



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105601748 B

(45) 授权公告日 2021.08.27

(21) 申请号 201511029485.8

(22) 申请日 2012.06.29

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105601748 A

(43) 申请公布日 2016.05.25

(30) 优先权数据  
61/504,128 2011.07.01 US  
61/515,126 2011.08.04 US

(62) 分案原申请数据  
201280032887.1 2012.06.29

(73) 专利权人 恩格姆生物制药公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 雷·灵 达林·A·琳霍特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51) Int.Cl.  
C07K 19/00 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
A61K 38/18 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2011047267 A1, 2011.04.21  
US 2011104152 A1, 2011.05.05

审查员 杨光

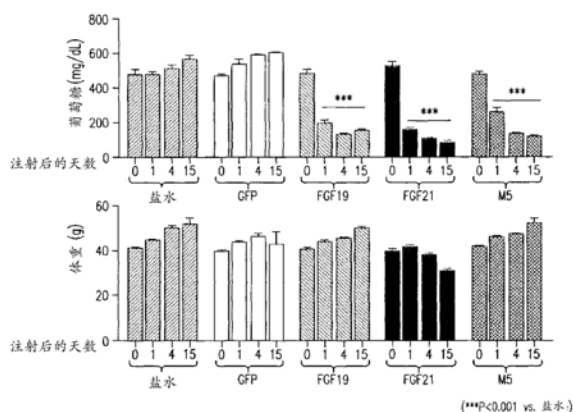
权利要求书3页 说明书45页 附图32页

### (54) 发明名称

用于代谢病症和疾病治疗的组合物、应用和方法

### (57) 摘要

本发明涉及具有一种或多种活性(如葡萄糖降低活性)的成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 的变体和融合体、成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 的变体和融合体、成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 的融合体,以及成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 蛋白质和肽序列(和拟肽)的变体或融合体,和用于高血糖及其他病症的治疗的方法和在所述治疗中的应用。



1. 一种肽,其特征在于,所述肽的氨基酸序列包含:

RDSSPLLQWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYL  
CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPPEEPE  
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFKEK (M52)

或由

RDSSPLLQWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYL  
CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPPEEPE  
DLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFKEK (M52) 组成。

2. 根据权利要求1所述的肽,其中,所述肽的长度小于250个氨基酸。

3. 根据权利要求1所述的肽,其中,所述肽的氨基酸序列包含RDSSPLLQWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFKEK (M52)。

4. 根据权利要求1所述的肽,其中,所述肽的氨基酸序列由RDSSPLLQWGDPIRLRHLTYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFKEK (M52) 组成。

5. 根据权利要求1或3任一项所述的肽,其中,所述肽与免疫球蛋白Fc区域融合。

6. 一种药物组合物,包含权利要求1至5中任一项所述的肽,以及可药用载体。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,进一步包含葡萄糖降低剂。

8. 编码权利要求1至4中任一项所述的肽的核酸分子。

9. 根据权利要求8所述的核酸分子,还包含可操纵连接的表达控制元件,其使得编码所述肽的核酸分子在体外、细胞中或体内表达。

10. 包含根据权利要求8所述的核酸分子的载体。

11. 根据权利要求10所述的载体,其中,所述载体包含病毒载体。

12. 转化细胞或宿主细胞系,其表达根据权利要求1至4中任一项所述的肽的序列。

13. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于降低受试者中的葡萄糖水平的药物中的用途。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述用途为与补充治疗联用。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中,所述补充治疗为重量减轻手术、胃旁路术、胃切除术、胃束带术、胃气球术或胃袖状切除术。

16. 根据权利要求14所述的用途,其中,所述补充治疗为葡萄糖降低剂、胰岛素、GLP1类似物、双胍类、磺脲类、噻唑烷二酮类、二肽基肽酶-4 (DPP-4) 抑制剂、溴隐亭制剂、胆汁酸螯合剂、二甲双胍、噻唑烷二酮类 (TZD)、SGLT-2抑制剂或它们的任意组合。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中,所述双胍或磺脲类选自由甲苯磺丁脲、氯磺丙脲、醋酸己脲、妥拉磺脲、格列本脲、格列吡嗪组成的组,或它们的任意组合。

18. 根据权利要求16所述的用途,其中,所述噻唑烷二酮类为罗格列酮或吡格列酮,或它们的组合。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中,所述胆汁酸螯合剂为考来维仑。

20. 根据权利要求14所述的用途,其中,所述补充治疗在施用权利要求1-4任一项所述的肽之前、同时或之后施用。

21. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述葡萄糖水平为血液葡萄糖水平。

22. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述受试者具有非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

23. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述受试者具有非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。

24. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述受试者具有的空腹血糖 (FPG) 水平为大于100mg/dl。

25. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述受试者具有的FPG水平为125mg/dl或更高。

26. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述受试者具有的FPG水平为约100至125mg/dl。

27. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述葡萄糖水平降低至少5%。

28. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述受试者具有的血红蛋白A1c (HbA1c) 水平高于6%。

29. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于治疗受试者中的高血糖病症的药物中的用途。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中,所述高血糖病症为糖尿病。

31. 根据权利要求29所述的用途,其中,所述高血糖病症为胰岛素依赖性 (I型) 糖尿病。

32. 根据权利要求29所述的用途,其中,所述高血糖病症为II型糖尿病。

33. 根据权利要求29所述的用途,其中,所述高血糖病症为妊娠期糖尿病。

34. 根据权利要求29所述的用途,其中,所述高血糖病症为前期糖尿病。

35. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于受试者中的胰岛素抵抗的药物中的用途。

36. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于治疗受试者中的高胰岛素血症的药物中的用途。

37. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于治疗受试者中的葡萄糖耐受不良的药物中的用途。

38. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于治疗受试者中的代谢综合征的药物中的用途。

39. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于治疗受试者中的肥胖症的药物中的用途。

40. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于降低受试者中高血糖素的药物中的用途。

41. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于增加受试者中的葡萄糖代谢或体内平衡的药物中的用途。

42. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于改善受试者中的胰腺功能的药物中的用途。

43. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于减少受试者中的甘油三酯的药物中的用途。

44. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于减少受试者中的胆固醇的药物中的用

途。

45. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于降低受试者中的IDL、LDL或VLDL水平的药物中的用途。

46. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于降低受试者的血压的药物中用途。

47. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于减少受试者中血管内膜增厚的药物中的用途。

48. 权利要求1至4中任一项所述的肽在制备用于减少受试者中的体重或体重增加的药物中的用途。

## 用于代谢病症和疾病治疗的组合物、应用和方法

[0001] 本申请是申请日为2012年6月29日,申请号为201280032887.1,名称为“用于代谢病症和疾病治疗的组合物、应用和方法”的中国发明专利申请的分案申请。本申请要求于2011年7月1日提交的美国专利申请序列号第61/504,128号和2011年8月4日提交的美国专利申请序列号第61/515,126号的优先权,其在此通过全文引用并入本发明。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及具有葡萄糖降低活性的成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 蛋白和肽序列(和拟肽)的变体和成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 蛋白和肽序列(和拟肽)的融合体,以及成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 蛋白和肽序列(和拟肽)的融合体的变体,及其用于高血糖及其他病症的治疗的方法和在所述治疗中的使用。

### [0003] 引言

[0004] 糖尿病是由胰岛素产生缺乏(1型)或者胰岛素耐受或来自胰腺 $\beta$ 细胞的胰岛素产生不足(2型)所引起的衰竭性代谢疾病。 $\beta$ -细胞是产生和储存胰岛素以用于餐后释放的专化内分泌细胞。胰岛素是有利于葡萄糖从血液向有需要的组织转移的激素。糖尿病患者必须经常监控血糖水平并且多数患者需要每日注射多次胰岛素以存活。然而,通过注射胰岛素,这些患者很少能达到理想的葡萄糖水平(Turner, R.C. 等人, JAMA 281:2005 (1999))。此外,延长的胰岛素水平提高可以导致不利的副作用,如低血糖休克和身体对胰岛素反应的敏感性降低。因此,糖尿病患者仍会发展出长期并发症,如心血管疾病、肾病、失明、神经损伤和伤口愈合病症(英国远景糖尿病研究(UK Prospective Diabetes Study, UKPDS) 小组, Lancet 352:837 (1998))。

[0005] 已提议将肥胖症治疗手术作为糖尿病可能的治疗。已假定手术后肠激素分泌的变化导致糖尿病病症的改变。潜在的分子机制尚有待阐明,尽管已推测高血糖素样肽1 (GLP-1) 作为可能的候选(Rubino, F. Diabetes Care 32 Suppl 2:S368 (2009))。FGF19在远端小肠中高度表达,并且FGF19的转基因过表达改善了葡萄糖的体内平衡(Tomlinson, E. Endocrinology 143 (5):1741-7 (2002))。人FGF19的血清水平在胃旁路手术后升高。FGF19表达和分泌的提高可以至少部分解释手术后所经受的糖尿病缓解。

[0006] 因此,需要人高血糖病症(如糖尿病、前期糖尿病、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良或代谢综合征)以及与葡萄糖水平升高有关的其他病症和疾病的替代治疗。本发明满足了该需要并提供了相关优势。

### [0007] 发明概述

[0008] 本发明部分基于具有一种或多种活性(如葡萄糖降低活性)的成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 肽序列的变体、成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 肽序列的融合体以及成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 肽序列的融合体(嵌合体)的变体。FGF19和/或FGF21肽序列的这些变体和融合体(嵌合体)包括不提高或诱导肝细胞癌(HCC)形成或HCC肿瘤发生的序列。FGF19和/或FGF21

肽序列的这些变体和融合体(嵌合体)还包括不诱导脂肪轮廓显著提高或增加的序列。

[0009] 在一种实施方式中,嵌合肽序列包括或由以下部分组成:具有至少7个氨基酸残基的N末端区域,具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置的N末端区域,其中N末端区域具有DSSPL或DASPH序列;和具有FGF19部分的C末端区域,其中所述C末端区域具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置,其中所述C末端区域包括FGF19(WGDPIRLRHLTYTSG)的氨基酸残基16-29,并且其中W残基对应于C末端区域的第一氨基酸位置。

[0010] 在另一种实施方式中,嵌合肽序列包括或由以下部分组成:具有FGF21部分的N末端区域,其中所述N末端区域具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置,其中所述N末端区域具有GQV序列,并且其中所述V残基对应于N末端区域的最后氨基酸位置;和包括FGF19部分的C末端区域,所述C末端区域具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置,其中所述C末端区域包括FGF19(RLRHLTYTSG)的氨基酸残基21-29,并且其中R残基对应于C末端区域的第一位置。

[0011] 在其他实施方式中,嵌合肽序列包括或由任何以下部分组成:包含SEQ ID NO:100 [FGF21]的部分的N末端区域,其中所述N末端区域具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置,其中所述N末端区域包含SEQ ID NO:100 [FGF21]的至少5个(或更多个)连续的氨基酸,其包括氨基酸残基GQV,并且其中所述V残基对应于N末端区域的最后氨基酸位置;和包含SEQ ID NO:99 [FGF19]的一部分的C末端区域,所述C末端区域具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置,其中所述C末端区域包含SEQ ID NO:99 [FGF19],RLRHLTYTSG,的氨基酸残基21-29,并且其中R残基对应于C末端区域的第一位置。在具体的方面,N末端区域包含SEQ ID NO:100 [FGF21]的至少6个连续的氨基酸(或更多个,例如,7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20-25、25-30、30-40、40-50、50-75、75-100个连续的氨基酸),所述SEQ ID NO:100 [FGF21]包括氨基酸残基GQV。

[0012] 在其他实施方式中,肽序列包括或由任何以下部分组成:与参照或野生型FGF19相比,具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失的成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 序列变体;与参照或野生型FGF21相比,具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失的成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 序列变体;融合至FGF21序列的部分的FGF19序列的部分;或融合至FGF21序列的部分的FGF19序列的部分,其中与参照或野生型FGF19和/或FGF21相比,FGF19和/或FGF21序列部分具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失。

[0013] 在其他实施方式中,肽序列或嵌合肽序列包括或由以下部分组成:融合至SEQ ID NO:99 [FGF19]的羧基末端氨基酸21-194的SEQ ID NO:100 [FGF21]的氨基末端氨基酸1-16,或者所述肽序列具有融合至SEQ ID NO:100 [FGF21]的羧基末端氨基酸147-181的SEQ ID NO:99 [FGF19]的氨基末端氨基酸1-147 (M41),或者所述肽序列具有融合至SEQ ID NO:100 [FGF21]的羧基末端氨基酸17-181的SEQ ID NO:99 [FGF19]的氨基末端氨基酸1-20 (M44),或者所述肽序列具有融合至SEQ ID NO:99 [FGF19]的羧基末端氨基酸148-194的SEQ ID NO:100 [FGF21]的氨基末端氨基酸1-146 (M45),或者所述肽序列具有SEQ ID NO:99 [FGF19]的氨基末端氨基酸1-20,其融合至SEQ ID NO:100 [FGF21]的内部氨基酸17-146,其融合至SEQ ID NO:99 [FGF19]的羧基末端氨基酸148-194的 (M46)。

[0014] 在其他实施方式中,肽序列或嵌合肽序列具有对应于SEQ ID NO:99 [FGF19]的氨基酸16-20的WGDPI序列的WGDPI序列基序,或者具有对应于FGF19的氨基酸16-20的FGF19WGDPI序列的取代、突变或缺失的WGDPI序列,或者WGDPI序列基序具有一个或多个取

代、突变或缺失的氨基酸；或者其不同于具有取代FGF19在氨基酸16-20的WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDPV、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一种的FGF 19变体序列。

[0015] 在其他实施方式中，肽序列或嵌合肽序列具有包括或由氨基酸残基VHYG组成的N末端区域，其中所述N末端区域包含氨基酸残基DASPHVHYG，或其中所述N末端区域包含氨基酸残基DSSPLVHYG，或其中所述N末端区域包含氨基酸残基DSSPLLQ，或其中所述N末端区域包含氨基酸残基DSSPLLQFGGQV。在具体的方面，G对应于N末端区域的最后位置，或Q残基是N末端区域的最后氨基酸位置，或V残基对应于N末端区域的最后位置。

[0016] 在其他实施方式中，肽序列或嵌合肽序列具有包括或由RHPIP组成的N末端区域，其中R是N末端区域的第一氨基酸位置；或者HPIP（例如，其中HPIP是N末端区域的前4个氨基酸残基），其中H是N末端区域的第一氨基酸位置；或者RPLAF，其中R是N末端区域的第一氨基酸位置；或者PLAF，其中P是N末端区域的第一氨基酸位置；或者R，其中R是N末端区域的第一氨基酸位置，或者在N末端区域具有以下序列中的任一项：MDSSPL、MSDSSPL、SDSSPL、MSSPL或者SSPL。

[0017] 在其他实施方式中，肽序列或嵌合肽序列在N末端区域的第一位置具有“M”残基、“R”残基、“S”残基、“H”残基、“P”残基、“L”残基或“D”残基。在替代性实施方式中，肽序列或嵌合肽序列在N末端区域的第一氨基酸位置不具有“M”残基或“R”残基。

[0018] 在其他实施方式中，肽序列或嵌合肽序列在N末端区域的第一和第二位置具有MR序列，或在N末端区域的第一和第二位置具有RM序列，或在N末端区域的第一和第二位置具有RD序列，或在N末端区域的第一和第二位置具有DS序列，或在N末端区域的第一和第二位置具有MD序列，或在N末端区域的第一和第二位置具有MS序列，或在N末端区域的第一至第三位置具有MDS序列，或在N末端区域的第一至第三位置具有RDS序列，或在N末端区域的第一至第三位置具有MSD序列，或在N末端区域的第一至第三位置具有MSS序列，或在N末端区域的第一至第三位置具有DSS序列，或在N末端区域的第一至第四位置具有RDSS序列，或在N末端区域的第一至第四位置具有MDSS序列，或在N末端区域的第一至第五位置具有MRDSS序列，或在N末端区域的第一至第五位置具有MSSPL序列，或在N末端区域的第一至第六位置具有MDSSPL序列，或在N末端区域的第一至第七位置具有MSDSSPL序列。

[0019] 在其他实施方式中，肽序列或嵌合肽序列在C-末端具有SEQ ID NO:99[FGF19]的氨基酸残基30-194的添加，从而导致产生了在对应于SEQ ID NO:99[FGF19]的约残基194的C末端区域的最后位置的嵌合多肽。在其他实施方式中，嵌合肽序列或肽序列包含FGF19序列（例如，SEQ ID NO:99）的全部或部分，其位于所述肽的C末端，或者其中氨基末端“R”残基从所述肽上缺失。

[0020] 在更具体的实施方式中，嵌合肽序列或肽序列包括M1-M98变体肽序列中的任一种或M1-M98变体肽序列中任一种的子序列或片段，或者由其组成。

[0021] 在其他具体的实施方式中，嵌合肽序列或肽序列具有长度约20至约200个氨基酸残基的N末端或C末端区域。在其他具体的实施方式中，嵌合肽序列或肽序列具有至少一个氨基酸缺失。在其他具体的实施方式中，嵌合肽序列或肽序列，或其子序列或片段从氨基末端、羧基末端或内部具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个氨基酸缺失。在具体的非限制性方面，氨基酸取代或缺失位于FGF19（AGPHVHYGWGDPI）的

氨基酸位置8-20的任何位置处。

[0022] 在更具体的实施方式中,嵌合肽序列或肽序列包括约5至10、10至20、20至30、30至40、40至50、60至70、70至80、80至90、90至100个或更多个氨基酸的氨基酸序列或由其组成。在更具体的实施方式中,嵌合肽序列或肽序列包括FGF19或FGF21的约5至10、10至20、20至30、30至40、40至50、50至60、60至70、70至80、80至90、90至100个或更多个氨基酸的氨基酸序列或由其组成。

[0023] 在其他具体的实施方式中,嵌合肽序列和肽序列具有具体的功能或活性。在一个方面,嵌合肽序列或肽序列维持或提高FGFR4介导的活性。在其他方面,嵌合肽序列或肽序列结合至成纤维细胞生长因子受体4 (FGFR4) 或激活FGFR4,或者不能可检测地结合至成纤维细胞生长因子受体4 (FGFR4) 或激活FGFR4,或者以小于、相当于或大于FGF19对FGFR4的结合亲和力的亲和力结合至FGFR4,或者以小于、相当于或大于FGF19激活FGFR4的程度或量激活FGFR4。在其他方面,嵌合肽序列或肽序列与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDPV、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI的任一种的FGF 19变体序列相比,具有降低的肝细胞癌(HCC)形成,和/或与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDPV、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI的任一种的FGF 19变体序列相比,具有较大的葡萄糖降低活性,和/或与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDPV、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI的任一种的FGF 19变体序列相比,具有较低的脂质增加活性,和/或与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDPV、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI的任一种的FGF 19变体序列相比,具有较低的甘油三酯、胆固醇、非HDL或HDL提高活性,和/或与FGF21相比具有较低的瘦肉(lean mass)减少活性。这些功能和活性可以在(例如)db/db小鼠中体外或体内确定。

[0024] 在其他实施方式中,嵌合肽序列和肽序列是分离或纯化的,和/或嵌合肽序列和肽序列可以包括于组合物中。在一种实施方式中,嵌合肽序列或肽序列包括于药物组合物中。这些组合物包括失活或其他活性成分的组合。在一种实施方式中,组合物(如药物组合物)包括嵌合肽序列或肽序列和葡萄糖降低剂。

[0025] 在其他实施方式中,提供了编码嵌合肽序列或肽序列的核酸分子。这些分子还可以包括以可操作连接的表达控制元件,其使得编码所述肽的核酸分子体外、在细胞中或体内表达,或者包括包含所述核酸分子的载体(例如,病毒载体)。还提供了表达嵌合肽序列和肽序列的转化的和宿主细胞。

[0026] 还提供了包括任何嵌合肽序列或肽序列的施用或递送的使用和治疗方法。在具体的实施方式中,受试者的使用或治疗方法包括以治疗疾病或病症有效的量施用本发明的嵌合肽或者肽序列至受试者,如患有通过本发明的肽序列可治疗的疾病或病症或具有患所述疾病或病症的风险的受试者。在其他实施方式中,方法包括施用本发明的嵌合肽或肽序列至受试者,如患有高血糖病症(例如,糖尿病,如胰岛素依赖型(I型)糖尿病、II型糖尿病或妊娠期糖尿病)、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良或代谢综合征的受试者,或者肥胖或具有不希望的体重的受试者。

[0027] 在所述方法和使用的具体方面,将嵌合肽序列或肽序列以改善所述受试者中葡萄糖代谢的有效量施用于受试者。在更具体的方面,在施用之前,受试者的空腹血糖水平大于100mg/dl或者血红蛋白A1c (HbA1c) 水平高于6%。

[0028] 在其他实施方式中,受试者的使用或治疗方法意欲或导致降低的葡萄糖水平、提高的胰岛素敏感度、降低的胰岛素抵抗、降低的高血糖素、葡萄糖耐量或者葡萄糖代谢或体内平衡的改善、改善的胰功能,或降低的甘油三酯、胆固醇、IDL、LDL或VLDL水平,或血压降低、血管内膜增厚降低,或者体重或体重增加降低。

[0029] 还提供了分析和/或鉴别嵌合肽序列或肽序列的方法,如具有葡萄糖降低活性而无显著肝细胞癌 (HCC) 活性的嵌合肽序列和肽序列。在一种实施方式中,方法包括:a) 提供候选嵌合肽序列或肽序列;b) 施用所述候选肽序列至测试动物(例如,db/db小鼠);c) 施用所述候选肽序列后,测量所述动物的葡萄糖水平以确定所述候选肽序列是否降低葡萄糖水平。在具体的方面,还分析了嵌合肽序列或肽序列对动物中HCC的诱导(例如,评价测试动物的肝组织样品),或与HCC活性有关的标志物的表达,其中候选肽具有葡萄糖降低活性并且无显著HCC活性。这些方法将候选物鉴别为具有葡萄糖降低活性,任选地还无显著肝细胞癌 (HCC) 活性。

## 附图说明

[0030] 图1示出了FGF19和FGF21蛋白序列,和代表性变体序列,即变体M5、变体M1、变体M2、变体M69、变体M3、变体M48、变体M49、变体M50、变体M51、变体M52、变体M53和变体M70肽序列。还示出了FGF21的3个其他等位(多晶型)形式,即M71、M72和M73。

[0031] 图2示出了FGF21(无阴影)和FGF19(灰色阴影)蛋白序列之间的代表性域交换,以及所得的融合(嵌合)序列。用数字表明了融合体(嵌合体)中存在的来自FGF21和FGF19中每一个的氨基酸区域。对每一个嵌合序列示出了葡萄糖降低和脂肪升高。

