型或诱导型的,并且可以是有力的组成型启动子(如T7)。

[0211] 表达构建体通常具有位于启动子序列附近的方便限制性位点,以提供编码相关蛋白质的核酸序列的插入。在表达宿主中可以存在可操作的选择性标记,以便于对含有载体的细胞的选择。此外,表达构建体可以包括附加的元件。例如,表达载体可以有一个或两个复制系统,从而使其能够被保持在生物体,例如,在哺乳动物或昆虫细胞中用于表达以及在原核宿主中用于克隆和扩增。此外,表达构建体可以含有选择性标记基因,以允许对转化的宿主细胞的选择。选择性基因为本领域所熟知并且将随所用的宿主细胞而变化。

[0212] 蛋白质的分离和纯化可根据本领域已知的方法来完成。例如,蛋白质可以通过免疫亲和纯化从细胞的裂解物(该裂解物经遗传修饰以对该蛋白质进行组成型表达和/或经诱导)中或从合成的反应混合物中分离,通常涉及使样本接触抗蛋白抗体,清洗以除去非特异性结合的材料,以及洗脱特异性结合的蛋白质。所分离的蛋白质可以通过透析以及蛋白质纯化方法中通常使用其他方法进一步纯化。在一个实施方式中,蛋白质可以用金属螯合色谱法进行分离。蛋白质可以包含修饰,以便于分离。

[0213] 多肽可以以基本上纯的或分离的形式(例如,脱离其他多肽)来制备。多肽可存在于组合物中,在该组合物中,相对于可存在的其他组分(如其他多肽或其他宿主细胞组分),多肽是富集的。例如,可以提供纯化的多肽,使得组合物中存在的多肽基本上不含其他表达

的蛋白质,如该组合物的小于90%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%、小于5%或小于1%由其他表达的蛋白质构成。

[0214] 治疗性和预防性用途

[0215] 本文还提供用于通过药剂或其组合物的施用来治疗或预防高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良、葡萄糖代谢紊乱、肥胖症和其他体重紊乱,以及其他代谢和代谢相关的疾病、紊乱和病症的方法。此外,如本文所述,本披露提供了用于治疗或预防一大群其他疾病、紊乱和病症的方法。这样的方法还可以通过,例如,降低症状的严重性或频率,对与疾病、紊乱和病症相关的一种或多种症状具有有利的影响。在某些实施方式中,该方法是一种用于治疗疾病或病症的方法。在其他实施方式中,该方法是一种用于预防疾病或病症的方法。

[0216] 在某些实施方式中,本披露考虑了治疗(或在某些情况下,预防)具有代谢紊乱的对象的方法,该方法包括提供具有代谢紊乱的对象,其中该对象显示出FGF19诱导的癌性病症的标记,以及向该对象施用从如本文所述的候选GF19变体多肽池中确认的治疗有效量的FGF19变体;其中该对象中的该代谢紊乱有改善。

[0217] 疾病、紊乱和病症的非限制性的例子包括:1)葡萄糖利用紊乱和与其有关的后遗症,包括糖尿病(I型和2型)、妊娠糖尿病、高血糖症、胰岛素抗性、葡萄糖代谢异常、“前期糖尿病”(空腹葡萄糖受损(IFG)或葡萄糖耐量受损(IGT)),以及与高血糖病症相关联或由其引起的其他生理障碍,包括,例如组织病理变化,如胰腺 β -细胞破坏。进一步的高血糖-相关的紊乱包括肾损伤(如肾小管损伤或肾病)、肝变性、眼损伤(如糖尿病性视网膜病或白内障),以及糖尿病足障碍;2)血脂异常及其后遗症,作为举例,例如,动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、脑血管疾病等等;3)可能与代谢综合征,如肥胖症和升高的体重(包括其合并症病症,例如,但不限于非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和多囊卵巢综合征(PCOS))相关并且还包括血栓形成、高凝和促血栓形成状态(动脉和静脉)、高血压、心血管疾病、中风和心脏衰竭的其他病症;4)其中涉及炎症反应的紊乱或病症,包括动脉粥样硬化、慢性炎性肠疾病(例如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、哮喘、系统性红斑狼疮、关节炎或其他炎性风湿性障碍;5)细胞周期或细胞分化过程的紊乱,例如脂肪细胞瘤,脂肪瘤癌,包括,例如,脂肪肉瘤、实体瘤和肿瘤;6)神经变性疾病和/或中枢和周围神经系统的脱髓鞘紊乱和/或涉及神经炎性过程的神经疾病和/或其他周围神经病,包括阿尔茨海默氏症、多发性硬化症、帕金森氏病、进行性多灶性白质脑病和格林-巴利综合征;7)皮肤和皮肤病学紊乱和/或伤口愈合过程的紊乱,包括红斑-鳞状皮肤病;以及8)其他紊乱,如X综合征、骨关节炎和急性呼吸窘迫综合征。

[0218] 为了通过本文提供的方法确定对象是否可以是治疗或预防高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良和/或葡萄糖紊乱的候选者,可以利用本领域已知的各种诊断方法(如空腹血浆葡萄糖(FPG)评价和口服葡萄糖耐量试验(oGTT))。

[0219] 为了通过本文提供的方法确定对象是否可以是治疗或预防体重紊乱(如肥胖症)的候选者,参数,例如但不限于,对象病症的病因和程度(如对象相比参考健康个体的超重程度)应该进行评估。例如,具有介于~25和~29.9kg/m²之间的BMI的成人可以被认为是超重的(肥胖前期),而具有~30kg/m²或更高的BMI的成人可以被认为是肥胖的。对超重和/或饮食差(如饮食中脂肪和热量高)的对象,常见的是在发起包含本披露的一种或多种多肽的

疗程之前,最初施行并评估改正的饮食习惯和/或锻炼方案的效果。

[0220] 本文还提供了治疗具有代谢或代谢相关的疾病、紊乱或病症的对象(如动物,如人类)的方法,所述方法包括:(i)确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选者,该方法包括:(a)提供具有癌性病症的标记的测试对象,该对象具有代谢紊乱,(b)向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及(c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强;其中癌性病症标记增强的缺乏表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者;以及其中如果在该测试对象中存在该癌性病症标记增强的缺乏,则该方法进一步包括(ii)随后施用该FGF19变体至该对象(如动物,如人类)。在某些实施方式中,该FGF19变体的随后施用是治疗有效量,导致该对象(如动物,如人类)中的该代谢或代谢相关疾病、紊乱或病症的治疗。

[0221] 本文还提供了一种治疗具有代谢或代谢相关的疾病、紊乱或病症的对象(如动物,如人类)的方法,所述方法包括:(i)确定具有代谢紊乱的测试对象是否是用FGF19变体进行治疗的候选者,该方法包括:(a)提供具有癌性病症的标记的测试对象,该测试对象具有代谢紊乱,(b)向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及(c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被减少;其中癌性病症标记的减少表示该测试对象是用FGF19变体进行治疗的候选者;以及其中如果在该测试对象中存在该癌性病症标记减少,则该方法进一步包括(ii)随后施用该FGF19变体至该对象(如动物,如人类)。在某些实施方式中,该FGF19变体的随后施用是治疗有效量,导致该对象(如动物,如人类)中的该代谢或代谢相关疾病、紊乱或病症的治疗。

[0222] 本文还提供了一种治疗具有代谢或代谢相关的疾病、紊乱或病症的对象(如动物,如人类)的方法,所述方法包括:(i)确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物,该方法包括:(a)向该具有代谢紊乱的测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及该FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中诱发癌性病症,以及(b)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被观察到;其中癌性病症的标记的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物;以及其中如果缺乏该癌性病症标记,则该方法进一步包括(ii)随后施用该FGF19变体至该对象(如动物,如人类)。在某些实施方式中,该FGF19变体的随后施用是治疗有效量,导致该对象(如动物,如人类)中的该代谢或代谢相关疾病、紊乱或病症的治疗。

[0223] 本文还提供了一种治疗具有代谢或代谢相关的疾病、紊乱或病症的对象(如动物,如人类)的方法,所述方法包括:(i)确定FGF19变体是否是用于治疗具有代谢紊乱的测试对象的候选物,该方法包括:(a)提供具有代谢紊乱的测试对象,该测试对象具有癌性病症的标记,(b)向该测试对象共同施用FGF19或FGF19替代品,以及FGF19变体,其中施用到该测试对象的该FGF19或该FGF19替代品的量足以在参考群体中加剧癌性病症,以及(c)确定癌性病症的标记是否在该测试对象中被增强;其中癌性病症标记加剧的缺乏表示该FGF19变体是用于治疗该测试对象的候选物;以及其中如果在该测试对象中缺乏该癌性病症标记的增强,则该方法进一步包括(ii)随后施用该FGF19变体至该对象(如动物,如人类)。在某些实施方式中,该FGF19变体的随后施用是治疗有效量,导致该对象(如动物,如人类)中的该代

谢或代谢相关疾病、紊乱或病症的治疗。在一些实施方式中，癌性病症的一种或多种标记在该测试对象被减少。

[0224] 本文还提供了一种治疗具有代谢或代谢相关的疾病、紊乱或病症的对象的方法，包括：(a)提供具有代谢紊乱的对象，其中该对象显示出FGF19诱导的癌性病症的标记，以及(b)向该对象施用在本文提供的任何一项方法或模型中确认的治疗有效量的FGF19变体；其中该对象中的该代谢或代谢相关的疾病、紊乱或病症有改善。

[0225] 在本文中提供的方法的某些实施方式中，该对象是动物。在其他实施方式中，该对象是人。在一些实施方式中，该癌性病症是肿瘤。在某些实施方式中，该肿瘤是结肠肿瘤或肝脏肿瘤。在一些实施方式中，该代谢或代谢相关的疾病、紊乱或病症是代谢紊乱。在一些实施方式中，该代谢紊乱选自如下：高血糖病症、胰岛素抗性、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良、肥胖症和代谢综合征。在一个实施方式中，该高血糖病症是糖尿病。在另一个实施方式中，治疗导致该代谢紊乱的改善。在某些实施方式中，该代谢紊乱的该改善是血液葡萄糖的降低。在其他实施方式中，该对象中该代谢紊乱的该改善是体重的降低。在某些实施方式中，该对象中该代谢紊乱的该改善是胰岛素的降低。

[0226] 在另一个方面，本发明提供一种，例如使用本文提供的FGF19变体拮抗FGF19的致癌活性的方法。在一些实施方式中，使表达FGF19的细胞与本文提供的FGF19变体接触。在一些实施方式中，该FGF19变体是M70。在某些实施方式中，本文提供一种拮抗对象中FGF19的致癌活性的方法，其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体，从而拮抗该对象中FGF19的致癌活性。在一些实施方式中，提供一种预防对象中FGF19依赖性疾病、紊乱或病症；或其症状的方法，其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体，其中该疾病、紊乱或病症；或其症状在该对象中得以预防。在其他实施方式中，提供了一种治疗对象中FGF19依赖性疾病、紊乱或病症；或其症状的方法，其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体，其中该疾病、紊乱或病症；或其症状在该对象中得以治疗。

[0227] 在某些实施方式中，该对象具有代谢紊乱和/或癌性病症的标记。在某些实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是癌症或肿瘤。在一些实施方式中，该癌症或肿瘤是肝脏、结肠、前列腺或肺癌症或肿瘤。在一些实施方式中，该癌症或肿瘤是良性的。在其他实施方式中，该癌症或肿瘤是恶性的。

[0228] 在某些实施方式中，该对象已经罹患FGF19依赖性疾病、紊乱或病症或有罹患FGF19依赖性疾病、紊乱或病症的风险。在一些实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是肝脏(肝细胞)疾病、紊乱或病症，如肝硬化或胆汁淤积。在一些实施方式中，该肝脏疾病或病症是慢性肝脏疾病或病症。在一些实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是癌症或肿瘤，如HCC。在其他实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症不是肝脏疾病、紊乱或病症，如肝硬化或胆汁淤积。在一些实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症不是癌症或肿瘤，如HCC。在一些实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是结肠癌或肿瘤。在某些实施方式中，该结肠癌或肿瘤是结肠腺癌。在一些实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是前列腺癌或肿瘤。在仍然其他的实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是肺癌或肿瘤。在某些实施方式中，该肺癌或肿瘤是肺鳞状细胞癌。在一些实施方式中，FGF19在原发性或转移性癌症或肿瘤细胞中表达。在某些实施方式中，该FGF19依赖性疾病、紊乱或病症是癌前期。例如，肝硬化和胆汁淤积有时导致肝癌，如HCC，以及考虑了治疗或预

防这种肝脏疾病和紊乱的方法。在某些实施方式中，该对象是需要其预防或治疗的对象。在一些实施方式中，该FGF19变体的施用维持该对象中胆汁酸稳态。

[0229] 本文还提供了一种治疗对象中癌症或肿瘤(如FGF19依赖性癌症或肿瘤)或其症状的方法，其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体。在某些实施方式中，该施用导致该对象中该癌症、肿瘤或其症状的改善。在一些实施方式中，该方法导致肿瘤数量、肿瘤大小或肿瘤重量的减少。本文还提供一种预防对象中癌症或肿瘤(如FGF19依赖性癌症或肿瘤)或其症状的方法，其包括向该对象施用治疗有效量的FGF19变体。在一些实施方式中，该施用导致该对象中该癌症、肿瘤或其症状的预防。在一些实施方式中，该方法导致肿瘤数量、肿瘤大小或肿瘤重量的减少。在特定的实施方式中，该癌症或肿瘤是FGF19依赖性癌症或肿瘤。在某些实施方式中，该癌症或肿瘤是肝细胞癌。在一些实施方式中，该癌症或肿瘤不是肝细胞癌。在一个实施方式中，该癌症或肿瘤是结肠癌或肿瘤。在一些实施方式中，该癌症或肿瘤是前列腺癌或肿瘤。在某些实施方式中，该癌症或肿瘤是肺癌或肿瘤。在某些实施方式中，该FGF19变体是包含SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中，该FGF19变体是由SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列组成的多肽。在某些实施方式中，该对象是需要其的对象。

[0230] 理解的是，本文提供的任何治疗或预防方法可以结合本文提供的任何模型或其他方法使用。

[0231] 在本文提供的方法的某些实施方式中，该FGF19变体选自如下：M5、M6、M7、M14、M15、M32、M36、M43、M52、M53、M67、M68、M69、M70、M75、M76、M77、M83、M84、M140、M144、M145、M146和M160。在一个实施方式中，该FGF19变体是M5。在另一个实施方式中，该FGF19变体是M6。在一些实施方式中，该FGF19变体是M7。在一个实施方式中，该FGF19变体是M14。在另一个实施方式中，该FGF19变体是M15。在其他实施方式中，该FGF19变体是M32。在一个实施方式中，该FGF19变体是M36。在另一个实施方式中，该FGF19变体是M43。在其他实施方式中，该FGF19变体是M52。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体是M53。在一些实施方式中，该FGF19变体是M67。在一个实施方式中，该FGF19变体是M68。在另一个实施方式中，该FGF19变体是M69。在一些实施方式中，该FGF19变体是M70。在一个实施方式中，该FGF19变体是M75。在另一个实施方式中，该FGF19变体是M76。在其他实施方式中，该FGF19变体是M77。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体是M83。在一个实施方式中，该FGF19变体是M84。在另一个实施方式中，该FGF19变体是M140。在其他实施方式中，该FGF19变体是M144。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体是M145。在一个实施方式中，该FGF19变体是M146。在一些实施方式中，该FGF19变体是M160。在其他实施方式中，也考虑了两种或更多前述的FGF19变体的任意组合。

[0232] 在本文提供的方法的某些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NOS:5-29任一项中所述的氨基酸序列；或亚序列或其片段。在本文提供的方法的其他的实施方式中，该FGF19变体由SEQ ID NOS:5-29任一项中所述的氨基酸序列；或亚序列或其片段组成。在某些实施方式中，该N末端R残基被删除。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:5或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:6或由其组成。在一个实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:7或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:8或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:9或由其组成。

在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:10或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:11或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:12或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:13或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一个实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:15或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:16或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:17或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:18或由其组成。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:19或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:20或由其组成。在一个实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:21或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:22或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:23或由其组成。在另一实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:24或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:25或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:26或由其组成。在仍然其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:27或由其组成。在一些实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:28或由其组成。在其他的实施方式中，该FGF19变体包括SEQ ID NO:29或由其组成。在某些实施方式中，该FGF19变体包括前述序列的任一项或由其组成，其中该N末端R残基被删除。在一些实施方式中，该FGF19变体包括任何前述序列的序列或由其组成。在其他的实施方式中，也考虑了两种或更多前述FGF19变体的任意组合。

[0233] 药物组合物

[0234] 本披露的多肽可以是适于施用给对象的组合物的形式。在一般情况下，这样的组合物是“药物组合物”，其包括一种或多种多肽以及一种或多种药学上可接受的或生理上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。在某些实施方式中，该多肽以治疗上可接受的量存在。该药物组合物可以被用于本披露的方法中；因此，例如，该药物组合物可以离体或体内施用至对象以实践本文所述的治疗和预防方法和用途。

[0235] 本披露的药物组合物可以配制成与预期的方法或给药途径相配伍；本文阐述了示例性给药途径。此外，该药物组合物可以组合如本文所述的其他治疗活性剂或化合物（如葡萄糖降低剂）使用，以便治疗或预防如本披露所考虑到的疾病、紊乱和病症。

[0236] 该药物组合物通常包含治疗有效量的本披露所考虑到的至少一种多肽以及一种或多种药学上和生理学上可接受的制剂。合适的药学上可接受的或生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于抗氧化剂（如抗坏血酸和硫酸氢钠）、防腐剂（如苯醇、甲基对羟基苯甲酸酯、对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯）、乳化剂、混悬剂、分散剂、溶剂、填料、增量剂、洗涤剂、缓冲液、溶媒、稀释剂和/或佐剂。例如，合适的溶媒可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲盐水，可能补充有用于肠胃外施用的药物组合物中常见的其他材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是进一步的示例性溶媒。本领域的技术人员将容易地认识到可以被用于药物组合物和剂型的各种缓冲液。典型的缓冲液包括但不限于药学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。作为举例，缓冲组分可以是水溶性物质，如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸及其盐。可接受的缓冲液包括，例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)以及N-3[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸

(TAPS)。

[0237] 已配制好药物组合物后,可以将其储存在无菌小瓶中,作为溶液、混悬液、凝胶、乳液、固体或者脱水或冻干的粉末。这样的制剂可以以现成的形式,使用前需复原的冻干形式,使用前需稀释的液体形式或其他可接受的形式进行存储。在一些实施方式中,提供含于一次性的容器(如一次性的小瓶、安瓿、注射器或自动注射器(类似于,例如EpiPen®))的该药物组合物,而在其他实施方式中提供多用途的容器(如多用途的小瓶)。可以使用任何药物递送装置来递送多肽,包括植入物(如可植入的泵)和导管系统,这两者都为本领域技术人员所公知。也可以利用通常皮下或肌内给药的贮库型注射剂来在限定的时间段内释放本文披露的多肽。贮库型注射剂通常是固体基或油基的以及通常包含本文阐述的制剂组分中的至少一种。本领域的普通技术人员熟悉可能的制剂和贮库型注射剂的用途。在某些实施方式中,考虑使用Nano Precision Medical的贮库递送技术(加州埃默里维尔的Nano Precision Medical)。该技术利用二氧化钛纳米管膜,其产生零级释放速率的大分子,如蛋白质和肽治疗剂。将生物相容性膜装在提供长期(例如,长达一年)、恒定速率递送的治疗大分子的小的皮下植入物中。目前正在对该技术进行,例如递送用于II型糖尿病治疗的GLP-1激动剂的评估。

[0238] 该药物组合物可以是无菌可注射水性或油性混悬液的形式。这种混悬液可以使用本文中提到的那些适当的分散剂或润湿剂和混悬剂,按照已知技术配制。无菌可注射制剂还可以是含于无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或混悬液,例如,含于1,3-丁二醇的溶液。可以采用可接受的稀释剂、溶剂和分散介质,包括水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、聚氧乙烯蓖麻油™(新泽西州帕西帕尼的BASF)或磷酸缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其合适的混合物。此外,通常将无菌、非挥发油用作溶剂或混悬介质。为了这个目的,可以采用任何温和的非挥发油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,脂肪酸,如油酸也可用于注射剂的制备。可以通过包含延迟吸收的药剂(如单硬脂酸铝或明胶)来实现特殊可注射制剂的延长吸收。

[0239] 含有活性成分的药物组合物可以是适于口服使用的形式,例如作为片剂、胶囊、锭剂、糖锭、水性或油性混悬液、可分散的粉末或颗粒、乳剂、硬或软胶囊;或糖浆、溶液、微珠或酏剂。用于口服使用的药物组合物可以根据本领域已知的任何用于药物组合物的制备的方法来制备,并且这种组合物可以含有一种或多种药剂,作为举例,例如,甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂,以便提供药学上美观和可口的制剂。片剂、胶囊等包含活性成分,混合有适于制备片剂的无毒的药学上可接受的赋形剂。这些赋形剂可以是,例如,稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒和崩解剂,如玉米淀粉或海藻酸;结合剂,如淀粉、明胶或阿拉伯胶,以及润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0240] 适于口服的片剂、胶囊等可以是未包衣的或通过已知技术包衣的,以延迟胃肠道中的崩解和吸收,从而提供持续作用。例如,可使用延时材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们也可以通过本领域中已知的技术包衣,以形成用于控释的渗透性治疗片剂。另外的药剂包括生物可降解或生物相容的粒子或聚合物质,如聚酯、聚胺酸类、水凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、聚酐类、聚乙醇酸、乙烯-乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白;或丙交酯/乙交酯共聚物、聚丙交酯/乙交酯共聚物;或乙烯-乙酸乙烯共聚物以便控制施用的组合物的递送。例如,口服剂可以通过分别使用羟甲基纤维素或明胶-微胶囊或聚

(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊;或者在胶体药物递送系统中被截留在通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中。胶体分散系统包括高分子复合物、纳米胶囊、微球体、微珠和基于脂质的系统,其包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。制备脂质体的方法被描述于,例如,美国专利号4,235,871、4,501,728和4,837,028中。用于上述制剂的制备的方法对本领域中熟练的技术人员来说,将是显而易见。

[0241] 用于口服使用的制剂还可以呈现为硬明胶胶囊,其中活性成分混合有惰性固体稀释剂,如碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素;或呈现为软明胶胶囊,其中活性成分混合有水或油介质,如花生油、液体石蜡或橄榄油。

[0242] 水性混悬液含有活性物质,混合有适于其制造的赋形剂。这样的赋形剂可以是混悬剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯-吡咯烷酮、黄蓍树胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂,例如天然存在的磷脂(如卵磷脂);或者烯基氧化物与脂肪酸的缩合产物(如聚氧-乙烯硬脂酸酯);或者环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物(如十七乙烯氧基十六醇);或者环氧乙烷与衍生自脂肪酸的偏酯和己糖醇的缩合产物(如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯);或者环氧乙烷与衍生自脂肪酸的偏酯和己糖醇酐的缩合产物(如聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯)。水性混悬液也可含有一种或多种防腐剂。