[0032] 图3A-图3I示出了葡萄糖降低和体重数据。在db/db小鼠中,A) 变体M5;B) 变体M1;C) 变体M2和变体M69;D) 变体M3;E) 变体M48和变体M49;F) 变体M51和变体M50;G) 变体M52肽;H) 变体M53肽;和I) 变体M70肽序列均具有葡萄糖降低(即抗糖尿病)活性。对小鼠注射表达FGF19、FGF21、所选变体的AAV载体,并且盐水和GFP是阴性对照。

[0033] 图4A-图4I显示注射了表达FGF19、FGF21或A) 变体M5;B) 变体M1;C) 变体M2和变体M69;D) 变体M3;E) 变体M48和变体M49;F) 变体M51和变体M50;G) 变体M52肽;H) 变体M53肽;和I) 变体M70肽序列的AAV载体的db/db小鼠的血清脂肪谱(甘油三酯、总胆固醇、HDL和非HDL)。与增加和提高脂肪的FGF19、M1、M2和M69相反,变体M5肽序列不增加或提高脂肪。所有变体的血清水平是相当的。盐水和GFP是阴性对照。

[0034] 图5A-图5I示出了A) 变体M5;B) 变体M1;C) 变体M2和变体M69;D) 变体M3;E) 变体M48和变体M49;F) 变体M51和变体M50;G) 变体M52;H) 变体M53肽;和I) 变体M70肽序列的肝细胞癌 (HCC) 相关数据。与FGF19相反,所有变体不会显著提高或诱导肝细胞癌 (HCC) 形成或HCC肿瘤发生。将HCC得分记录为注射变体小鼠的整个肝表面上的HCC小瘤的数目除以注射野生型FGF19小鼠的HCC小瘤的数目。

[0035] 图6A-图6I示出了A) 变体M5;B) 变体M1;C) 变体M2和变体M69;D) 变体M3;E) 变体M48和变体M49;F) 变体M51和变体M50;G) 变体M52;H) 变体M53肽;和I) 变体M70肽序列的瘦肉或

脂肪数据。与FGF21相反,除了M2、M5和M69,变体肽序列降低瘦肉或脂肪。

[0036] 图7A-图7B示出了图示数据,其表明重组A)变体M5;和B)变体M69多肽的注射降低了ob/ob小鼠中的血糖。

[0037] 图8示出了表明醛-酮还原酶家族1成员C18 (Akr1C18) 和溶质载体家族1成员2 (slc1a2) 的肝表达似乎与HCC活性有关。

[0038] 说明详述

[0039] 本发明提供了能够降低或减少葡萄糖水平的嵌合肽序列和肽序列。在一种实施方式中,嵌合肽序列包括或由以下部分组成:具有至少7个氨基酸残基的N末端区域,和具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置的N末端区域,其中N末端区域具有DSSPL或DASPH序列;和具有FGF19部分的C末端区域,和具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置的C末端区域,其中所述C末端区域包括FGF19 (WGDPIRLRHLTYSG) 的氨基酸残基16-29,并且W残基对应于C末端区域的第一氨基酸位置。

[0040] 在另一种实施方式中,嵌合肽序列包括或由以下部分组成:具有FGF21部分的N末端区域,和具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置的N末端区域,其中N末端区域具有GQV序列并且V残基对应于N末端区域的最后氨基酸位置;和具有FGF19部分的C末端区域,和具有第一氨基酸位置和最后氨基酸位置的C末端区域,其中所述C末端区域包括FGF19 (RLRHLTYSG) 的氨基酸残基21-29,并且R残基对应于C末端区域的第一氨基酸位置。

[0041] 在其他实施方式中,肽序列包括或由以下部分组成:与参照或野生型FGF19相比,具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失的成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 序列变体。在其他实施方式中,肽序列包括或由以下部分组成:与参照或野生型FGF21相比,具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失的成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 序列变体。在其他实施方式中,肽序列包括或由以下部分组成:融合至FGF21序列部分的FGF19序列部分。在其他实施方式中,肽序列包括或由以下部分组成:融合至FGF21序列部分的FGF19序列部分,其中与参照或野生型FGF19和/或FGF21相比,FGF19和/或FGF21序列部分具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失。

[0042] 本发明还提供了治疗患有使用成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 肽序列的变体和融合体可治疗的代谢病症或具有患所述病症的风险的受试者的方法和使用。在一种实施方式中,方法包括以治疗所述病症有效的量用成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 肽序列的一个或多个变体或融合体接触或施用于受试者。在另一种实施方式中,该方法包括以治疗所述病症有效的量用编码成纤维细胞生长因子19 (FGF19) 和/或成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 肽序列的一个或多个核酸分子(例如,与编码所述肽序列的核酸可操纵地连接的表达控制元件,任选地包括载体)接触或施用于受试者。

[0043] 尽管为了实践本发明,不需要理解本发明肽的潜在作用机制,但是不受任何特定理论或假设的束缚,据信本发明肽至少部分模拟了肥胖症治疗手术对(例如)葡萄糖体内平衡和重量减轻的影响。相信肥胖症治疗手术后胃肠道激素分泌的变化(例如,高血糖素样肽1 (GLP-1)) 是(例如)糖尿病病症解决的原因。FGF19在远端小肠中高度表达,并且FGF19的转基因过表达改善了葡萄糖体内平衡。由于在人中,胃旁路手术后FGF19的水平也会升高,因此升高的FGF19可能与肥胖症治疗手术后观察到的糖尿病缓解有关。

[0044] 代表性的参照或野生型FGF19序列如下所示：RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEEDIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFKEK (SEQ ID NO:99)。

[0045] 代表性的参照或野生型FGF21序列如下所示：HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDYGALYGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (SEQ ID NO:100)。图1中示出了FGF21等位变体 (例如, M70、M71和M72)。

[0046] 在本文中, 术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”序列是可互换使用的以表示两种或更多种氨基酸或“残基”, 其包括通过酰胺键或等价物共价连接的氨基酸的化学修饰和衍生物。形成全部或部分肽的氨基酸可以来自已知的21种天然存在的氨基酸, 其通过它们的单字母缩写或常用的三字母缩写表示。在本发明的肽序列中, 常规氨基酸残基具有它们常规的含义。因此, “Leu”是亮氨酸, “Ile”是异亮氨酸, “Nle”是正亮氨酸等。

[0047] 在本文中举例说明了与本文所述的参考FGF19和FGF21多肽不同的肽序列, 所述肽序列体内减少或降低葡萄糖 (表1-8和图1)。非限制性具体实例为具有融合至FGF19的羧基末端氨基酸21-194的FGF21的氨基末端氨基酸1-16的肽序列; 具有融合至FGF21的羧基末端氨基酸147-181的FGF19的氨基末端氨基酸1-147的肽序列; 具有融合至FGF21的羧基末端氨基酸17-181的FGF19的氨基末端氨基酸1-20的肽序列; 具有融合至FGF19的羧基末端氨基酸148-194的FGF21的氨基末端氨基酸1-146的肽序列; 和具有FGF19的氨基末端氨基酸1-20的肽序列, 其融合至FGF21的内部氨基酸17-146, 其融合至FGF19的羧基末端氨基酸148-194。

[0048] 其他具体的肽序列具有对应于FGF19的氨基酸16-20的WGDPI序列的WGDPI序列基序, 缺少对应于FGF19的氨基酸16-20的WGDPI序列的WGDPI序列基序, 或具有取代的 (即突变的) 对应于FGF19的氨基酸16-20的FGF19WGDPI序列的WGDPI序列基序。

[0049] 本发明具体的肽序列还包括不同于FGF19和FGF21 (例如, 如本文所示), 和在氨基酸16-20处具有取代FGF19WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDPV、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一项的FGF 19变体序列的序列。因此, 野生型FGF19和FGF21 (例如, 本文中分别以SEQ ID NOS:99和100所示的) 可以是排除序列, 并且在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDPV、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中的任一种的FGF19也可以排除。然而, 这种排除不适用于序列具有 (例如) 融合至具有 (例如) GQV、GQV、GDI或GPI中任一种的FGF19的3个FGF21残基, 或者融合至WGPI、WGDI、GDPI、WDPI、WGDI或WGDP中任一种的2个FGF21残基的情况。

[0050] 肽序列的具体非限制性实例包括本文中以M1-M98 (SEQ ID NO:1-98) 指明的序列变体的全部或部分或由它们组成。肽序列的更具体的非限制性实例包括如下所示的序列组的全部或部分或者由它们组成:

[0051] HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEEDIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFKEK (FGF21序列还可以在氨基末端包括“R”残基), 或其子序列或片段; 或者

[0052] DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK,或其子序列或片段;或者

[0053] RPLAFSDASPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK,或其子序列或片段;或者

[0054] RPLAFSDSSPLVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK,或其子序列或片段;或者

[0055] DSSPLVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK,或其子序列或片段;或者

[0056] RDSSPLVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M69),或其子序列或片段;或者

[0057] RDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M52),或其子序列或片段;或者

[0058] HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M5),或其子序列或片段;

[0059] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHSLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (M71),或其子序列或片段;或者

[0060] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS (M72),或其子序列或片段;或者

[0061] HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGS LHFDP EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVQDELQGVGEGCHMHPENCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE (M73),或其子序列或片段;或者

[0062] RPLAFSDASPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M1),或其子序列或片段;或者

[0063] RPLAFSDSSPLVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERIPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK (M2),或其子序列或片段;或者

[0064] RPLAFSDAGPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVARTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLYSEEDCAFEERILEDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL

- PMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M3), 或其子序列或片段; 或者
- [0065] RDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIKGVHS  
VRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVP  
EEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M48), 或其子序列或片段; 或者
- [0066] RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAI  
KGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML  
LPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M49), 或其子序列或片段; 或者
- [0067] RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIK  
GVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E E ILEDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML  
PMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M50), 或其子序列或片段; 或者
- [0068] RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIK  
GVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML  
PMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M51), 或其子序列或片段; 或者
- [0069] MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIKGVHS  
VRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVP  
EEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M53), 或其子序列或片段; 和
- [0070] MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIKG  
VH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP  
MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK (M70), 或者其子序列或片段, 或者对  
于任何上述肽序列, R末端残基可以缺失。
- [0071] 肽序列的其他具体非限制性实例包括或由以下部分组成:
- [0072] HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIKG  
VH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP  
MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, 或其子序列或片段; 或者
- [0073] DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIKGVHS  
RYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPE  
EPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, 或其子序列或片段;
- [0074] RPLAFSDASPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTV  
AIKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL  
PMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, 或其子序列或片段;
- [0075] RPLAFSDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTV  
AIKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL  
PMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, 或其子序列或片段;
- [0076] DSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL EIKAV ALRTVAIKGVH  
SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE E EIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMV  
PEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK, 或者其子序列或片段。
- [0077] 肽序列的其他具体非限制性实例在N-末端具有包括以下任一种的全部或部分或  
由其组成的肽序列: HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M5);
- [0078] DSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M6);

- [0079] RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M7) ;
- [0080] HPIPDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSG (M8) ;
- [0081] HPIPDSSPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M9) ;
- [0082] HPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG (M10) ;
- [0083] RPLAFSDAGPLLQWGDPIRLRHLYTSG (M11) ;
- [0084] RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG (M12) ;
- [0085] RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHLYTSG (M13) ;
- [0086] HPIPDSSPHVHYGGQVRLRHLYTSG (M14) ;
- [0087] RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M15) ;
- [0088] RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M16) ;
- [0089] RPLAFSDAGPHVGWGDPIRLRHLYTSG (M17) ;
- [0090] RPLAFSDAGPHYGWGDPIRLRHLYTSG (M18) ;
- [0091] RPLAFSDAGPVYGWGDPIRLRHLYTSG (M19) ;
- [0092] RPLAFSDAGPVHGWGDPIRLRHLYTSG (M20) ;
- [0093] RPLAFSDAGPVHYWGDPIRLRHLYTSG (M21) ;
- [0094] RPLAFSDAGPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M22) ;
- [0095] RPLAFSDAGPHHWGDPIRLRHLYTSG (M23) ;
- [0096] RPLAFSDAGPHHYWGDPIRLRHLYTSG (M24) ;
- [0097] RPLAFSDAGPHVYWGDPIRLRHLYTSG (M25) ;
- [0098] RPLAFSDSSPLVHWGDPIRLRHLYTSG (M26) ;
- [0099] RPLAFSDSSPHVHWGDPIRLRHLYTSG (M22) ;
- [0100] RPLAFSDAGPHVWGDPIRLRHLYTSG (M28) ;
- [0101] RPLAFSDAGPHVHYWGDPIRLRHLYTSG (M29) ;
- [0102] RPLAFSDAGPHVHYAWGDPIRLRHLYTSG (M30) ;
- [0103] RHPIPDSSPLLQFGAQVRLRHLYTSG (M31) ;
- [0104] RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSG (M32) ;
- [0105] RHPIPDSSPLLQFGPQVRLRHLYTSG (M33) ;
- [0106] RHPIPDSSPLLQFGGAVRLRHLYTSG (M34) ;
- [0107] RHPIPDSSPLLQFGGEVRLRHLYTSG (M35) ;
- [0108] RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLYTSG (M36) ;
- [0109] RHPIPDSSPLLQFGGQARLRHLYTSG (M37) ;
- [0110] RHPIPDSSPLLQFGGQIRLRHLYTSG (M38) ;
- [0111] RHPIPDSSPLLQFGGQTRLRHLYTSG (M39) ;
- [0112] RHPIPDSSPLLQFGWQPVRRLRHLYTSG (M40) ;
- [0113] DAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG (M74) ; VHYGWGDPIRLRHLYTSG (M75) ; RLRHLYTSG (M77) ;  
RHPIPDSSPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG ;
- [0114] RHPIPDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSG ;
- [0115] RPLAFSDAGPLLQFGWGDPIRLRHLYTSG ;
- [0116] RHPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSG ;

- [0117] RPLAFSDAGPLLQFGGQVRLRHLYTSG;  
[0118] RHPIPDSSPHVHYGGQVRLRHLYTSG;  
[0119] RPLAFSDAGPHVHYGGDIRLRHLYTSG;  
[0120] RDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG;  
[0121] RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSG;  
[0122] RHPIPDSSPLLQFGAQVRLRHLYTSG;  
[0123] RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSG;  
[0124] RHPIPDSSPLLQFGPQVRLRHLYTSG;  
[0125] RHPIPDSSPLLQFGGAVRLRHLYTSG;  
[0126] RHPIPDSSPLLQFGGEVRLRHLYTSG;  
[0127] RHPIPDSSPLLQFGGNVRLRHLYTSG;  
[0128] RHPIPDSSPLLQFGGQARLRHLYTSG;  
[0129] RHPIPDSSPLLQFGGQIRLRHLYTSG;  
[0130] RHPIPDSSPLLQFGGQTRLRHLYTSG;

[0131] RHPIPDSSPLLQFGWGQPVRLRHLYTSG;并且对于任何上述肽序列,氨基末端R残基可以缺失。

[0132] 本发明的肽序列另外包括与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDP A、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一项的FGF 19变体序列相比,肝细胞癌(HCC)的诱导或形成降低或缺乏的那些。本发明的肽序列还包括与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDP A、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一项的FGF 19变体序列相比,具有较高葡萄糖降低活性的那些。此外,本发明的肽序列包括与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDP A、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一项的FGF 19变体序列相比,具有较低脂肪(例如,甘油三酯、胆固醇、非HDL或HDL)提高活性的那些。

[0133] 通常,本发明肽序列中氨基酸或残基的数目总计将小于约250(例如,其氨基酸或模拟物)。在多个具体的实施方式中,残基数目包括约20多至约200个残基(例如,其氨基酸或模拟物)。在其他实施方式中,残基数目包括约50多至约200个残基(例如,其氨基酸或模拟物)。在其他实施方式中,在长度上残基数目包括约100多至约195个残基(例如,其氨基酸或模拟物)。

[0134] 可以通过酰胺或通过非天然和非酰胺化学键连接氨基酸或残基,其包括(例如)通过戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯、双官能马来酰亚胺或N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)形成的那些。非酰胺键包括(例如)酮亚甲基、氨基亚甲基、烯烃、乙醚、硫醚等(参见,例如, *Spatola in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, 第7卷,第267-357页(1983), "Peptide and Backbone Modifications," Marcel Decker, NY)。因此,当本发明的肽包括FGF19序列的部分和FG21序列的部分时,所述两部分不需要通过酰胺键将彼此连接在一起,但是可以通过任何其他化学部分连接或通过接头部分结合在一起。

[0135] 本发明还包括举例说明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列,以及表1-8和图1中所列的FGF19/FGF21融合体和嵌合体)的子序列、变体和修饰形式,只要上述子序列、变体和修饰形式保留了至少可检测或可测量的活性或功能。例如,某些举例说明的变体肽在C-末端部分具有FGF19C-末端序列,PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK,例如,在变体的“TSG”氨基酸残基后。

[0136] 另外,某些举例说明的变体肽(例如,在氨基末端具有FGF21序列全部或部分的那些)具有位于N-末端的“R”残基,其可以省去。类似地,某些举例说明的变体肽包括位于N-末端的“M”残基,其可以附加在或进一步取代省去的残基,如“R”残基。更具体地,在多种实施方式中,N-末端的肽序列包括以下任一种:RDSS、DSS、MDSS或MRDSS。此外,在细胞中,当“M”残基邻近“S”残基时,可以切割“M”残基从而使“M”残基从肽序列上缺失,而当“M”残基邻近“D”残基时,“M”残基不可以切割。因此,举例来说,在多种实施方式中,肽序列包括在N-末端具有以下残基的那些:MDSSPL、MSDSSPL(切割成SDSSPL)和MSSPL(切割成SSPL)。

[0137] 因此,本发明的“肽”、“多肽”和“蛋白质”序列包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列以及表1-8和图1中所列的FGF19/FGF21融合体和嵌合体的子序列、变体和修饰形式,只要所述子序列、变体或修饰形式(例如,融合体或嵌合体)保留了至少可检测的活性或功能。

[0138] 如本文所使用的,术语“修饰”及其语法变化是指相对于参考组成(如肽序列),组成偏离。这些修饰的肽序列、核酸及其他组成可以具有更大或更小的活性或功能,或者与参考未修饰的肽序列、核酸或其他组成相比,具有不同的功能或活性,或者可以在配制用于疗法的蛋白质中具有期望的性质(例如,血清半衰期)以引起用于在检测测定中使用的抗体和/或用于蛋白质纯化。例如,可以修饰本发明的肽序列以提高血清半衰期,以提高蛋白质的体外和/或体内稳定性等。

[0139] 在本文中举例说明的肽序列的这些子序列、变体和修饰形式的具体实例(表1-8和图1中所列的肽序列)包括氨基末端、羧基末端或内部的一种或多种氨基酸的取代、缺失和/或插入/添加或从氨基末端、羧基末端或内部开始的一种或多种氨基酸的取代、缺失和/或插入/添加。一个实例是在肽序列内用氨基酸残基取代另一个氨基酸残基。另一种是一个或多个氨基酸残基从肽序列的缺失,或者一个或多个氨基酸残基向肽序列中的插入或添加。

[0140] 取代、缺失或插入/添加的残基数目为肽序列的一个或多个氨基酸(例如,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或更多个)。因此,FGF19或FGF21序列可以具有少数或多个取代、缺失或插入/添加的氨基酸(例如,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或更多个)。另外,FGF19氨基酸序列可以包括来自FGF21的约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或更多个氨基酸的氨基酸序列或由其组成;或者FGF21氨基酸或序列可以

包括来自FGF19的约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或更多个氨基酸的氨基酸序列或由其组成。

[0141] 具体的取代的例子包括用D-残基取代L-残基。因此,尽管以L-异构体构型列出了残基,但是包括了在本发明的肽序列的任何具体或所有位置的D-氨基酸,除非D-异构体导致序列不具有可检测或可测量的功能。

[0142] 其他具体的实例是非保守和保守取代。“保守取代”是用生物学、化学或结构类似的残基取代一个氨基酸。生物学类似是指取代与生物活性(例如,葡萄糖降低活性)相容。结构类似是指氨基酸具有长度类似的侧链,如丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸,或具有类似的大小,或维持了第一、第二或其他肽序列的结构。化学类似是指残基具有相同电荷或者是亲水性和疏水性的。具体实例包括用一个疏水性残基(如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸)取代另一个,或者用一个极性残基取代另一个,如精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天门冬氨酸,或谷氨酰胺取代天门冬酰胺、丝氨酸取代苏氨酸等。常规测定可用于确定子序列、变体或修饰形式是否具有活性,例如,葡萄糖降低活性。

[0143] 在本文中举例说明的肽序列的子序列、变体和修饰形式的具体实例(例如,表1-8和图1中所列的肽序列)对参考肽序列(例如,表1-8和图1的任一个中的肽序列)具有50%-60%、60%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%或96%、97%、98%或99%的同一性。术语“同一性”和“同源性”及其语法变化是指两种或更多种所提及的实体是相同的。因此,当两条氨基酸序列相同时,它们具有相同的氨基酸序列。“同一性区域、区或域”是指两种或更多种所提及的实体的一部分是相同的。因此,当两条氨基酸序列相对于一个或多个序列区域相同或同源时,它们在这些区域中具有同一性。

[0144] 可以使用本领域中已知的计算机程序和数学算法确定两条序列之间的同一性程度。计算序列同一性(同源性)百分比的这些算法通常解释比较区域内的序列空缺和不匹配。例如,BLAST(例如,BLAST 2.0)搜索算法(参见,例如,Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403(1990),通过NCBI公共可用)具有以下示例性搜索参数:误配-2;空缺空位(gap open)5;空缺延伸(gap extension)2。对于肽序列比较,BLASTP算法通常与计分矩阵(如PAM100、PAM250、BLOSUM 62或BLOSUM 50)组合使用。还使用FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)和SSEARCH序列比较程序对同一性程度定量(Pearson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988);Pearson,Methods Mol Biol.132:185(2000);和Smith等人,J.Mol.Biol.147:195(1981))。还发展了使用Delaunay基拓扑定位(Delaunay-based topological mapping)对蛋白质结构相似性定量的程序(Bostick等人,Biochem Biophys Res Commun.304:320(2003))。

[0145] 在本发明的肽序列(包括在本文中举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式)中,“氨基酸”或“残基”包括常规 $\alpha$ -氨基酸和 $\beta$ 氨基酸、 $\alpha$ , $\alpha$ -二取代氨基酸和N-取代氨基酸,其中至少一个侧链是如本文所定义的氨基酸侧链部分。“氨基酸”还包括N-烷基 $\alpha$ -氨基酸,其中N-末端氨基具有C1至C6直链或支链烷基取代基。因此,术语“氨基酸”包括天然存在的蛋白质氨基酸、非蛋白质氨基酸、翻译后修饰的氨基酸(例如,通过糖基化作用、磷酸化作用、酯或酰胺切割等)、酶修饰或合成的氨基酸、衍生化氨基酸、设计来模拟氨基酸的构件或结构、具有从天然存在部分修饰、衍生化的侧链部分的氨基酸或者合成或非天然存在的氨基酸等的立体异构体和修饰。修饰的和非常见的氨基酸包

括在本发明的肽序列中(参见,例如,在Synthetic Peptides:A User's Guide中;Hruby等人,Biochem.J.268:249(1990);和Tonio C.,Int.J.Peptide Protein Res.35:287(1990))。

[0146] 另外,包括了氨基酸的保护和修饰基团。如本文所使用的术语“氨基酸侧链部分”包括任何氨基酸的任何侧链,如术语“氨基酸”在本文中所定义的。因此,这包括天然存在的氨基酸中的侧链部分。它还包括如本文所说明的和本领域技术人员所知的修饰的天然存在的氨基酸中的侧链部分,如天然存在的蛋白质氨基酸、非蛋白质氨基酸、翻译后修饰的氨基酸、酶修饰或合成的氨基酸、衍生化氨基酸、设计来模拟氨基酸的构件或结构等的立体异构体和修饰中的侧链部分。例如,本文所公开的或本领域技术人员所知的任何氨基酸的侧链部分包括在该定义内。

[0147] “氨基酸侧链部分的衍生物”包括在氨基酸侧链部分的定义内。衍生化的氨基酸侧链部分的非限制性实例包括,例如:(a) 将一个或多个饱和或不饱和的碳原子添加到现有的烷基、芳基或芳烷基链中;(b) 将侧链中的碳用另一种原子,优选地氧或氮取代;(c) 向侧链的碳原子添加末端基团,其包括甲基( $-\text{CH}_3$ )、甲氧基( $-\text{OCH}_3$ )、硝基( $-\text{NO}_2$ )、羟基( $-\text{OH}$ )或氰基( $-\text{C}\equiv\text{N}$ );(d) 对于包括羟基、硫醇或氨基的侧链部分,添加适合的羟基、硫醇或氨基保护基;或(e) 对于包括环状结构的侧链部分,添加一个或多个直接连接或通过醚键连接的环取代基,其包括羟基、卤素、烷基或芳基基团。对于氨基,适合的保护基是技术人员所知的。所提供的这种衍生化作用在最终的肽序列中提供了所需的活性(例如,葡萄糖降低、改善的葡萄糖或脂代谢、抗糖尿病活性、无显著HCC形成或肿瘤发生、无显著的瘦肉或脂肪调节等)。

[0148] “氨基酸侧链部分”包括所有这种衍生化作用,并且具体的非限制性实例包括: $\gamma$ -氨基丁酸、12-氨基十二烷酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、6-氨基己酸、4-(氨甲基)-环己烷羧酸、8-氨基辛酸、联苯丙氨酸、Boc-叔丁氧羰基、苯甲基、苯甲酰基、瓜氨酸、二氨基丁酸、吡咯赖氨酸、二氨基丙酸、3,3-二苯基丙氨酸、鸟氨酸(orthonine)、瓜氨酸、1,3-二氢-2H-异吲哚羧酸、乙基、Fmoc-苄氧羰基、庚酰( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-$ )、己酰( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ )、高精氨酸、高半胱氨酸、高赖氨酸、高苯丙氨酸、高丝氨酸、甲基、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸砷、正缬氨酸(NVA)、苯基甘氨酸、丙基、异丙基、肌氨酸(SAR)、叔丁基丙氨酸和苄氧羰基。

[0149] 单个氨基酸,其包括天然存在的蛋白质氨基酸、非蛋白质氨基酸、翻译后修饰的氨基酸、酶合成的氨基酸、非天然存在的氨基酸(包括衍生化氨基酸)、来源于任何上述氨基酸的 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸(即, $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸,其中至少一个侧链与其所来源的残基的侧链相同)、来源于任何上述氨基酸的 $\beta$ -氨基酸(即,除了存在 $\beta$ -碳以外,其他与其所来源的残基相同的 $\beta$ -氨基酸)等的立体异构体和修饰,包括所有上述氨基酸在本文中均可以称为“残基”。除了 $\alpha$ -氨基酸的侧链部分之外,适合的取代基包括 $\text{C}_1$ 至 $\text{C}_6$ 直链或支链烷基。Aib是 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸的实例。尽管可以使用常规L-和D-异构体表示方法来表示 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸,但是应理解这些表示方法是为了方便,并且当 $\alpha$ 位的取代基不同时,根据情况,这些氨基酸可以可互换地称为来源于具有指定氨基酸侧链部分的残基的L-或D-异构体的 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸。因此,(S)-2-氨基-2-甲基-己酸可以被称为来源于L-Nle(正亮氨酸)的 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸或来源于D-Ala的 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸。类似地,Aib可以称为来源于Ala的 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸。当提供 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸时,应理解为包括其所有(R)和(S)构型。

[0150] “N-取代的氨基酸”包括任何氨基酸,其中氨基酸侧链部分共价键键合到主链氨基上,任选地其中在 $\alpha$ -碳位置中除了H之外无取代基。肌氨酸是N-取代的氨基酸的实例。举例来说,肌氨酸可以称为Ala的N-取代的氨基酸衍生物,其中肌氨酸的氨基酸侧链部分和Ala是相同,即甲基。

[0151] 本发明肽序列的共价修饰(包括在本文中举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式)包括在本发明中。一种类型的共价修饰包括将目标氨基酸残基与能够与肽所选择的侧链或者N-或C-末端残基反应的有机衍生化试剂反应。使用双官能试剂的衍生化作用对于(例如)将肽交联至不溶于水的载体基质或表面从而在纯化抗肽抗体的方法中使用来说是有用的,并且反之亦然。常用的交联剂包括,例如,1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯(例如,与4-叠氮水杨酸的酯)、同型双官能酰亚胺酯,其包括二琥珀酰亚胺酯,如3,3'-二硫双(琥珀酰亚胺基丙酯)、双官能马来酰亚胺,如双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷和试剂,如甲基-3-[(对叠氮苯基)二硫]丙亚氨酸酯。

[0152] 其他修饰包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺为相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化作用、丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化作用、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基的甲基化作用(T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N末端胺的乙酰化作用、任何C末端羧基的酰胺化等。

[0153] 举例说明的肽序列和在本文中举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式还可以包括出于稳定性的主链变化、衍生物和拟肽。术语“拟肽”包括作为残基模拟物的分子(称为“模拟物”),其包括(但不限于)哌嗪核心分子、酮哌嗪核心分子和二氮杂卓核心分子。除非另作说明,否则本发明的肽序列的氨基酸模拟物包括羧基和氨基两者,和对应于氨基酸侧链的基团,或者就甘氨酸的模拟物来说,除了氢以外无侧链。

[0154] 举例来说,这些将包括模拟天然存在的氨基酸的空间排列、表面电荷分布、极性等,但不需要是氨基酸的化合物,其将赋予生物系统稳定性。例如,脯氨酸可以被具有适合大小和取代作用的其他内酰胺或内酯取代;亮氨酸可以被烷基酮、N-取代酰胺取代,和使用烷基、烯基或其他取代基在氨基酸侧链长度中的变化,其他的对于技术人员可以是显而易见的。进行这些取代的基本元素是提供具有与用于设计分子的残基大致相同的大小和电荷以及构型的分子。通过在功能性(例如,葡萄糖降低)或其他测定中分析化合物并比较结构活性关系,将对这些修饰进行细化。这些方法属于在药物化学和药物开发领域工作的技术人员的范围内。

[0155] 本发明肽序列(包括举例说明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的肽)的子序列、序列变体和修饰形式)的另一种类型的修饰是糖基化作用。如本文所使用的,“糖基化”广泛地表示一种或多种糖(例如,碳水化合物)部分在蛋白质、脂质或其他有机分子中的存在,或者向它们的添加或连接。在本文中,术语“去糖基化”的使用通常旨在表示一种或多种糖(例如,碳水化合物)部分的去除或缺失。另外,该短语包括天然蛋白质的糖基化作用中的性质变化,其包括所存在的多种糖(例如,碳水化合物)部分的类型和比例(量)的变化。

[0156] 可以通过氨基酸残基修饰,或通过添加在天然序列中可以或可以不存在的一个或

多个糖基化作用位点来实现糖基化作用。例如,通常非糖基化残基可以被可以糖基化的的残基取代。可以通过改变氨基酸序列来实现糖基化作用位点的添加。可以(例如)通过一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(对于O-连接的糖基化作用位点)或者天门冬酰胺残基(对于N-连接的糖基化作用位点)的添加或取代来进行肽序列的改变。在每种类型中存在的N-连接和O-连接的寡糖和糖残基的结构可以是不同的。通常在两者上存在的一种类型的糖是N-乙酰神经氨酸(在下文中称为唾液酸)。唾液酸通常是N-连接和O-连接寡糖的末端残基,并且借助于其负电荷,可以赋予糖蛋白酸性性质。

[0157] 任选地,可以通过核苷酸(例如,DNA)水平上的变化,具体地通过在预选的碱基处使编码所述肽的DNA突变从而产生将翻译为所需氨基酸的密码子来改变本发明的肽序列。提高所述肽上碳水化合物部分数目的另一种方法是通过糖苷与所述多肽的化学或酶促连接(参见,例如,在WO 87/05330中)。可以通过除去潜在的糖基化作用位点,通过以化学和/或酶促方法去除糖基化作用,或通过取代编码糖基化氨基酸残基的密码子来实现去糖基化作用。化学去糖基化技术是已知的,并且可以通过使用多种内糖苷酶和外糖苷酶来实现多肽上碳水化合物部分的酶促切割。

[0158] 多种细胞系可以用于产生糖基化蛋白。一种非限制性实例是二氢叶酸还原酶(DHFR)缺陷型中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,它是用于产生重组糖蛋白的常用宿主细胞。这些细胞不表达 $\beta$ -半乳糖苷 $\alpha$ -2,6-涎基转移酶,并且因此不会增加 $\alpha$ -2,6键合至在这些细胞中产生的糖蛋白的N-连接寡糖的唾液酸。

[0159] 另一种类型的修饰是在本发明的肽序列的N-和/或C-末端结合(例如,连接)一个或多个其他组分或分子,如另一种蛋白质(例如,具有与主体蛋白质异源的氨基酸序列的蛋白质)或载体分子。因此,示例性肽序列可以与另一种组分或分子结合。

[0160] 在某些实施方式中,本发明的肽序列的氨基或羧基末端可以与免疫球蛋白Fc区(例如,人Fc)融合以形成融合结合物(或融合分子)。Fc融合结合物可以提高生物药物的全身半衰期,并因此生物药物产品可以具有延长的活性或需要较低的施用频率。Fc结合至沿血管排列的内皮细胞中的新生儿Fc受体(FcRn),并且一旦结合,Fc融合分子受到保护而不会降解和再释放到循环中,从而保持分子循环时间更长。据信这种Fc结合是内源IgG保持其长血浆半衰期的机制。熟知并且批准的Fc-融合药物由连接到抗体Fc区的两份生物药物组成以改善药物动力学、溶解度和产生效率。最近,Fc融合技术将一份生物药物连接至抗体的Fc区,从而与传统的Fc-融合结合物相比,优化了所述生物药物的药物动力学和药效性质。

[0161] 结合物修饰可用于产生保留了活性以及第二分子的额外或补充功能或活性的肽序列。例如,肽序列可以结合至分子,例如,以有利于体内溶解度、存储,或者体内货架半衰期或稳定性、降低免疫原性、延缓或控制释放等。其他功能或活性包括相对于非结合肽序列降低毒性的结合物,比非结合肽序列更有效地靶向细胞或器官类型的结合物,或进一步对抗与本文所述的病症或疾病(例如,糖尿病)有关的原因或作用的药物。

[0162] 蛋白质治疗剂的临床有效性可以受限于短血浆半衰期和对降解的敏感性。多种治疗性蛋白的研究已表明多种修饰,包括将肽序列结合或连接到任何多种非蛋白质聚合物,例如,聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯(参见,例如,通常通过共价结合至蛋白质和非蛋白质聚合物(例如,PEG)两者的连接部分)可以延长半衰期。这些PEG-结合的生物分子已显示具有临床有用的性质,其包括更好的物理和热稳定性,保护抵抗对酶促降解的敏感性、

提高的溶解度、更长的体内循环半衰期和降低的清除率、降低的免疫原性和抗原性和降低的毒性。

[0163] 适合于结合至本发明的肽序列的PEG通常在室温下可溶于水,并且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ ,其中R是氢或保护基,如烷基或链烷醇基,并且其中n是从1至1,000的整数。当R是保护基时,它通常具有1至8个碳。结合至所述肽序列的PEG可以是直链或支链的。支链PEG衍生物、“星形PEG”和多臂PEG均包括在本发明中。在本发明中使用的PEG的分子量不局限于任何具体的范围,但是某些实施方式具有500至200,00之间的分子量,而其他实施方式具有4,000至10,000之间的分子量。

[0164] 本发明包括结合物的组合物,其中PEG具有不同的“n”值,并因此多种不同的PEG以具体的比值存在。例如,一些组合物包含结合物的混合物,其中n=1、2、3和4。在一些组合物中,当n=1时,结合物的百分比为18-25%,当n=2时,结合物的百分比为50-66%,当n=3时,结合物的百分比为12-16%,并且当n=4时,结合物的百分比多至5%。这些组合物可以通过本领域中已知的反应条件和纯化方法产生。

[0165] PEG可以直接或间接(例如,通过中间物)结合至本发明的肽序列。例如,在一种实施方式中,PEG通过末端反应基团(“间隔臂”)结合。间隔臂是(例如)末端反应基团,其调节一个或多个肽序列和聚乙二醇的自由氨基或羧基之间的键。具有间隔臂的PEG可以结合至自由氨基,其包括可以通过用N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯来制备的N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇。可以结合至自由氨基的另一种活化的聚乙二醇是可以通过将聚乙二醇一甲基醚与氰尿酸氯反应来制备的2,4-双(0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪。结合至自由羧基的活化的聚乙二醇包括聚氧乙烯二胺。

[0166] 可以通过多种常规方法进行一种或多种本发明的肽序列与具有间隔臂的PEG的结合。例如,结合反应可以使用4:1至30:1的试剂与蛋白质的摩尔比,在pH 5至10,在4℃至室温的温度下,在溶液中进行30分钟至20小时。可以选择反应条件以指导反应主要产生所需的取代度。一般地,低温、低pH(例如,pH=5)和短反应时间倾向于降低所连接的PEG的数目,而高温、中性至高pH(例如,pH≥7)和更长的反应时间倾向于提高所连接的PEG的数目。可以使用本领域中已知的多种方法来终止反应。在一些实施方式中,通过使反应混合物酸化和在(例如)-20℃冷冻来终止反应。

[0167] 包括举例说明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的肽)的子序列、序列变体和修饰形式的本发明的肽序列还包括与大的、缓慢代谢的大分子的结合,所述大分子如蛋白质;多糖,如琼脂糖、琼脂糖、纤维素、纤维素珠;聚合物氨基酸,如聚谷氨酸、聚赖氨酸;氨基酸共聚物;失活的病毒颗粒;失活的细菌毒素,如来自白喉、破伤风、霍乱、白细胞毒素分子的类毒素;失活的细菌;和树突状细胞。如果需要,这些结合形式可以用于产生抗本发明的肽序列的抗体。

[0168] 适合于结合的其他组分和分子包括(例如)甲状腺球蛋白;白蛋白,如人血清白蛋白(HSA);破伤风类毒素;白喉类毒素;聚氨基酸,如聚(D-赖氨酸:D-谷氨酸);轮状病毒的VP6多肽;流感病毒血球凝集素、流感病毒核蛋白;钥孔血蓝素(KLH);和乙型肝炎病毒核心蛋白和表面抗原;或上述的任意组合。

[0169] 可以通过(例如)遗传操纵实现白蛋白与本发明的肽序列的融合,从而编码HSA(人血清白蛋白)或其片段的DNA与编码肽序列的DNA连接。此后,可以用处于(例如)适合的质粒

形式的融合的核苷酸序列转化或转染适合的宿主,以表达融合多肽。可以从(例如)原核或真核细胞体外实现表达,或者从(例如)转基因生物体内实现。在本发明的一些实施方式中,融合蛋白的表达是在哺乳动物细胞系中进行的,例如,CHO细胞系。

[0170] 将靶标蛋白或肽基因融合至白蛋白的其他方法包括称为 **Albufuse®** (Novozymes Biopharma A/S;Denmark) 的技术,并且结合的治疗性肽序列通常会更加有效并且在体内的吸收更好。该技术已商业应用于产生 **Albuferon®** (Human Genome Sciences),用于治疗丙型肝炎感染的白蛋白和干扰素 $\alpha$ -2B的组合。

[0171] 另一种实施方式需要使用一种或多种人域抗体(dAb)。dAb是人抗体(IgG)最小的功能性结合单元并且具有良好的稳定性和溶解度特征。该技术需要结合至HSA的dAb(借此形式“AlbudAb”;参见,例如,EP1517921B、W02005/118642和W02006/051288)和所关心的分子(例如,本发明的肽序列)。与当前用于延长肽的血清半衰期的技术相比,AlbudAb通常更小并且更易于在微生物表达系统(如细菌或酵母)中产生。由于HSA的半衰期为约三周,因此所得的结合分子改善了半衰期。dAb技术的使用也可以提高所关心的分子的效力。

[0172] 其他适合于结合的组分和分子包括适合于分离或纯化的那些。具体的非限制性实例包括结合分子,如生物素(生物素-抗生物素蛋白特异性结合对)、抗体、受体、配体、凝集素或包含固体载体的分子,所述载体包括(例如)塑料或聚苯乙烯珠、板或珠、磁性珠、测试条和膜。

[0173] 纯化方法(如阳离子交换色层法)可以通过电荷差用于分离结合物,其有效地将结合物分成它们多种分子量。例如,可以加载阳离子交换柱,然后用约20mM乙酸钠(pH~4)清洗,然后用在pH 3至5.5(优选地,pH~4.5)缓冲的线性(0M至0.5M)NaCl梯度洗脱。可以使用常规方法(例如,质谱法、SDS-PAGE或用于通过分子量分离分子实体的其他已知方法)通过分子量鉴别通过阳离子交换色谱法获得的部份的含量。然后,相应地鉴别含有具有连接了所需个数的PEG的结合物的部分,并从未修饰的蛋白质序列和具有连接了其他数目的PEG的结合物中纯化。

[0174] 在其他实施方式中,本发明的肽序列连接至化学试剂(例如,抗毒素或化疗剂),其包括(但不限于)细胞毒素剂,包括红豆杉醇、细胞分裂抑素B,短杆菌肽D、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素及其类似物或同系物。其他化学试剂包括(例如)抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺);烷化剂(例如,氮芥、卡莫司汀和洛莫司汀、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺铂);抗生素(例如,博来霉素);和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。可以使用本领域中已知的和本文所述的接头技术将细胞毒素结合至本发明的肽。

[0175] 其他适合于结合的组分和分子包括适合于在测定中检测的那些。具体的非限制性实例包括可检测标记物,如放射性同位素(例如, $^{125}\text{I}$ ; $^{35}\text{S}$ ; $^{32}\text{P}$ ; $^{33}\text{P}$ )、产生可检测产物的酶(例如,荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶)、荧光蛋白、生色蛋白、染料(例如,异硫氰酸荧光素);荧光发射金属(例如, $^{152}\text{Eu}$ );化学发光化合物(例如,氨基苯二酰肼和吖啶鎓盐);生物发光化合物(例如,萤光素);和荧光蛋白质。间接标记物包括结合至肽序列的标记的或可检测的抗体,其中所述抗体是可以检测的。

[0176] 在某些实施方式中,本发明的肽序列结合至放射性同位素以产生用作诊断或治疗

剂的细胞毒素放射性药物(放射性免疫结合物)。这些放射性同位素的实例包括(但不限于)碘<sup>131</sup>、铟<sup>111</sup>、钇<sup>90</sup>和镱<sup>177</sup>。用于制备放射性免疫结合物的方法是技术人员所知的。可商购的放射性免疫结合物的实例包括替伊莫单抗、替坦(tiuxetan)和托西莫单抗。

[0177] 本发明所包括的用于延长本发明的肽序列的循环半衰期、提高稳定性、降低清除率或改变免疫原性或变应原性的其他方式和方法包括通过HES化的肽序列修饰,其利用了连接至其他分子的羟乙基淀粉衍生物来修饰分子特征。在(例如)美国专利申请No.2007/0134197和2006/0258607中描述了HES化的多个方面。

[0178] 用于修饰本发明的肽序列的任何上述组分和分子可以任选地通过接头结合。适合的接头包括“灵活接头”,其通常具有足够的长度以允许修饰肽序列和连接的组分和分子之间进行一些运动。接头分子通常约6-50个原子长。接头分子还可以是(例如)芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇低聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。可以容易地选择适合的接头并且所述接头可以具有任何适合的长度,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50个氨基酸(例如,甘氨酸)。

[0179] 示例性的灵活接头包括甘氨酸聚合物(G)<sub>n</sub>、甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如,(GS)<sub>n</sub>、GSGGS<sub>n</sub>和GGGS<sub>n</sub>,其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及其他灵活接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,并因此可以用作组分之间的中性链。示例性的灵活接头包括(但不限于)GGSG、GSGGG、GSGSG、GSGGG、GGGSG和GSSSG。

[0180] 本发明的肽序列,包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列以及FGF19/FGF21融合体和嵌合体,以及表1-8和图1中所列的序列的子序列、序列变体和修饰形式具有如本文所述的一种或多种活性。活性的一个实例的葡萄糖降低活性。活性的另一个实例是(例如)与FGF19相比,肝细胞癌(HCC)刺激或形成的降低。活性的其他实例是(例如)与FGF21相比,脂肪(例如,甘油三酯、胆固醇、非HDL)或HDL增加活性的降低或下降。活性的另一个实例是(例如)与FGF21相比,瘦肉减少活性的降低或下降。活性的另一个实例是结合至成纤维细胞生长因子受体-4(FGFR4),或激活FGFR4,例如,以与FGF19的结合亲和力相当或更大的FGFR4亲和力结合至FGFR4的肽序列;和激活FGFR4的程度或量与FGF19激活FGFR4的相当或更大的肽序列。活性的其他实例包括例如与FGF19相比,醛-酮还原酶基因表达的下调或降低;与FGF21相比,S1c1a2基因表达的上调或提高。