[0243] 油性混悬液可以通过使活性成分悬浮于植物油,如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油中;或悬浮于矿物油,如液体石蜡中得以配制。该油性混悬液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以添加如上面列出的那些甜味剂,以及调味剂以提供可口的口服制剂。

[0244] 适合于通过加入水来制备水性混悬液的可分散的粉末和颗粒提供活性成分,混合有分散剂或润湿剂、混悬剂和一种或多种防腐剂。合适的分散剂或润湿剂和混悬剂在本文中举例说明。

[0245] 本披露的药物组合物还可以是水包油型乳剂的形式。油相可以是植物油,如橄榄油或花生油;或矿物油,如液体石蜡;或这些的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶,如阿拉伯树胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,如大豆、卵磷脂,以及酯类或衍生自脂肪酸的偏酯;己糖醇酐,如山梨醇酐单油酸酯;以及偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯。

[0246] 制剂还可以包括载体,以防止该组合物从体内快速降解或消除,如控释制剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微胶囊递送系统。例如,延时材料,例如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯,单独或结合蜡,都可使用。

[0247] 本披露考虑了以用于药物的直肠给药的栓剂形式对多肽的施用。该栓剂可以通过将药物与合适的无刺激性赋形剂混合来制备,该赋形剂在常温下是固体但在直肠温度下为液体,因此会在直肠中融化以释放药物。这样的材料包括但不限于可可脂和聚乙二醇。

[0248] 本披露考虑到的多肽可以是目前已知的或在将来开发的任何其他合适的药物组合物(如经鼻或吸入用喷雾剂)的形式。

[0249] 制剂中的多肽或其片段的浓度可广泛地变化(例如,以重量计,从少于约0.1%,通常为或至少约2%,多达20%至50%或更多)以及通常将按照,例如选择的特定给药模式,主要基于流体体积、粘度以及基于对象的因素进行选择。

[0250] 给药途径

[0251] 本披露考虑了以任何适当的方式对所披露的多肽及其组合物的施用。合适的给药

途径包括胃肠外(如肌内、静脉内、皮下(如注射或植入)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、大脑内(脑实质内和脑室内)、口服、鼻、阴道、舌下、眼内、直肠、局部(如透皮)、舌下和吸入。[0252] 也可以利用通常皮下或肌内给药的贮库型注射剂来在限定的时间段内释放本文披露的多肽。贮库型注射剂通常是固体基或油基的以及通常包含本文阐述的制剂组分中的至少一种。本领域的普通技术人员熟悉可能的制剂和贮库型注射剂的用途。

[0253] 关于抗体,在示例性的实施方式中,本披露的抗体或抗体片段于4℃以10mg/ml被存储在注射用的无菌等渗盐水溶液中并在施用给对象之前,被稀释于100ml或200ml 0.9%注射用氯化钠中。按介于0.2和10mg/kg之间的剂量,在1小时的过程中通过静脉内输注施用该抗体。在其他实施方式中,在介于15分钟和2小时之间的时间段内通过静脉内输注施用该抗体。在仍然其他的实施方式中,施用程序是通过皮下弹丸注射。

[0254] 联合疗法

[0255] 本披露考虑了本文中确认的该FGF19变体多肽与一种或多种活性治疗剂或其他预防或治疗模式结合的用途。在这样的联合疗法中,各种活性剂经常具有不同的作用机制。这种联合疗法可通过允许一种或多种药剂的剂量降低,从而减少或消除与一种或多种药剂有关的不良影响而变得特别有利;此外,这样的联合疗法可具有对潜在的疾病、紊乱或病症的协同治疗或预防效果。

[0256] 如本文所用,“联合”意在包括可以被单独施用,例如经单独配制用于单独施用(例如,如试剂盒中可以提供的)的疗法,以及可以在单一制剂(即“联合制剂”)中一起施用的疗法。使用本文所述的利用一种或多种活性治疗剂或其他预防或治疗模式的方法和模型确认的多肽的组合可以序贯(例如,其中一种药剂在一种或多种其他药剂之前被施用)或同时(例如,其中两种或多种药剂在或大约在相同的时间被施用)施用或施加。不管该两种或多种药剂被序贯还是同时施用,对于本披露的目的,它们皆被认为是在联合施用。

[0257] 因此,通过使用本文所述的方法和模型确认的多肽的方法和用途可以在另一种治疗之前,与其基本上同时或在其之后实施,并可以补充有其他形式的疗法。补充疗法包括其他葡萄糖降低和/或减肥治疗,如胰岛素、胰岛素敏感性增强剂和其他药物治疗;改变饮食(低糖、低脂等);减肥手术-(通过胃旁路术、胃大部切除术减少胃容积)、胃束带、胃水球、胃套管等。

[0258] 本披露考虑了利用众多试剂(及其类别)的联合疗法,包括:1)必然伴有胰岛素分泌的刺激的胰岛素、胰岛素模拟物和药剂,其包括磺酰脲类(如氯、妥拉磺脲、醋磺、甲苯磺丁脲、格列本脲、格列美脲、格列吡嗪)和氯茴苯酸类(如瑞格列奈(PRANDIN)和那格列奈(STARLIX));2)双胍类(如二甲双胍(GLUCOPHAGE))和其他药剂,其通过提高葡萄糖利用率,降低肝葡萄糖产量和/或减少肠道葡萄糖输出量起作用;3) α -葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖和米格列醇)和其他药剂,其减缓肠道碳水化合物的消化乃至吸收并降低餐后高血糖症;4)噻唑烷二酮类(如罗格列酮(AVANDIA)、曲格列酮(REZULIN)、吡格列酮(ACROS)、格列吡嗪、巴格列酮、来格列酮、萘格列酮、曲格列酮、恩格列酮、环格列酮、adaglitazone、达格列酮,其增强胰岛素作用(如通过胰岛素增敏),从而促进外周组织中葡萄糖的利用率;5)胰高血糖素样肽,其包括DPP-IV抑制剂(如维格列汀(GALVUS)和西他列汀(JANUVIA))以及胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和GLP-1激动剂以及类似物(如艾塞那肽(BYETTA和ITCA 650(递送艾塞那肽类似物超过12个月的时间段的插入皮下的渗透泵;马萨诸塞州波士顿的

Intarcia);6)以及抗DPP-IV类似物(肠促胰岛素模拟物)、PPAR γ 激动剂、双效PPAR激动剂、泛效PPAR激动剂、PTP1B抑制剂、SGLT抑制剂、胰岛素促泌剂、RXR激动剂、糖原合酶激酶-3抑制剂、免疫调节剂、 β -3肾上腺素能受体激动剂、11 β -HSD1抑制剂以及胰淀素类似物。

[0259] 此外,本披露考虑了利用促进减重的药剂和方法(如刺激代谢或降低食欲,以及经改进促进减重的饮食和/或锻炼方案)的联合疗法。食欲抑制药是众所周知的并且可以与本文提供的方法组合使用。

[0260] 本披露的FGF19变体多肽可以以根据情况的任何适当的方式与一种或多种其他药剂组合使用。在一个实施方式中,在一段时间内维持利用本披露的至少一种活性剂和至少一种多肽的治疗。在另一个实施方式中,减少或中断(如当对象稳定时)利用该至少一种活性剂的治疗,而在恒定的给药方案中维持利用本披露的多肽的治疗。在进一步的实施方式,减少或中断(如当对象稳定时)利用该至少一种活性剂的治疗,而减少利用本披露的多肽的治疗(例如,较低剂量、较低频率的给药或较短的治疗方案)。在仍然另一个实施方式中,减少或中断(如当对象稳定时)利用该至少一种活性剂的治疗,以及增加利用本披露的多肽的治疗(例如,较高剂量、较频繁的给药或较长的治疗方案)。在仍然另一个实施方式中,维持利用该至少一种活性剂的治疗以及减少或中断利用本披露的多肽的治疗(例如,较低剂量、较低频率的给药或较短的治疗方案)。在仍然另一个实施方式中,减少或中断利用该至少一种活性剂的治疗和利用本披露的多肽的治疗(例如,较低剂量、较低频率的给药或较短的治疗方案)。

[0261] 给药

[0262] 本披露的多肽可以按一定量被施用至对象,该量取决于,例如施用的目标(如所需的解决程度);待治疗的对象的年龄、体重、性别以及健康和身体状况;该多肽和/或正在施用的制剂的性质;给药途径;以及该疾病、紊乱、病症或其症状的性质(如葡萄糖/胰岛素失调的严重程度和该紊乱的阶段)。给药方案还可以考虑到任何与正在施用的药剂相关的副作用的存在、性质和程度。有效剂量和给药方案可容易地根据,例如,体内研究(如动物模型)中的安全性和剂量递增试验,以及本领域技术人员已知的其他方法来确定。

[0263] 一般情况下,给药参数决定了剂量应该少于对该对象具有不可逆毒性的量(即最大耐受剂量“MTD”),而不少于对该对象产生可测量的效果所需的量。这样的量通过,例如与吸收、分布,代谢和排泄(“ADME”)相关联的药代动力学和药效学参数,考虑给药途径和其他因素得以确定。

[0264] 有效剂量(ED)是在服用药剂的对象的某一部分中产生治疗反应或期望效果的该药剂的剂量或量。药剂的“半数有效量”或ED50是在施用药剂的50%群体中产生治疗反应或期望效果的该药剂的剂量或量。虽然该ED50通常用作对药剂效果的合理期待的量度,但是它不一定是临床医师考虑到所有相关因素时可能认为适当的剂量。因此,在一些情况下,有效量大于所算得的ED50,在其他情况下,有效量小于所算得的ED50,而在仍然其他情况下,有效量与所算得的ED50是相同的。

[0265] 此外,本披露的有效剂量的多肽可以是这样的量,当按一种或多种剂量施用至对象时,产生相对于健康对象的期望的结果。例如,有效剂量可以是这样的剂量,当施用至具有升高的血浆葡萄糖和/或血浆胰岛素的对象时,达到与健康对象的相比,至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至

少约80%或超过80%的所期望的减少。

[0266] 适当的剂量水平通常为每日约0.001至100mg/kg患者体重,其可以单剂量或多剂量给药。在一些实施方式中,该剂量水平为每日约0.01至约25mg/kg,以及在其他实施方式中,为每日约0.05至约10mg/kg。合适的剂量水平可以是每日约0.01至25mg/kg、每日约0.05至10mg/kg或每日约0.1至5mg/kg。在此范围内,该剂量可以是每日0.005至0.05、0.05至0.5或0.5至5.0mg/kg。

[0267] 对于口服剂的施用,该组合物可以以包含1.0至1000mg活性成分,特别是1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0和1000.0mg活性成分的片剂、胶囊等的形式提供。多肽可以按,例如每日1至4次,以及经常每日一次或两次的方案施用。

[0268] 本披露的多肽的给药可以根据该多肽的药代动力学(如半衰期)以及药效学响应(如该多肽的治疗效果的持续时间),以适当的频率重复进行,其可以在每日一次至每三个月一次的范围内。在一些实施方式中,其中该多肽是抗体或其片段;或多肽或其变体,给药在每周一次和每3个月一次之间频繁重复。在其他实施方式中,这类多肽大约每月施用一次。

[0269] 在某些实施方式中,所披露的多肽的剂量被包含在“单位剂型”中。短语“单位剂型”是指物理上离散的单元,每个单元含有足以产生所希望的效果的预定量的本披露的多肽,单独或组合有一种或多种另外的药剂。将理解的是,单位剂型的参数将取决于具体的药剂和要实现的效果。示例性单位剂量的范围可以为约25-250;250-500;500-1,000;1,000-2,500;2,500-5,000;5,000-25,000;或25,000-50,000ng;或从约25-250;250-500;500-1,000;1,000-2,500;2,500-5,000;5,000-25,000;25,000-50,000μg;或从约25-250;250-500;500-1,000;1000-2,500;2,500-5,000;5,000-25,000;或25,000-50,000mg。

[0270] 单次或多次剂量可以例如,连续几天,交替几天,每周或间歇地每日多次施用(例如,每周两次;每1、2、3、4、5、6、7或8周一次;或每2、3、4、5或6个月一次)。

[0271] 试剂盒

[0272] 本披露还考虑了试剂盒,其包括所披露的多肽及其药物组合物。该试剂盒一般是如下文所述的容纳各种组分的物理结构形式,以及可以,例如在实施上述方法(例如,将多肽施用至需要恢复葡萄糖稳态的对象)中使用。

[0273] 试剂盒可以包括本文披露的一种或多种多肽(例如,含于无菌容器中被提供),其可以是适合于施用至对象的药物组合物的形式。该多肽可以以备用或以在施用之前需要,例如复原或稀释的形式提供。当该多肽是需要由用户复原的形式时,该试剂盒还可以包括包装有该多肽或与该多肽分离的缓冲液、药学上可接受的赋形剂以及诸如此类。当考虑到联合疗法时,该试剂盒可以单独包含若干药剂或它们已经可以在该试剂盒中进行组合。该试剂盒的各组分可以被封装在单独的容器内以及所有各种容器都可以在单个包装内。本披露的试剂盒可以根据正确保持其中容纳的组分的条件(如冷藏或冷冻)而进行设计。

[0274] 试剂盒可以含有标签或包装插页,其包括关于其中的组件的识别信息及其使用说明书(例如,给药参数、活性成分的临床药理学,包括作用机制、药代动力学和药效学、副作用、禁忌症等)。标签或插页可以包括制造商信息,如批号和有效期。该标签或包装插页可以被,例如整合到容纳该组件的物理结构内,单独包含在该物理结构内或贴到该试剂盒的组

件(如安瓿、管子或小瓶)上。示例性说明书包括那些用于利用所披露的多肽及其药物组合物来减少或降低血液葡萄糖,治疗高血糖症,治疗糖尿病等的说明。

[0275] 标签或插页还可以包括或者被整合入计算机可读介质,如磁盘(如硬盘、卡、内存磁盘);光盘,如CD-或DVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁带;或电存储介质,如RAM和ROM或这些的混合物,如磁/光存储介质、FLASH介质或存储型卡。在一些实施方式中,实际的说明书不存在于该试剂盒中,但是提供了用于从远程源(例如,经由互联网)获得说明的装置。

[0276] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本领域的普通技术人员通常所理解的,具有相同的含义。尽管与本文所述的类似于或等同的方法与材料可以被用于本发明的实践或试验中,本文还是描述了合适的方法和材料。

[0277] 在冲突的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式的“一种”、“一个”和“该”包括复数对象,除非上下文另有明确说明。因此,例如,对“一种肽序列”或一种“治疗”的提及包括多个这样的序列、治疗等。进一步注意的是,权利要求书可以撰写成排除任何可选的元素。就此而言,本声明旨在作为关于权利要求元素的叙述,使用诸如“仅”、“只”等的排除性术语或使用“否定”限定的先行基础。

[0278] 当提供数值范围时,理解的是,除非上下文另有明确说明,否则,该范围的上限值和下限值之间,到该下限值十分位的每个中间值以及在所述范围中的任何其他所述或中间值被本发明所涵盖。这些较小范围的上限值和下限值可以被独立地包括在较小的范围内,并且也被本发明所涵盖,服从于所述范围内的任何明确排除的限值。当所述范围包括一个或两个限值时,排除那些所包含的限值之一或两者的范围也被包括在本发明中。

[0279] 如本文所用,在整个本文件中,数值通常以范围格式呈现。范围格式的使用仅仅是为了方便和简洁,以及除非上下文另外清楚地指出,否则不应当被解释为对本发明的范围的硬性限制。因此,除非上下文另外清楚地指出,否则,范围的使用明确地包括所有可能的子范围,在该范围内的所有单个数值,以及所有数值或数值范围,包括这类范围内的整数和范围内值的分数或整数。无论范围的宽度,这种结构在整个本专利文件的所有上下文中均适用。因此,例如,对范围90-100%的提及包括91-99%、92-98%、93-95%、91-98%、91-97%、91-96%、91-95%、91-94%、91-93%并依此类推。对范围90-100%的提及还包括91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%等,以及91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%等、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%等并依此类推。另外,对范围1-3、3-5、5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-110、110-120、120-130、130-140、140-150、150-160、160-170、170-180、180-190、190-200、200-225、225-250的提及包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等。在进一步的例子中,对范围25-250、250-500、500-1000、1000-2500、2500-5000、5000-25,000或5000-50,000的提及包括,例如25、26、27、28、29…250、251、252、253、254…500、501、502、503、504…等内的任何数值或范围或包含这样的值范围。对一系列范围的使用包括上部和下部范围的组合,以提供另一范围。无论范围的宽度,这种结构在整个本专利文件的所有上下文中均适用。因此,例如,对一系列范围,如5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-75、75-100、100-150的提及包括,例如5-20、5-30、5-40、5-50、5-75、5-100、5-150,以及10-30、10-40、10-50、10-75、10-100、10-150,以及20-40、20-50、20-75、20-100、20-150并依此类推的范围。

[0280] 为了简明起见,本文使用了某些缩写。一个例子是表示氨基酸残基的单字母缩写。

氨基酸及其相应的三字母和单字母缩写如下：

[0281]	丙氨酸	Ala	(A)
[0282]	精氨酸	Arg	(R)
[0283]	天冬酰胺	Asn	(N)
[0284]	天冬氨酸	Asp	(D)
[0285]	半胱氨酸	Cys	(C)
[0286]	谷氨酸	Glu	(E)
[0287]	谷氨酰胺	Gln	(Q)
[0288]	甘氨酸	Gly	(G)
[0289]	组氨酸	His	(H)
[0290]	异亮氨酸	Ile	(I)
[0291]	亮氨酸	Leu	(L)
[0292]	赖氨酸	Lys	(K)
[0293]	蛋氨酸	Met	(M)
[0294]	苯丙氨酸	Phe	(F)
[0295]	脯氨酸	Pro	(P)
[0296]	丝氨酸	Ser	(S)
[0297]	苏氨酸	Thr	(T)
[0298]	色氨酸	Trp	(W)
[0299]	酪氨酸	Tyr	(Y)
[0300]	缬氨酸	Val	(V)

[0301] 本文一般使用肯定的语言来描述许多实施方式以披露本发明。本发明还具体地包括这样的实施方式，其中全部或部分地排除了特定的主题，如物质或材料、方法步骤和条件、协议、程序、测定或分析。因此，即使在本发明中，一般不对本发明不包括的内容进行表达，本发明中没有明确包含的方面仍然在本文中得以披露。

[0302] 已经描述了本发明的许多实施方式。然而，将理解的是，可以做各种修改，而不脱离本发明的精神和范围。因此，实验部分的说明旨在说明而不是限制权利要求中所述的本发明的范围。

[0303] 实验

[0304] 提出下面的实施例，以便为本领域的普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的完整披露和说明，并且不意在限制发明人视为本发明的内容的范围，他们也不用来表示下面的实验是进行的全部或唯一实验。已努力确保所用数字(如量、温度等)的准确性，但也应对一些实验误差和偏差做出解释。

[0305] 除非另有说明，份是重量份，分子量是重均分子量，温度为摄氏度(℃)，压力是或接近大气压。使用包括以下的标准缩写：bp=碱基对；kb=千碱基；p1=微微升；s或sec=秒；min=分钟；h或hr=小时；aa=氨基酸；kb=千碱基；nt=核苷酸；ng=毫微克；μg=微克；mg=毫克；g=克；kg=公斤；d1或dL=分升；μl或μL=微升；m1或mL=毫升；l或L=升；μM=微摩尔；mM=毫摩尔；M=摩尔；kDa=千道尔顿；i.m.=肌内(地)；i.p.=腹腔内(地)；s.c.=皮下(地)；bid=每日两次；HPLC=高效液相色谱；BW=体重；U=单位；ns=非统计学

显著的;PG=空腹血浆葡萄糖;FPI=空腹血浆胰岛素;ITT=胰岛素耐受试验;PTT=丙酮酸糖耐量试验;oGTT=口服葡萄糖耐量试验;GSIS=葡萄糖刺激的胰岛素分泌;AAV=腺相关病毒;PBS=磷酸盐缓冲盐水;PCR=聚合酶链反应;NHS=N-羟基琥珀酰亚胺;DMEM=Dulbecco改良Eagle培养基;GC=基因组拷贝;EDTA=乙二胺四乙酸;FGF19CF=在C末端具有FLAG-标签的FGF19;GFP=绿色荧光蛋白;ELISA=酶联免疫吸附测定;ANOVA=方差分析;SEM=平均值的标准误差。

[0306] 实施例1

[0307] 实施例2-5的材料和方法

[0308] 下面的方法和材料被用于实施例2-5。

[0309] 动物.在受控的光线(12小时光照和12小时黑暗周期,6:30p.m.-6:30a.m.黑暗)、温度($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$)和湿度(50% \pm 20%)条件下,按照福利指南照料db/db小鼠(缅因州巴尔港的The Jackson Laboratory)(大约15周龄的小鼠并且在治疗开始时体重大约为36-48g)。小鼠自由地饮用蒸压蒸馏水并随意食用含有1千卡%脂肪、24千卡%蛋白质和58千卡%碳水化合物的市售饲料(印第安纳州印第安纳波利斯的Harlan Laboratories, Irradiated2018Teklad Global 18%Protein Rodent Diet)。所有的动物研究均由NGM机构动物护理和使用委员会(NGM Institutional Animal Care and Use Committee)批准。

[0310] 核酸和氨基酸序列.使用从人小肠组织制备的重组DNA(cDNA)经由PCR扩增FGF19ORF(ORF编码hFGF19的cDNA(GenBank登录号NM_005117.2)和其编码的蛋白质序列(GenBank登录号NP_005108.1))。具有Phusion®高保真DNA聚合酶的PCR试剂盒((F-530L; New England BioLabs; 马萨诸塞州伊普斯威奇)利用如下引物使用:正向PCR引物:5' CCGACTAGTCACCAatgcggagcggtgtgtgg (SEQ ID NO:40),以及反向PCR引物:5' ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTCTCAAAGCTGGACTCCTC (SEQ ID NO:41)。

[0311] 扩增的DNA片段用Spe I和Not I消化(限制性位点分别包含在5'或3'PCR引物中),然后用已经用相同的限制性内切酶消化过的AAV转基因载体连接。用于表达的载体含有可选择的标记和表达盒,该表达盒由如下组成:用于插入经克隆的编码序列的位点的强大的真核启动子5',接着是3'非翻译区以及牛生长激素聚腺苷酸化尾。在5'和3'端处,表达构建体的侧翼还有内部末端重复序列。