[0181] 更具体地,本发明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列以及FGF19/FGF21融合体和嵌合体,以及表1-8和图1中所列的序列的子序列、变体和修饰形式)包括具有以下活性的那些:与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDP、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一项的FGF 19变体序列相比,具有降低的肝细胞癌(HCC)形成的肽序列;与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDP、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一项的FGF 19变体序列相比,具有更高的葡萄糖降低活性的肽序列;与FGF19或在FGF19的氨基酸16-20处具有取代WGDPI序列的GQV、GDI、WGPI、WGDPV、WGDI、GDPI、GPI、WGQPI、WGAPI、AGDPI、WADPI、WGDAI、WGDP、WDPI、WGDI、WGDP或FGDPI中任一项的FGF 19变体序列相比,具有较低脂肪提高活性(例如,较低的甘油三酯、胆固醇、非HDL)或更高的HDL提高活性的肽序

列;和与FGF21相比,具有较低瘦肉减少活性的肽序列。

[0182] 更具体地,本发明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列以及FGF19/FGF21融合体和嵌合体,以及表1-8和图1中所列的序列的子序列、变体和修饰形式)包括具有以下活性的那些:结合至成纤维细胞生长因子受体-4 (FGFR4),或激活FGFR4的肽序列,如以与FGF19的结合亲和力相当或更大的FGFR4亲和力结合至FGFR4的肽序列;激活FGFR4的程度或量与FGF19激活FGFR4的相当或更大的肽序列;例如,与FGF19相比,下调或降低醛-酮还原酶基因表达的肽序列;和与FGF21相比,上调或提高溶质载体家族1成员2 (Slc1a2) 基因表达的肽序列。

[0183] 可以在动物(如db/db小鼠)中确定活性,如,例如,肝细胞癌(HCC)形成或肿瘤发生、葡萄糖降低活性、脂质增加活性或瘦肉减少活性。可以通过本文所公开的(参见,例如,实施例1)或技术人员已知的测定来确定对与FGFR4的结合和FGFR4的激活的测量。

[0184] 当用于表示肽序列时,术语“结合”是指肽序列在分子水平上的相互作用。因此,结合至FGFR4的肽序列结合至FGFR4序列的全部或部分。使用本领域中已知的测定(例如,竞争结合、免疫沉淀法、ELISA、流式细胞术、免疫印迹),特异性和选择性结合可以不同于非特异性结合。

[0185] 可以使用本领域中已知的方法产生和分离肽和拟肽。可以使用化学法完整或部分地合成肽(参见,例如,Caruthers(1980). *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215; Horn(1980); and Banga, A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA)。可以使用多种固相技术进行肽合成(参见,例如,Roberts Science 269:202 (1995); Merrifield, *Methods Enzymol.* 289:3 (1997)) 并且可以(例如)根据生产商的说明书使用ABI 431A肽合成仪(Perkin Elmer)实现自动合成。还可以使用组合方法合成肽和肽模拟物。可以使用本领域中已知的多种程序和方法合成引入合成残基和多肽的模拟物(参见,例如, *Organic Syntheses Collective Volumes*, Gilman等人主编, John Wiley & Sons, Inc., NY)。可以通过化学修饰方法产生修饰的肽(参见,例如, Belousov, *Nucleic Acids Res.* 25:3440 (1997); Frenkel, *Free Radic. Biol. Med.* 19:373 (1995); 和 Blommers, *Biochemistry* 33:7886 (1994))。还可以使用如寡核苷酸介导(定点)突变、丙氨酸扫描和PCR基突变的方法来进行肽序列的改变、衍生化、取代和修饰。定点突变(Carter等人, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller等人, *Nucl. Acids Res.* 10:6487 (1987))、盒式突变(Wells等人, *Gene* 34:315 (1985))、限制-选择突变(Wells等人, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* 317:415 (1986)) 和其他技术可以用于克隆的DNA以产生本发明的肽序列、变体、融合体和嵌合体、及其改变、衍生化、取代和修饰。

[0186] “合成”或“产生”的肽序列是通过包括人为操纵在内的任何方法所制备的肽。这些方法包括(但不限于)上述方法,如化学合成、DNA重组技术、大分子的生物化学或酶促片段以及上述方法的组合。

[0187] 还可以修饰包括举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、序列变体和修饰形式的本发明的肽序列以形成嵌合分子。根据本发明,提供了包括异源域的肽序列。这些域可以添加到肽序列的氨基末端或羧基末端。还可以将异源域定位在肽序列内,和/或作为另外一种选择,侧接至FGF19和/或FGF21来源的氨基酸序列。

[0188] 术语“肽”还包括肽的二聚体或多聚体(低聚物)。根据本发明,还提供了举例说明的肽序列的二聚体或多聚体(低聚物)以及举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式。

[0189] 本发明还提供了编码本发明的肽序列的核酸分子,所述肽序列包括表1-8和图1中所列的序列的子序列、序列变体和修饰形式,以及包含编码所述肽的核酸的载体。因此,“核酸”包括编码本文所公开的举例说明的肽序列的那些,以及编码举例说明的肽序列的功能性子序列、序列变体和修饰形式的那些,只要它们保留了至少可检测或可测量的活性或功能。例如,本文所公开的举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体或修饰形式保留了降低或减少葡萄糖、提供正常的葡萄糖体内平衡,或减轻与体内慢性或急性高血糖有关的组织病理学病症等的一些能力。

[0190] 核酸在本文中还可以称为基因、多核苷酸、核苷酸序列、引物、寡核苷酸或探针,它是指含有天然或修饰的嘌呤和嘧啶的任意长度的聚合物,所述聚合物是多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸或者混合的多核糖-多脱氧核糖核苷酸及其端基异构形式。含有两种或更多种嘌呤和嘧啶的聚合物通常通过磷脂键或其类似物连接。该术语可以可互换地使用以表示核酸的所有形式,其包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。核酸可以是单链、双链或三链的、直链或环形的。核酸包括基因组DNA和cDNA。RNA核酸可以是剪接或非剪接mRNA、rRNA、tRNA或反义的。核酸包括天然存在的、合成的和核苷酸类似物和衍生物。

[0191] 由于遗传密码的简并度,核酸分子包括相对于编码本发明的肽序列的核酸分子的序列简并。因此,提供了编码肽序列(包括在本文中举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式)的简并核酸序列。当用于表示核酸序列时,术语“互补”是指所提及区域是100%互补的,即表现出100%的碱基配对而无错配。

[0192] 可以使用任何多种已知的标准克隆和化学合成方法来产生核酸,并且可以通过定点突变或本领域技术人员已知的其他重组技术来有意地改变。可以通过测序、凝胶电泳、UV光谱法确定多核苷酸的纯度。

[0193] 可以将核酸插入到其中所述核酸的表达受本文中称作“表达盒”的“表达控制元件”的影响或调控的核酸构件中。术语“表达控制元件”是指调控或影响可操作地连接其上的核酸序列的表达的一个或多个核酸序列元件。根据情况,表达控制元件可以包括启动子、增强子、转录终止子、基因沉默子、蛋白质编码基因前的起始密码子(例如,ATG)等。

[0194] 可操纵地连接至核酸序列的表达控制元件控制核酸序列的转录和(根据情况)翻译。术语“可操纵地连接”是指毗连,其中所提及的组分处于允许它们以其预定方式起作用的关系。通常,表达控制元件在基因的5'或3'末端是毗连的,但是还可以是内含子。

[0195] 表达控制元件包括组成性激活转录的元件,它是可诱导的(即,需要外部信号或刺激物进行激活)或去阻遏的(即,需要信号来关闭转录;当信号不存在时,转录激活或“脱阻遏”)。本发明的表达盒还包括足以赋予特定细胞类型或组织(即,组织特异性控制元件)可控的基因表达的控制元件。通常,这些元件位于编码序列的上游或下游(即5'和3')。启动子通常位于编码序列的5'位置。通过重组DNA或合成技术产生的启动子可用于提供本发明的多核苷酸的转录。“启动子”通常表示足以指导转录的最小序列元件。

[0196] 可以将核酸插入到质粒中以用于向宿主细胞的转化以及用于后续的表达和/或基因操纵。质粒是可以在宿主细胞中稳定增殖的核酸;质粒可以任选地含有表达控制元件以

驱使核酸的表达。对本发明来说,载体与质粒具有相同含义。质粒和载体通常含有至少一个用于在细胞中增殖的复制起点和启动子。质粒和载体还可以包括用于在宿主细胞中表达的表达控制元件,并因此对于(例如)编码肽序列、在宿主细胞和生物(例如,需要治疗的受试者)中表达肽序列,或者产生肽序列的核酸的表达和/或基因操纵是有用的。

[0197] 如本文所使用的,术语“转基因”是指已通过一定方式引入到细胞或生物中的多核苷酸。例如,具有转基因的细胞,所述转基因已通过基因操纵或细胞“转化”引入。已引入转基因的细胞或其子代被称为“转化的细胞”或“转化株”。通常,转化株的子代中包含转基因,或者转基因已成为由所述细胞发展成的生物的一部分。可以将转基因插入到染色体DNA中,或者作为自复制质粒、YAC、微型染色体等维持。

[0198] 细菌系统启动子包括T7和诱导型启动子,如噬菌体 $\lambda$ 的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂交启动子)和四环素反应性启动子。昆虫细胞系统启动子包括组成型或诱导型启动子(例如,蜕皮激素)。哺乳动物细胞组成型启动子包括SV40、RSV、牛乳头瘤病毒(BPV)和其他病毒启动子,或源于哺乳动物细胞基因组(例如,金属硫蛋白IIA启动子;热激启动子)或源于哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子;诱导型小鼠乳腺癌病毒长末端重复)的诱导型启动子。作为另外一种选择,逆转录病毒基因组可以是遗传修饰过的,以便引入并且指导肽序列在适合的宿主细胞中的表达。

[0199] 由于本发明的方法和使用包括体内递送,因此表达系统还包括为了体内使用而设计的载体。具体的非限制性实例包括腺病毒载体(美国专利No.5700470和5731172)、腺伴随病毒载体(美国专利No.5604090)、单纯疱疹病毒载体(美国专利No.5501979)、逆转录病毒载体(美国专利No.5624820、5693508和5674703)、BPV载体(美国专利No.5719054)、CMV载体(美国专利No.5561063)和细小病毒、轮状病毒、诺沃克病毒和慢病毒载体(参见,例如,美国专利No.6013516)。载体包括将基因递送至肠道细胞,包括干细胞的那些(Croyle等人, *Gene Ther.* 5:645 (1998); S.J.Henning, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 17:341 (1997), 美国专利No.5821235和6110456)。这些载体中的多数已批准用于人类研究。

[0200] 酵母载体包括组成型和诱导型启动子(参见,例如, Ausubel等人主编, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第2卷, 第13章, Greene Publish.Assoc.& Wiley Interscience, 1988; Grant等人, *Methods in Enzymology*, 153:516 (1987), eds.Wu & Grossman; Bitter *Methods in Enzymology*, 152:673 (1987), eds.Berger & Kimmel, Acad.Press, N.Y.; 和 Strathern等人, *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (1982) Cold Spring Harbor Press, 第I和II卷)。可以使用如ADH或LEU2的组成型酵母启动子或如GAL的诱导型启动子(R.Rothstein, *DNA Cloning, A Practical Approach*, 第11卷, 第3章, D.M.Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986)。能够促进外源核酸序列通过(例如)同源重组整合到酵母染色体上的载体是本领域已知的。当插入的多核苷酸对于更常见的载体来说太大时(例如,超过约12Kb), 通常使用酵母人工染色体(YAC)。

[0201] 表达载体还可以含有赋予对选择压力的抗性的可选择标志物或可识别标志物(例如,  $\beta$ -半乳糖苷酶), 借此使得具有待选择的载体的细胞能够生长和扩增。作为另外一种选择, 可选择标志物可以位于第二载体上, 所述载体与含有编码肽序列的核酸的第一载体一起共转染到宿主细胞中。选择系统包括(但不限于)单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(Wigler等人, *Cell* 11:223 (1977))、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(Szybalska等人,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:2026 (1962)) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy等人, Cell 22: 817 (1980)) 基因, 它们分别可以应用于tk-、hgp<sup>r</sup>t-或ap<sup>r</sup>t-细胞。另外, 可以将抗代谢物抗性用作选择dhf<sup>r</sup>的基础, 它能够赋予对氨基蝶呤的抗性 (O'Hare等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527 (1981)); gpt基因, 它能赋予对霉酚酸的抗性 (Mulligan等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072 (1981)); 新霉素基因, 它能赋予对氨基糖苷G-418的抗性 (Colberre-Garapin等人, J.Mol.Biol.150:1 (1981)); 嘌呤霉素; 以及潮霉素基因, 它能赋予对潮霉素的抗性 (Santerre等人, Gene 30:147 (1984))。其他的可选择基因包括trpB, 它使得细胞能够利用吡啶以取代色氨酸; hisD, 它使得细胞能够利用组胺醇以取代组氨酸 (Hartman等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:8047 (1988)); 和ODC (鸟氨酸脱羧酶), 它能赋予对鸟氨酸脱羧酶抑制剂2- (二氟甲基) -DL- 鸟氨酸 (DFMO) 的抗性 (McConlogue (1987) In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory)。

[0202] 根据本发明, 提供了产生如本文所述的FGF19和/或FGF21的变体或融合体的转化细胞 (体外、离体和体内) 和宿主细胞, 其中FGF19和/或FGF21的变体或融合体的表达是通过编码FGF19和/或FGF21的变体或融合体的核酸赋予的。表达本发明的肽序列的转化细胞和宿主细胞通常包括编码本发明的肽序列的核酸。在一种实施方式中, 转化细胞或宿主细胞是原核细胞。在另一种实施方式中, 转化细胞或宿主细胞是真核细胞。在多个方面, 真核细胞是酵母或哺乳动物 (例如, 人、灵长类等) 细胞。

[0203] 如本文所使用的, “转化”或“宿主”细胞是其中引入了核酸的细胞, 所述核酸可以增殖和/或转录以用于编码的肽序列的表达。该术语还包括宿主细胞的任何子代或亚克隆。

[0204] 转化细胞和宿主细胞包括, 但不限于, 微生物, 如细菌和酵母; 以及植物、昆虫和哺乳动物细胞。例如, 用重组噬菌体核酸、质粒核酸或粘粒核酸表达载体转化的细菌; 用重组酵母表达载体转化的酵母; 用重组病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒CaMV; 烟草花叶病毒TMV) 感染的或用重组质粒表达载体 (例如, Ti质粒) 转化的植物细胞系统; 用重组病毒表达载体 (例如, 杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统; 和用重组病毒表达载体 (例如, 逆转录病毒、腺病毒、牛痘病毒) 感染的动物细胞系统, 或为了短暂或稳定增殖或表达而工程改造的转化的动物细胞系统。

[0205] 对于基因疗法的使用和方法, 转化细胞可以在受试者中。可以用编码如本文所述的本发明的肽序列的核酸体内转化受试者中的细胞。作为另外一种选择, 可以用转基因或多核苷酸体外转化细胞, 然后再将所述细胞移植到受试者的组织中以使治疗起效。作为另外一种选择, 可以用编码FGF19和/或FGF21的变体或其融合/嵌合序列 (或变体) (如包括FGF19的全部或部分或者包括FGF21的全部或部分的嵌合肽序列) 的转基因或多核苷酸转化原代细胞分离株或建立的细胞系, 然后任选地将其移植到受试者的组织中。

[0206] 用于肽序列表达, 具体地体内表达的非限制性靶细胞包括胰腺细胞 (胰岛细胞)、肌细胞、粘膜细胞和内分泌细胞。这些内分泌细胞可以提供FGF19和/或FGF21的变体或其融合/嵌合序列 (或变体), 如包括FGF19的全部或部分或者包括FGF21的全部或部分的嵌合肽序列的可诱导的产生 (分泌)。其他转化细胞包括干细胞或其他多能或多潜能细胞, 例如, 分化成多种胰腺细胞 (胰岛细胞)、肌细胞、粘膜细胞和内分泌细胞的祖细胞。靶标干细胞提供本发明的肽序列的长期表达。

[0207] 如本文所使用的,当用于表示细胞时,术语“培养”是指细胞的体外生长。这些细胞的具体实例是分离自受试者和在组织培养中生长或适合于在组织培养中生长的细胞。另一个实例是体外基因操纵并移植回到相同或不同的受试者中的细胞。

[0208] 当用于表示细胞时,术语“分离的”是指从其天然存在的体内环境中分离的细胞。可以人为控制“培养的”和“分离的”细胞,如遗传转化。这些术语包括细胞的任何子代,其包括由于细胞分裂期间发生的突变,可能与亲本细胞不相同的子代细胞。该术语不包括全部人类。

[0209] 可以引入编码本发明的肽序列的核酸以用于向完整生物的细胞内稳定表达。包括非人转基因动物的这些生物对于研究在完整动物中的肽表达的影响以及治疗益处是有用的。例如,如本文所公开的,在小鼠中,FGF19和/或FGF21的变体或其融合/嵌合序列(或变体)(如包括如本文所说明的FGF19的全部或部分或FGF21的全部或部分的嵌合肽序列)的产生降低了葡萄糖并且是抗糖尿病的。

[0210] 发展了特定疾病(例如,糖尿病、退行性病症、癌症等)或对发展特定疾病敏感的小鼠系也用于引入如本文所述的治疗性蛋白以研究在疾病敏感小鼠中治疗性蛋白表达的作用。对特定疾病或生理条件敏感的转基因或遗传动物模型(如链脲佐菌素(STZ)-诱导的糖尿病(STZ)小鼠)是表达如本文所述的FGF19和/或FGF21的变体或其融合/嵌合序列(或变体),如包括FGF19的全部或部分或者包括FGF21的全部或部分的嵌合肽序列的适合的靶标。因此,根据本发明,提供了产生FGF19和/或FGF21的变体或其融合/嵌合序列(或变体),如包括如本文所说明的FGF19的全部或部分或FGF21的全部或部分的嵌合肽序列的非人转基因动物,所述肽的产生在所述动物中不是天然存在的,而是通过存在于所述动物的体细胞或生殖细胞中的转基因赋予的。

[0211] 术语“转基因动物”是指体细胞或生殖细胞具有直接或间接通过亚细胞水平上有意的基因操纵(如通过微量注射或用重组病毒转染)接受的遗传信息的动物。术语“转基因”还包括得自如本文所述的遗传操纵的转基因动物的细胞或组织(即“转基因细胞”、“转基因组织”)。在本文中,“转基因动物”不涵盖通过经典杂交育种或体外受精所产生的动物,而是表示其中一个或多个细胞接受核酸分子的动物。就转基因而言,本发明的转基因动物可以是杂合的或纯合的。在本领域中,用于产生转基因动物(包括小鼠、绵羊、猪和青蛙)的方法是熟知的(参见,例如,美国专利No.5,721,367、5,695,977、5,650,298和5,614,396),并且照此,这些方法是另外包括的。

[0212] 肽序列、编码肽序列的核酸、表达肽序列的载体和转化的宿主细胞包括分离和纯化的形式。当用作本发明组分的修饰语时,术语“分离的”是指组分基本上完全或至少部分从环境中的一种或多种组分中分离。一般地,当分离时,在自然界中存在的组分基本不含在自然界中通常与它们相关的一种或多种材料,例如,一种或多种蛋白质、核酸、脂肪、碳水化合物或细胞膜。术语“分离的”不排除组分的替代物理形式,如变体、修饰或衍生化形式、融合体和嵌合体、多聚体/寡聚体等,或者在宿主细胞中表达的形式。术语“分离的”也不排除其中存在组分的形式(例如,药物组合物、合并组合物等),其中任一种均是人为产生的。

[0213] 当不含一种或多种其他材料(如污染物或不期望的物质或材料)中的一些、大量或者大部分或全部时,“分离的”组分还可以是“纯化的”。本发明的肽序列通常在自然界中是未知的或者认为是不存在的。然而,对于在自然界中确实存在的组分,分离的组分通常将不

含一些、大量或者大部分或全部其他材料,所述材料通常在自然界中是与所述组分有关的。因此,在自然界中也存在的分离的肽序列不包括在数百万种其他序列中存在的多肽或多核苷酸,如(例如)蛋白质文库的蛋白质或者基因组或cDNA文库中的核酸。“纯化的”组分包括与一种或多种其他失活或活性分子的组合。例如,本发明的肽序列与另一种药物或试剂(如,例如,葡萄糖降低药物或治疗剂)混合。

[0214] 当用作肽序列、编码肽序列的核酸等的修饰语时,如本文所使用的,术语“重组”是指已经通过通常在自然界中不存在的方式(例如,体外)操纵(即工程改造)的组分。重组肽的具体实例将是通过用编码所述肽序列的核酸转染的细胞表达本发明的肽序列的情况。重组核酸的具体实例将是以下情况:编码肽序列的核酸(例如,基因组或cDNA)克隆至质粒,其具有或不具有在生物的基因组中所述基因通常邻接的5'、3'或内含子区。重组肽或核酸的另一个实例是杂交或融合序列,如包含FGF19的部分和FGF21的部分的嵌合肽序列。

[0215] 根据本发明,提供了本发明的肽序列的组合物和混合物,所述肽序列包括举例说明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列,以及表1-8和图1中所列的FGF19/FGF21融合体和嵌合体)的子序列、变体和修饰形式。在一种实施方式中,混合物包括一种或多种肽序列和可药用载体或赋形剂。在另一种实施方式中,混合物包括一个或多个肽序列和辅助药物或治疗剂,如抗糖尿病或葡萄糖降低药物或治疗剂。下文中说明了药物和治疗剂的实例。还提供了组合,如可药用载体或赋形剂中的一种或多种肽序列与一种或多种抗糖尿病或葡萄糖降低药物或治疗剂的组合。本发明的肽序列与另一种药物或试剂(如葡萄糖降低药物或治疗剂)的这些组合在(例如)根据本发明用于(例如)受试者治疗的方法和使用中是有用的。

[0216] 组合还包括本发明的肽序列或核酸向颗粒或聚合物的掺入,所述聚合物如聚酯、碳水化合物、聚胺酸、水凝胶、聚乙烯基吡咯烷酮、亚乙基-乙烯基乙酸酯、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、聚交酯/乙交酯共聚物或乙酸乙烯酯共聚物;在通过凝聚技术或通过界面聚合(例如,分别通过使用羟甲基纤维素或明胶-微胶囊或者聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)制备的微胶囊中的包埋;在胶体药物递送和分散系统中掺入,所述系统如大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠和脂质基体系(例如,N-脂酰基如N-月桂酰基、N-油酰基,脂肪胺如十二烷胺、油酰胺等,参见美国专利No.6638513),其包括(例如)水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

[0217] 包括如本文所述的举例说明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列,以及表1-8和图1中所列的FGF19/FGF21融合体和嵌合体)的子序列、变体和修饰形式的本发明的肽可以用于调节葡萄糖代谢并且有利于葡萄糖从血液向主要代谢器官(如瘦肉、肝和脂肪)的输送。这些肽序列可以足以或有效地恢复葡萄糖耐量和/或改善或提供正常葡萄糖体内平衡的量产生。

[0218] 如本文所公开的,多种FGF19和FGF21变体以及融合肽序列向小鼠的施用成功地降低了葡萄糖水平。此外,与FGF19相反,某些肽序列在小鼠中不刺激或诱导HCC形成或肿瘤发生。因此,本发明的肽(包括举例说明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的FGF19和FGF21变体和子序列,以及表1-8和图1中所列的FGF19/FGF21融合体和嵌合体)的子序列、变体和修饰形式)通过直接或间接体内方法或通过离体方法(例如,施用变体或融合肽、编码所述变体或融合肽的核酸,或表达所述变体或融合肽的转化细胞或基因疗法载体)向动物的施用

可以用于治疗多种病症。

[0219] 因此,本发明包括体外、离体和体内(例如,在受试者上或中)方法和使用。可以使用本文所述的本发明的肽序列中的任一种实践这些方法和使用。

[0220] 根据本发明,提供了治疗患有病症或具有患病风险的受试者的方法。在多种实施方式中,方法包括向受试者施用对治疗病症有效的量的肽序列,如表1-8和图1中所列的FGF19或FGF21的变体、融合体或嵌合体,或者表1-8和图1中所列的FGF19或FGF21的变体、融合体或嵌合体的子序列、变体或修饰形式。

[0221] 使用本发明的肽、以及方法和使用可治疗、可预防等的示例性病症包括代谢疾病和病症。疾病和病症的非限制性实例包括:1. 葡萄糖利用病症和与之有关的后遗症,包括糖尿病(1型和2型)、妊娠期糖尿病、高血糖、胰岛素抵抗、异常葡萄糖代谢、“糖尿病前期”(空腹血糖受损(IFG)或葡萄糖耐量受损(IGT))以及与高血糖病症有关或由高血糖病症产生的其他生理病症,其包括(例如)组织病理学变化,如胰腺 $\beta$ -细胞破坏。对于治疗,本发明的肽序列可以施用于空腹血糖(FPG)水平大于约100mg/dl的受试者。本发明的肽序列还可以用于其他高血糖相关病症,其包括肾损害(例如,肾小管损害或肾病)、肝变性、眼损害(例如,糖尿病性视网膜病或白内障)和糖尿病足病症;2. 血脂异常及其后遗症,如(例如)动脉粥样硬化、冠状动脉病、脑血管病症等;3. 可能与代谢综合征有关的其他病症,如肥胖和体重升高(包括其共病病症,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)),并且还包括血栓形成、高凝血和血栓前状态(动脉和静脉)、高血压、心血管疾病、中风和心力衰竭;4. 其中涉及炎症反应的病症或病症,其包括动脉粥样硬化、慢性炎症性疾病(例如,克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、哮喘、红斑狼疮、关节炎或其他炎症性风湿性病症;5. 细胞周期或细胞分化过程的病症,如脂肪细胞肿瘤、脂肪瘤样癌,其包括(例如)脂肪肉瘤、实体瘤和赘生物;6. 中枢和周围神经系统的神经退行性疾病和/或脱髓鞘病症和/或涉及神经炎症过程的神经疾病和/或其他外周神经病,其包括阿尔茨海默氏病、多发性硬化、帕金森氏病、进行性多灶性白质脑病和格林-巴利综合征;7. 皮肤和皮肤学病症和/或伤口愈合过程的病症,其包括红斑-鳞屑性皮肤病;和8. 其他病症,如X综合征、骨关节炎和急性呼吸窘迫综合征。

[0222] 如本文所使用的,当用于表示受试者的病症时,术语“高血糖的”或“高血糖症”是指受试者血液中的短暂或长期异常高葡萄糖水平。该病症可以由葡萄糖代谢或吸收中的延迟所引起,从而受试者表现出在正常受试者中不存在的葡萄糖耐受不良或葡萄糖升高的状态(例如,在具有发展糖尿病风险的葡萄糖不耐糖尿病前期受试者中,或者在糖尿病受试者中)。血糖量正常的空腹血糖(FPG)水平小于约100mg/dl,对于葡萄糖代谢受损,空腹血糖水平在约100至126mg/dl,对于糖尿病,空腹血糖水平大于约126mg/dl。

[0223] 如本文所公开的,本发明包括预防(例如,在易患特定病症的受试者中)、延迟、减缓或抑制肥胖症或不适当的体重(例如,与年龄、性别、种族等相当的适合的匹配受试者相比,大于正常体重指数或“BMI”)的发展、发病或治疗(例如,改善)所述疾病的方法。因此,在多种实施方式中,本发明用于(例如)治疗肥胖症或不适当的体重(包括肥胖症的共病病症,例如,阻塞性睡眠呼吸暂停)、关节炎、癌症(例如,乳腺癌、子宫内膜癌和结肠癌)、胆结石或高血糖的方法包括以对于治疗肥胖症或不适当的体重有效的量接触或施用如本文所述的本发明的肽(例如,如表1-8或图1中所示的FGF19和/或FGF21的变体或融合体)。在具体的方

面,受试者的体重指数大于25,例如,25-30、30-35、35-40,或大于40。

[0224] 此外,本发明包括预防(例如,在易患特定病症的受试者中)、减缓或抑制LDL、VLDL、甘油三酯或胆固醇不期望的血清/血浆水平或异常升高的发展,延缓其发病或治疗所述疾病的方法,上述情况均可以单独和组合导致(例如)斑块形成、血管狭窄或阻塞,以及高血压、中风和冠状动脉病风险的提高。这些病症可以由于(例如)遗传倾向性或饮食造成。

[0225] 术语“受试者”是指动物。通常,所述动物是将受益于使用本发明的肽序列的治疗的哺乳动物。具体实例包括灵长类(例如,人)、狗、猫、马、牛、猪和绵羊。

[0226] 受试者包括患有病症(例如,高血糖病症,如糖尿病)的那些,或者未患病症但可以具有发展所述病症的风险的受试者,例如,FPG水平大于100mg/dl(例如,在约100至126mg/dl之间)的糖尿病前期受试者。具有发展病症风险的受试者包括(例如)饮食可以有助于急性或慢性高血糖(例如,糖尿病)、不适当的体重或肥胖症的发展的那些,以及对急性或慢性高血糖、或不适当的体重或肥胖症的发展可能具有家族史或遗传倾向性的那些。

[0227] 如本文所公开的,治疗方法包括在受试者中以对于实现所需结局或结果有效的量接触或施用如本文所述的本发明的肽(例如,如表1-8或图1中所示的FGF19和/或FGF21的变体或融合体)。导致所需结局或结果的治疗包括在受试者中降低、减轻或防止病症的一种或多种症状的严重性或频率,例如,受试者病症的改善或者“有益作用”或“治疗作用”。因此,治疗可以短期(例如,1-6、6-12或12-14小时)、中期(例如,1-6、6-12、12-24或24-48天)或长期(例如,1-6、6-12、12-24、24-48周或者大于24-48周)降低或减轻或防止病症的一种或多种症状的严重性或频率,稳定或抑制病症的发展或恶化,并且在一些情况下,逆转所述病症。因此,就高血糖病症而言,例如,治疗可以降低或减少血糖,改善葡萄糖耐量,改善葡萄糖代谢,提供正常葡萄糖体内平衡,降低或减少胰岛素抵抗,降低或减少胰岛素水平,或者减轻、预防、改善或逆转代谢综合征或与高血糖病症(如糖尿病)有关或由它所引起的组织病理学变化。

[0228] 例如,肽序列、方法或使用可以将FPG水平大于100mg/dl(例如,约100至125mg/dl之间,或者大于125mg/dl)的一个或多个受试者中的葡萄糖降低或减少5-10%、10-20%、20-30%或30-50%或者更多,或者(例如)从大于200mg/dl降低或减少至小于200mg/dl,从大于150mg/dl降低或减少至小于150mg/dl,从大于125mg/dl降低或减少至小于125mg/dl等。另外,肽序列、方法或使用可以降低或减少(例如)基线HbA1c水平大于约5%、6%、7%、8%、9%或10%,具体地5%、6%或7%的糖尿病前期或糖尿病(例如,2型)受试者的葡萄糖。

[0229] 与高血糖病症有关的组织病理学变化的改善的非限制性实例包括(例如)降低、抑制、减少或阻止以下情况:胰腺细胞(例如, $\beta$ -细胞)的破坏或变性、肾损害(如肾小管钙化或肾病)、肝变性、眼损害(例如,糖尿病性视网膜病、白内障)、糖尿病足、粘膜(如口腔和牙龈)溃疡、牙周炎、过量出血、损伤或创口的缓慢或延迟愈合(例如,导致糖尿病合并痛的那些)、皮肤感染及其他皮肤病症、心血管和冠心病、周围性血管疾病、中风、血脂异常、高血压、肥胖症,或者发展任何上述疾病的风险。不适当的体重或肥胖症的改善可以包括(例如)体重减轻(如通过BMI等反映的)或相关症状的改善,如甘油三酯、胆固醇、LDL或VLDL水平的降低,血压降低、血管内膜增厚减少、心血管疾病或中风风险的降低或减少,安静时心率的降低等。

[0230] 对于使用和/或对于治疗受试者,“有效量”或“足够量”是指以单剂量或多剂量单

独或与一种或多种其他组分(治疗剂,如用于高血糖的药物或治疗)、治疗、规程或治疗方案试剂结合,提供任何时间期限(短期、中期或长期)的可检测反应,所需的结局或者对受试者任何可测量或可检测程度或对于任何时间期限(例如,数小时、数天、数月、数年或治愈)的客观或主观益处。这些量通常对于将病症,或所述病症的一种、多种或全部不利症状、后果或并发症改善至可测量的程度是有效的,尽管认为降低或抑制所述病症的发展或恶化是令人满意的结局。

[0231] 如本文所使用的,术语“改善”表示受试者病症的改善,病症严重性的降低或病症发展或恶化的抑制(例如,稳定病症)。就高血糖病症(例如,糖尿病、胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良、代谢综合征等)而言,例如,改善可以是血糖的降低或减少、胰岛素抵抗的降低、高血糖素的降低、葡萄糖耐量或葡萄糖代谢或体内平衡的改善。如本文所述,高血糖病症的改善还可以包括改善的胰功能(例如,抑制或防止β细胞/胰岛的破坏或提高β-细胞数目和/或功能),与所述病症有关或者由所述病症产生的病理的降低,如受影响的组织或器官的组织病理学改善。就不适当的体重或肥胖症而言,例如,改善可以是重量增加的减少、体重减轻(例如,如通过降低的BMI所反映的)或与不适当的体重或肥胖症有关的病症的改善,例如,如本所述(例如,血糖、甘油三酯、胆固醇、LDL或VLDL水平的降低或减小、血压降低、血管内膜增厚的减少等)。

[0232] 因此,治疗益处或改善不必需是与病症或疾病有关的任一种、大部分或全部症状、并发症、后果或潜在原因的完全去除。因此,当在一段时间内(数小时、数天、数周、数月等),存在短期、中期或长期的受试者病症发展性改善,或者发生、频率、严重性、发展或持续时间的部分降低,或者所述病症或疾病的一种或多种相关不利症状或并发症或后果或潜在原因、恶化或发展(例如,稳定病症、病症或疾病的一种或多种症状或并发症)的抑制或逆转,则实现了满意的终点。

[0233] 因此,就通过本发明的肽序列可治疗的病症而言,足以改善病症的肽的量将取决于所述病症的类型、严重性和程度或持续时间、所需要的治疗效果或结局,并且可以容易地由技术人员确定。适合的量还将取决于个体受试者(例如,在受试者中的生物利用率、性别、年龄等)。例如,受试者中正常葡萄糖体内平衡的短期或部分恢复可以降低胰岛素注射的剂量或频率,尽管尚未达到胰岛素的完全免除。

[0234] 可以通过(例如)测量一种或多种相关生理作用来确定有效量。在就高血糖病症而言的具体非限制性实例中,血糖的降低或减少或者葡糖耐量试验中的改善可以用于确定本发明的肽序列(包括举例说明的肽序列(例如,表1-8和图1中所列的序列)的子序列、序列变体和修饰形式)的量对于治疗高血糖病症是否有效。在另一个具体的非限制性实例中,有效量是足以降低或减少任何FPG水平(例如,基线水平)的量,其中,例如,足以将大于200mg/dl的FPG水平降低至小于200mg/dl的量、足以将175mg/dl至200mg/dl之间的FPG水平降低至小于施用前水平的量、足以将150mg/dl至175mg/dl之间的FPG水平降低至小于施用前水平的量、足以将125mg/dl至150mg/dl之间的FPG水平降低至小于施用前水平等的量(例如,将FPG水平降低至小于125mg/dl、小于120mg/dl、小于115mg/dl、小于110mg/dl等)。就HbA1c水平而言,有效量包括足以将水平降低或减少超过约10%至9%、超过约9%至8%、超过约8%至7%、超过约7%至6%、超过约6%至5%等的量。更具体地,HbA1c水平降低或减少约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%或以上是根据本发明的有效量。在就不适当的体重或肥胖症而言的另一个具体的非限制性实例中,有效量是足以降低或减少受试者体重指数(BMI)、降低或减少葡萄糖、降低或减少甘油三酯、脂肪、胆固醇、脂肪酸、LDL和/或VLDL的血清/血浆水平的量。在其他具体非限制性实例中,量是足以将任何上述参数降低或减少(例如)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%或以上的量。

[0235] 本发明用于治疗受试者的方法和使用适用于预防法以预防受试者中的病症,如高血糖病症或不适当的体重或肥胖症的发展。作为另外一种选择,方法和使用可以在受试者的治疗期间或之后实施。例如,在使用(例如)胰岛素或另一种葡萄糖降低药物或治疗剂治疗受试者以降低葡萄糖之前、期间或之后,本发明的方法或使用可以,例如,可以将本发明的肽序列施用于受试者。另外,可以将组分(如本发明的肽序列)与另一种药物或试剂(如,例如,葡萄糖降低药物或治疗剂)混合。

[0236] 相应地,本发明用于治疗受试者的方法和使用可以在另一种治疗之前、基本同时或之后实施,并且可以补充其他形式的疗法。补充疗法包括其他葡萄糖降低治疗,如胰岛素、胰岛素敏感性增强剂和其他药物治疗、饮食改变(低糖、低脂肪等)、重量减轻手术(通过胃旁路术、胃切除术减少胃容积)、胃束带术、胃气球术、胃袖状切除术等。例如,本发明用于治疗高血糖或胰岛素抵抗病症的方法或使用可以与在受试者中降低葡萄糖或提高胰岛素灵敏度的药物或其他药物组合物结合使用。用于治疗糖尿病的药物包括(例如)双胍和磺脲类(例如,甲苯磺丁脲、氯磺丙脲、醋酸己脲、妥拉磺脲、格列本脲和格列吡嗪)、噻唑烷二酮类(罗格列酮、吡格列酮)、GLP-1类似物、二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂、溴隐亭制剂(例如,胆汁酸螯合剂(例如,考来维仑))和胰岛素(丸剂和基本类似物)、具有或不具有噻唑烷二酮(TZD)的二甲双胍(例如,盐酸二甲双胍)和SGLT-2抑制剂。食欲抑制药物也是熟知的并且可以与本发明的方法结合使用。可以在本发明的方法和使用之前、同时或之后施用补充疗法。

[0237] 本发明的肽序列包括举例说明的肽序列(表1-8和图1中所列的序列)的子序列、序列变体和修饰形式,并且可以配制成单位剂量或单位剂量形式。在具体的实施方式中,肽序列处于对治疗(例如)由于高血糖而需要治疗的受试者有效的量。示例性单位剂量的范围为约25-250、250-500、500-1,000、1,000-2,500或2,500-5000、5,000-25000、25,000-50,000ng;约25-250、250-500、500-1000、1000-2500或2,500-5,000、5,000-25,000、25,000-50,000μg;和约25-250、250-500、500-1,000、1,000-2,500或2,500-5000、5,000-25,000、25,000-50,000mg。

[0238] 可以作为单一剂量或多剂量(例如,以有效或足够的量)施用包括举例说明的肽序列(表1-8和图1中所列的序列)的子序列、序列变体和修饰形式在内的本发明的肽序列以提供预期效果。示例性剂量范围为约25-250、250-500、500-1,000、1,000-2,500或2,500-5,000、5,000-25,000、25000-50000pg/kg;约50-500、500-5,000、5,000-25,000或25,000-50,000ng/kg;和约25-250、250-500、500-1,000、1,000-2,500或2,500-5,000、5,000-25,000、25,000-50,000g/kg。可以(例如)连续数天每天多次、隔天、每周或间歇(例如,每周两次、每1、2、3、4、5、6、7或8周1次,或每2、3、4、5或6个月1次)施用单剂量或多剂量。

[0239] 可以施用包括举例说明的肽序列(表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式在内的本发明的肽序列,并且可以通过任何途径通过全身、部位或局部施用实施方

法。例如,可以肠胃外(例如,皮下、静脉内、肌肉或腹膜内)、口服(例如,吞服、口腔或舌下)、吸入剂、皮内、腔内、颅内、经皮(局部)、经粘膜或直肠施用肽序列。可以通过(微)封装的递送系统施用包括举例说明的肽序列(表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式在内的本发明的肽序列和包括药物组合物的本发明的方法,或者可以将其包裹在用于施用的植入物中。

[0240] 本发明还提供了“药物组合物”,其包括本发明的肽序列(或序列),所述序列包括举例说明的肽序列(表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式和一种或多种药物可用的或生理学可用的稀释剂、载体或赋形剂。在具体的实施方式中,肽序列或序列以治疗可用的量存在。药物组合物可以根据本发明的方法和使用来使用。因此,例如,药物组合物可以离体或体内施用至受试者以实践本发明的治疗方法和使用。

[0241] 可以配制本发明的药物组合物以适合于预期的方法或施用途径;在本文中说明了示例性的施用途径。另外,药物组合物还可以包含本文所公开的或技术人员已知的其他治疗活性剂或化合物(例如,葡萄糖降低剂),它们可以在如本文所述的多种疾病或病症的治疗或预防中使用。

[0242] 药物组合物通常包含治疗有效量的至少一种本发明的肽序列(包括举例说明的肽序列(表1-8和图1中所列的序列)的子序列、变体和修饰形式)和一种或多种药物和生理学可用的配制试剂。适合的药物可用或生理学可用的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于,抗氧化剂(例如,抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如,苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、羟基苯酸乙酯或正丙酯)、乳化剂、助悬剂、分散剂、溶剂、填充剂、膨胀剂、缓冲剂、载体、稀释剂和/或佐剂。例如,适合的载体可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲盐水,其可能补充了在肠胃外施用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其他的示例性载体。本领域那些技术人员将容易地分辨可以在本发明中所使用的药物组合物和剂量形式中使用的多种缓冲剂。典型的缓冲剂包括但不限于,药物可用的弱酸、弱碱或其混合物。缓冲液组分还包括水溶性材料,如磷酸、酒石酸、乳酸、丁二酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、门冬氨酸、谷氨酸及其盐。

[0243] 载体中的主要溶剂在本质上可以是水性或非水性的。另外,所述载体可以含有用于改变或维持药物组合物的pH、渗透性、粘度、无菌性或稳定性的其他药物可用赋形剂。在某些实施方式中,药物可用的载体是水性缓冲液。在其他实施方式中,载体包含(例如)氯化钠和/或柠檬酸钠。

[0244] 本发明的药物组合物可以含有用于改变或维持本发明的肽的释放速率的其他药物可用的配制试剂。这些配制试剂包括技术人员已知用于制备缓释制剂的那些物质。有关药物和生理学可用的配制试剂的其他参考,参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(1990,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.18042),第1435-1712页,The Merck Index,第12版(1996,Merck Publishing Group,Whitehouse,NJ);和 Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms(1993,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,Pa.)。适合于施用的其他药物组合物在本领域中是已知的并且适用于本发明的方法和组合物。

[0245] 药物组合物可以作为溶液、混悬液、凝胶、乳浊液、固体或者脱水或冷冻干燥的粉末保存在无菌小瓶中。这些组合物可以作为即可使用的形式、使用前需要复原的冷冻干

干燥形式、使用前需要稀释的液体形式或其他可用形式存储。在一些实施方式中,药物组合物在单次使用容器(例如,单次使用的小瓶、安瓿瓶、注射器或自动注射器(类似于(例如)EpiPen®))中提供,而在其他实施方式中提供了多次使用容器(例如,多次使用的小瓶)。任何药物传送装置可以用于递送本发明的肽,其包括植入物(例如,可植入的泵)和导管系统,这两者均是技术人员已知的。通常皮下或肌肉内施用的积存注射也可以用于在限定的一段时间内释放本发明的肽。积存注射通常是固体基或油基的,并且通常包含至少一种本文所述的配制组分。技术人员熟悉积存注射的可能配制和使用。

[0246] 可以将药物组合物配制成为适于其预定施用途。因此,药物组合物包括适合于通过以下途径施用的载体、稀释剂或赋形剂,所述途径包括肠胃外(例如,皮下(s.c.)、静脉内、肌肉或腹膜内)、皮内、口服(例如,吞服)、吸入、腔内、颅内和透皮(局部)。

[0247] 药物组合物可以处于无菌可注射水性或油性混悬液的形式。可以使用本文所公开的技术人员已知的适合的分散剂或润湿剂和助悬剂来配制这种混悬液。无菌可注射制剂也可以是处于无毒肠胃外可用的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液,例如,作为1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可用的稀释剂、溶剂和分散介质包括水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、克列莫佛EL™(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其适合的混合物。另外,通常将无菌固定油剂用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的固定油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸(如油酸)在可注射剂的制备中得到使用。可以通过包含延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶)来实现具体可注射制剂的延长吸收。