[0312] AAV编码的FGF19和FGF19变体的生产和纯化.在补充有10%胎牛血清和1×抗菌-抗霉菌溶液(Mediatech)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM,维吉尼亚州赫恩登的Mediatech)中培养AAV293细胞(加州圣克拉拉的Agilent Technologies)。在第1天在150-mm细胞培养板中按50%的密度将该细胞制成板以及在第2天使用磷酸钙沉淀法,利用以下三种质粒(20 μg /每板)将其转染:i)AAV转基因质粒,ii)pHelper质粒(Agilent Technologies),以及iii)AAV2/9质粒(Rabinowitz等人,2002)。转染后48小时,将该细胞从该板上刮下,以3000 $\times g$ 离心沉淀并再悬浮于含有20mM Tris pH 8.5、100mM NaCl和1mM MgCl₂的缓冲液中。将悬浮液在醇干冰浴中冷冻,然后于37°C水浴中解冻;将冻融循环重复三次。添加Benzonase®(Sigma-Aldrich;密苏里州圣路易斯)至50U/mL以及添加脱氧胆酸盐加至0.25%的最终浓度。于37°C孵育30分钟后,通过5000 $\times g$ 离心沉淀细胞碎片达20分钟。上清液中的病毒颗粒使用如先前所述的碘克沙醇(Sigma-Aldrich)梯度纯化(Zolotukhin等人,(2002)Endocrinology143(5):1741-47)。病毒原液使用Vivaspin®20

(分子量(MW)截留量100,000Da,Sartorius Stedim Biotech;法国欧巴涅)浓缩以及用10%甘油再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并储存于-80°C。

[0313] 为了测定病毒基因组拷贝(GC)数,于37°C在含有50U/mL的核酸酶、50mM Tris-HCl pH 7.5、10mM MgCl₂和10mM CaCl₂的6μL溶液中孵育2μL的病毒原液达30分钟。此后,添加含有2mg/mL的蛋白酶K、0.5% SDS和25mM EDTA的15μL溶液以及于55°C将混合物孵育另外20分钟以释放病毒DNA。用微型DNeasy®试剂盒(加州巴伦西亚的Qiagen)清洗病毒DNA并用40μL的水洗脱。使用定量PCR测定病毒GC。用盐水稀释病毒原液至期望的GC/mL并将操作溶液(200μL)经尾静脉注射入小鼠体内。

[0314] 血液葡萄糖测定.通过剪尾从个体非禁食动物中收集血样,并用血糖仪(Accu-Chek®仪器;印第安纳州印第安纳波利斯的Roche Diagnostics),依照制造商的说明测量血浆葡萄糖水平。

[0315] 血清FGF19和FGF19变体暴露水平测定.将来自小鼠尾巴剪切片的全血(~50μl/小鼠)收集到光滑的毛细管(BD Clay Adams SurePrep™,Becton Dickinson;马里兰州帕克市)中。通过在Autocrit™Ultra 3离心机(Becton Dickinson)中按10,000rpm、4°C离心10分钟来分离血清和血细胞并立即于-80°C冷冻。使用市售的ELISA(北卡罗来纳州阿什维尔的Biovendor),按照制造商的说明测量血清中的FGF19和FGF19变体的水平。将人FGF19用作标准物并对M70的相对浓度进行了测定。可以相应地测定其他FGF19变体的相对浓度。

[0316] 脂肪量和肌肉量测量.将未麻醉的动物单独放置在塑料支架中并使用NMR-MRI(全身成分分析仪,德克萨斯州休斯顿的EchoMRI™)测定身体成分。记录了脂肪量、肌肉量和水含量(数据未提交)。针对每只动物,整个过程不超过2分钟。

[0317] 全量肝结节评估.AAV注射后24周,将动物处以安乐死并对个别肝脏进行全量结节形成的检测。对可见(直径>2mm)的肝结节的数量进行计数和记录。

[0318] 统计分析.所有的结果均表示为平均值±平均值的标准误差(SEM)。使用单向ANOVA,继之以Dunnett事后检定来比较来自多个组的数据(GraphPad Prism®;加州圣地亚哥)。指出时,使用非配对学生t检验来比较两种治疗。使用双向ANOVA,继之以Bonferroni事后检定来比较多个群组,用于时程研究。0.05或更小的p值被认为是统计学显著的。

[0319] 实施例2

[0320] 基因递送之后db/db小鼠中的血浆FGF19水平

[0321] 进行了24周的研究,以评估该FGF19变体M70能否阻止db/db小鼠内FGF19诱导的肿瘤发生。作为常规递送方法的替代,在本实施例(以及随后的实施例2-4)中将AAV用作溶媒,以在小鼠内递送和表达有关外源基因并且实现连续、持续和全身地暴露于这些转基因编码的蛋白质。

[0322] 在基因递送之前,将小鼠分成六组(5只雄性小鼠/组),如表1中所述,以及记录每只小鼠的血液葡萄糖和体重测量值。

[0323] 表1

[0324]

组	AAV 构建体	剂量水平 (AAV)	体积 (mL/小鼠)	描述符
1	盐水	0	0.2	对照
2	GFP	3e11	0.2	AAV-对照
3	FGF19-标签	3e9	0.2	FGF19 低剂量
4	FGF19-标签	3e10	0.2	FGF19 低剂量
5	M70 FGF19-标签	3e11 3e9	0.2 (总)	M70/FGF19 低剂量
6	M70 FGF19-标签	3e11 3e10	0.2 (总)	M70/FGF19 高剂量

[0325] 在第0周,小鼠注射有0.2mL盐水或0.2mL来自2-6组的AAV构建体的一种。在第3和5周,再次记录1-6组中每只小鼠的血液葡萄糖和体重测量值。

[0326] 基因递送后五周,测量从注射有盐水(第1组)或AAV构建体(第2-6组)的小鼠中分离的血清中的FGF19浓度。由于用于测量药物浓度的ELISA无法准确地区分FGF19和M70,因此测定的第5和6组的血浆水平代表这两种蛋白质的总血浆浓度。

[0327] 结果如图2中所述。在接受低(3e9;第3组)和高(3e10;第4组)剂量的重组FGF19-标签病毒的小鼠中检测到的FGF19水平与AAV剂量(分别是 1.4 ± 0.5 ng/mL和 93.6 ± 12.6 ng/mL)都是成比例的。在同时注射有FGF19-标签和M70转基因的小鼠内,M70病毒(3e11)与单独的FGF19-标签构建体相比,以100倍或10倍过量存在。作为共同注射这两种转基因的结果,在低剂量和高剂量FGF19-标签(分别是 734.0 ± 61.1 ng/mL(第5组)和 453.4 ± 169.4 ng/mL(第6组))时均检测到FGF19的高血清水平,这表示来自M70和FGF19-标签两者的表达的贡献。与此相反,在从注射有盐水或AAV-GFP的db/db小鼠中分离的样本中,FGF19是检测不到的。

[0328] 在第23周,再次记录每只小鼠的血液葡萄糖和体重测量值。基因递送后二十四周,将所有动物处以安乐死并进行尸检。

[0329] 实施例3

[0330] 不存在和存在FGF19变体M70时db/db小鼠内FGF19介导的全量肝结节的形成

[0331] 使用实施例2的处以安乐死的动物,对来自单个小鼠的肝脏进行了检查,以及测定了可见的肝结节的数量。结果如图3中所述。对组号的引用参考表1。

[0332] 如图3中所示,在低(3e9;第3组)和高(3e10;第4组)的病毒剂量(分别为每个肝脏 2.4 ± 1.4 处病变以及每个肝脏7.8处病变)下,该db/db小鼠模型中FGF19-标签的异位表达均促进了突出肝脏表面的多个凸起大结节的形成。通过比较,从同时表达FGF19-标签和M70的小鼠中分离的肝脏是完全不含肝结节的(第5组和第6组)。结果表示为同一研究组中的所有动物的平均值和SEM。应当指出的是,虽然c-标签组分可以影响FGF19的抗糖尿病作用,它

却没有影响FGF19的肿瘤发生作用。

[0333] 血清浓度低至1ng/mL时,FGF19-标签的异位表达促进了db/db小鼠内肝结节的形成。然而,当该FGF19-标签和M70转基因被共表达在该模型中时,由肝损伤的外观所证实的FGF19诱导的肿瘤发生完全得到抑制。这些数据表明,工程化的FGF19变体M70不仅缺乏在小鼠体内与野生型蛋白质有关的致瘤潜力,而且它可以有效地干扰野生型蛋白质的增殖作用。

[0334] 实施例4

[0335] 转基因表达对db/db小鼠体重和组成的影响

[0336] 如实施例2中提到的,如表1中所示,对15周龄的雄性db/db小鼠(n=5)注射0.2mL盐水或重组AAV转基因。在注射前(周-1)和注射后3周、5周和23周测量每只小鼠的体重。结果如图4中所述,表示为所有动物的个体测量值的平均值和SEM。

[0337] 共表达M70和FGF19-标签的转基因db/db小鼠(第5和6组)显示,与用盐水给药的动物(第1组)相比,显著的体重减少。虽然减少似乎是剂量依赖性的,以及在第3和5周,在注射较高剂量的动物(第3和4组)中比较显著,在表达该FGF19-标签转基因的小鼠中观察到的对体重的影响却没有那么显著。

[0338] 注意,两个对照组中的小鼠(用盐水(第1组)或AAV-GFP(第2组)给药)在研究结束时倾向于显示,与基因递送之后第3和5周它们的最大体重相比,显著的质量损失。这些动物的减重通常与24周研究过程中在db/db小鼠中观察到的严重的高血糖症和2型糖尿病的进展有关。

[0339] 在共表达FGF19-标签和M70转基因的小鼠中观察到的体重变化反映在与从盐水组的动物中收获的那些相比,减少的肝脏重量(数据未示出);值得注意的是,这些小鼠中减小的器官体积与较低的体重成正比。相反,在表达FGF19-标签的小鼠中,相对肝脏重量得以增加,尽管当归一化为体重时,这些变化同样不显著(数据未示出)。

[0340] 此外,使用NMR-MRI对注射后23周治疗对身体组成的影响进行了测定。与所观察到的体重的减少一致,该M70和FGF19-标签转基因的异位共表达导致了db/db小鼠中,与经盐水处理的小鼠相比,脂肪量和肌肉量两者的损失(数据未示出)。FGF19-标签的表达对接受低或高剂量转基因的db/db小鼠的身体组成几乎没有影响(数据未示出)。

[0341] 实施例5

[0342] 转基因表达对db/db小鼠的非禁食血液葡萄糖的影响

[0343] 如实施例2中提到的,如表1中所示,对15周龄的雄性db/db小鼠(n=5)注射0.2mL盐水或重组AAV转基因。在注射前(周-1)和注射后3周、5周和23周测量每只小鼠的血液葡萄糖。结果如图5中所述,表示为所有动物的个体测量值的平均值和SEM。

[0344] 共表达M70和FGF19-标签的转基因db/db小鼠(第5和6组)显示,与对照动物(第1和2组)相比,显著的血液葡萄糖减少。在共表达FGF19-标签和M70转基因的小鼠中,血液葡萄糖水平迅速降低,在基因递送后大约3周达到坪水平(高剂量(第6组)和低剂量(第5组)的FGF19-标签转基因时,分别为160和141mg/dL)。在表达FGF19-标签的小鼠(第3和4组)中,血液葡萄糖水平与对照组相比,显著较低,并且在24周的研究过程中保持在初始基线水平(大约400-450mg/dL)。如前面所指出的,虽然c-标签组分可以影响FGF19的抗糖尿病作用,它却没有影响FGF19的肿瘤发生作用。

[0345] 正如所预期的，在研究的过程中，盐水(第1组)或对照病毒AAV-GFP(第2组)注射之后没有观察到葡萄糖降低。值得注意的是，血糖仪测定的对照组中的血液葡萄糖浓度(\sim 600mg/dL)表示仪器检测的上限值，并且可能未充分表示这些样本中的实际的葡萄糖浓度。

[0346] 实施例6

[0347] 实施例7-11的材料和方法

[0348] 下面的方法和材料被用于实施例7-11。

[0349] DNA构建体.人FGF19(NM_005117)、人FGFR4(NM_022963)、小鼠FGFR4(NM_008011)、人KLB(NM_175737)和小鼠KLB(NM_031180)cDNA从Genecopoeia处购得。使用QuickChangeTM定点诱变试剂盒(Stratagene)在FGF19构建体中引入了突变。

[0350] AAV编码的FGF19和FGF19变体的生产和纯化.在补充有10%胎牛血清和1×抗菌-抗霉菌溶液(Mediatech)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM, 维吉尼亚州赫恩登的Mediatech)中培养AAV293细胞(加州圣克拉拉的Agilent Technologies)。在第1天在150-mm细胞培养板中按50%的密度将该细胞制成板以及在第2天使用磷酸钙沉淀法, 利用以下三种质粒(20 μ g/每板)将其转染: i) AAV转基因质粒, ii) pHelper质粒(Agilent Technologies), 以及 iii) AAV2/9质粒(Rabinowitz等人, 2002)。转染后48小时, 将该细胞从该板上刮下, 以3000 \times g离心沉淀并再悬浮于含有20mM Tris pH 8.5、100mM NaCl和1mM MgCl₂的缓冲液中。将悬浮液在醇干冰浴中冷冻, 然后于37°C水浴中解冻; 将冻融循环重复三次。添加Benzonase[®](Sigma-Aldrich; 密苏里州圣路易斯)至50U/mL以及添加脱氧胆酸盐加至0.25%的最终浓度。于37°C孵育30分钟后, 通过5000 \times g离心沉淀细胞碎片达20分钟。上清液中的病毒颗粒使用如先前所述的碘克沙醇(Sigma-Aldrich)梯度纯化(Zolotukhin等人, (2002)Endocrinology143(5):1741-47)。病毒原液使用Vivaspin[®] 20(分子量(MW)截留量100,000Da, Sartorius Stedim Biotech; 法国欧巴涅)浓缩以及用10%甘油再悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并储存于-80°C。

[0351] 为了测定病毒基因组拷贝(GC)数, 于37°C在含有50U/mL的核酸酶、50mM Tris-HCl pH 7.5、10mM MgCl₂和10mM CaCl₂的6 μ L溶液中孵育2 μ L的病毒原液达30分钟。此后, 添加含有2mg/mL的蛋白酶K、0.5% SDS和25mM EDTA的15 μ L溶液以及于55°C将混合物孵育另外20分钟以释放病毒DNA。用微型DNeasy[®]试剂盒(加州巴伦西亚的Qiagen)清洗病毒DNA并用40 μ L的水洗脱。使用定量PCR测定病毒GC。用盐水稀释病毒原液至期望的GC/mL并将操作溶液(200 μ L)经尾静脉注射入小鼠体内。

[0352] 动物实验.所有的动物研究均由NGM机构动物护理和使用委员会批准。在受控的12小时光照和12小时黑暗周期条件下, 于22°C将小鼠安放无病原体的动物设施中。所有的小鼠随意食用标准的饲料(Harlan Laboratories, Teklad 2918)和蒸压水。除非另有规定, 否则使用雄性小鼠。C57BL/6J、FVB/NJ、BDF、ob/ob和db/db小鼠从Jackson Laboratory处购得。杂合的rash2转基因小鼠从Taconic处得到。在第7天, 成群的10-12周龄的ob/ob或db/db小鼠或6-8周龄的C57BL/6J、FVB/NJ、BDF或rash2小鼠基于体重被随机分到治疗组。所有动物在第1天经由尾静脉接受AAV的3x 10¹¹基因组拷贝的单次200 μ L静脉注射。记录体重并通过剪尾收集血液, 用于血清FGF19水平的测量。将动物处以安乐死并在AAV给药后24或52周收集肝脏。

[0353] 全量、组织学和免疫组化分析.为确定注射有AAV-FGF19的小鼠体内肝脏的变化的

起病,在整个一年的过程中按指定的时间间隔进行了总量和组织学评价。尸检时,记录了体重、肝重和肝脏肿瘤结节数量。至于FGF19变体的肿瘤评分计算,肿瘤评分=表达变体的肝脏的整个表面上的肿瘤结节的数量/表达野生型FGF19的肝脏的整个表面上的肿瘤结节的数量。因此,用任意值1给予表达FGF19的小鼠肿瘤评分。用苏木精和曙红(H&E)将福尔马林-固定的石蜡-包埋的组织切片染色,以进行肝细胞增生、肥大或瘤形成的组织学评估。当指出时,肝脏切片用柠檬酸盐缓冲液(Vector Laboratories)进行抗原修复处理,然后用10 μ g/mL抗PCNA(Dako)、抗Ki67(Dako)、抗谷氨酰胺合成酶(Thermofisher)或抗 β -连环蛋白抗体(Cell Signaling)孵育。将生物素化的次级抗体、ABC-HRP试剂和DAB比色的过氧化物酶底物(Vector Laboratories)用于检测。对于LacZ染色,肝脏被包埋在OCT中并在低温恒温器上切片。将组织切片固定在含有4%多聚甲醛和2%戊二醛的PBS中10分钟并于37℃用含于5mM亚铁氰化钾和5mM铁氰化钾的1mg/mL X-gal(Promega)孵育2小时。

[0354] 荧光素酶检测.从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得大鼠L6成肌细胞,并在5%CO₂下于37℃培养在补充有10%胎牛血清(FBS)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中。使用FuGENE®6转染试剂(Roche Applied Science),用编码小鼠KLb、小鼠FGFR4、GAL4-E1k-1转录激活因子(pFA2-E1k1,Stratagene)、萤火虫荧光素酶报道基因驱动的GAL4结合位点(pFR-1uc,Stratagene),以及Renilla荧光素酶(pRL-SV40,Promega)的表达载体瞬时转染96孔板中的细胞。转染后当天,用含于包含20 μ g/mL肝素的无血清培养基(Sigma)的配位体将该细胞刺激6小时。用裂解缓冲液(Promega)裂解细胞并使用Dual-Glo®萤光素酶检测系统(Promega)和EnSpire®平板读数器(Perkin Elmer)测定萤光素酶活性。将萤火虫荧光素酶活性归一化为共表达的Renilla荧光素酶活性并显示为三次复制的平均值±SEM。

[0355] 原代肝细胞中Cyp7a1表达.在涂覆有I型胶原的96孔板(Becton Dickinson)上将来自小鼠、大鼠或人肝的原代肝细胞(Life Technologies)制成板,并在补充有100nM地塞米松和0.25mg/mL的基质胶的Williams'E培养基中孵育过夜。用重组FGF19或M70蛋白处理细胞24小时(小鼠或大鼠肝细胞)或6小时(人肝细胞)。使用QuantiTect多路qRT-PCR Master Mix(Qiagen)和预制的引物和探针(Life Technologies;小鼠Cyp7a1:Mm00484150_m1;大鼠Cyp7a1:Rn00564065_m1;人Cyp7a1:Hs00167982_m1),通过qRT-PCR分析来测定细胞裂解物中的Cyp7a1表达。反应在Applied Biosystems 7900HT序列检测系统上以一式三份进行。通过比较阈值循环法,将18S RNA(小鼠和大鼠)或肌动蛋白(人)用作内标来计算相对的mRNA水平。

[0356] 体内信号转导分析.给予db/db小鼠(9-11周龄)(Jackson Laboratories)FGF19或M70重组蛋白的腹腔内(i.p.)注射(1mg/kg)。于注射后15分钟、2小时或4小时收集肝脏并在液氮中快速冷冻。在含有蛋白酶抑制剂(Roche)和磷酸酶抑制剂(Sigma)的RIPA裂解缓冲液(50mM的Tris pH7.5,150mM NaCl,1%NP40和0.5%脱氧胆酸钠,1mM二硫苏糖醇,1mM PMSF,2mM氟化钠,以及2mM原钒酸钠)中使冷冻的肝脏样本均质化。在4-20%聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Rad)上将如通过BCA检定(Thermo Fisher)测定的等量的蛋白质(15 μ g)分离并转移至硝酸纤维素膜(Bio-Rad)上。在含于PBS/0.05%吐温20的5%无脂干牛奶中将膜封阻并用pSTAT3(Cell Signaling)、STAT3(Cell Signaling)的抗体或抗体混合物I(Cell Signaling)进行孵育。用辣根过氧化物酶(HRP)-共轭的次级试剂检测结合的抗体并

使用Odyssey®扫描器(Li-Cor Biotechnology)进行可视化。

[0357] 异种移植实验.6-8周龄无胸腺nu/nu雌性小鼠(Charles River Laboratories)肋腹中皮下注射有 5×10^6 细胞(200 μ L/小鼠)。将负荷有类似体积的肿瘤($\sim 100\text{mm}^3$)的小鼠随机分组，并通过一次性尾静脉注射 3×10^{11} AAV-M70或对照病毒(AAV-GFP)进行处理。用电子卡尺测量肿瘤以及用下式计算平均肿瘤体积:(W²x L)/2，其中W和L分别是较小的直径和大直径。

[0358] 统计分析.所有的结果均表示为平均值±平均值的标准误差(SEM)。使用单向ANOVA，继之以Dunnett事后检定来比较来自多个组的数据(GraphPad Prism®)。指出时，使用非配对学生t检验来比较两种治疗。使用双向ANOVA，继之以Bonferroni事后检定来比较多个群组，用于时程研究。0.05或更小的p值被认为是统计学显著的。

[0359] 实施例7

[0360] 用于体内肝细胞肿瘤发生的评价的AAV介导的转基因系统

[0361] AAV介导的基因递送提供了手段，以实现连续的转基因表达，而无通常与其他的病毒载体相关的炎症应答(Zaiss等人, 2002, J. Virol. 76, 4580–4590)。当引入成年小鼠中时，用AAV基因递送方法已经观察到长达1年的持续表达(Rivera等人, 1999, PNAS 96, 8657–8662)。第一AAV载体最近被批准为人类遗传性障碍的疗法(Wirth等人, 2013, Gene 525, 162–169)。

[0362] 在先前报道的FGF19转基因模型中，FGF19被异位表达于骨骼肌，FGF19表达的非生理部位(Inagaki等人, 2005, Cell Metabol. 2, 217–225; Nicholes等人, 2002, Amer. J. Pathol. 160, 2295–2307)。在病理条件(如肝硬化或胆汁淤积)下，FGF19表达在肝脏中被诱导(Desnoyers等人, 2008, Oncogene 27, 85–97; Hasegawa Y, 2013, Hepatol. 58, 802A; Schaap等人, 2009, Hepatol. 49, 1228–1235)。作为产生转基因小鼠的常规方法的替代方法，在6-12周龄的小鼠中经AAV引入FGF19(图6A)。使用这种方法，转基因表达的主要组织是肝脏，在心脏和肌肉中只有微小的表达(数据未显示)。如先前报道，观察到，AAV单次施用之后肝细胞的90–100%转导和长期的基因表达而没有毒性(Zincarelli等人, 2008, Mol. Ther. 16, 1073–1080)(数据未显示)。

[0363] 对多个小鼠品系进行FGF19诱导的肝肿瘤形成的延迟和鲁棒性评估(表2)。对照AAV病毒(AAV-GFP, 绿色荧光蛋白)没有产生任何肝脏肿瘤(表2)。

[0364] 如表2中所示，FGF19促进了多个小鼠模型中的肝癌发生。各种品系的小鼠(6-12周龄)注射有编码FGF19的AAV载体的 3×10^{11} 基因组拷贝或对照基因(GFP, 绿色荧光蛋白)。在AAV施用后24或52周测定肿瘤发病率。n.d.没有测定。

[0365] 表2

[0366]

	FGF19		对照		
	小鼠品系	24周	52周	24周	52周
C57BL6/J	0/5	4/5 (80%)	0/5	0/5	
BDF	0/5	5/5 (100%)	0/5	0/5	
FVB/N	0/5	3/5 (60%)	0/5	0/5	
ob/ob	3/5 (60%)	n.d.	n.d.	n.d.	
db/db	5/5 (100%)	n.d.	n.d.	n.d.	