[0248] 药物组合物可以处于适合于口服使用的形式,例如,作为片剂、胶囊、锭剂、糖锭、水性或油性混悬液、可分散性粉剂或微粒、乳浊液、固体或软胶囊、或者糖浆、溶液、微珠或酞剂。可以根据本领域对于药物组合物制备已知的任何方法来制备设计用于口服使用的药物组合物。这些组合物可以含有一种或多种试剂,如甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂,以提供药理学精美并且适口的制剂。含有本发明的肽的片剂可以与适合于片剂制备的无毒药物可用的赋形剂混合。这些赋形剂包括(例如)稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;成粒剂和崩解剂,例如,玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如,淀粉、明胶或阿拉伯胶;和润滑剂,例如,硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0249] 适合于口服的片剂、胶囊等可以是未涂覆的并且可以通过已知技术涂覆它们以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,并借此提供在较长的一段时间内的持续作用。例如,可以使用延迟材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们还可以通过本领域中已知的技术涂覆以形成用于缓释的渗透性治疗片剂。其他试剂包括生物可降解或生物相容性颗粒或聚合物,如聚酯、聚胺酸、水凝胶、聚乙烯基吡咯烷酮、聚酞、聚乙醇酸、乙烯基乙酸亚乙基酯、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、聚交酯/乙交酯共聚物或乙酸乙烯酯共聚物,以控制所施用的组合物的递送。例如,口头试剂可以包埋在通过凝聚技术或通过界面聚合(例如,分别通过使用羟甲基纤维素或明胶-微胶囊或者聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)制备的微胶囊中,或胶体药物递送系统中。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、微珠和脂质基系统,其包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用于制备这些制剂的方法是本领域技术人员已知的并且是可商购的。

[0250] 用于口服使用的制剂也可作为硬明胶胶囊存在,其中活性成分与惰性固体稀释剂

(例如,碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素)混合,或作为软明胶胶囊存在,其中活性成分与水或油性介质(例如,花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0251] 水悬液含有与适合于水悬液生产的赋形剂混合的活性物质。这些赋形剂是助悬剂,例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂,例如,卵磷脂,或者环氧烷与脂肪酸的缩合产物,例如,聚氧乙烯硬脂酸酯,或者环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物,例如,十七乙烯氧基鲸蜡醇,或者环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物,如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯,或者环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物,例如,聚乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。水悬剂还可以含有一种或多种防腐剂。

[0252] 可以通过将活性成分悬浮在植物油(例如,花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(如液体石蜡)中来配制油性悬液。油性悬液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂(如以上所说明的那些)和调味剂以提供适口的口服制剂。

[0253] 适合于通过加入水来制备水悬剂的可分散性粉剂和微粒提供了与分散剂或润湿剂、助悬剂以及一种或多种防腐剂相混合的活性成分。在本文中举例说明了适合的分散剂或润湿剂以及助悬剂。

[0254] 本发明的药物组合物还可以处于水包油乳化剂的形式。油相可以是植物油(例如,橄榄油或花生油)或矿物油(例如液体石蜡)或这些油剂的混合物。适合的乳化剂可以是天然存在的胶,例如,阿拉伯树胶或黄芪胶;天然存在的磷脂,例如,黄豆、卵磷脂,以及衍生自脂肪酸的酯或偏酯;己糖醇酐,例如,山梨糖醇酐单油酸酯;和偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如,聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。

[0255] 药物组合物还可以包括载体以保护所述组合物不被快速降解或从体内消除,如缓释制剂,其包括植入物、脂质体、水凝胶、前体药物和微囊密封的递送系统。例如,可以单独使用延迟材料(如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯)或与蜡结合使用。可以通过包含延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶)来实现可注射药物组合物的延长吸收。可通过多种抗菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)防止微生物的作用。

[0256] 本发明还包括处于用于直肠施用的栓剂形式的本发明的肽。可以通过将本发明的肽与在常温下为固体而在直肠温度下为液体并因此将在直肠中融化以释放药物的适合的无刺激赋形剂混合来制备栓剂。这些材料包括(但不限于)可可脂和聚乙二醇。

[0257] 根据本发明,提供了鉴别具有葡萄糖降低活性但无明显肝细胞癌(HCC)活性的肽(或如本文所述的子序列、变体或修饰形式)的方法。在一种实施方式中,方法包括:筛选(例如,测定或测量)肽序列(或如本文所述的子序列、变体或修饰形式)的葡萄糖降低活性;和筛选(例如,测定或测量)肽序列(或如本文所述的子序列、变体或修饰形式)的HCC活性或者与HCC活性有关的标志物的表达。借此,具有葡萄糖降低活性并且具有降低的或没有HCC活性的肽鉴别了所述肽。在具体的方面,与HCC活性有关的标志物包括脂质谱——与FGF19相比,具有较低脂肪提高活性的肽表明所述肽具有降低的或者不具有HCC活性;或者与HCC活性有关的标志物包括醛-酮还原酶基因表达——与FGF19相比,下调或降低醛-酮还原酶基因表达的肽表明所述肽具有降低的或者不具有HCC活性;或者指示HCC活性的标志物包括Slc1a2基因表达——与FGF19相比,上调或提高Slc1a2基因表达的肽表明所述肽具有降低

的或者不具有HCC活性。

[0258] 在本文中,术语“测定”和“测量”及其语法变化是可互换使用的并且表示定性或定量确定,或者定性和定量确定两者。当这些术语用于表示检测时,考虑了测定相对量的任何含义,其包括本文所述和本领域中已知的多种方法。例如,可以通过RNA印迹法、免疫印迹法、免疫沉淀测定或通过测量所表达的蛋白(例如,醛酮还原酶或Slc1a2)的活性、功能或量来测定或测量基因表达。

[0259] 作为最常见的肝癌类型的HCC的风险因素包括2型糖尿病(可能由肥胖症加剧)。根据糖尿病的持续时间以及治疗规程,2型糖尿病中HCC的风险更大(非糖尿病风险的约2.5至约7倍)。

[0260] 可以在HCC的筛选和诊断中使用多种方法并且这些方法对于技术人员是熟知的。HCC的指示物包括肿瘤标志物的检测,如升高的甲胎蛋白(AFP)或右旋- $\gamma$ -羧基-凝血酶原(DCP)水平。多种不同的扫描和成像技术也是有用的,其包括超声、CT扫描和MRI。对于本发明,通过(例如)定量动物模型(如db/db小鼠)中HCC瘤的形成,施用肽,与野生型FGF19的HCC瘤的形成进行比较,可以体内确定肽(例如,候选肽)是否表现出诱导HCC的迹象的评价。宏观地,肝癌可以是瘤状的,其中肿瘤(它们是圆形至椭圆形、灰色或绿色、被很好的围绕但未包封)表现为一个大块或多个小块。作为另外一种选择,HCC可以作为浸润性肿瘤存在,它是弥漫性的并且未充分围绕并经常浸润门静脉。

[0261] 通常在一种或多种上述技术的结果表明HCC可能存在后,进行肝组织样品的病理评价。因此,本发明的方法还可以包括评价来自在HCC研究中有用的体内动物模型(例如,db/db小鼠)的肝组织样品以确定肽序列是否表现出诱导HCC的迹象。通过显微评价,病理学家可以确定HCC的四种一般结构和细胞类型(形状)中的一种是否存在(即纤维板层、假腺管型(腺状)、多形态(巨细胞)和透明细胞)。

[0262] 本发明还包括抗体及其片段的产生和使用,所述抗体及其片段结合本发明的肽序列,所述肽序列包括举例说明的肽序列(包括表1-8和图1中所列的肽)的子序列、序列变体和修饰形式。

[0263] 如本文所使用的,术语“抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)表示具有相同结构特性的糖蛋白。尽管抗体对抗原显示出结合特异性,但是免疫球蛋白包括抗体和可能缺少抗原特异性的其他抗体样分子两者。

[0264] 术语“抗体”包括完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两个完整抗体所形成的多重特异性抗体(例如,双重特异性抗体)和包括Fab和F(ab)<sup>2</sup>的抗体结合片段,只要它们表现出所需的生物活性即可。基本的抗体结构单元包含四聚体,并且每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。相反,每条链的羧基末端部分定义了主要负责效应子功能的恒定区。人的轻链分为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链,而人的重链分为 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 或 $\epsilon$ ,并且分别将抗体同型定义为IgM、IgD、IgA和IgE。通过重组DNA技术,或通过完整抗体的酶促或化学切割产生了结合片段。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv和单链抗体。

[0265] 每条重链在一端具有可变域(VH),随后是多个恒定域。每条轻链在一端具有可变域(VL)并且在它的另一端具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域对应,而轻链可

变域与重链可变域对应。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过具有约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括具有约10个或更多个氨基酸的“D”区。抗体链均显示出通过三个高变区(也称为互补决定区或CDR)连接的相对保守的框架区(FR)的相同一般结构。来自每对的两条链的CDR通过框架区排列,使得能够结合至特异性表位。从N末端至C末端,轻链和重链均包含域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0266] 完整的抗体具有两个结合位点,并且除了在双功能或双重特异性抗体中之外,所述两个结合位点是相同的。双重特异性或双功能抗体是具有两个不同的重链/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂交抗体。可以通过多种方法(包括杂交瘤融合或Fab'片段连接)产生双重特异性抗体。

[0267] 如本文所使用的,术语“单克隆抗体”是指得自基本均一的抗体群体的抗体,即除了可以少量存在的可能的天然突变之外,组成所述群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异的,并且针对单个抗原位点。与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备相反,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。

[0268] “中和抗体”是能够消除或显著降低它所结合的靶标抗原的效应子功能的抗体分子。

[0269] 可以通过完整抗体的酶促或化学切割产生抗体结合片段。用木瓜蛋白酶消化抗体导致产生了两个相同的抗原结合片段(也称为“Fab”片段),和无抗原结合活性的“Fc”片段。用胃蛋白酶消化抗体导致产生了F(ab')<sub>2</sub>片段,其中抗体分子的两个臂仍保持连接并包含两个抗原结合位点。F(ab')<sub>2</sub>片段具有交联抗原的能力。

[0270] 术语“Fab”是指包含轻链恒定域和重链CH1域的抗体片段。当在本文中使用时,术语“Fv”是指保留抗原识别和抗原结合位点两者的抗体的最小片段。在双链Fv种类中,该区域由一条重链可变域和一条轻链可变域通过非共价结合形成的二聚体构成。在单链Fv种类中,可通过柔性肽接头将一条重链可变域和一条轻链可变域共价连接,从而可使轻链和重链以类似于双链Fv种类中的结构的“二聚”结构结合。它处于这种构象:每个可变域的三个CDR相互作用以限定VH-VL二聚体的表面上的抗原结合位点。总之,6个CDR为抗体提供了抗原结合特异性,即使是单个可变域(或只包含3个对抗原特异的CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力。

[0271] 术语“互补决定区”或“CDR”是指免疫学受体的部分,它与特异性配体接触并确定了它的特异性。术语“高变区”是指导致抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基和/或来自“高变区”的那些残基。

[0272] 如本文所使用的,术语“表位”是指蛋白质抗原上抗体的结合位点。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团组成,如氨基酸或糖侧链,以及特异性立体结构以及电荷特性。据称当解离常数 $\leq 1\mu\text{M}$ ,优选地 $\leq 100\text{nM}$ ,并且最优选地 $\leq 10\text{nM}$ 时,抗体结合抗原。平衡常数( $K_D$ )提高是指表位和抗体之间的亲和力较低,而平衡常数降低是指表位和抗体之间的亲和力较高。 $K_D$ “不大于”某个量的抗体是指抗体将以给定的 $K_D$ 或更强烈地结合至表位。而 $K_D$ 描述表位和抗体的结合特征,“效价”描述抗体本身对抗体功能的有效性。平衡常数和效价之间不必存在相关性;因此,例如,相对低的 $K_D$ 不能自动表示高效价。

[0273] 与抗体有关的术语“选择性结合”不表示抗体仅结合至单一物质,而是抗体对第一物质的 $K_D$ 小于抗体对第二物质的 $K_D$ 。只结合至表位的抗体仅结合至该单一表位。

[0274] 当施用于人时,含有啮齿类(鼠或大鼠)的可变区和/或恒定区的抗体有时与(例如)从体内快速清除或通过身体抵抗抗体而产生的免疫应答有关。为了避免啮齿类来源的抗体的使用,可以通过将人抗体功能引入到啮齿类中来产生完全人抗体,从而使啮齿类产生完全人抗体。除非在本文中具体指出,否则“人”和“完全人”抗体可以在本文中可互换地使用。当区别仅部分为人的抗体与完整或完全人抗体时,术语“完全人”可以是有用的。技术人员了解产生完全人抗体的多种方法。

[0275] 为了解决可能的人抗小鼠抗体反应,可以使用嵌合抗体或另外的人源化抗体。嵌合抗体具有人恒定区和鼠可变区,并且照此,可以在一些患者中观察到人抗嵌合抗体反应。因此,有利的是提供抗多聚体酶的完全人抗体,以避免可能的人抗小鼠抗体或者人抗嵌合抗体反应。

[0276] 可以通过(例如)通过技术人员已知的技术的杂交瘤细胞系的产生来制备完全人单克隆抗体。其他制备方法包括编码用于适合的哺乳动物宿主细胞(如CHO细胞)的转化的特定抗体的序列的使用。转化可以通过用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的任何已知方法,其包括(例如)将多核苷酸包装到病毒(或病毒载体)中并用病毒(或载体)或通过本领域中已知的转染程序转导宿主细胞。用于将异源多核苷酸引入到哺乳动物细胞中的方法在本领域中是熟知的并且包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、多核苷酸在脂质体中的封装和DNA向核中的直接微量注射。作为用于表达的宿主可用的哺乳动物细胞系在本领域中是熟知的并且包括(但不限于)CHO细胞、HeLa细胞和人肝细胞癌细胞。

[0277] 可以诊断和/或治疗性使用抗体。例如,通过检测本发明的一种或多种肽在受试者中的水平并将检测水平与标准对照水平或先前(例如,在任何疾病之前)在受试者中确定的基线水平相比较,可以将抗体用作诊断剂。抗体可以用作治疗剂以调节本发明的一种或多种肽的活性,借此对病症或病症产生作用。

[0278] 本发明提供了试剂盒,其包括(但不限于)包装在适合的包装材料中的本发明的肽序列,其任选地与其一种或多种治疗剂、组分和药物组合物结合。试剂盒任选地包括商标或包装说明,其包括组分说明或者其中组分的体外、体内或离体使用的说明。示例性说明包括减小或降低血糖、高血糖治疗、糖尿病治疗等的说明。

[0279] 试剂盒可以含有这些组分中的一些,例如,单独的两种或更多种肽序列,或肽序列与另一种治疗有用组分(例如,抗糖尿病药物,如促胃液素化合物)的组合。

[0280] 术语“包装材料”是指安放试剂盒组分的物理结构。包装材料可以维持组分无菌,并且可以由常用于这些目的的材料(例如,纸、波纹纤维、玻璃、塑料、箔片、安瓿瓶、小瓶、管等)制备。

[0281] 本发明的试剂盒可以包括标签或插页。标签或插页包括“印刷品”,例如,单独的或粘贴在组分、试剂盒或包装材料(例如,箱)上的或连接到(例如)含有试剂盒组分的安瓿瓶、管或小瓶上的纸或纸板。标签或插页还可以包括计算机可读的媒介,如磁盘(例如,硬盘、记录卡、存储磁盘)、光盘,如CD-或DVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁带,或者电存储媒介,如RAM和ROM,或者这些的混合,如磁性/光学存储媒介、闪存媒介或存储类卡。

[0282] 标签或插页可以包括其中的一种或多种组分、剂量、活性成分的临床药理学(包括作用机理、药物动力学和药效学)的识别信息。标签或插页可以包括标识生产商信息、批号、

生产商地址和日期的信息。

[0283] 标签或插页可以包括可以使用试剂盒组分的病症、病症、疾病或症状的信息。标签或插页可以包括对临床医师或对受试者在方法、治疗规程或治疗方案中使用一种或多种试剂盒组分的说明。说明可以包括剂量、频率或持续时间以及实施本文所述的任何方法、治疗规程或治疗方案的说明。示例性说明包括如本文所述的治疗或肽序列的使用的说明。因此，本发明的试剂盒还可以包括实施本文所述的发明的任何方法和使用(包括治疗方法和使用的)的标签或说明。

[0284] 标签或插页可以包括组分可以提供的任何益处的信息，如预防或治疗益处。标签或插页可以包括有关可能的不良副作用的信息，如警告受试者或临床医师不适合使用特定组分的情况。当受试者已经、将要或者正在进行可能与所述组分不相容的一种或多种其他药物治疗，或者受试者已经、将要或者正在经历将会与所述组分不相容的另一种治疗规程或治疗方案时，也可以发生不良副作用，并且因此，说明可以包括有关这些不相容性的信息。

[0285] 本发明的试剂盒还可以包括其他组分。试剂盒的每种组分可以包装在单个容器内并且可以将所有多个容器放置在单个包装内。本发明的试剂盒可以设计用于冷藏。本发明的试剂盒还可以设计含有本发明的肽序列，或者含有编码肽序列的核酸。试剂盒中的细胞可以维持在适合的储存条件下直至使用。

[0286] 除非另外定义，否则本文中所使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域技术人员通常理解的含义相同。尽管可以在本发明的实践或测试中使用与本文所述那些相似或等同的方法和材料，但是在本文中描述了适合的方法和材料。

[0287] 本文中引用的所有专利申请、专利公开、专利及其他参考文献、GenBank引用和ATCC引用均以它们的全部内容作为参考并入。在矛盾的情况下，将以本说明书(包括定义)为准。除非在上下文中明确说明，否则如本文所使用的，单数形式的“一个”、“和”以及“所述”包括复数对象。因此，例如，提及“肽序列”或“治疗”包括多个这些序列、治疗等。

[0288] 如本文所使用的，在整个文档中，数值通常以范围的形式存在。除非在上下文中明确表示，否则范围形式的使用仅是为了方便和简洁，并不应将其视作对本发明范围刻板的限制。因此，除非上下文明确说明，否则范围的使用明确地包括了所有可能的子范围，该范围内所有单个数值，并且所有数值或数值范围包括这些范围内的整数和数值的分数或范围内的整数。不考虑范围的宽度并且在本专利文献的整个上下文中，该构成是适用的。因此，例如，提到范围90-100%包括91-99%、92-98%、93-95%、91-98%、91-97%、91-96%、91-95%、91-94%、91-93%等。提到范围90-100%还包括91%、92%、93%、94%、95%、95%、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。

[0289] 另外，提到范围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包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等。在其他实例中，提到范围25-250、250-500、500-1000、1000-2500或者2500-5000、5000-25,000、5000-50,000包括其中的或涵盖这些数值的任何数值或范围，例如，25、26、27、28、29...250、251、252、253、254...500、501、502、503、504...等。

[0290] 另外如本文所使用的,在整个该文档中公开了一系列范围。一系列范围的使用包括上下限的组合以提供另一个范围。不考虑范围的宽度并且在本专利文献的整个上下文中,该构成是适用的。因此,例如,提到一系列范围,如5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-75、75-100、100-150,包括范围,如5-20、5-30、5-40、5-50、5-75、5-100、5-150和10-30、10-40、10-50、10-75、10-100、10-150和20-40、20-50、20-75、20-100、20-150等

[0291] 为了简洁,在本文中使用了某些缩写。一个实例是单字母缩写以代表氨基酸残基。氨基酸以及它们相应的三字母和单字母缩写如下所示:

	丙氨酸	Ala	(A)
	精氨酸	Arg	(R)
	天门冬酰胺	Asn	(N)
	门冬氨酸	Asp	(D)
	半胱氨酸	Cys	(C)
	谷氨酸	Glu	(E)
	谷氨酰胺	Gln	(Q)
	甘氨酸	Gly	(G)
[0292]	组氨酸	His	(H)
	异亮氨酸	Ile	(I)
	亮氨酸	Leu	(L)
	赖氨酸	Lys	(K)
	蛋氨酸	Met	(M)
	苯丙氨酸	Phe	(F)
	脯氨酸	Pro	(P)
	丝氨酸	Ser	(S)
	苏氨酸	Thr	(T)
	色氨酸	Trp	(W)
[0293]	酪氨酸	Tyr	(Y)
	缬氨酸	Val	(V)

[0294] 本文使用肯定的语言一般地公开了本发明以描述多种实施方式。本发明还具体地包括其中全部或部分排除了特定主题(如物质或材料、方法步骤和条件、规程、程序、测定或分析)的实施方式。因此,尽管在本文中本发明通常不会表达本发明所不包括的内容,但尽管如此,未明确包括在本发明内的方面也在本文中公开。

[0295] 已描述了本发明的多个实施方式。尽管如此,应理解在不背离本发明的精神和范围的情况下可以进行多种改变。因此,以下实施例旨在说明但不限制在权利要求中描述的本发明的范围。

## 实施例

### [0296] 实施例1

[0297] 以下是对在本文的研究中所使用的多种方法和材料的说明。

[0298] 动物。db/db小鼠购自The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), 根据福利方针, 在控制的光照(12小时光照和12小时黑暗循环, 黑暗为6:30pm-6:30am)、温度( $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ )和湿度( $50\% \pm 20\%$ )条件下饲养小鼠。它们能够自由饮水(高压灭菌的蒸馏水)并且无限制地饲喂含有17kcal%脂肪、23kcal%蛋白质和60kcal%碳水化合物的商品化饲料(Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, Irradiated 2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet)。对于饲料诱导的肥胖症, 用含有60kcal%脂肪、20kcal%蛋白质和20kcal%碳水化合物的高脂肪饲料(D12492, Research Diet, New Brunswick, NJ, USA)饲养C57BL6/J小鼠(Jackson Laboratory) 16-20周。所有动物研究是经过NGM实验动物关怀及使用委员会批准的。

[0299] DNA和氨基酸序列。编码人FGF19的ORF的cDNA (智人FGF19, GenBank登录号No. NM\_005117.2) 变体

[0300] cDNA编码的蛋白质序列 (GenBank登录号No. NP\_005108.1) PCR。使用从小肠组织制备的重组DNA (cDNA) 通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增FGF19 ORF。使用Phusion高保真DNA聚合酶的PCR试剂盒购自New England BioLabs (F-530L, Ipswich, MA)。使用了以下引物: PCR正义引物: 5' CCGACTAGTCACCatgcgagcggtgtgtgg和PCR反义引物: 5' ATAAGAATGCGGCCGCT TACTTCTCAAAGCTGGGACTCCTC。

[0301] 用限制酶Spe I和Not I (限制酶切位点分别包括在5'或3' PCR引物中) 消化扩增的DNA片段, 然后用已通过相同限制酶消化的AAV转基因载体连接。用于表达的载体含有可选择标志物和由克隆编码序列插入位点5'的强真核启动子, 随后是3'未翻译区和牛生长素多腺苷酸尾组成的表达盒。表达构件还在5'和3'端侧接了内部末端重复。

[0302] AAV的产生和纯化。将AAV293细胞 (得自Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 在添加了10%胎牛血清和1×抗生素-抗真菌溶液 (Mediatech, Inc. Manassas, VA) 的杜尔贝科改良的伊格尔培养基 (DMEM, Mediatech, Inc. Manassas, VA) 中培养。将细胞在第1天以50%的密度在150mm细胞培养板上铺板, 并在第2天使用磷酸钙沉淀法通过下列3种质粒 (每种20mg/板): AAV转基因质粒、pHelper质粒 (Agilent Technologies) 和AAV2/9质粒转染 (Gao等人, J. Virol. 78:6381 (2004))。转染后48小时, 从板上刮去细胞, 通过在3000×g离心成粒并在含有20mM Tris pH 8.5、100mM NaCl和1mM  $\text{MgCl}_2$ 的缓冲液中再悬浮。将悬液在乙醇干冰浴中冷冻, 然后在37°C水浴中融化。冷冻和融化循环重复三次; Benzenase (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) 加入至50单位/ml; 脱氧胆酸盐加入至最终浓度0.25%。在37°C孵育30分钟后, 通过在5000×g离心20分钟将细胞碎片成粒。如前所述, 使用不连续的iodixanal (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) 梯度纯化上清液中的病毒颗粒 (Zolotukhin S. 等人 (1999) Gene Ther. 6:973)。使用Vivaspin 20 (截留分子量100,000道尔顿, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France) 浓缩病毒母液, 并使用10%甘油在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中再悬浮, 并在-80°C储存。为了确定病毒基因组复制数, 将2ml病毒母液在37°C在6ml含有50单位/ml Benzonase, 50mM Tris-HCl pH 7.5、10mM  $\text{MgCl}_2$ 和10mM  $\text{CaCl}_2$ 的溶液中孵育30分钟。

[0303] 随后, 加入15ml含有2mg/ml蛋白酶K、0.5% SDS和25mM EDTA的溶液并将混合物在

55℃再孵育20分钟以释放病毒DNA。用微型DNeasy试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)清洗病毒DNA并用40ml水洗脱。通过使用定量PCR确定病毒基因组拷贝(GC)。

[0304] 用PBS将病毒母液稀释至所期望的GC/ml。通过尾静脉注射将病毒工作溶液(200μl)递送至小鼠。

[0305] 血糖测定。按照生产商的说明,使用通过ACCU-CHEK活性计(Roche Diagnostics, Indianapolis,IN)读取的ACCU-CHEK活性测试条测量小鼠尾部剪段中的血糖。

[0306] 脂肪谱测定。将小鼠尾部剪段的全血收集到扁平毛细管(BD Clay Adams SurePrep,Becton Dickinson and Co.Sparks,MD)中。通过在Autocrit Ultra 3(Becton Dickinson and Co.Sparks,MD)中旋转管将血清和血细胞分开。按照生产商的说明,使用Integra 400临床分析仪(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)测定血清样品的脂肪谱(甘油三酯、总胆固醇、HDL和非HDL)。

[0307] 血清FGF19/FGF21/变体暴露水平测定。将小鼠尾部剪段的全血(约50ml/只小鼠)收集到扁平毛细管(BD Clay Adams SurePrep,Becton Dickinson and Co.Sparks,MD)中。通过在Autocrit Ultra 3(Becton Dickinson and Co.Sparks,MD)中旋转管将血清和血细胞分开。按照生产商的说明,使用EIA试剂盒(Biovendor)确定血清中FGF19、FGF21和变体的暴露水平。

[0308] 肝细胞癌(HCC)测定。AAV注射后6个月,从db/db小鼠收获肝脏样品。将HCC得分记录为来自变体注射小鼠的整个肝脏表明上HCC瘤的数目除以来自野生型FGF19-注射的小鼠的HCC瘤的数目。

[0309] 肝脏基因表达测定。收获肝脏样品并在Trizol试剂(Invitrogen)中均质化。按照生产商的说明,提取总RNA。用DNA酶(Ambion)处理RNA,然后使用得自Applied Biosystems的Taqman引物和试剂进行定量RT-PCR分析。使用DDCt法计算肝脏中醛-酮还原酶和slc1a2的相对mRNA水平。

[0310] FGFR4结合和活性测定。使用纯化的重组蛋白质进行固相ELISA(结合)和ERK磷酸化测定。使用固相ELISA进行FGFR结合测定。简要地,用2ug/ml抗hFc抗体涂覆96孔板,并与1ug/ml FGFR1-hFc或FGFR4-hFc孵育。通过生物素化抗FGF19抗体(0.2ug/mL)并随后通过抗生蛋白链菌素-HRP孵育(100ng/mL)检测在存在1ug/ml可溶性b-klotho和20ug/ml肝素的情况下与FGF19变体的结合。对于FGFR4激活测定,在37℃用FGF19变体刺激Hep3B细胞10分钟,然后立即细胞溶解并使用得自Cis-Bio的可商购试剂盒测定ERK磷酸化作用。

[0311] 实施例2

[0312] 以下是显示FGF19和FGF21的多种序列变体以及FGF19/FGF21融合构件的葡萄糖降低活性的研究说明。

[0313] 图2示出了示例性FGF19/FGF21融合构件,以及来自融合肽中存在的FGF19和FGF21的每一个的部分。分析了这些肽的葡萄糖降低活性和统计学显著的脂肪升高或提高活性(表1-8和图1)。

[0314] 用表达FGF19、FGF21或变体的病毒载体注射小鼠(db/db),并在注射后分析。通过“+”号(“-”号表示无葡萄糖降低活性,“+/-”号表示变体保留了最低的葡萄糖降低活性)表示每条序列的葡萄糖降低活性;通过“+”号(“-”号表示无脂肪提高活性,“+/-”号表示变体保留了最低的脂肪提高活性,图2)表示脂肪提高活性。

[0315] FGF21和FGF19的两个融合体(表示为变体M5和变体45(M45))显示出葡萄糖降低活性并且没有统计学显著的脂质升高或提高活性。分别表示为M1、M2和M69的变体(图1)也表现出葡萄糖降低活性(图3B和3C,表5)。图3A-3C和4A-4C中示出了将M5、M1、M2和M69葡萄糖降低活性和脂肪升高或提高活性与FGF19和FGF21相比较的数据。

### [0316] 实施例3

[0317] 以下研究说明显示变体M5、M1、M2和M69不致癌,如通过肝细胞癌(HCC)形成所确定的,并且变体M5、M2和M69也不减少瘦肉和脂肪的量。

[0318] 用表达FGF19、FGF21、M5、M1、M2或M69的AAV载体注射,或者用盐水注射动物(db/db),并在注射后6个月分析。数据表明变体M5、M1、M2和M69不显著诱导(HCC)形成(图5A-5C)。

[0319] 用表达FGF19、FGF21、M5、M1、M2或M69的病毒载体注射,或者用盐水注射动物(db/db小鼠),并在注射后6个月分析对瘦肉和脂肪的影响。数据表明与FGF21相反,M5、M2和M69肽不导致瘦肉或脂肪的统计学显著减少,而M1肽使瘦肉降低(图6A-图6C)

### [0320] 实施例4

[0321] 以下是分析了脂肪升高活性和致癌作用的另外25个变体肽的数据总结。数据清楚地显示脂质升高和致癌作用之间是正相关的,如通过db/db小鼠中肝细胞癌(HCC)形成所确定的。

[0322] 表1至3总结了26种不同变体肽的数据。这些举例说明的变体肽具有FGF19C末端序列:

[0323] PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK,在C-末端位置,例如,在“TSG”氨基酸残基之后。值得注意的,不导致脂肪统计学显著升高的变体肽(总计7种,包括M5)不诱导肝细胞癌(HCC)形成。相反,引起脂肪统计学显著升高的所有变体肽(总计17种)还导致小鼠中肝细胞癌(HCC)的形成。该数据表明脂肪升高活性和肝细胞癌(HCC)形成之间存在强烈的正相关性。因此,脂肪升高活性可以用作动物中肝细胞癌(HCC)形成的指示物和/或预报因子。

[0324] 表1:db/db小鼠中甘油三酯和胆固醇的升高似乎与HCC形成正相关。

	N 末端结构域	核心	脂质升高	HCC 形成
[0325]				
	FGF19 RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	FGF21 HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
	M5 R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
	M74 R----- DAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	M75 R-----VHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
[0326]	M76 R----- GDPI	RLRHLYTSG	-	-
	M77 R-----	RLRHLYTSG	-	-
	M78 R-----AGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	M79 R-----GPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	M80 R-----PHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-
	M81 R-----HVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	-

[0327] 表2:db/db小鼠中甘油三酯和胆固醇的升高似乎与HCC形成正相关。

		N 末端结构域	核心	脂质升高	HCC 形成
	FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
	M82	RPLAFSAAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
[0328]	M83	RPLAFSDAAPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/
	M84	RPLAFSDAGAHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+/-	+/
	M85	RPLAFSDAGPHVHYGAGDPI	RLRHLYTSG	-	-
	M86	RPLAFSDAGPHVHYGWGAPI	RLRHLYTSG	+	+
	M87	RPLAFSDAGPHVHYGWGDAI	RLRHLYTSG	+	+

[0329] 表3:db/db小鼠中甘油三酯和胆固醇的升高似乎与HCC形成正相关

	N末端结构域	核心	脂肪升高	HCC形成	
	<b>FGF19</b>	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	-
	H31A/S141A (M88)	FGF19	+	+	
	H31A/H142A (M89)	FGF19	+	+	
	K127A/R129A (M90)	FGF19	+	+	
[0330]	K127A/S141A (M91)	FGF19	+	+	
	K127A/H142A (M92)	FGF19	+	+	
	R129A/S141A (M93)	FGF19	+	+	
	S141A/H142A (M94)	FGF19	+	+	
	K127A/H142A (M95)	FGF19	+	+	
	K127A/R129A/S141A (M97)	FGF19	+	+	
	K127A/R129A/H142A (M98)	FGF19	+	+	
	K127A/R129A/S141A/H142A (M99)	FGF19	+	+	

[0331] 实施例5

[0332] 以下是分析了葡萄糖降低活性和脂肪升高活性的其他FGF19变体肽的数据总结。

[0333] 表4示出了表示为M5至M40的另外35种FGF19变体的肽“核心序列”。这些举例说明的变体肽具有FGF19C末端序列,PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVLRITVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHLRPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFKEK,在C-末端部分,例如,在核心序列的“TSG”氨基酸残基之后。数据清楚地表明变体M6、M7、M8、mM38和M39在db/db小鼠中具有所需的特性:葡萄糖降低活性和非统计学显著的脂肪升高活性。

[0334] 表4:其他变体和N末端结构域的精细定位

	N 末端结构域	核心	葡萄糖降低	脂质升高
	FGF19 RPLAFSDAGPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	FGF21 HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	+	-
	M5 R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
	M6 R-----DSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
	M7 RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+	-
	M8 R-HPIPDSSPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	+	-
	M9 R-HPIPDSSPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	+	+
	M10 R-HPIPDSSPHVHYGWGDPI	RLRHLYTSG	-	+
	M11 RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M12 RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI	RLRHLYTSG	-	+
	M13 RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
	M14 R-HPIPDSSPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	-	-
	M15 RPLAFSDAGPHVHYG--GQV	RLRHLYTSG	+	+
[0335]	M16 RPLAFSDAGPHVH--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M17 RPLAFSDAGPHV--GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M18 RPLAFSDAGPH--YGWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M19 RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M20 RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M21 RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M22 RPLAFSDAGPHVH-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M23 RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M24 RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M25 RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M26 RPLAFSDSSPLVH--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M27 RPLAFSDSSPHVH--WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M28 RPLAFSDAPHV---WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M29 RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M30 RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI	RLRHLYTSG	N/D	N/D
	M31 R-HPIPDSSPLLQ--FGAQV	RLRHLYTSG	+/-	-
	M32 R-HPIPDSSPLLQ--FGIYQV	RLRHLYTSG	-	-
	M33 R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	-
	M34 R-HPIPDSSPLLQ--FG7AV	RLRHLYTSG	+/-	-
	M35 R-HPIPDSSPLLQ--FGGEV	RLRHLYTSG	+/-	+/
[0336]	M36 R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	+/-	-
	M37 R-HPIPDSSPLLQ--FGGUA	RLRHLYTSG	-	-
	M38 R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+	-
	M39 R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT	RLRHLYTSG	+	-
	M40 R-HPIPDSSPLLQFGWQPO	RLRHLYTSG	-	+
[0337] 表4a:				

N-末端结构域		葡萄糖 下降	脂质 升高	HCC 形成
	核心			
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
M9	R-HPIPDSSPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M8	R-HPIPDSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
[0338] M12	RPLAFSDAGPLLQFGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M10	R-HPIPDSSPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M13	RPLAFSDAGPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	-	+	+
M15	RPLAFSDAGPHVHYG--GQV RLRHLYTSG	-	-	+/-
M14	R-HPIPDSSPHVHYG--GQV RLRHLYTSG	-	-	+/-
M43	RPLAFSDAGPHVHYG-GD-I RLRHLYTSG	-	-	+/-
M6	R----DSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
M7	RPLAFSDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-

[0339] 表4b:

N-末端结构域		葡萄糖 下降	脂质 升高	HCC 形成
	核心			
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
[0340] M31	R-HPIPDSSPLLQ--FGAQV RLRHLYTSG	+	-	+
M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGDQV RLRHLYTSG	+	-	-
M33	R-HPIPDSSPLLQ--FGPQV RLRHLYTSG	-	-	+
M34	R-HPIPDSSPLLQ--FGGAV RLRHLYTSG	-	-	+
M35	R-HPIPDSSPLLQ--FGGEV RLRHLYTSG	-	-	+
M36	R-HPIPDSSPLLQ--FGGNV RLRHLYTSG	+	-	+/-
M37	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQA RLRHLYTSG	-	-	+
M38	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQI RLRHLYTSG	-	-	+
M39	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQT RLRHLYTSG	-	-	+
M40	R-HPIPDSSPLLQFGWGQPV RLRHLYTSG	-	+	+

N-末端结构域		葡萄糖 下降	脂质 升高	HCC 形成
	核心			
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWDPI RLRHLYTSG	+	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV RQRYLYTDD	+	-	-
M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV RLRHLYTSG	+	-	-
M52	R----DSSPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M54	RPLAFSDAGPLLQ--WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M55	RPLAFSDAGPH--YGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M56	RPLAFSDAGP-V-YGWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M57	RPLAFSDAGP-VH-GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M58	RPLAFSDAGP-VHY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M59	RPLAFSDAGPH-H-GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M60	RPLAFSDAGPH-HY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M61	RPLAFSDAGPHV--GWGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M62	RPLAFSDAGPHV-Y-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M63	RPLAFSDAGPHVH--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M64	RPLAFSDSSPLVH--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M65	RPLAFSDSSPHVH--WGDPI RLRHLYTSG	-	+	+
M66	RPLAFSDAGPHLQ--WGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M67	RPLAFSDAGPHV---WGDPI RLRHLYTSG	-	-	+/-
M68	RPLAFSDAGPHVHY-WGDPI RLRHLYTSG	-	+	-
M4	RPLAFSDAGPHVHYAWGDPI RLRHLYTSG	+	+	+
M69	R----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M70	MR----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-
M53	M----DSSPLVHYGWGDPI RLRHLYTSG	+	+	-

[0342] 表5示出了表示为M1、M2和M69的其他3种FGF19变体的肽序列。数据清楚地显示这三种变体在db/db小鼠中具有所需的特性:葡萄糖降低活性(图3B和图3C)。这三种变体似乎

提高了db/db小鼠中的脂肪(图4B和图4C)。

[0343] 表5:其他变体

[0344] M1:

[0345] RPLAFSDASPHVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVVDCARGQSAHS LLEIK AVALRTVA  
IKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPM  
LPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK

[0346] M2:

[0347] RPLAFSDSSPLVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVVDCARGQSAHS LLEIK AVALRTVA  
IKGVH SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPM  
LPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK

[0348] M69:

[0349] RDSSPLVHYGWGDP IRLRHLYTSGPHGLSSCF LRIRADGVVDCARGQSAHS LLEIK AVALRTVAIKGVH  
SVRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFE EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVP  
EEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSF EK

[0350] 实施例6

[0351] 以下是显示FGF19降低饲料诱导的肥胖小鼠和ob/ob小鼠中体重以及db/db小鼠中肝肿瘤形成活性和体重的数据总结。

[0352] 用AAV载体中的FGF19或FGF21注射小鼠。注射后4周记录体重。

[0353] 表6:FGF19降低饲料诱导的肥胖小鼠和ob/ob小鼠中的体重

	N-末端结构域	核心	DIO 中 体重下降	Ob/ob 中 体重下降
[0354] FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDP I	RLRHLYTSG	+	+
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	+	+

[0355] 表7:db/db小鼠中FGF19、FGF21和所选变体的体重和肝肿瘤形成的相关性

	N末端结构域	核心	肝脏 肿瘤结节	体重
FGF19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDP I	RLRHLYTSG	+	升高
FGF21	HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RQRYLYTDD	-	降低
[0356] M5	R-HPIPDSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	升高
M6	R----DSSPLLQ--FGGQV	RLRHLYTSG	-	降低
M32	R-HPIPDSSPLLQ--FGDQV	RLRHLYTSG	-	降低
M52	R----DSSPLLQ--WGDPI	RLRHLYTSG	-	降低
M69	R----DSSPLVHYGWGDP I	RLRHLYTSG	-	升高

[0357] 实施例7

[0358] 以下是显示变体M5和变体M69肽降低血糖的研究。

[0359] 用M5(0.1和1mg/kg, s.c.)或FGF19(1mg/kg, s.c.)或变体M69(0.1和1mg/kg, s.c.)或FGF19(1mg/kg, s.c.) (皮下)注射小鼠(ob/ob)。在注射后2、4、7和24小时测量血浆葡萄糖水平,并在图7中显示结果。M5(图7A)和变体M69(图7B)示出了与野生型FGF19相似的葡萄糖

降低作用。

[0360] 实施例8

[0361] 该实施例描述了显示醛-酮还原酶家族1成员C18 (Akr1C18) 和溶质载体家族1成员2 (slc1a2) 的肝表达似乎与HCC活性有关的研究。

[0362] 用表达FGF19 (HCC+)、FGF21 (HCC-)、dN2 (HCC-) 或M5 (HCC-) 的病毒载体注射或用GFP注射小鼠 (db/db)。在注射后两周,收获肝脏样品并通过定量RT-PCR分析。图8中所示数据显示Akr1C18和slc1a2的肝表达似乎与HCC活性相关。

[0363] 表8:3T3L1脂肪细胞信号测定中FGF19变体的总结

[0364]	3T3L1 脂肪细胞 中的 P-Erk 测定	FGF19	FGF21	M5	M2	M63	M64	M1	M8
	实验 1:								

[0365]	E <sub>max</sub>	3.67	4.33	3.52	4.19	3.21	3.67	4.24	4.16
	EC <sub>50</sub> (nM)	0.05	0.65	0.03	0.05	0.92	0.02	0.03	0.03
	实验 2:								
	E <sub>max</sub>	4.52	4.83	4.01	5.56	4.17	4.85	5.30	5.34
	EC <sub>50</sub> (nM)	0.33	1.48	0.14	0.15	0.66	0.12	0.09	0.09
	实验 3:								
	E <sub>max</sub>	4.09	4.14	3.74	4.24	3.15	4.15	4.77	4.16
	EC <sub>50</sub> (nM)	0.16	1.50	0.24	0.14	0.28	0.14	0.07	0.14

**FGF19**

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI  
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKH  
RLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDP  
FGLVTGLEAVRSPSEK

**FGF21**

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK  
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP  
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA  
S

**M5**

HPIPDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA  
LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVS  
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVT  
GLEAVRSPSEK

**M71**

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK  
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP  
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA  
S

**M72**

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK  
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP  
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA  
S

**M73**

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQKALK  
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP  
GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVQDELQGVGG  
EGCHMPENCKTLLTDIDRTHTEKPVWDGITGE

**M1**

RPLAFSDASPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI  
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKH  
RLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDP  
FGLVTGLEAVRSPSEK

图1

**M2**

RPLAFSDSSPLVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI  
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKH  
RLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP  
FGLVTGLEAVRSPSEK

**M69**

RDSSPLVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVA  
LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVS  
LSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVT  
GLEAVRSPSEK

**M3**

RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI  
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIIIILEDGYNVYRSEKHR  
LPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP  
GLVTGLEAVRSPSEK

**M48**

RDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV  
LRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVS  
LSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVT  
GLEAVRSPSEK

**M49**

RPLAFSDSSPLLQFGGQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI  
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLP  
VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP  
FGLVTGLEAVRSPSEK

**M50**

RHPIPDSSPLLQFGDQVRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEI  
KAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEIIIILEDGYNVYRSEKHRLP  
VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDP  
FGLVTGLEAVRSPSEK

图1 (续)

**M51**

RHPIPDSSPLLQFGGWRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV  
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEETIRPDGYNVYRSEKHRLPV  
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV  
TGLEAVRSPSFKEK

**M52**

RDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV  
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEETIRPDGYNVYRSEKHRLPV  
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV  
TGLEAVRSPSFKEK

**M53**

MDSSPLLQWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV  
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEETIRPDGYNVYRSEKHRLPV  
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV  
TGLEAVRSPSFKEK

**M70**

MRDSSPLVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAV  
ALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQYSEEDCAFEETIRPDGYNVYRSEKHRLPV  
SLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLV  
TGLEAVRSPSFKEK

图1 (续)

FGF21 (氨基酸位置)	FGF19	葡萄糖 降低	脂质 升高
1-181	-	+	-
-	1-194	+	+
1-16	21-194	+	-
147-181	1-147	+/-	+
1-16 & 147-181	21-147	-	-
17-181	1-20	+	+
1-146	148-194	+	-
17-146	1-20 & 148-194	+/-	-