[0367] 一般情况下,注射有AAV-GFP的小鼠表现出与注射盐水的动物相似的表型(数据未示出)。为简单起见,在下面的研究中只有来自注射AAV-GFP的动物的结果被作为对照示出。

[0368] 有趣的是,肿瘤延迟因小鼠遗传背景而不同。瘦素受体的突变经常发现于硬变的肝脏中并与人HCC相关(Ikeda等人,2014,Gastroenterol.,146:222-232;Wang等人,2010,World J.Gastroenterol.16,5801-5809)。瘦素受体中具有遗传缺陷(Tartaglia等人,1995,Cell 83,1263-1271)的db/db小鼠提供了用于评估候选HCC-促进基因的临床相关的遗传背景。事实上,在测试的几个小鼠品系中,db/db小鼠显示出最短的延迟和高肿瘤外显率,AAV-FGF19递送之后24周出现突出肝脏表面的多个凸起大肿瘤结节(图6B)。

[0369] 在db/db小鼠中,单尾静脉注射AAV-FGF19的 3×10^{11} 基因组拷贝后1周,血清FGF19水平达到 $\sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$ (图6C)。注射有对照病毒的小鼠中没有检测到FGF19。高循环水平的FGF19持续了整个24周的研究期间(图6C)。对整个肝脏表面上可见的肿瘤结节进行计数(图6D)。记录了肝脏肿瘤结节的最大直径(图6D)。偶尔在注射有对照病毒或盐水的db/db小鼠中观察到少数的肝脏肿瘤结节,这可能反映在这种遗传模型中肿瘤发生的背景增加(图6D以及数据未显示)。如在材料和方法中描述的,根据肝脏肿瘤结节的多重性建立了肿瘤评分系统(实施例6)(图6D)。

[0370] 显微镜检查将AAV-FGF19诱导的原位肝脏肿瘤分类为实体HCC,其与FGF19转基因动物中报告的那些类似(图6E)。通过免疫组化染色进行Ki-67和PCNA检查的细胞增殖状态表明该肿瘤是高度增生的。与FGF19转基因小鼠中观察到的类似,AAV-FGF19小鼠中的肝脏肿瘤是谷氨酰胺合成酶-阳性的,其暗示中心周围源(Nicholes等人,2002,Amer.J.Pathol.160,2295-2307)(图6E)。来自AAV-FGF19小鼠的肝脏肿瘤也显示了 β 连环蛋白的增加的核染色(图6E)。因此,AAV介导的转基因表达提供了一种强有力的方法,以评估体内FGF19诱导的肝癌发生。

[0371] 实施例8

[0372] M70是工程化的无瘤FGF19变体

[0373] FGF19和FGF21属于同一FGF亚科,共享34%的氨基酸同一性。有趣的是,不像FGF19,FGF21在我们的AAV介导的转基因模型中,不诱导肝脏肿瘤形成(数据未显示)。为了确认对于由FGF19诱导的肿瘤发生来说关键的结构元件,通过系统地交换所预测的包括 α -链和 β -螺旋的二级结构元件生成了多个介于FGF19和FGF21之间的嵌合构建体(表3)。表3示出了具有衍生自FGF19或FGF21的氨基酸序列的嵌合构建体。在AAV介导的转基因表达后24周评估肝脏肿瘤形成。系统地替换FGF19的次级结构组件(β 折叠和 β 折叠之间的环)。连续暴露24周后,通过AAV将构建体单独引入db/db小鼠中,以评估其致瘤的潜力。FGF19的N末端10–20个氨基酸被确认为对致瘤性是至关重要的(表3)。

[0374] 表3

名称	来自FGF19 的氨基酸	来自FGF21 的氨基酸	肿瘤评分	
对照			0.00 ± 0.00	
FGF19	R23-K216		1.00 ± 0.18	
FGF21		H26-S208	0.00 ± 0.00	
<i>FGF19 “末端交换” 变体:</i>				
N-ter	R23-R43	H26-R44	0.00 ± 0.00	
C-ter	P170-K216	R162-S208	2.70 ± 0.50	
<i>FGF19 “环交换” 变体:</i>				
环-1	S50-L56	D51-T56	0.59 ± 0.29	
环-2	R63-G68	R63-G66	2.55 ± 0.34	
环-3	A71-A76	A71-P76	1.58 ± 0.51	
环-4	A86-T89	K86-V89	1.69 ± 0.27	
环-5	G94-S97	G94-T97	0.90 ± 0.17	
环-6	A105-G107	P105-G107	1.00 ± 0.17	
[0375]	环-7	L112-S116	S112-O129	0.67 ± 0.18
	环-8	R127-D129	L127-D129	0.06 ± 0.03
	环-9	S136-H139	S136-H139	0.79 ± 0.10
	环-10	V143-L162	L143-K149	1.32 ± 0.22
	环-11	R157-H164	R158-G168	1.24 ± 0.38
<i>FGF19 “折叠交换” 变体:</i>				
折叠-1	R43-T49	R44-T50	0.32 ± 0.14	
折叠-2	S57-I62	E57-I62	0.35 ± 0.10	
折叠-3	V67-A71	T67-A71	1.78 ± 0.14	
折叠-4	L80-V85	L80-L85	3.99 ± 0.63	
折叠-5	T89-K93	V89-L93	0.36 ± 0.05	
折叠-6	V98-G104	S98-R104	0.73 ± 0.17	
折叠-7	K108-G111	A108-G111	1.91 ± 0.66	
折叠-8	F122-R127	F122-L127	0.94 ± 0.21	
折叠-9	G130-S136	G130-S136	1.17 ± 0.22	
折叠-10	R140-P142	G140-P142	2.00 ± 0.41	
折叠-11	F165-M168	R158-A161	0.39 ± 0.31	

[0376] 随后,通过仅改变该区域之内的氨基酸而生成附加构建体(表4)。表4示出了对N末端区域中FGF19变体的结构活性关系分析。相比野生型FGF19的氨基酸改变用下划线标出。

转基因表达后24周评估肝脏肿瘤形成。

[0377] 表4

名称	N末端序列	肿瘤评分	
对照		0.00 ± 0.00	
FGF19	RFLAFSDAGFHVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.00 ± 0.18	
FGF19N 末端 SAR 变体:			
N1	R-----DAGPHVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.25 ± 0.30	
N2	R-----VHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	0.00 ± 0.00	
SSL	R-----DSSPLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	0.00 ± 0.00	
SSH	R-----DSSPHYVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	2.39 ± 0.83	
SGL	R-----DSGPLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	0.68 ± 0.14	
[0378]	ASL	R-----DASPLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.09 ± 0.18
EDL	R-----DEDPLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.18 ± 0.45	
EGL	R-----DEGPLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.15 ± 0.17	
EDH	R-----DEDPHVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.00 ± 0.36	
EGH	R-----DECPHVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.44 ± 0.05	
QGH	R-----DQGPBVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.01 ± 0.18	
QGL	R-----DQGPLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	0.68 ± 0.12	
QSH	R-----DQSPHVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.42 ± 0.20	
ESH	R-----DQSPHVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.22 ± 0.31	
QSL	R-----DQSPFLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	1.08 ± 0.33	
ESL	R-----DESPLVHYGNGDFIRLRLRHLYTSGPFGGLSS	0.01 ± 0.01	

[0379] 总体上,分别对30多个FGF19变体进行了致瘤性评估。选择被称为M70(SEQ ID NO:1)的携带3个氨基酸取代(A30S、G31S、H33L)和5-氨基酸删除的FGF19变体用于进一步的研究(图7A)。

[0380] 与FGF19相反,来自高度全身暴露于M70达24周的db/db小鼠的肝脏是完全没有肝脏肿瘤结节(对于FGF19和M70,分别是每个肝脏 15.6 ± 2.8 个肿瘤结节以及每个肝脏 0.0 ± 0.0 个肿瘤结节, $n=5$, $p<0.001$;图7B)。FGF19-表达小鼠表现出肝脏重量的显著增加(2.91 ± 0.19 g对比对照小鼠中的 1.86 ± 0.12 g, $n=5$, $p<0.001$;图7C),这如以往的研究中所报道的,与肝脏肿瘤负荷密切相关。与此相反,M70-表达小鼠没有表现出任何增加的肝脏重量(1.56 ± 0.09 g对比FGF19小鼠中的 2.91 ± 0.19 g, $n=5$, $p<0.001$;图7C)。当计算肝脏对体重比时获得类似的结果(图7D和图7E)。这些小鼠中M70的平均血清浓度为 $2\text{--}3\mu\text{g}/\text{ml}$,比人的循环FGF19水平高约10,000倍(图7F)。肝组织学分析表明,M70-表达小鼠没有罹患与小鼠中FGF19过表达相关的任何可辨别的癌前和肿瘤性病变。具体地,没有观察到改变的肝灶、肝细胞发育不良、肝细胞腺瘤或肝细胞癌(图7G)。在FGF19-表达小鼠中,非致瘤性区域显示中央静脉周围细胞密度增加,但在M70-表达小鼠中没有观察到这样的改变。M70的过表达不导致Ki-67-阳性细胞数目的增加,其是由FGF19-过表达所致的(图7G)。此外,虽然FGF19表达细胞中的肝肿瘤病变对于谷氨酰胺合成酶变得高度阳性,M70表达-小鼠的肝脏中却没有观察到增加的对谷氨酰胺合成酶的表达(图7G)。最后,如通过肝酶的血清水平所确定的,长时间暴露于M70达24周之后没有观察到肝脏毒性(图7H)。合起来看,这些结果表明,M70缺乏促

进db/db小鼠中肝细胞肿瘤发生的能力。

[0381] 进一步评价rash2转基因小鼠模型中M70的致瘤性。对人H-RAS转基因来说是半合子的CB6F1-Rash2小鼠已经被广泛地应用,以加速评价,而传统的是啮齿类动物2年致癌评估(Storer等人,2010,Toxicologic Pathol.38,51-61)。rash2小鼠对遗传毒性和非遗传毒性致癌物质都很敏感,其比野生型小鼠较早罹患自发性和诱发性肿瘤。因为在人HCC中经常观察到PAS信号传导途径的激活,所以这种品系还为研究致肝癌性提供了相关的遗传背景(Calvisi等人,2006,Gastroenterol.130,1117-1128)。

[0382] 在52周的研究过程中,表达FGF19或M70的rash2小鼠与对照小鼠相比,有显著的减重(图8A)。然而,来自FGF19和M70-表达组的肝脏的形态显示出巨大差异。在表达FGF19的小鼠的肝脏中观察到多个肿瘤结节的总体形态变化,与HCC的形成一致(每个肝脏3.8±1.5个肿瘤结节;图8B)。与此相反,来自表达M70的小鼠的肝脏有正常的总体形态并且是完全没有肿瘤结节的(图8B)。应当指出的是,在对照rash2小鼠中观察到低水平的自发肝脏肿瘤形成(图8B)。M70-表达动物与FGF19小鼠比较,显示出显著的肝脏重量的减少(0.76±0.05g对比FGF19小鼠中的1.71±0.24g,n=9,p<0.001;图8C)。M70也使rash2小鼠中肝脏和体重的比率正常化(5.34±0.24%对比FGF19小鼠中的8.66±1.36%,n=9,p<0.01;图8D)。这些小鼠中FGF19和M70的血清水平是不相上下的,分别为155±28ng/ml和209±22ng/ml(图8E)。

[0383] 对来自这些小鼠的H&E染色的肝脏切片进行肿瘤和癌前病变的存在的评价(图8F)。此外,进行抗谷氨酰胺合成酶染色,作为FGF19诱导的肝肿瘤的标志物(图8F)。针对谷氨酰胺合成酶染色的切片取自用H&E染色的配对切片以及照片显示相同的门(p)静脉和中央(c)静脉。表达FGF19的rash2小鼠显示肝细胞腺瘤和肝细胞癌。在FGF19-表达rash2小鼠中也注意到癌前肝细胞病变。值得注意的是,来自表达M70的小鼠的肝脏没有一个表现出肿瘤或癌前病变的组织学证据(图8F)。确凿的组织学结果,增加的Ki-67和AFP(常在HCC中诱发的胚胎肝蛋白)的肝表达(Marrero和El-Serag,2011,Hepatol.53,1060-1062)在FGF19-表达rash2小鼠中,但不在M70-表达小鼠中被观察到(图8G)。

[0384] 这些结果表明,不像FGF19,长时间暴露于高循环水平的M70(即,在db/db小鼠中24周或rash2小鼠中52周)没有促进肝脏肿瘤形成。

[0385] 实施例9

[0386] 在体外和体内M70结合并激活FGFR4

[0387] 为了阐明强调M70不能诱发肝脏肿瘤的分子机制,对M70与FGF19的已知受体复合物的相互作用进行了评估。使用表面等离子体共振(SPR)分析来测量M70或FGF19与FGFR4的直接结合。在Biacore测定法中,M70或FGF19被用来流过涂覆有FGFR4的细胞外结构域(ECD)的Fc融合蛋白的芯片。M70以可比拟FGF19的亲和力直接相互作用于FGFR4(解离常数K_D分别=134±47nM和167±5nM,如图9A和图9B)。M70也以与FGF19类似的亲和力结合KLB(K_D分别=24.1±11.0pM和28.5±0.8pM;数据未显示)。M70与FGF19结合KLB的同一位点,这通过竞争性Biacore测定法得以证实(数据未显示)。在固相测定法中,M70与FGFR4-KLB受体复合物相互作用(图9C)。KLB的存在大大增加了配体-受体亲和力。M70结合于该FGFR4-KLB受体复合物的解离常数表示了高亲和力的相互作用,K_D为2.14nM(相对于FGF19的为2.49nM的K_D)。

[0388] 在基于细胞的测定中,使用经FGF-响应GAL-E1k1萤光素酶报道基因转染的大鼠L6细胞来评价M70激活其受体的能力(Wu等人,2011,PloS one6,e17868;Wu等人,2010a,PNAS,

107, 14158–14163)。在该测定中, 配体与FGFR的有效结合导致内源性ERK激酶途径的激活, 从而导致包含E1k-1激活结构域和GAL4DNA-结合结构域的嵌合转录活化剂的随后激活。L6细胞缺乏功能性FGFR或KLB并且当用同源受体共转染时, 仅响应于FGF19(数据未显示)。M70与FGF19同样有效地激活了共表达FGFR4和KLB的L6细胞中的细胞内信号转导途径(M70和FGF19的EC₅₀分别=38pM和52pM;图9D)。与此相反, 单独用FGFR4转染的细胞中的信号转导对任一配体都有较少的响应, 这显示加入FGF19或M70之后>500倍的效力降低(图9D)。这些结果表明, FGFR4-KLB共受体和同源配体之间的三元复合物的形成对于细胞内信号转导的有力激活是重要的。然后对人HCC细胞系Hep3B中的FGFR4途径激活进行了分析。Hep3B细胞主要表达FGFR的亚型之中的FGFR4, 以及KLB。重组M70蛋白以与野生型FGF19类似的效力和功效, 诱导了ERK的磷酸化和激活(M70和FGF19的半数最大有效浓度EC₅₀分别=0.38nM和0.37nM;图9E)。

[0389] 人类和啮齿类动物中的肝胆汁酸代谢的调节中分别牵连有FGF19/FGF15(Holt等人, 2003, Genes Dev. 17, 1581–1591)(Inagaki等人, 2005, Cell Metabol. 2, 217–225)。在一个需要FGFR4的过程中, FGF19/FGF15有力地抑制了胆固醇-7a-羟化酶1(Cyp7a1)的肝表达(Inagaki等人, 2005, Cell Metabol. 2, 217–225; Wu等人, 2011, PLoS one 6, e17868)。对M70调节原代肝细胞中的Cyp7a1的能力进行了评估。加入到培养基之后, M70有效抑制了衍生自小鼠、大鼠或人肝脏的原代肝细胞中的Cyp7a1表达(图9F)。M70的活性与野生型FGF19的活性不相上下(在原代小鼠肝细胞中, M70的半数最大抑制浓度IC₅₀为0.64pM, 对比FGF19的0.65pM;在原代大鼠肝细胞中, M70的IC₅₀为0.49pM, 对比FGF19的3.96pM;在原代人肝细胞中, M70的IC₅₀为6.80pM, 对比FGF19的1.73pM;图9F)。在原代人肝细胞中, FGF19的加入导致了97%的Cyp7a1 mRNA的最大抑制率。同样, M70能够将Cyp7a1表达减少98%(图9F)。

[0390] 为了评价在体内, M70施用对Cyp7a1的肝表达的急性作用, 以范围从0.001到10mg/kg的剂量, 对小鼠腹膜内(i. p.)注射重组M70或FGF19蛋白(图9G)。M70的单次i. p. 注射以1.29μg/kg的ED₅₀强效地抑制了Cyp7a1 mRNA(图9G)。这些数据证实, M70的全身施用可以强效和快速地触发体内FGFR4介导的细胞内。

[0391] 总之, M70和野生型FGF19表现出生物学活性方面不相上下的特性, 从而导致ERK信号转导和Cyp7a1调节的激活。

[0392] 实施例10

[0393] 与FGF19相比, M70表现出差分信号转导途径激活

[0394] M70结合FGFR4受体复合物并激活细胞内信号转导途径, 导致Cyp7a1抑制, 但在db/db或rash2小鼠模型中均不促进肝脏肿瘤形成。为了阐明缺乏致瘤潜力的分子基础, 分析了参与肿瘤发生的关键的信号转导蛋白, 包括ERK、PI3K/AKT、STAT和WNT/β-连环蛋白途径的激活。

[0395] 将M70和FGF19蛋白(1mg/kg)腹膜内注射到db/db小鼠中。15分钟(数据未显示), 2小时(图10A)和4小时(数据未示出)之后收集肝脏并通过免疫印迹测量信号转导蛋白的磷酸化。与培养的原代肝细胞中两种分子进行信号转导的能力相一致, FGF19和M70在体内肝组织中以类似的程度刺激了ERK磷酸化。与以前的关于FGF19在调节肝蛋白质合成中的作用的报告一致(Kir等人, 2011, Science 331, 1621–1624), 野生型FGF19和M70均诱导了肝脏中核糖体S6蛋白的强有力磷酸化(图10以及数据未显示)。这与M70保留了对FGFR4-KLB受体复

合物的活性的概念相符合。无论是M70还是FGF19均没有对磷酸化的AKT的肝水平产生任何影响。在测试的所有三个时间点中没有观察到GSK3 β 和 β -连环蛋白的激活。

[0396] 值得注意的是,FGF19在给药后2小时诱导了STAT3磷酸化(图10A)。这种效果持续到给药后4小时(数据未示出)。与此相反,M70没有增加STAT3磷酸化(图10A)。一种已知的STAT3活化剂IL-6被显示在经FGF19但非经M70处理的肝脏中被上调(图10B)。FGF19对pSTAT3的激活可能是由于肝脏上的非细胞自主机制,因为在蛋白注射后15分钟或在原代小鼠肝细胞培养物中没有观察到pSTAT3的诱导(数据未显示)。通过STAT3磷酸化和激活确证,增加的STAT3靶基因(包括生存素、bc1-X_L和细胞周期蛋白D1)的表达在表达FGF19,而非M70的rasH2肝脏中观察到(图10C)。由于STAT3是经常被激活于HCC的癌基因(He和Karin,2011,CellRes.21,159–168),FGF19对其的活化为FGF19诱导的肝癌发生提出了一种貌似可信的机制。M70无力激活STAT3途径,这可能有助于其在体内缺乏致瘤性。

[0397] 因此,M70只激活其受体下游的信号传导途径亚群,这是选择性调节剂的一种标志(Kenakin和Christopoulos,2013,Nat.Rev.Drug Discov.12,205–21)。M70的确认和表征使得我们能够定义由FGF19–FGFR4途径调节的两个不同的生物过程,胆汁酸稳态和肿瘤发生。

[0398] 实施例11

[0399] M70抑制FGF19诱导的肿瘤形成

[0400] 我们的观察表明,M70作为选择性调节剂或“偏爱性配体”以激活代谢信号转导而非来自FGFR4的肿瘤发生信号。下面,确定M70的偏爱性激动作用是否可以被利用,以经由正构或变构机制抑制FGF19相关的肿瘤形成。

[0401] db/db小鼠注射有AAV–FGF19的 3×10^{10} 基因组拷贝,有或没有10倍摩尔过量的AAV–M70(3×10^{11} 基因组拷贝)。转基因表达后24周对小鼠进行尸检并切除肝脏用于分析。虽然db/db小鼠中FGF19的异位表达促进了肝表面上肿瘤结节的形成(每个肝脏 7.8 ± 2.3 个肿瘤结节),来自表达FGF19和M70两者的小鼠的肝脏却是完全没有肿瘤结节的(图11A)。相比FGF19–表达小鼠,来自M70–共表达的小鼠的肝重是显著较低的(分别为 1.59 ± 0.14 g和 2.42 ± 0.20 g,n=5,p<0.01;图11B)。在M70和FGF19共同处理的小鼠中肝脏对体重比与对照小鼠的并没有显著的不同(图11C)。当单独给药时,FGF19的血清水平为 94 ± 12 ng/ml,以及FGF19和M70的联合血清水平是 453 ± 169 ng/ml(图11D)。肝脏的组织学分析证实,共表达M70和FGF19的小鼠不像FGF19–表达小鼠,并没有显示出肝脏肿瘤的任何组织学证据(图11E)。这些数据证实,M70在预防FGF19–表达小鼠中肿瘤形成方面,有效地与FGF19媲美。

[0402] 据报告,FGF19在HCC和结肠癌中被扩增和/或过表达(Desnoyers等人,2008;Sawey等人,2011,Oncogene 27,85–97)。对一组肝脏、结肠、乳腺和其他人癌细胞系进行了筛选,以及观察到FGF19由Huh-7(HCC)和HCT-116(结肠癌)细胞系等等产生和分泌(图11F),该细胞系被选择用于进一步的研究。通过ELISA测定,培养基中FGF19的水平达到了1–2ng/ml,是人体生理FGF19浓度的约10倍高。

[0403] HCC细胞系Huh-7含有11q13.3扩增子并过表达FGF19和CCND1两者。对M70对Huh-细胞的肿瘤形成能力的影响进行了测试。对无胸腺裸小鼠进行了Huh-7细胞皮下注射,并允许肿瘤达到 $\sim 100 \text{mm}^3$ 的尺寸。这时,将小鼠分为2个处理组:一组静脉内注射AAV–M70,另一组注射对照病毒。经M70处理的小鼠表现出28%的生长迟缓的趋势(末期肿瘤大小:对照物中 $1856 \pm 348 \text{mm}^3$ 对比M70处理之后 $1340 \pm 406 \text{mm}^3$;n=10;图11G)。注意到对体重无显著效果(数

据未示出)。

[0404] 也对M70对HCT-116结肠癌异种移植生长的影响进行了检测。对负荷有成型HCT116结肠癌肿瘤的小鼠进行AAV-M70或对照病毒给药。早在治疗开始后8天,M70将肿瘤生长抑制了37%(肿瘤大小:对照组中 $459 \pm 83\text{mm}^3$ 对比M70组中 $287 \pm 87\text{mm}^3$;n=5;图11H)。在治疗后第15天,经M70处理的小鼠表现出对肿瘤生长的在统计学上显著的71%抑制率(末期肿瘤大小:对照物中 $1634 \pm 524\text{mm}^3$ 对比M70处理后 $479 \pm 155\text{mm}^3$,n=5,p<0.001;图11H和11I)。观察到对体重无显著效果(图11J)。

[0405] 这些结果表明,M70用作偏爱性配体,其能够在肿瘤发生信号转导中拮抗野生型FGF19,并证实了使用选择性调节剂(如M70)来抑制FGF19依赖性肿瘤生长的潜力。

[0406] 实施例12

[0407] M70抑制了CT26结肠肿瘤生长

[0408] 进行了该项研究以进一步评估有免疫能力的小鼠的同系模型中M70对肿瘤进展的作用。CT26是小鼠结肠癌细胞系,其在同系Balb/c小鼠中移植并生长良好。CT26被广泛用于表征针对肿瘤生长的化合物/药剂,尤其用于评估癌症免疫疗法。

[0409] 使用程序性死亡-1(PD-1)的阻断性抗体作为阳性对照。PD-1及其配体PD-L1/PD-L2表示免疫检查点轴。PD-1途径通过损害T细胞反应并促进周边Foxp3+Tregs的诱导来下调肿瘤特异性免疫力。阻断该PD-1途径,并结合其他免疫疗法,抑制了同系模型中的肿瘤进展。多种人抗PD-1单克隆抗体(mAb),以及人抗PD-L1mAb,已进入临床试验,以及第一抗PD-1抗体最近已被FDA批准作为抗癌疗法。

[0410] Balb/c小鼠购自Jackson Laboratory。将动物安放无病原体的设施中。所有的动物方案得到NGM生物制药机构动物护理和使用委员会的批准。

[0411] CT26小鼠结肠癌细胞系购自ATCC。在具有10%FBS和青霉素/链霉素混合物的DMEM中培养细胞。收获成倍增长的细胞用于植入小鼠。将细胞再悬浮于注射用盐水中。

[0412] Balb/c小鼠的肋腹处植入 1×10^6 CT26细胞。三天后,将M70蛋白皮下注射到负荷有CT26植入物的Balb/c小鼠中每日一次达15天。用卡尺每周测量CT26肿瘤的生长两次。用如下公式计算肿瘤体积:肿瘤体积=宽²*长度/2。

[0413] 如图13中所示,与单独的溶媒相比,M70在施用10mg/kg剂量(图13A)或3mg/kg剂量(图13B)之后,延迟了CT26结肠癌同系小鼠模型中的肿瘤生长。在施用10mg/kg剂量(图14A)或3mg/kg剂量(图14B)之后,M70还显示使体重减少。

[0414] 因此,这些研究表明,M70治疗延迟了有免疫能力的Balb/c同系小鼠中CT26结肠肿瘤生长,对于两种剂量(3mg/kg和10mg/kg)的M70均观察到抗肿瘤功效。

[0415] *****

[0416] 本文描述了本发明的具体实施方式,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读前面的说明之后,所披露的实施方式的各种变型可能变得对于在本领域工作的个人来说显而易见的,并且预计那些技术人员可以在适当时候采用这样的变型。因此,意图是,本发明可以以与本文具体描述的方式不同的方式实施,并且本发明包括本文所附权利要求书中所述的主题的如适用法律所允许的所有修改和等同物。此外,在所有可能的变型中上述元素的任何组合被包涵于本发明中,除非本文另外指出或另外上下文明显矛盾。

[0417] 本说明书中引用的所有的出版物、专利申请、登录号和其他参考文献通过引用被

整体并入本文，如同特别地且单独地指出通过引用并入每个单独的出版物或专利申请。对于本文所讨论的出版物，仅仅提供其在本申请的申请日之前的披露内容。本文没有内容可以被解释为承认，依据在先发明，本发明没有资格先于这类出版物。此外，所提供的出版物的日期可以不同于可能需要单独确认的实际出版日期。

[0418] 序列表

[0419] 兹提交本说明书，连同序列表的计算机可读形式(CRF)的副本。该CRF被命名为13370-020-228_SEQLIST.txt，创建于2014年10月27日且大小为50,105个字节，其与序列表的纸质副本是相同的并且通过引用被全部并入本文。

<110> 恩格姆生物制药公司
雷·灵

<120> 癌症模型及相关方法

<130> 13370-020-228

<140>

<141>

<150> 61/896,473
<151> 2013-10-28

<150> 61/922,586
<151> 2013-12-31

<150> 62/067,273
<151> 2014-10-22

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> M70序列

<400> 1

[0001] Met Arg Asp Ser Ser Pro Leu Val His Tyr Gly Trp Gly Asp Pro Ile
1 5 10 15
Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys
20 25 30
Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln
35 40 45
Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val
50 55 60
Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp
65 70 75 80
Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe
85 90 95
Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys
100 105 110
His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr
115 120 125
Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro
130 135 140
Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp
145 150 155 160
Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu
165 170 175
Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
180 185 190

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FLAG-标签(或FLAG八肽)序列

<400> 2
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 3
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <223> FGF19序列

<400> 3
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
 20 25 30
 Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
 35 40 45
 Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
 50 55 60
 Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
 65 70 75 80
 Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
 85 90 95
 Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 100 105 110
 Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
 115 120 125
 Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
 130 135 140
 Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
 165 170 175
 Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
 180 185 190
 Glu Lys

[0002]

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 4
 Trp Gly Asp Pro Ile
 1 5

<210> 5
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> M5序列

<400> 5
 Arg His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 20 25 30
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly

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

<210> 6
<211> 187
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M6序列

400	6		
Arg Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Leu Arg			
1	5	10	15
His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg			
20	25	30	
Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His			
35	40	45	
Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys			
50	55	60	
Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met			
65	70	75	80
Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu			
85	90	95	
Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu			
100	105	110	
Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg			
115	120	125	
Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro			
130	135	140	
Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser			
145	150	155	160
Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly			
165	170	175	
Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys			
180	185		

<210> 7
<211> 192
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M7序列

400	7		
Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly			
1	5	10	15
Gln Val Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser			

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

<210> 8
<211> 191
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M14序列

<400> 8
 Arg His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro His Val His Tyr Gly Gly Gln
 [0004] 1 5 10 15
 Val Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 20 25 30
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly
 35 40 45
 Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr
 50 55 60
 Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala
 85 90 95
 Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu
 100 105 110
 Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu
 130 135 140
 Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly
 165 170 175
 Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

<210> 9
<211> 192
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M15序列

<400> 9
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Gly

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

<210> 10
<211> 191
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M32序列

[0005] <400> 10

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

<210> 11
<211> 191
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M36序列

<400> 11
 Arg His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Asn
 1 5 10 15
 Val Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 20 25 30
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly
 35 40 45
 Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr
 50 55 60
 Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala
 85 90 95
 Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu
 100 105 110
 Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu
 130 135 140
 Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly
 165 170 175
 Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

<210> 12
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0006] <220>
 <223> M43序列

<400> 12
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Gly
 1 5 10 15
 Asp Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser
 20 25 30
 Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg
 35 40 45
 Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg
 50 55 60
 Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys
 85 90 95
 Ala Phe Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser
 100 105 110
 Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln
 115 120 125
 Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met
 130 135 140
 Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu
 145 150 155 160
 Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe
 165 170 175
 Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

<210> 13
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> M50序列

<400> 13
 Arg His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Asp Gln
 1 5 10 15
 Val Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser
 20 25 30
 Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly
 35 40 45
 Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr
 50 55 60
 Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala
 85 90 95
 Phe Glu Glu Glu Ile Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu
 100 105 110
 Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu
 130 135 140
 Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser
 145 150 155 160
 Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly
 165 170 175
 Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

<210> 14

<211> 187

<212> PRT

<213> 人工序列

[0007]

<220>

<223> M52序列

<400> 14
 Arg Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Trp Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg
 1 5 10 15
 His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg
 20 25 30
 Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His
 35 40 45
 Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys
 50 55 60
 Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu
 85 90 95
 Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu
 100 105 110
 Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg
 115 120 125
 Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro
 130 135 140
 Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly
 165 170 175
 Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185

<210> 15

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> M53序列

<400> 15

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

[0008]

<210> 16

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> M67序列

<400> 16

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

<210> 17
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M68序列

<400> 17
Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Trp Gly
1 5 10 15
Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu
20 25 30
Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala
35 40 45
Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu
50 55 60
Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met
65 70 75 80
Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp
85 90 95
Cys Ala Phe Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg
100 105 110
Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg
115 120 125
Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro
130 135 140
Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu
145 150 155 160
Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro
165 170 175
Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu
180 185 190
Lys

[0009]

<210> 18
<211> 189
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M69序列

<400> 18
Arg Asp Ser Ser Pro Leu Val His Tyr Trp Gly Asp Pro Ile Arg
1 5 10 15
Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe
20 25 30
Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser
35 40 45
Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala
50 55 60
Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly
65 70 75 80
Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu
85 90 95
Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His
100 105 110
Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys
115 120 125
Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met
130 135 140
Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met
145 150 155 160
Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val
165 170 175
Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys

180

185

<210> 19
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> M70序列
 <400> 19
 Met Arg Asp Ser Ser Pro Leu Val His Tyr Gly Trp Gly Asp Pro Ile
 1 5 10 15
 Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys
 20 25 30
 Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln
 35 40 45
 Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val
 50 55 60
 Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe
 85 90 95
 Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys
 100 105 110
 His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr
 115 120 125
 Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro
 130 135 140
 Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp
 145 150 155 160
 Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu
 165 170 175
 Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190
 [0010]

<210> 20
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> M75序列

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

		165	170	175
	Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys			
	180			
	<210> 21			
	<211> 179			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> M76序列			
	<400> 21			
	Arg Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His			
	1 5 10 15			
	Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp			
	20 25 30			
	Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val			
	35 40 45			
	Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu			
	50 55 60			
	Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu			
	65 70 75 80			
	Glut Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val			
	85 90 95			
[0011]	Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys			
	100 105 110			
	Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe			
	115 120 125			
	Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly			
	130 135 140			
	His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met			
	145 150 155 160			
	Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser			
	165 170 175			
	Phe Glu Lys			
	<210> 22			
	<211> 175			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> M77序列			
	<400> 22			
	Arg Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser			
	1 5 10 15			
	Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly			
	20 25 30			
	Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr			
	35 40 45			
	Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala			
	50 55 60			
	Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala			
	65 70 75 80			
	Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu			
	85 90 95			
	Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu			
	100 105 110			
	Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu			
	115 120 125			
	Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser			
	130 135 140			
	Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly			
	145 150 155 160			

Leu	Val	Thr	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Arg	Ser	Pro	Ser	Phe	Glu	Lys
				165				170					175	

<210> 23
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M83序列

<400> 23
Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Ala Pro His Val His Tyr Gly Trp
1 5 10 15
Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
20 25 30
Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
35 40 45
Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
50 55 60
Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
65 70 75 80
Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
85 90 95
Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
100 105 110
Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
115 120 125
Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
130 135 140
Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
145 150 155 160
Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
165 170 175
Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
180 185 190
Glu Lys

[0012]

<210> 24
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M84序列

<400> 24
Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Ala His Val His Tyr Gly Trp
1 5 10 15
Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
20 25 30
Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
35 40 45
Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
50 55 60
Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
65 70 75 80
Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
85 90 95
Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
100 105 110
Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
115 120 125
Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
130 135 140
Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His

145 150 155 160
 Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
 165 170 175
 Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
 180 185 190
 Glu Lys

<210> 25
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M140序列

<400> 25
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
 20 25 30
 Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
 35 40 45
 Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
 50 55 60
 Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
 65 70 75 80
 Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
 85 90 95
 Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 100 105 110
 Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
 115 120 125
 Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
 130 135 140
 Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
 165 170 175
 Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
 180 185 190
 Glu Lys

[0013]

<210> 26
<211> 190
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M144 (M5-R)序列

<400> 26
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln val
 1 5 10 15
 Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys
 20 25 30
 Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln
 35 40 45
 Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val
 50 55 60
 Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe
 85 90 95
 Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys
 100 105 110

His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr
 115 120 125
 Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro
 130 135 140
 Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp
 145 150 155 160
 Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu
 165 170 175
 Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

<210> 27
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> M145 (M6-R) 序列

<400> 27
 Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Leu Arg His
 1 5 10 15
 Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile
 20 25 30
 Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser
 35 40 45
 Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly
 50 55 60
 Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln
 65 70 75 80
 Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe Glu Glu Ile
 85 90 95
 Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro
 100 105 110
 Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly
 115 120 125
 Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu
 130 135 140
 Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser
 145 150 155 160
 Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu
 165 170 175
 Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185

<210> 28
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> M146 (M50-R) 序列

<400> 28
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Asp Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly Leu Ser Ser Cys
 20 25 30
 Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys Ala Arg Gly Gln
 35 40 45
 Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala Leu Arg Thr Val
 50 55 60
 Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys Met Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu Asp Cys Ala Phe
 85 90 95

Glu Glu Glu Ile Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Arg Ser Glu Lys
 100 105 110
 His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln Arg Gln Leu Tyr
 115 120 125
 Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu Pro Met Leu Pro
 130 135 140
 Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His Leu Glu Ser Asp
 145 150 155 160
 Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp Pro Phe Gly Leu
 165 170 175
 Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe Glu Lys
 180 185 190

<210> 29
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M160序列

<400> 29
 Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp
 1 5 10 15
 Gly Asp Pro Ile Arg Gln Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
 20 25 30
 Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
 35 40 45
 Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
 50 55 60
 Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
 65 70 75 80
 Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
 85 90 95
 Asp Cys Ala Phe Glu Glu Ile Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
 100 105 110
 Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
 115 120 125
 Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
 130 135 140
 Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
 165 170 175
 Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
 180 185 190
 Glu Lys

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 TAT的第47-57个残基

<400> 30
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 31

Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Thr	Ser	Lys	Leu	Met	Lys	Arg
1					5				10		

<210> 32

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 32

Gly	Trp	Thr	Leu	Asn	Ser	Ala	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gly	Lys	Ile	Asn	Leu
1				5				10				15			
Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Lys	Lys	Ile	Leu					
					20				25						

<210> 33

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 33

Lys	Ala	Leu	Ala	Trp	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala
1				5			10			15					
Leu	Ala	Lys	His	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Lys	Cys	Glu
				20			25			30					
Ala															

[0016]

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 34

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5				10			15				

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 35

Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5				

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> 合成肽

<400> 36

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
1 5

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 37

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 38

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 39

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 40

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400> 40

ccgactagtc accatgcgga gcgggtgtgt gg

32

<210> 41

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

[0018]

<400> 41
ataagaatgc ggccgcttac ttctcaaagc tggactcct c 41

<210> 42
<211> 202
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 42
Arg Pro Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro His Val His Tyr Gly Trp
1 5 10 15
Gly Asp Pro Ile Arg Leu Arg His Leu Tyr Thr Ser Gly Pro His Gly
20 25 30
Leu Ser Ser Cys Phe Leu Arg Ile Arg Ala Asp Gly Val Val Asp Cys
35 40 45
Ala Arg Gly Gln Ser Ala His Ser Leu Leu Glu Ile Lys Ala Val Ala
50 55 60
Leu Arg Thr Val Ala Ile Lys Gly Val His Ser Val Arg Tyr Leu Cys
65 70 75 80
Met Gly Ala Asp Gly Lys Met Gln Gly Leu Leu Gln Tyr Ser Glu Glu
85 90 95
Asp Cys Ala Phe Glu Glu Glu Ile Arg Pro Asp Gly Tyr Asn Val Tyr
100 105 110
Arg Ser Glu Lys His Arg Leu Pro Val Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gln
115 120 125
Arg Gln Leu Tyr Lys Asn Arg Gly Phe Leu Pro Leu Ser His Phe Leu
130 135 140
Pro Met Leu Pro Met Val Pro Glu Glu Pro Glu Asp Leu Arg Gly His
145 150 155 160
Leu Glu Ser Asp Met Phe Ser Ser Pro Leu Glu Thr Asp Ser Met Asp
165 170 175
Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Leu Glu Ala Val Arg Ser Pro Ser Phe
180 185 190
Glu Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
195 200

FGF19 (SEQ ID NO:42):

RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGW
 DCARQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSQLGADGKMQQLL
 QYSEEDCAFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFL
 PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE
AVRSPSFEKDYKDDDK

图1

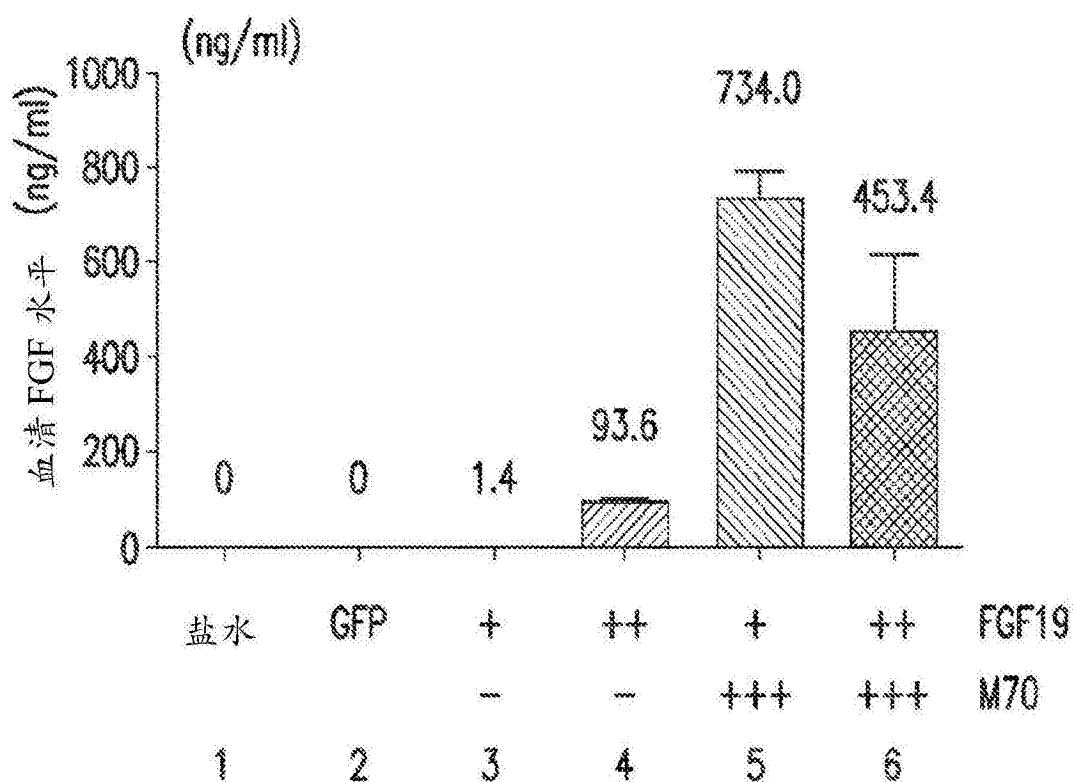


图2

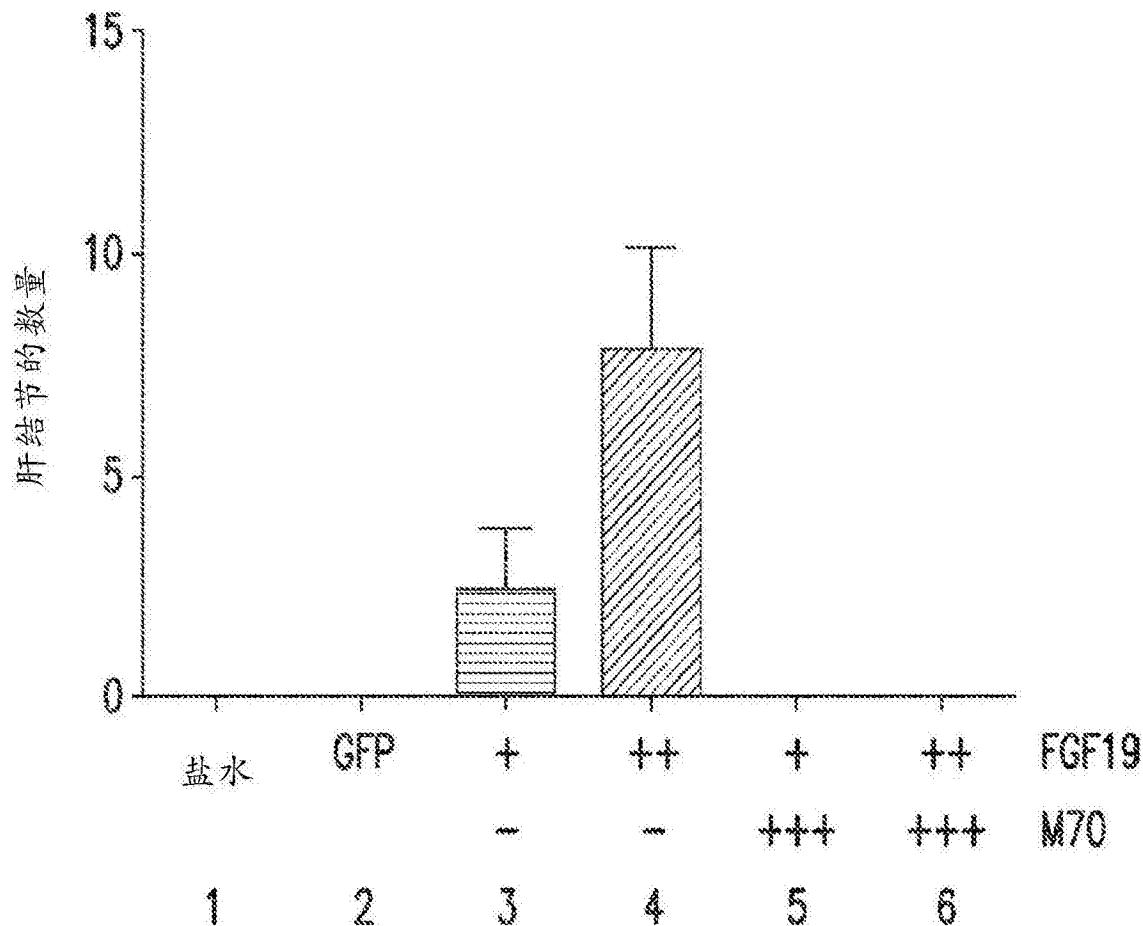


图3

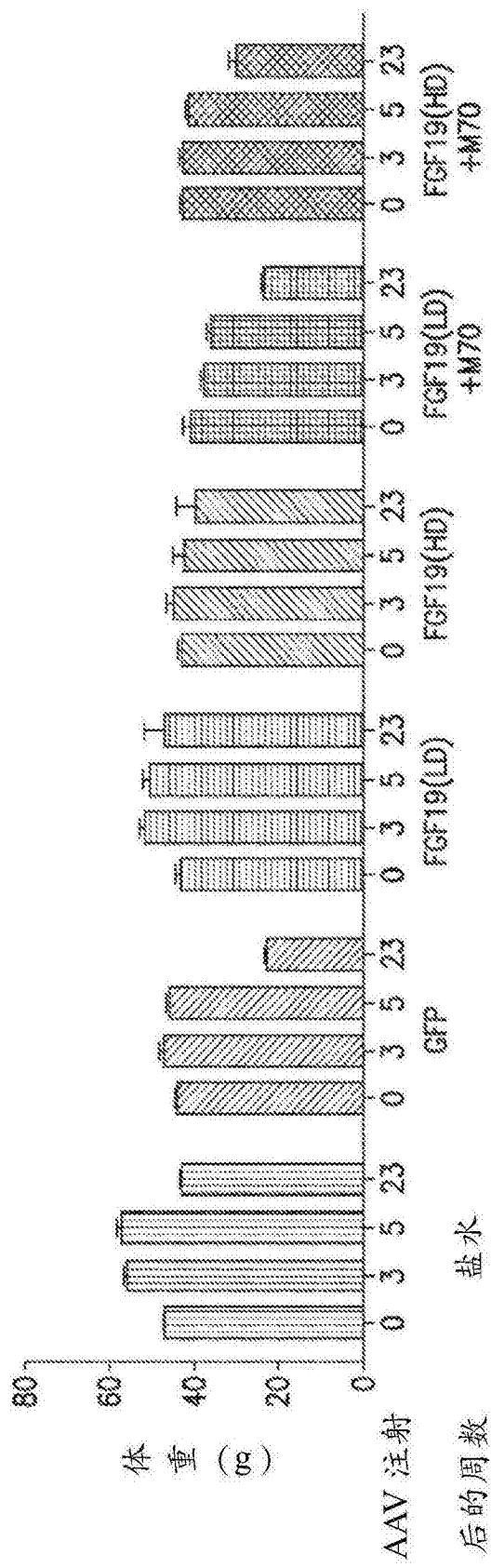


图4

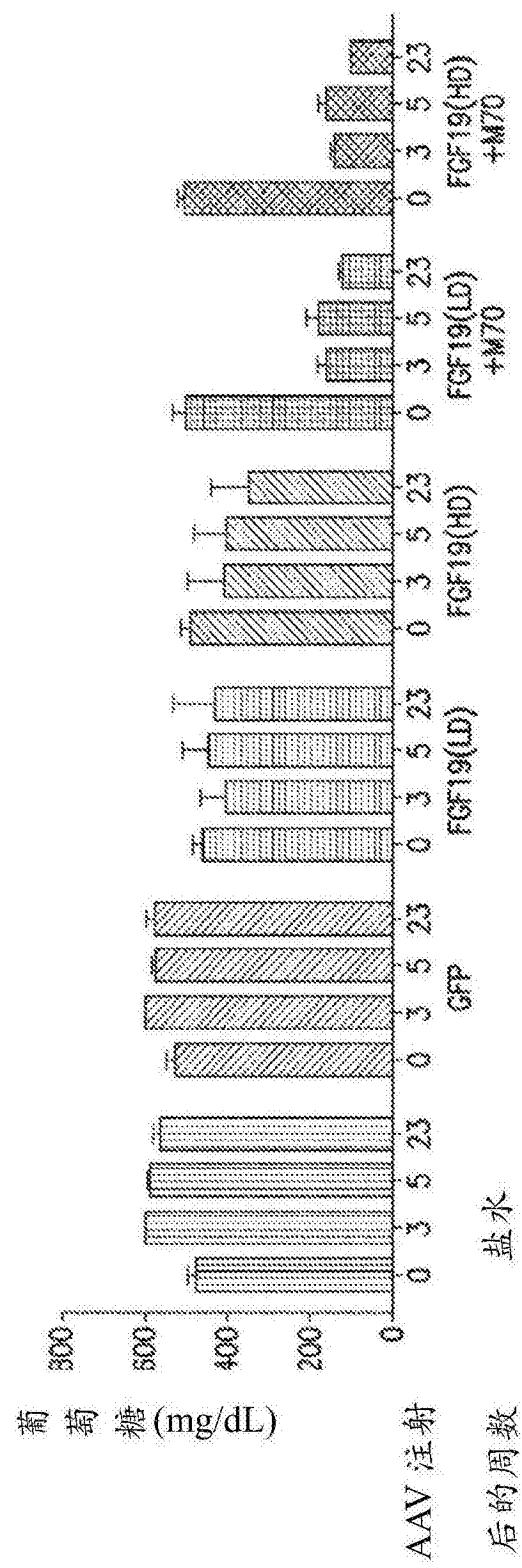
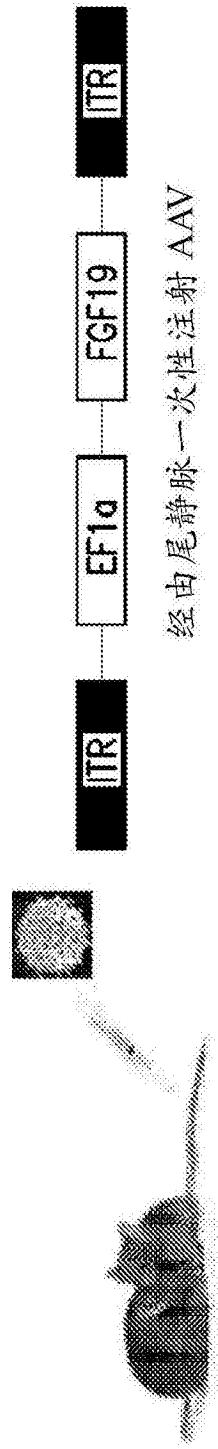


图5



经由尾静脉一次性注射AAV

↓ 24 或 52 周

评价肿瘤负荷

对照

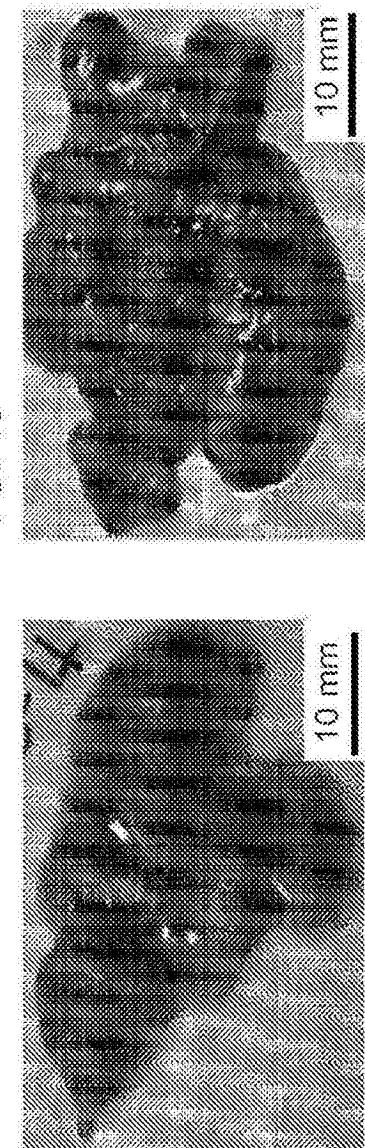


图6B

图6A

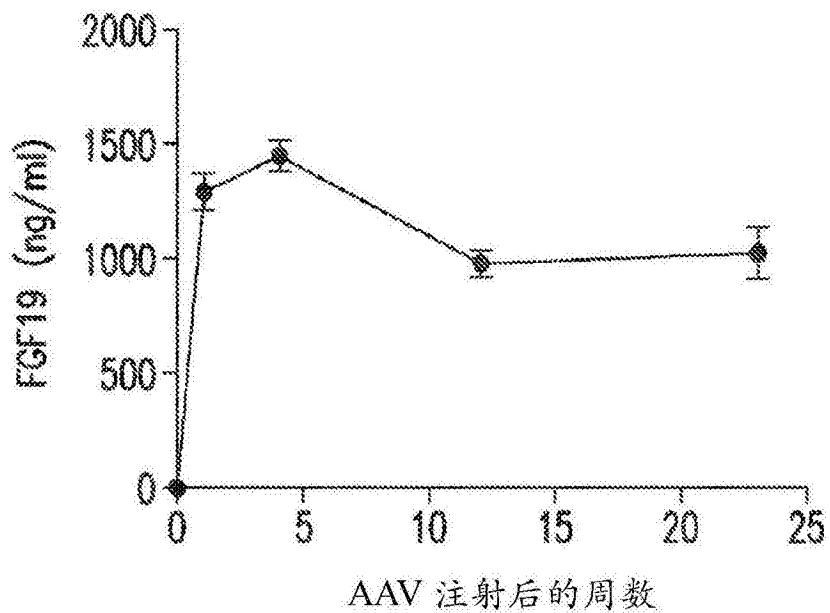


图6C

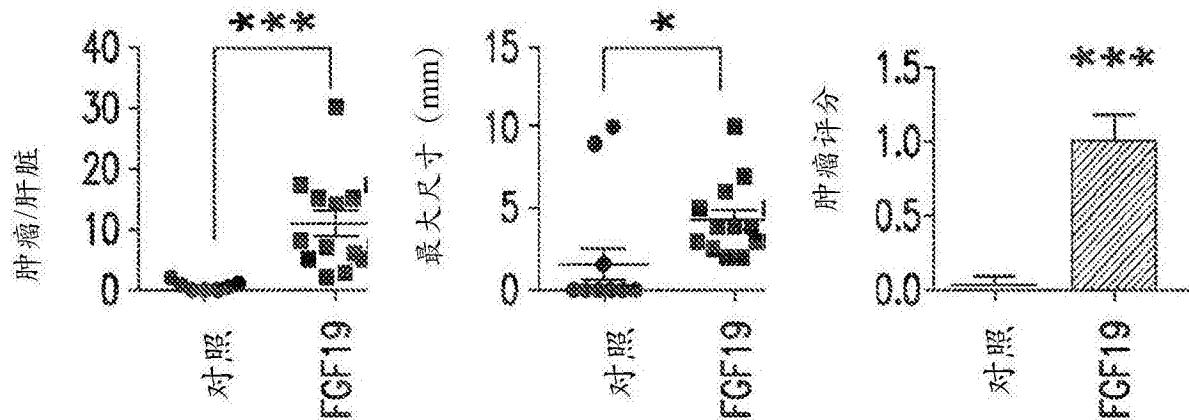


图6D

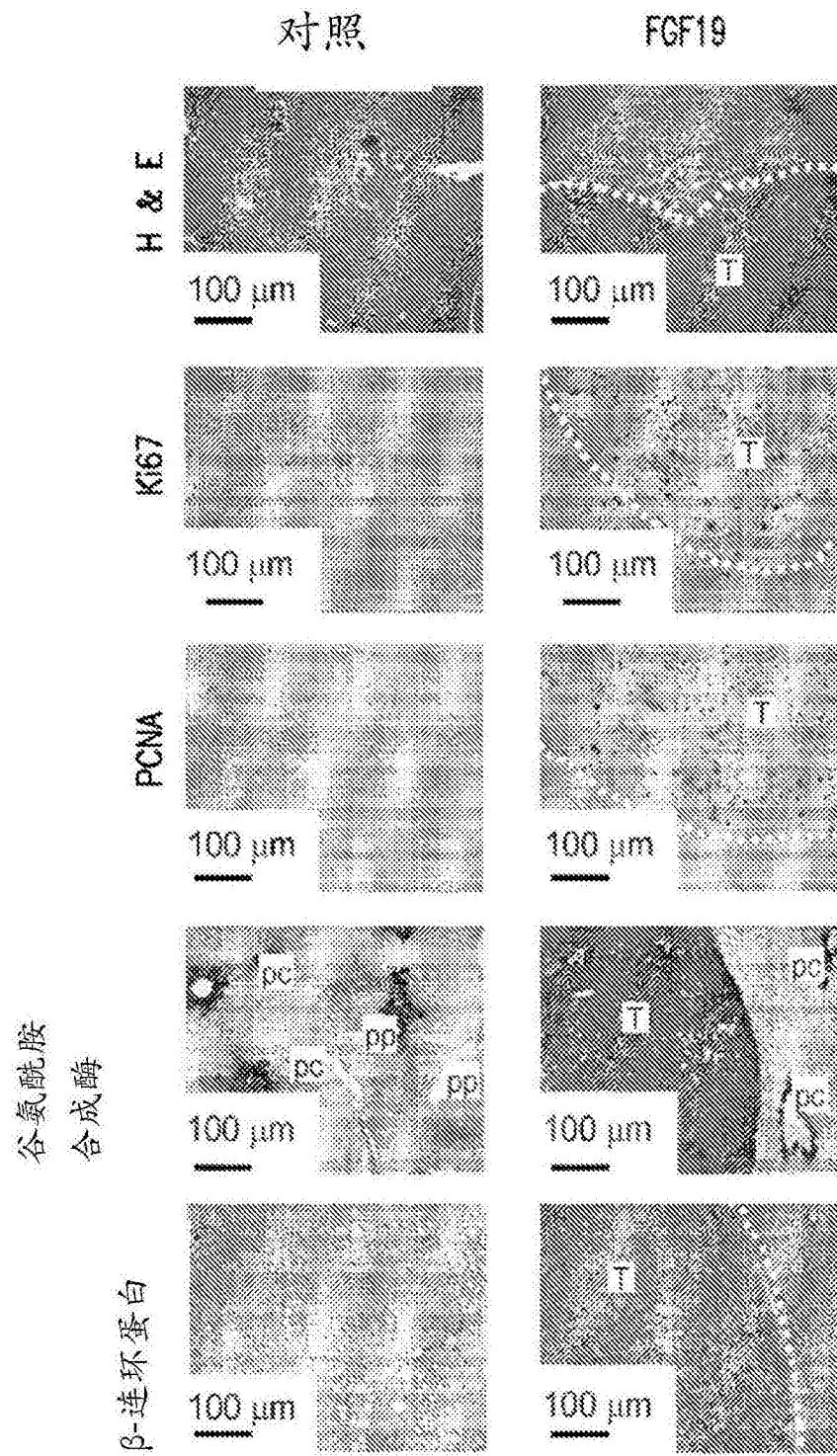


图6E

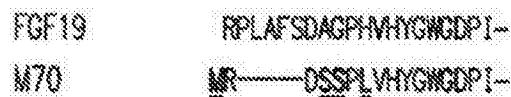


图 7A

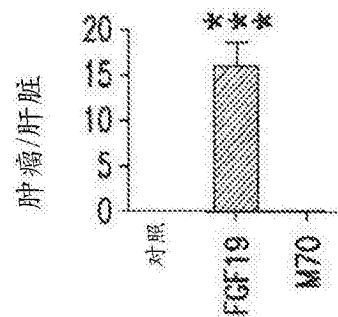


图 7B

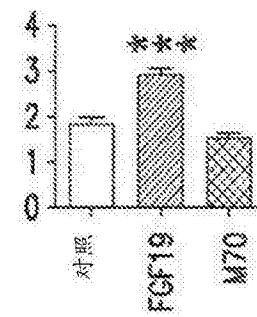


图 7C

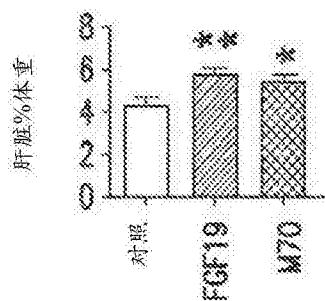


图 7D

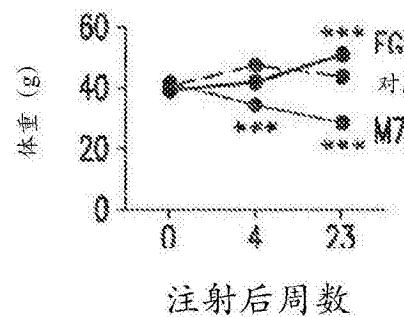


图 7E

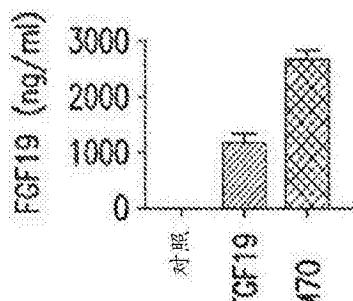


图 7F

图 7G

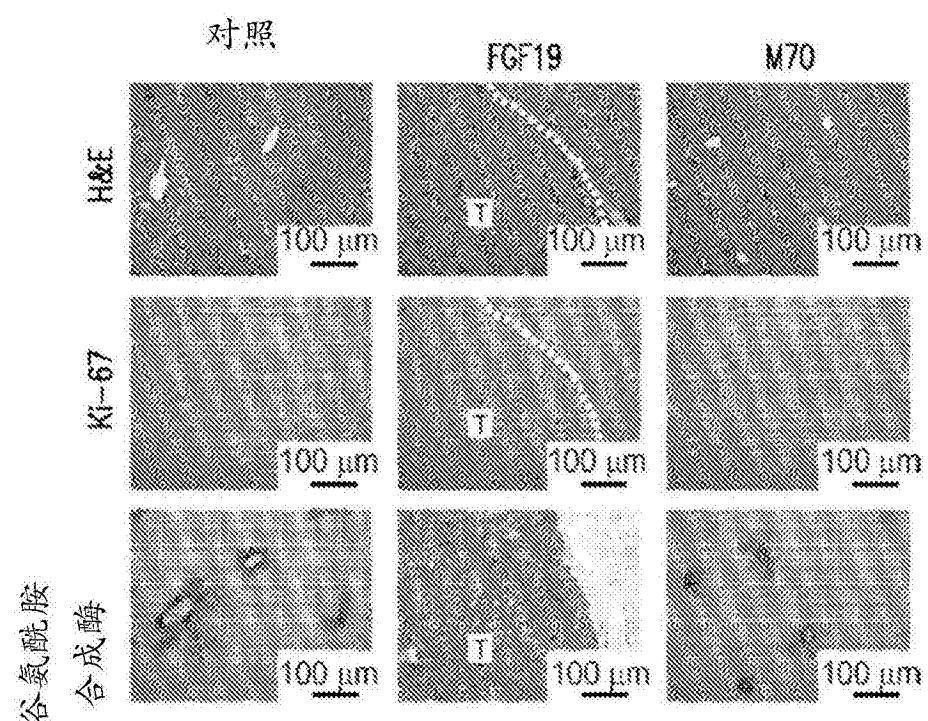


图 7G

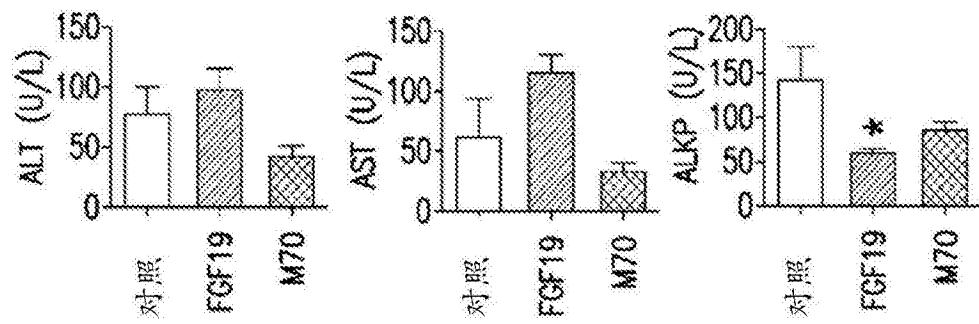


图 7H

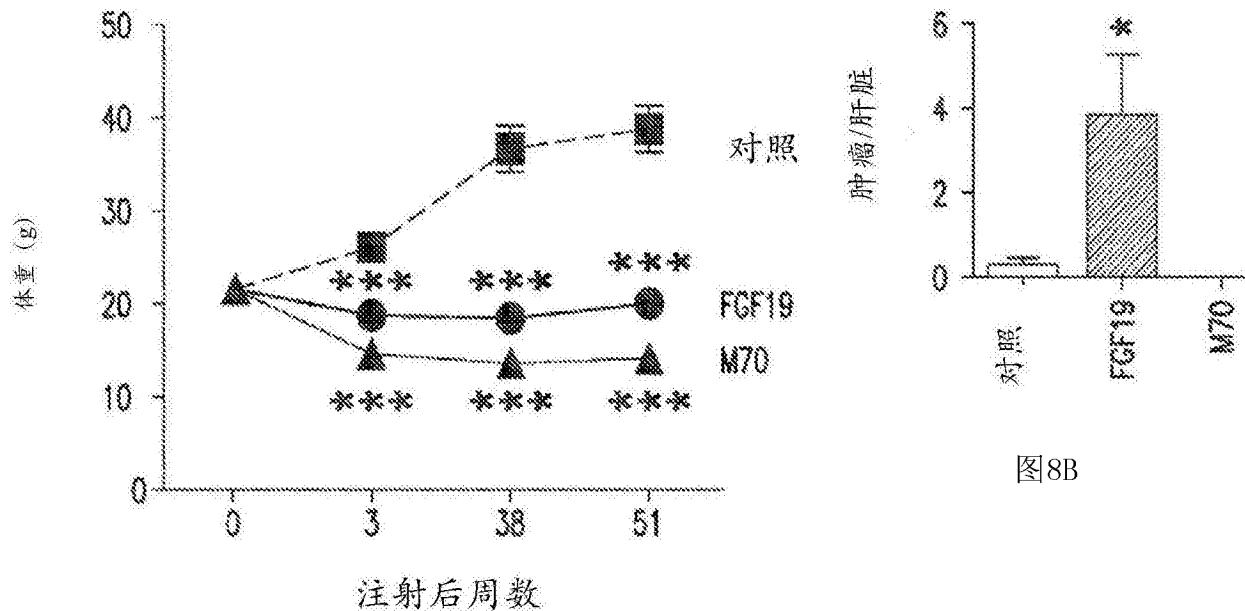


图 8B

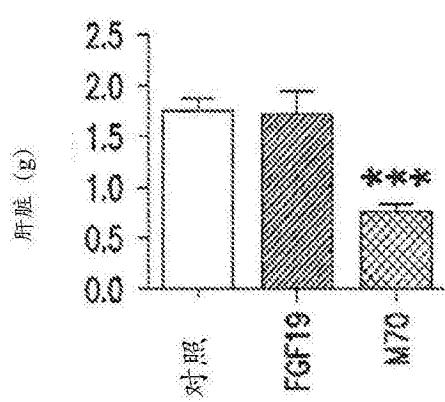


图 8C

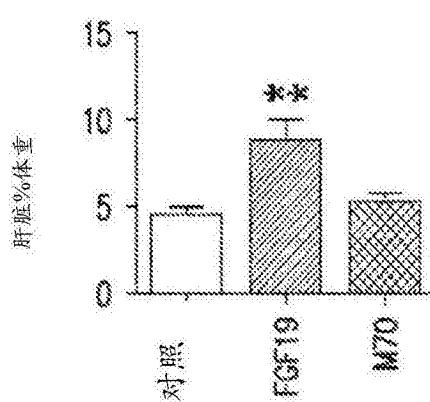


图 8D

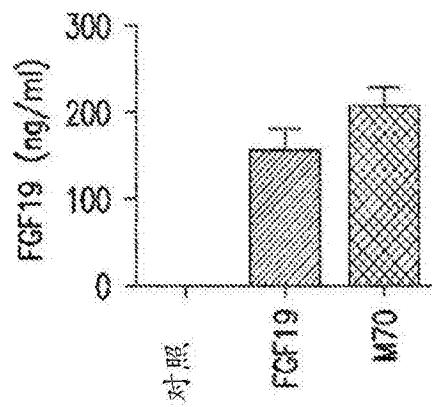


图8E

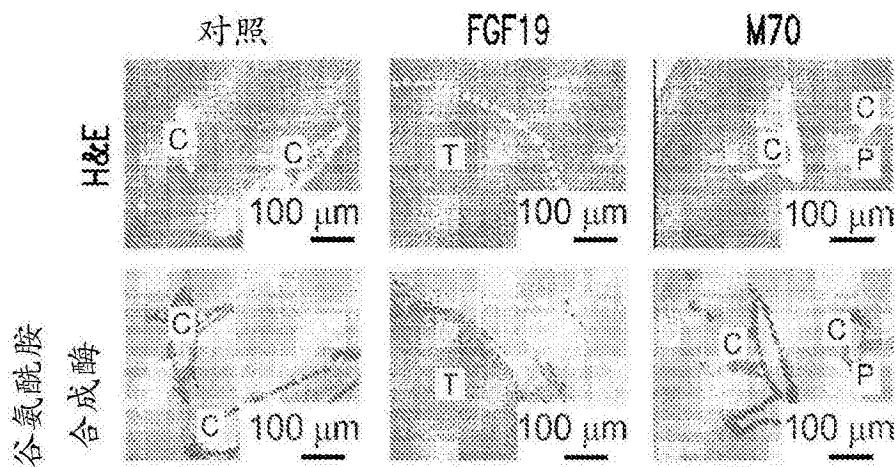


图8F

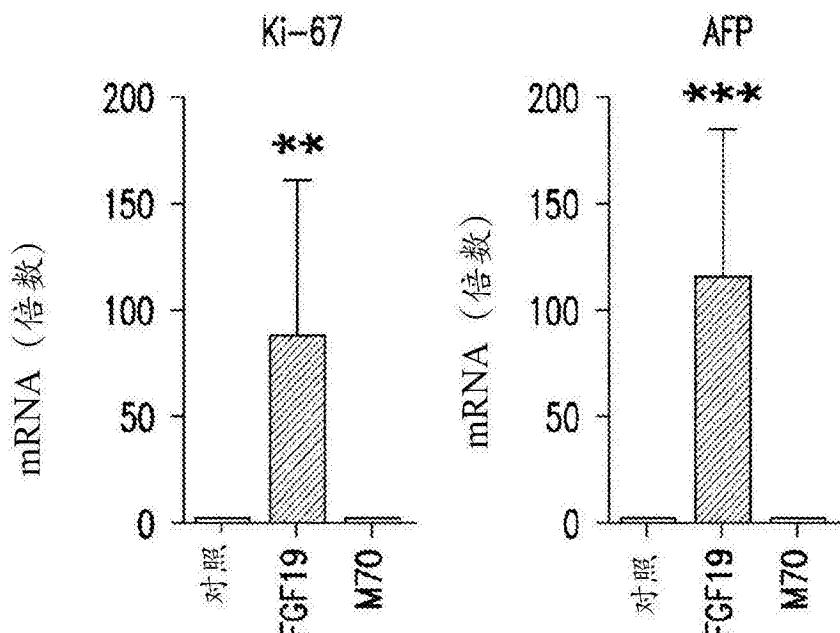


图8G

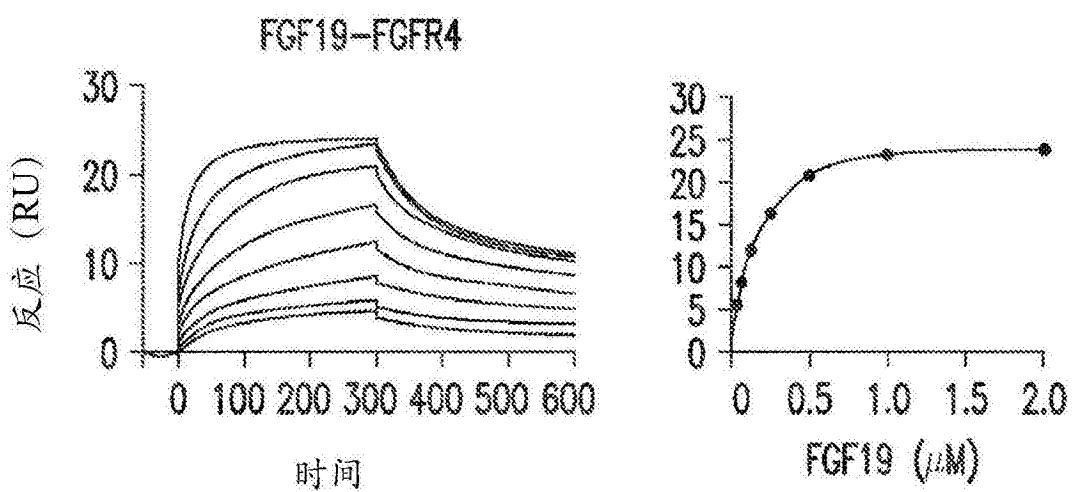


图9A

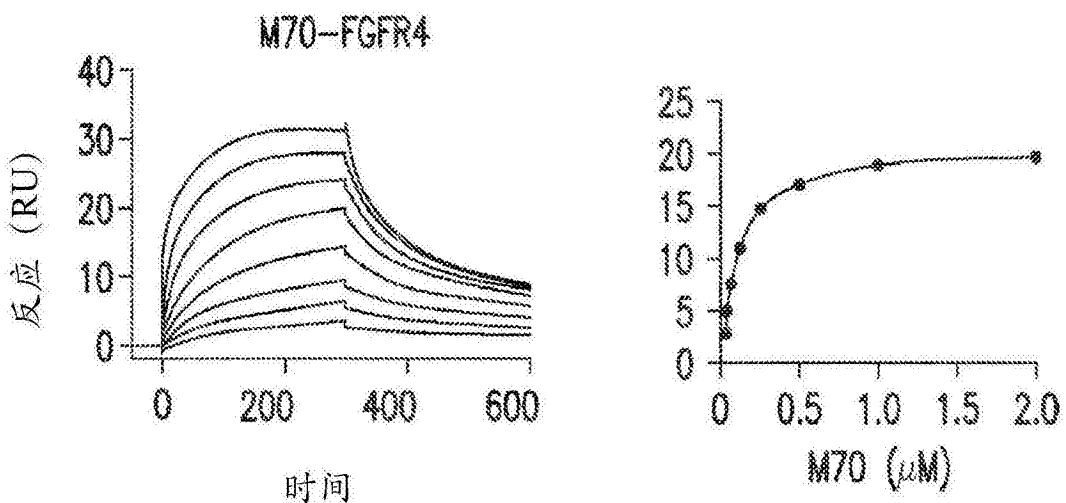


图9B

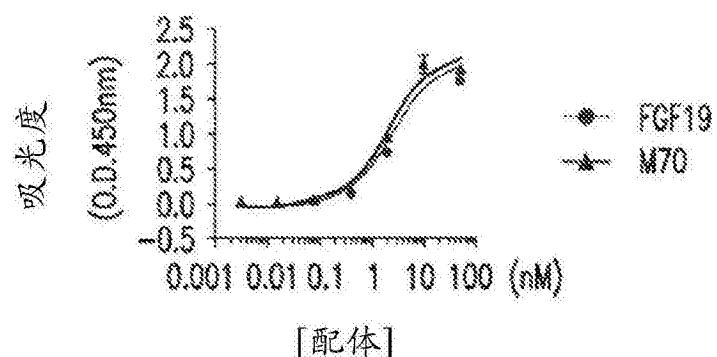


图9C

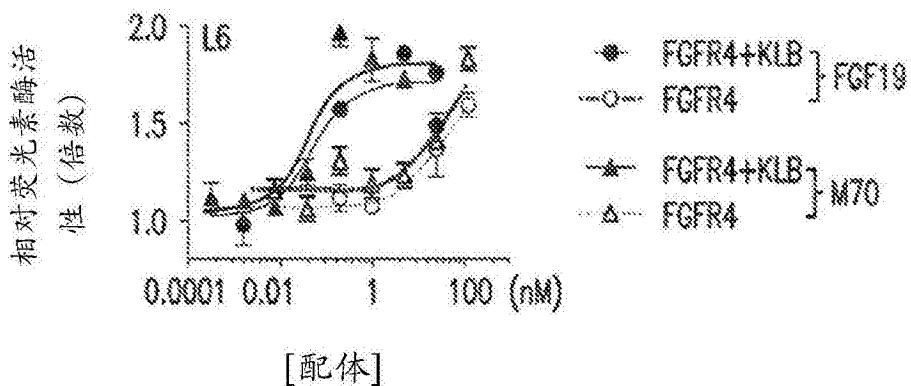


图9D

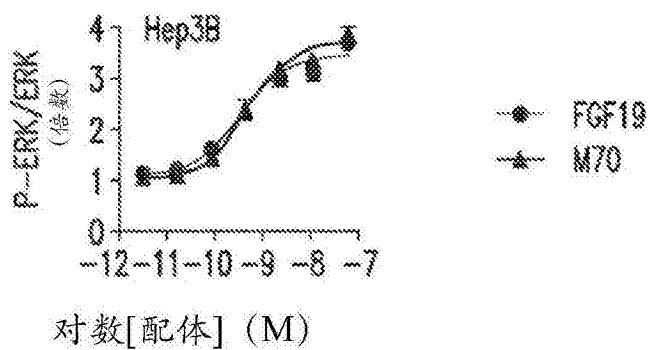


图9E

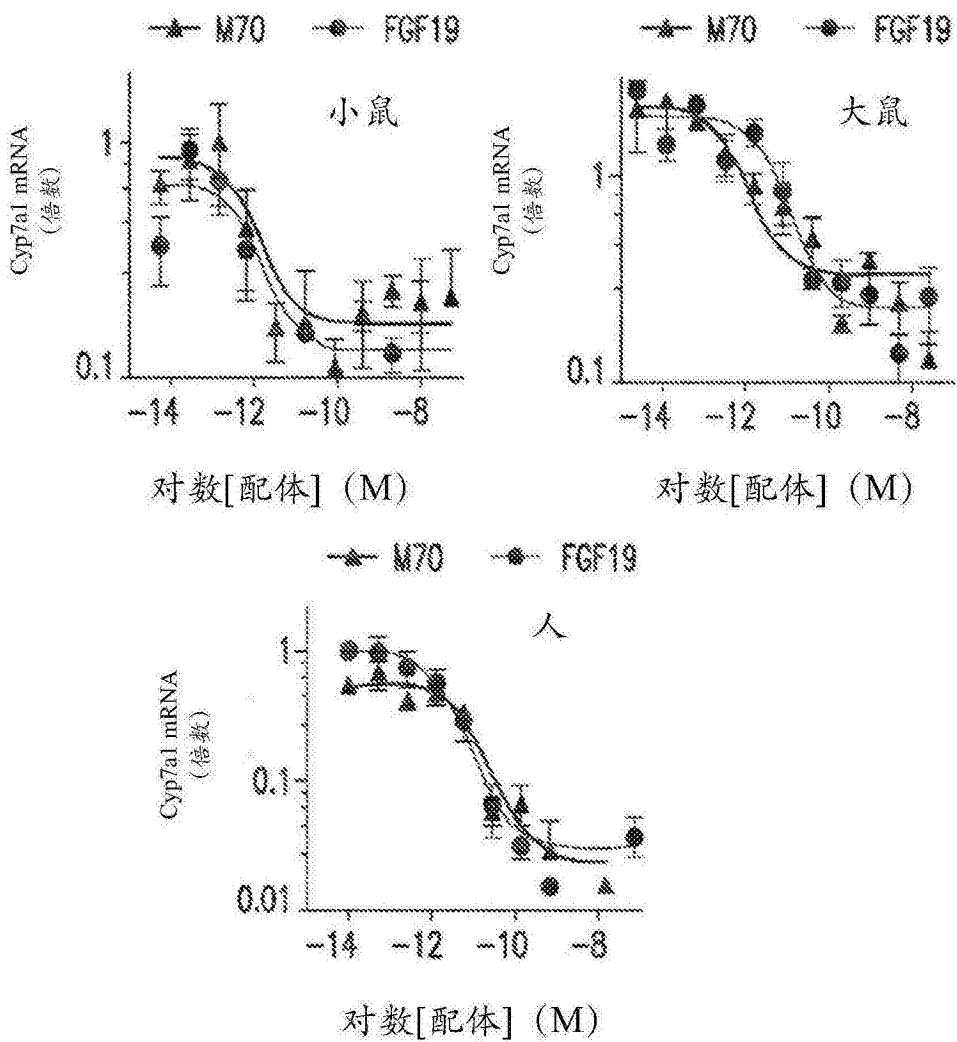


图9F

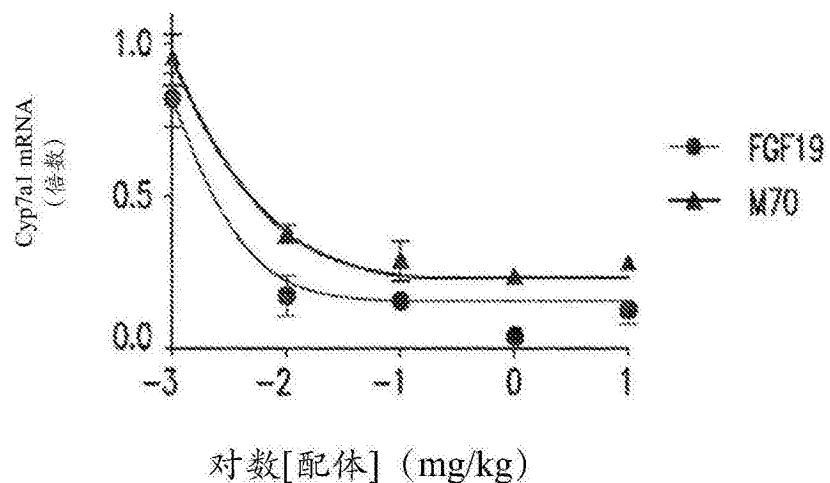


图9G

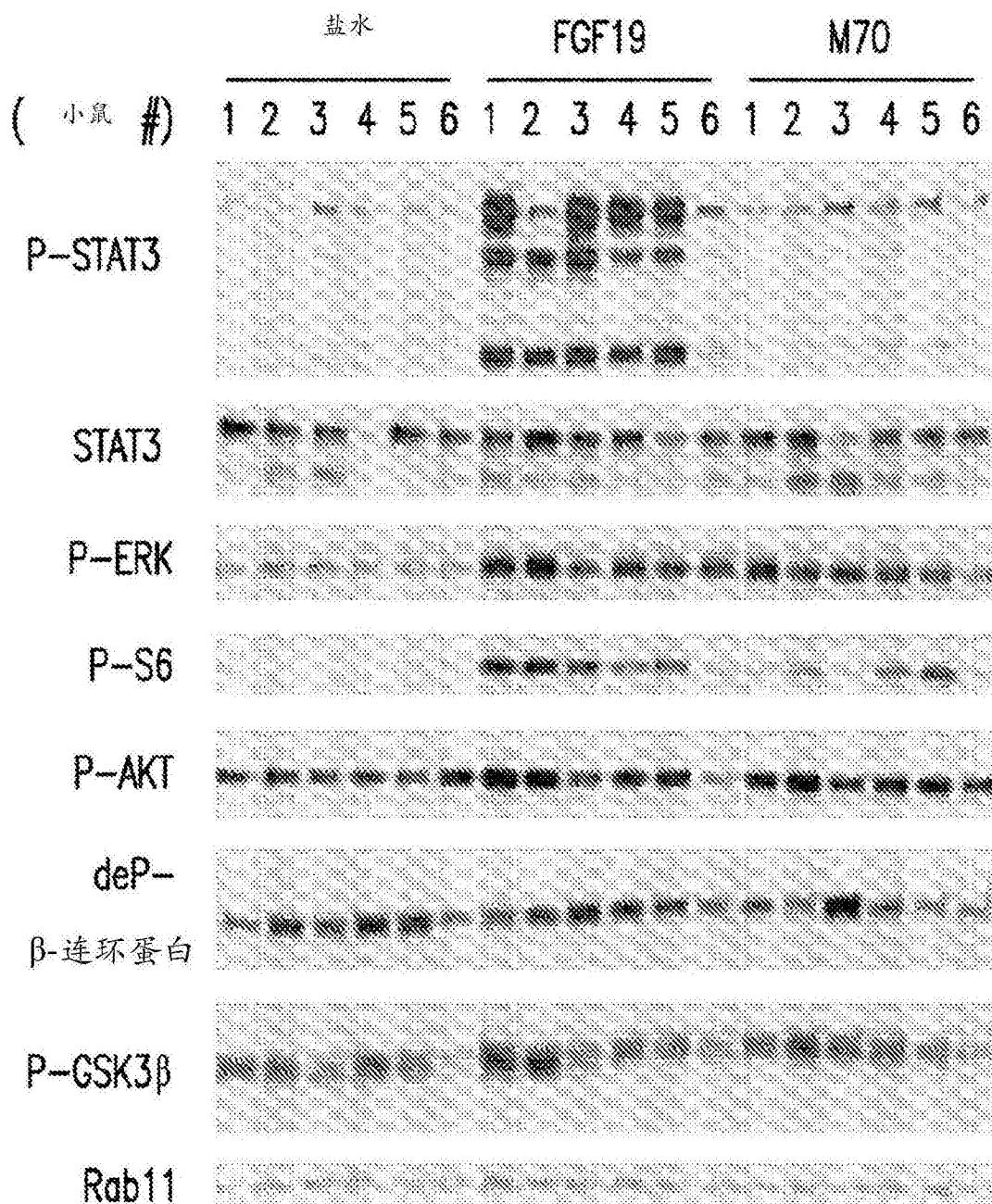


图10A

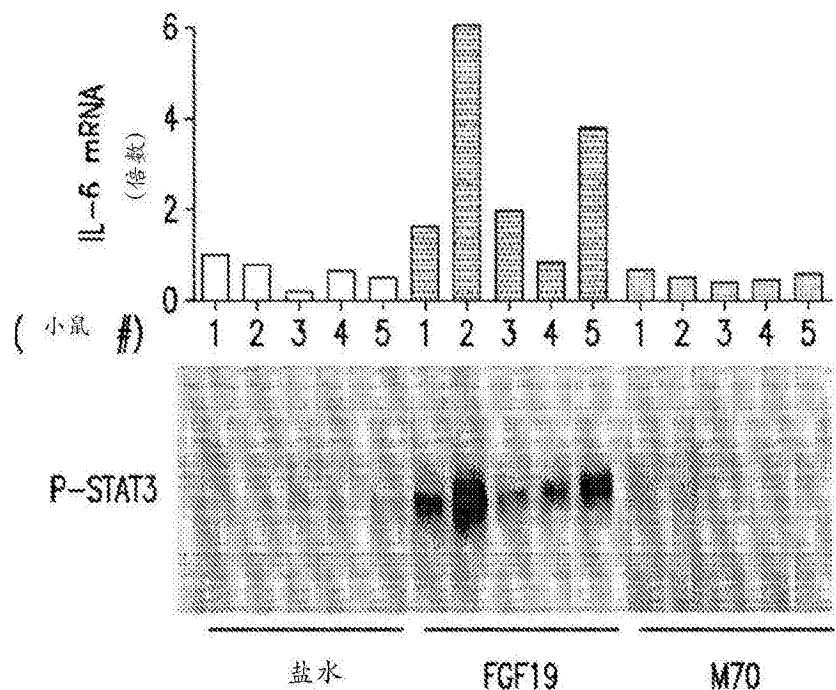


图10B

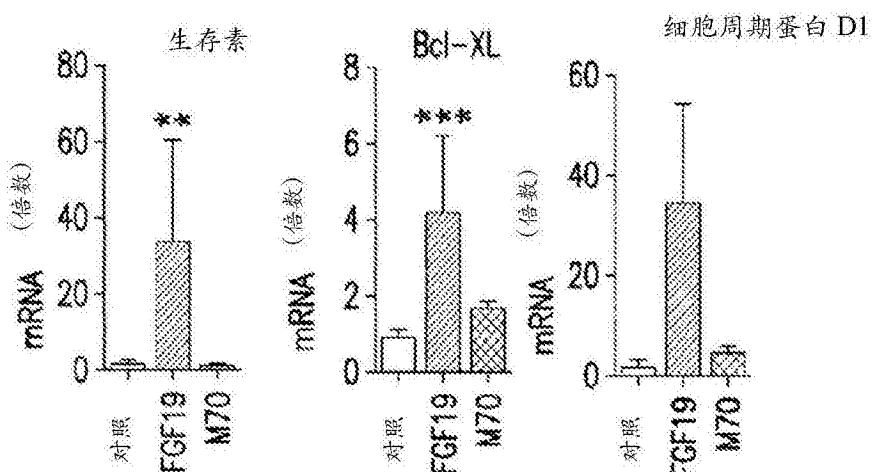


图10C

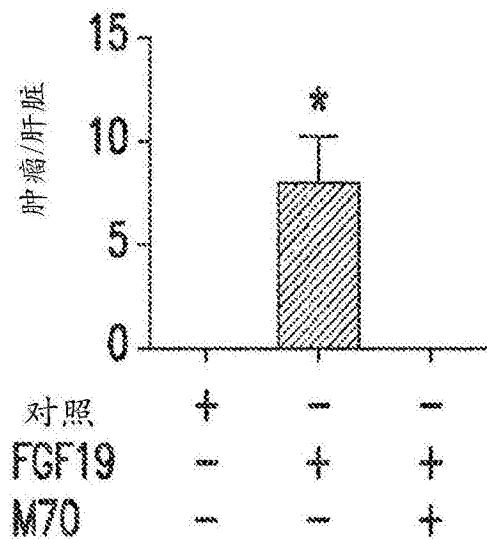


图11A

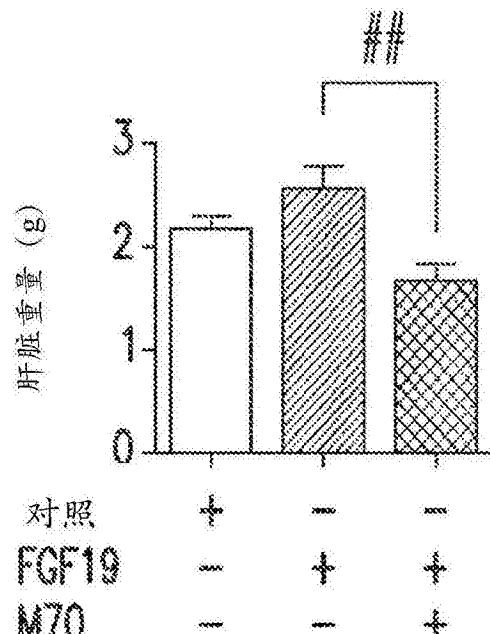


图11B

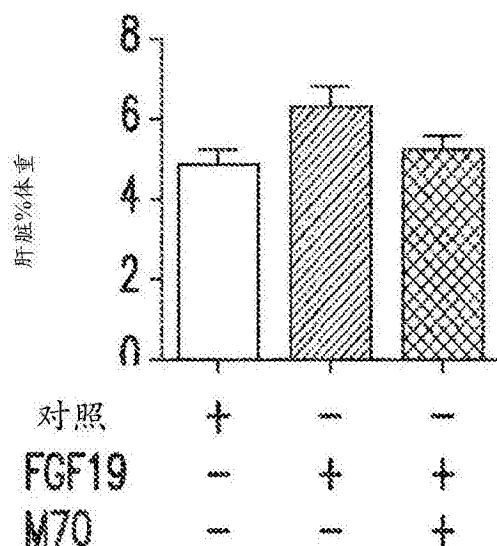


图11C

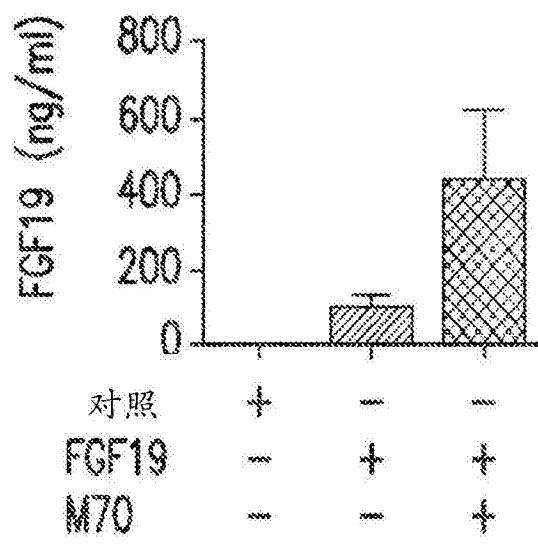


图11D

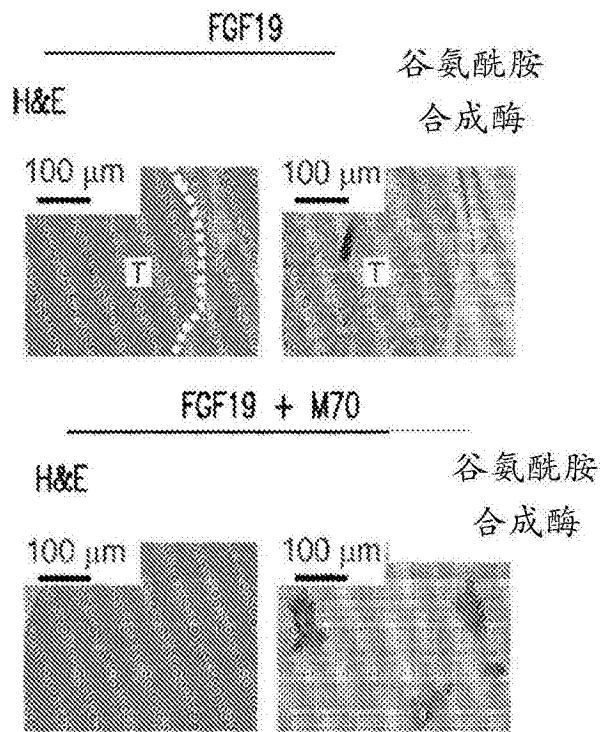


图11E

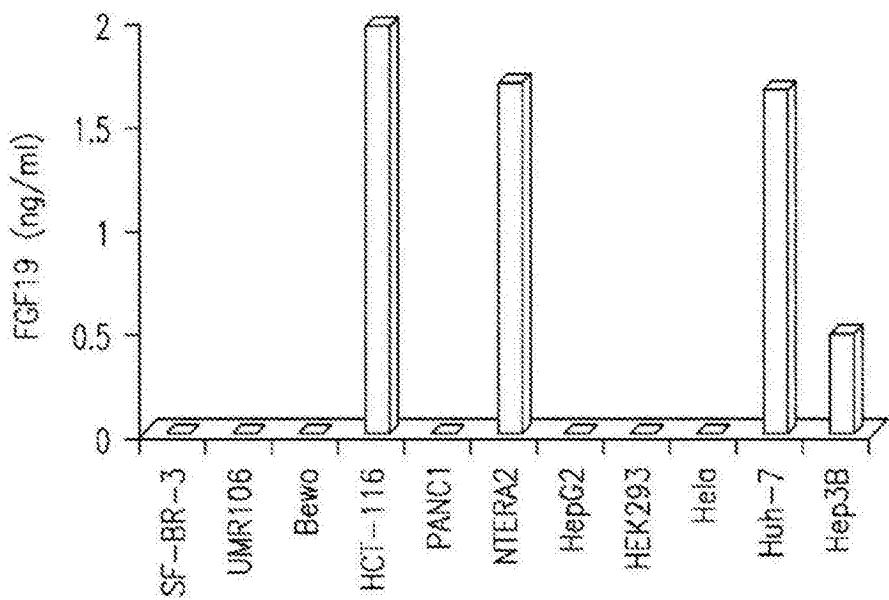


图11F

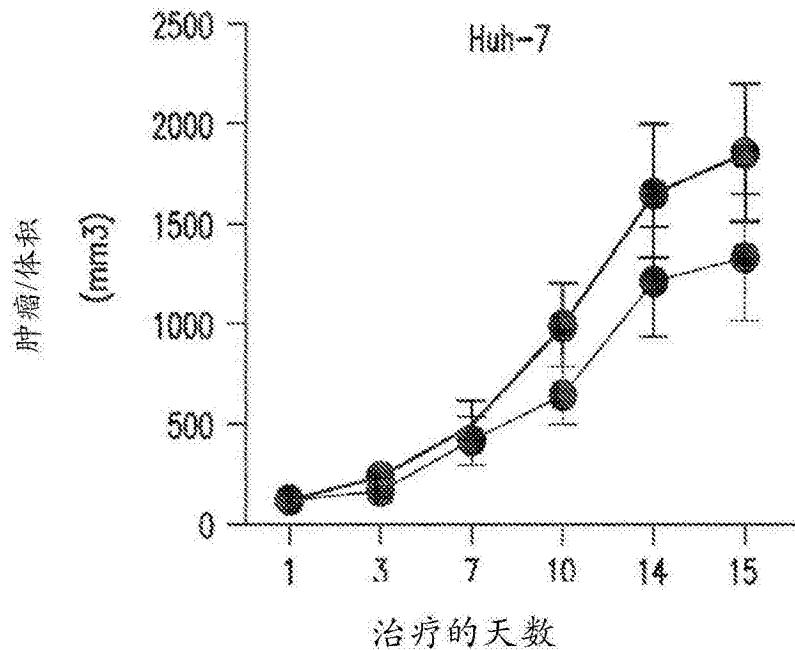


图11G

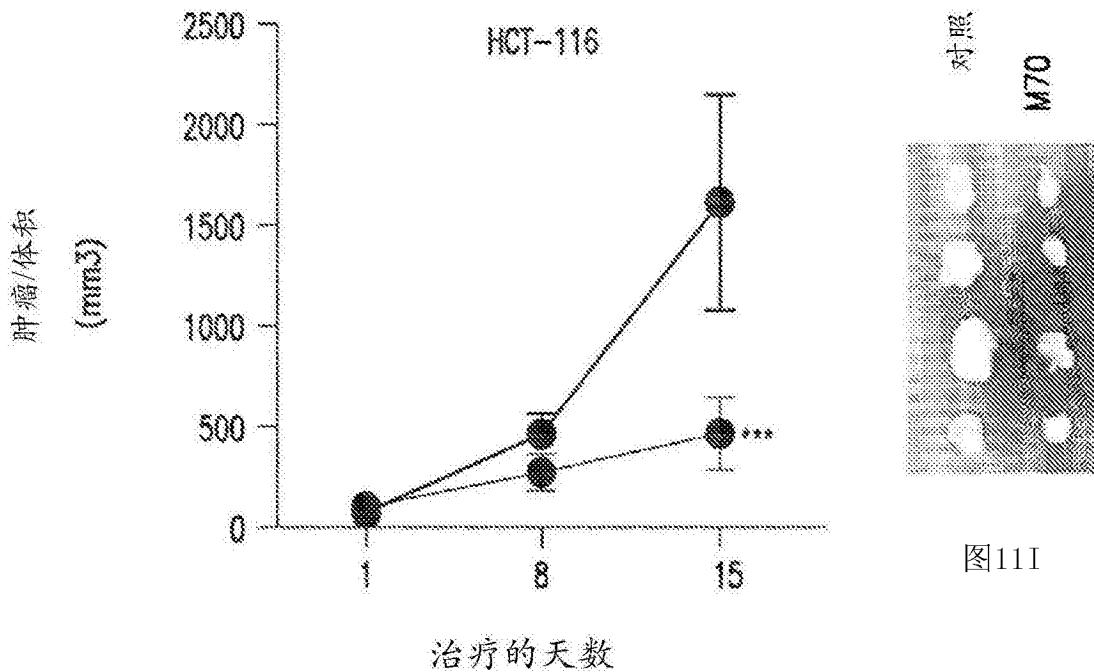


图11H

图11I

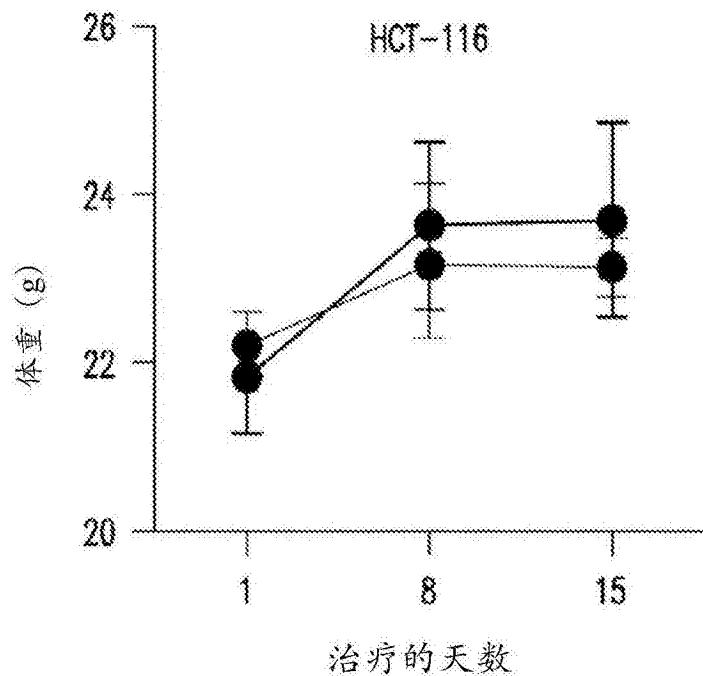


图11J

慢性肝损伤
(胆汁郁积、肝硬化等)

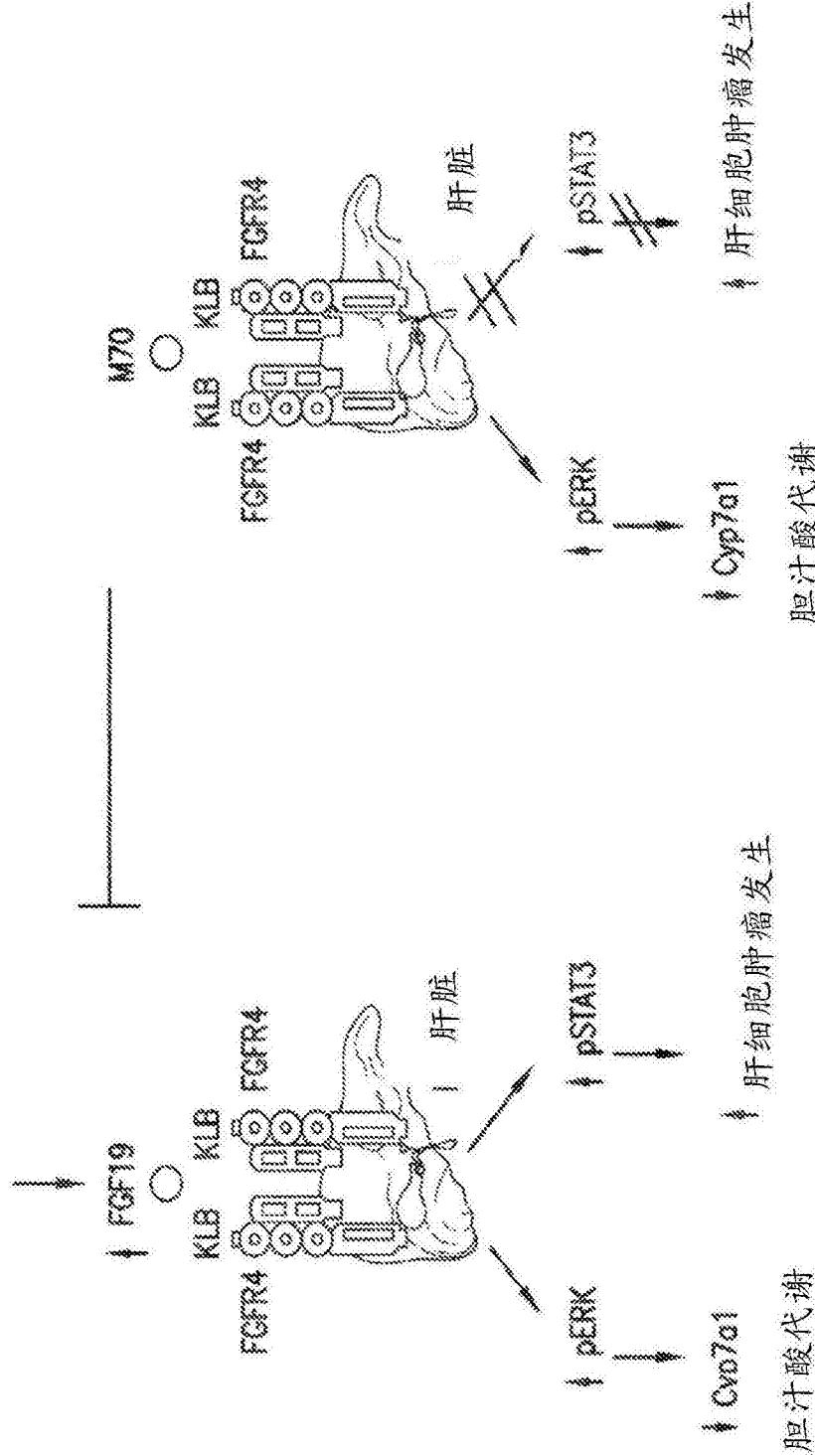


图 12A

图 12B

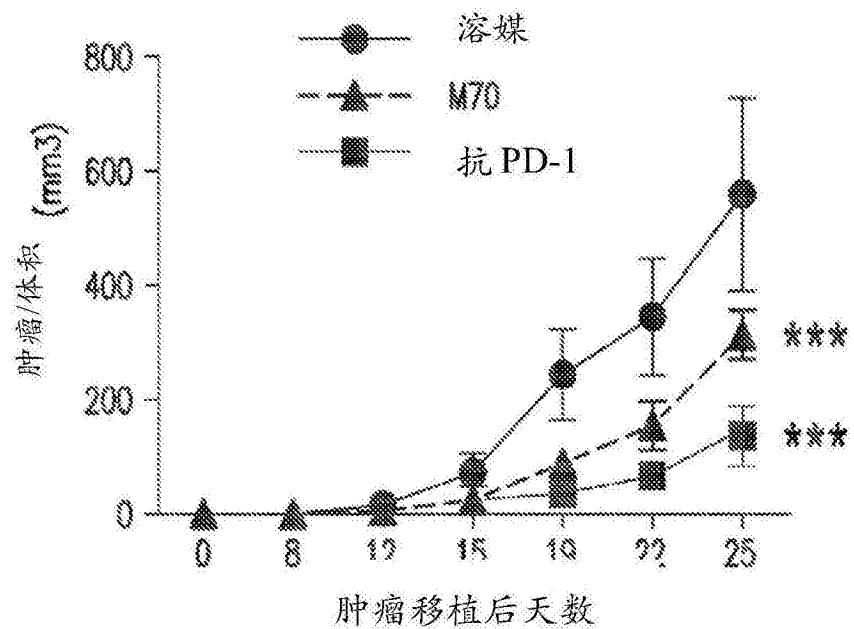


图13A

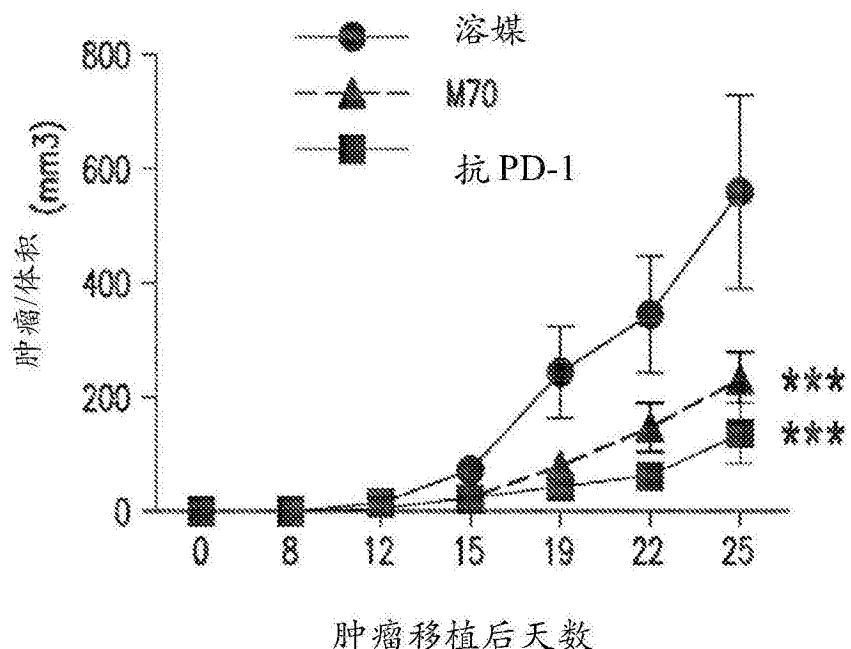


图13B

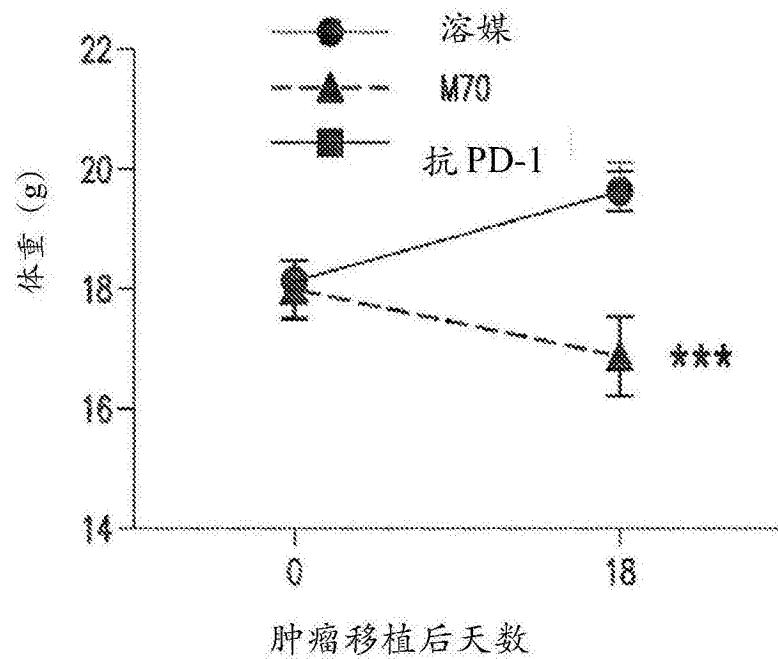


图14A

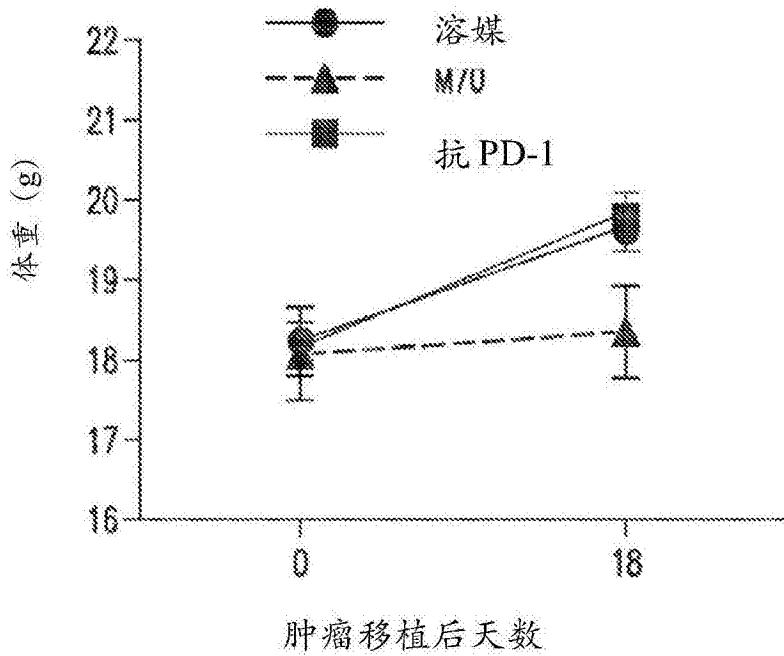


图14B