图2

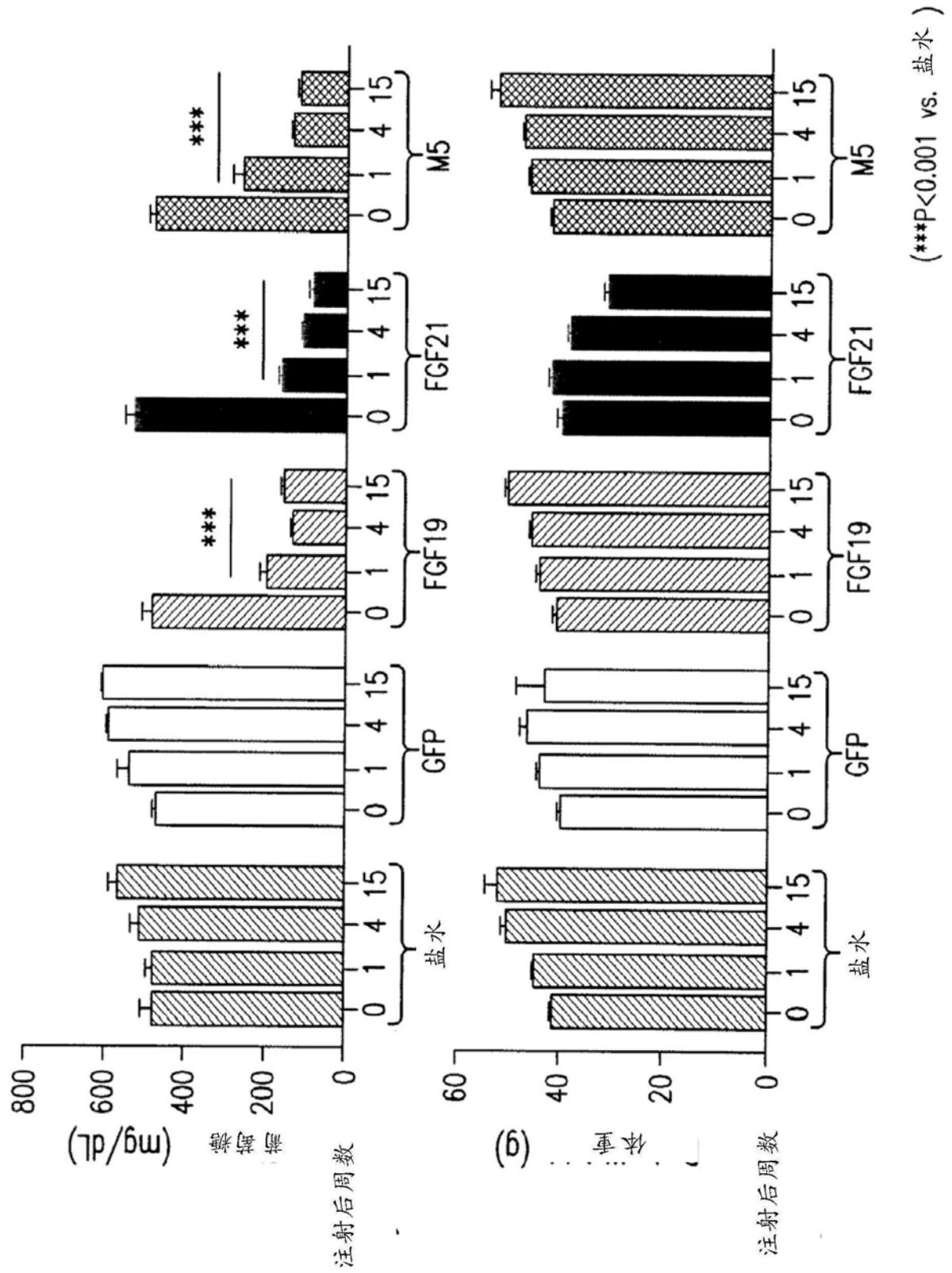


图3A

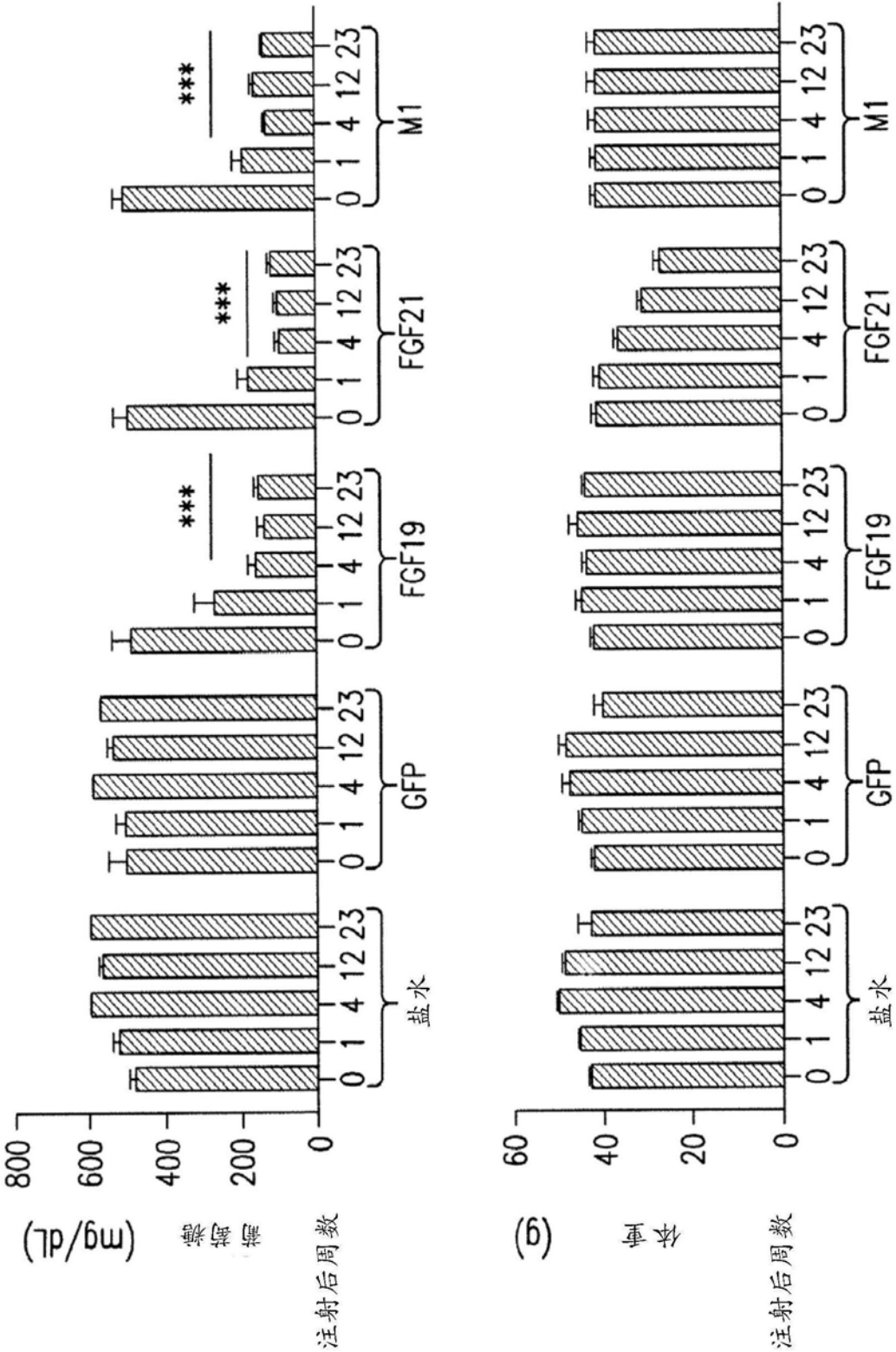


图3B

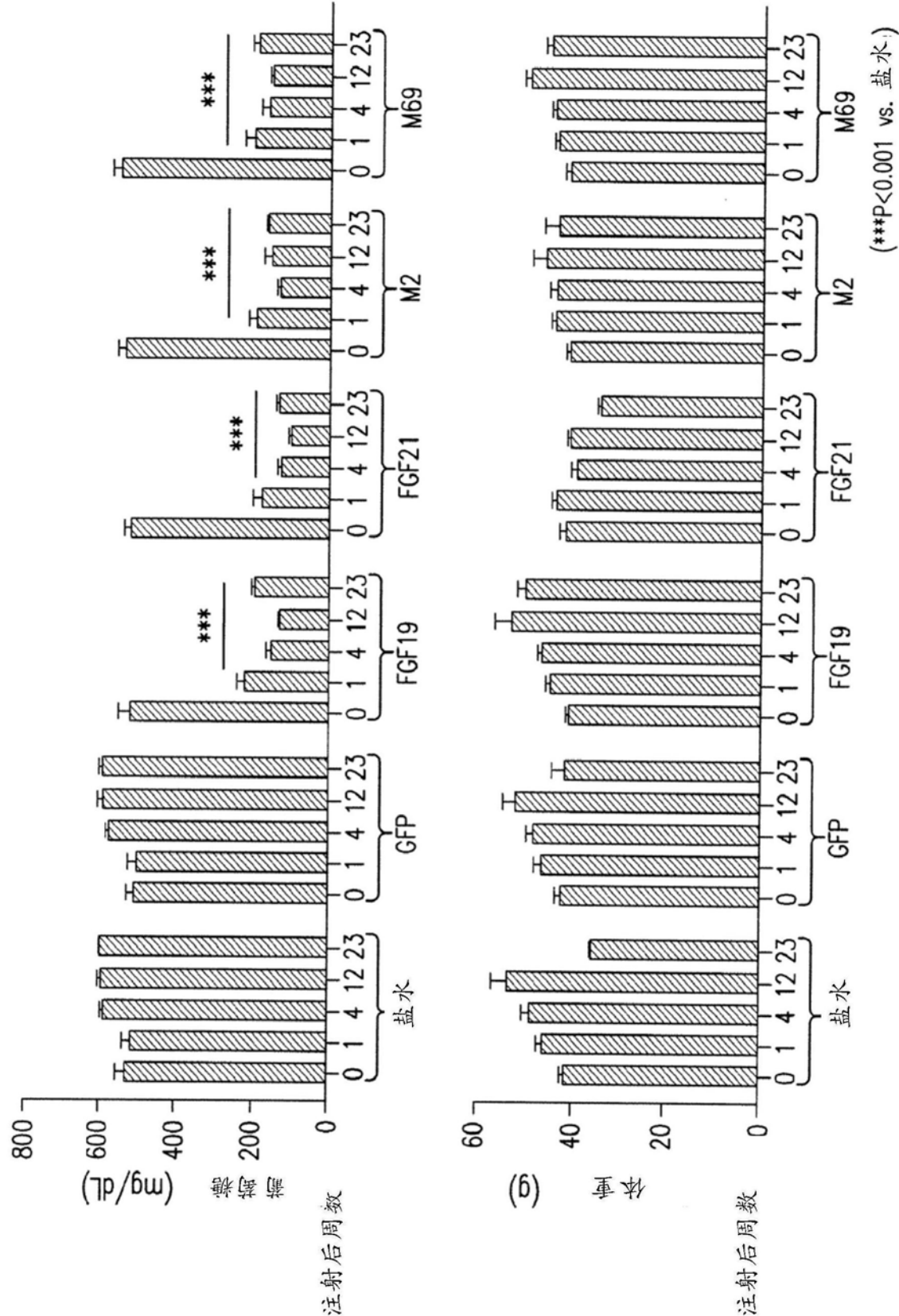


图3C

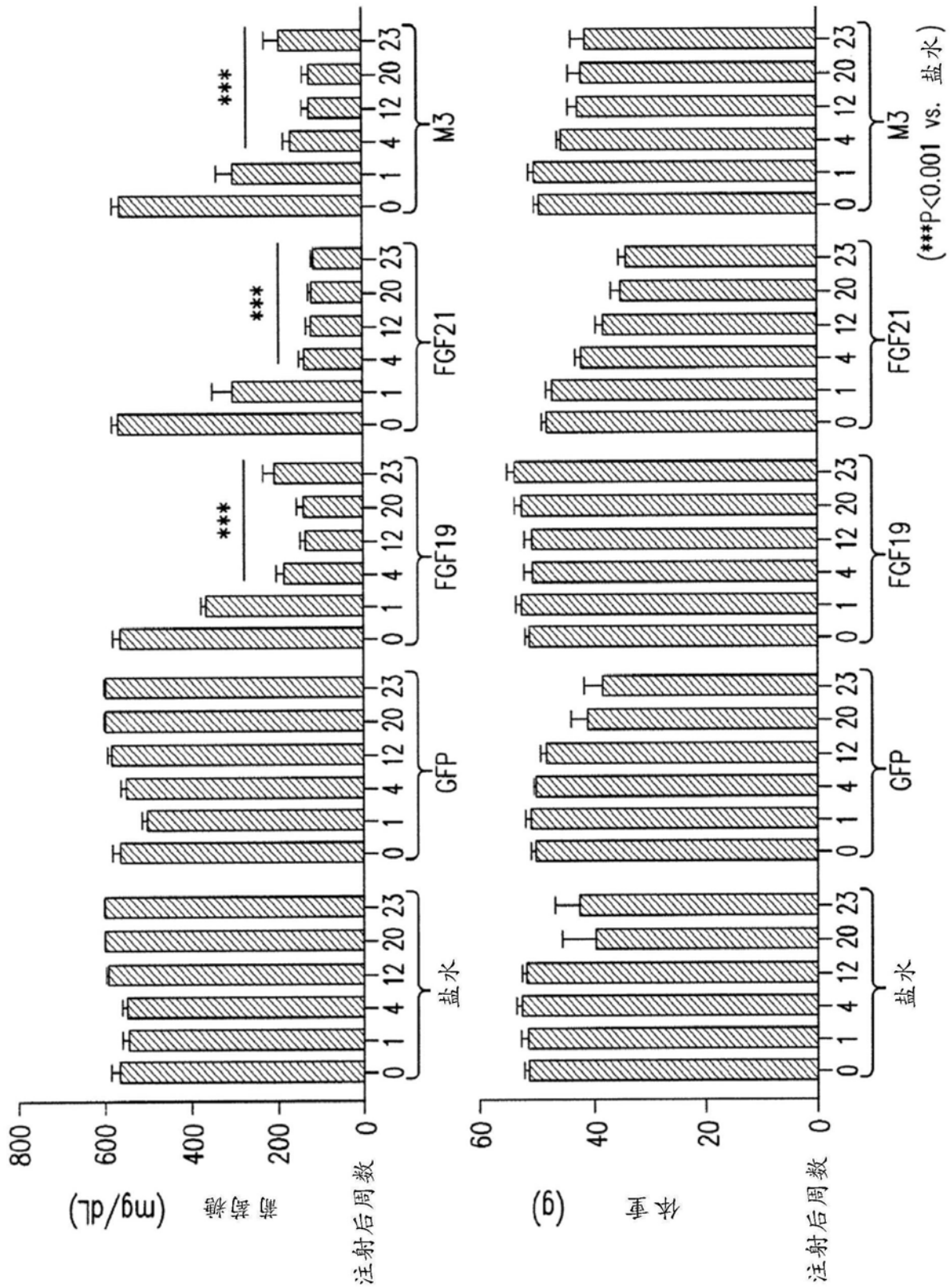


图3D

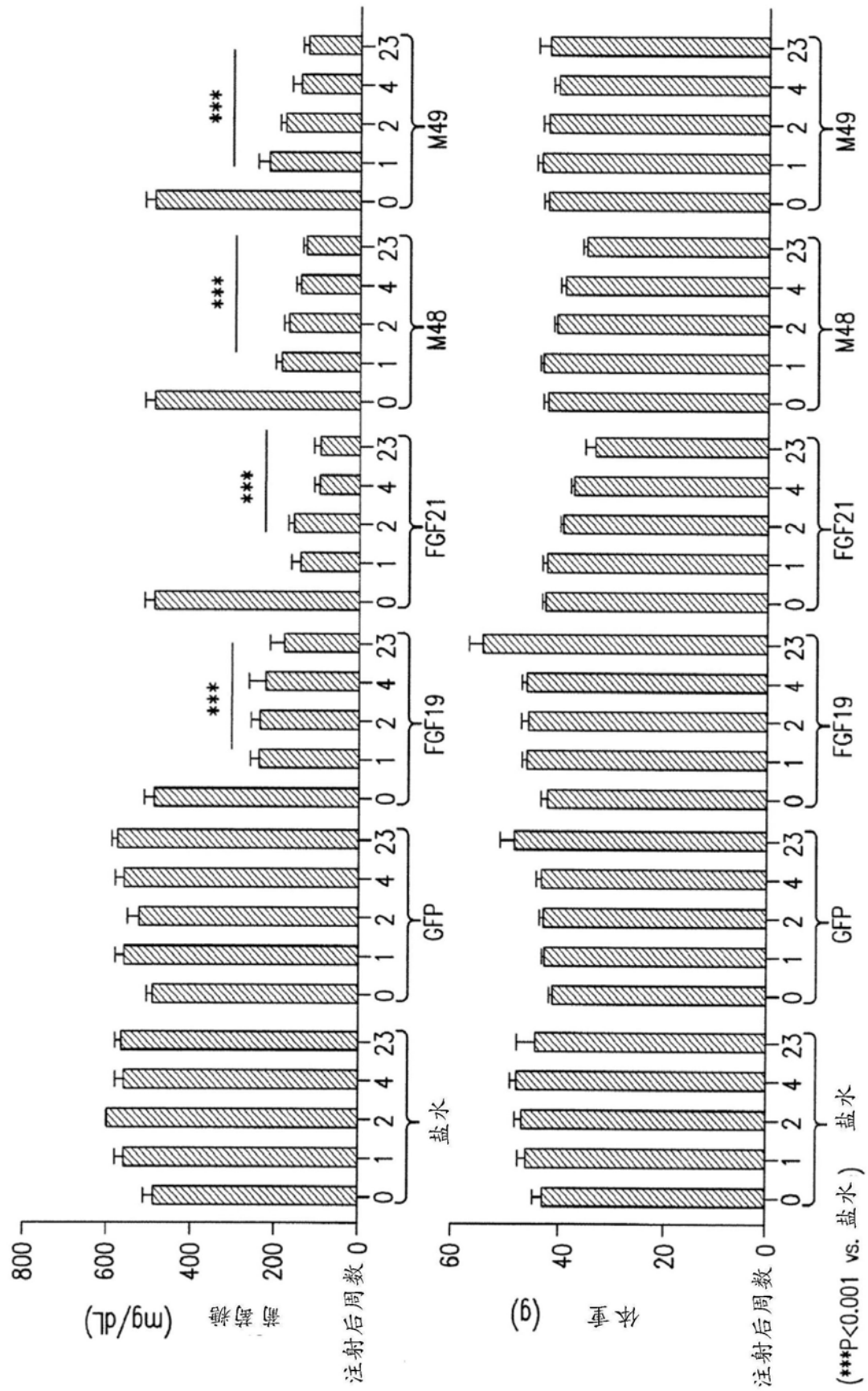


图3E

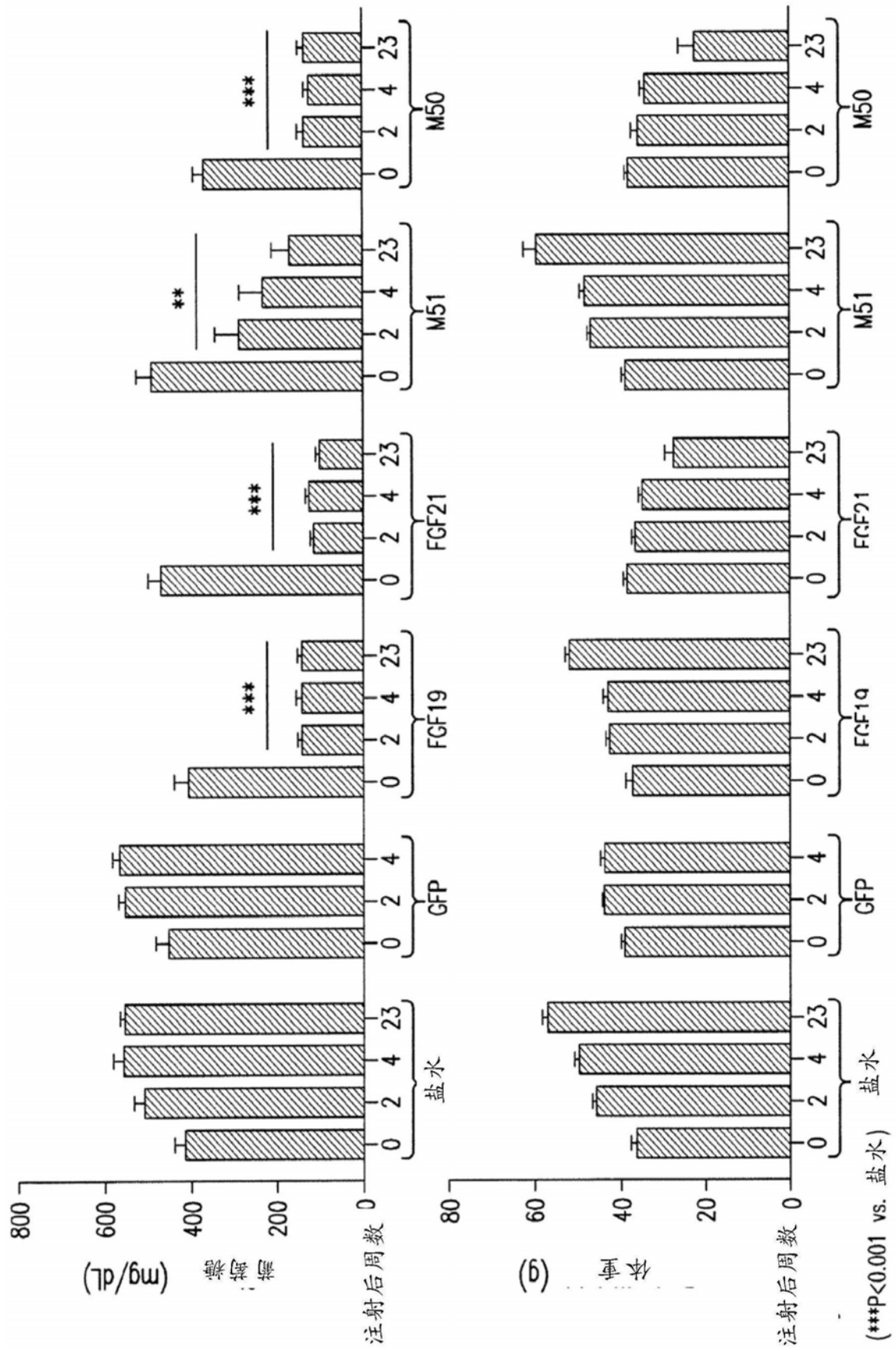


图3F

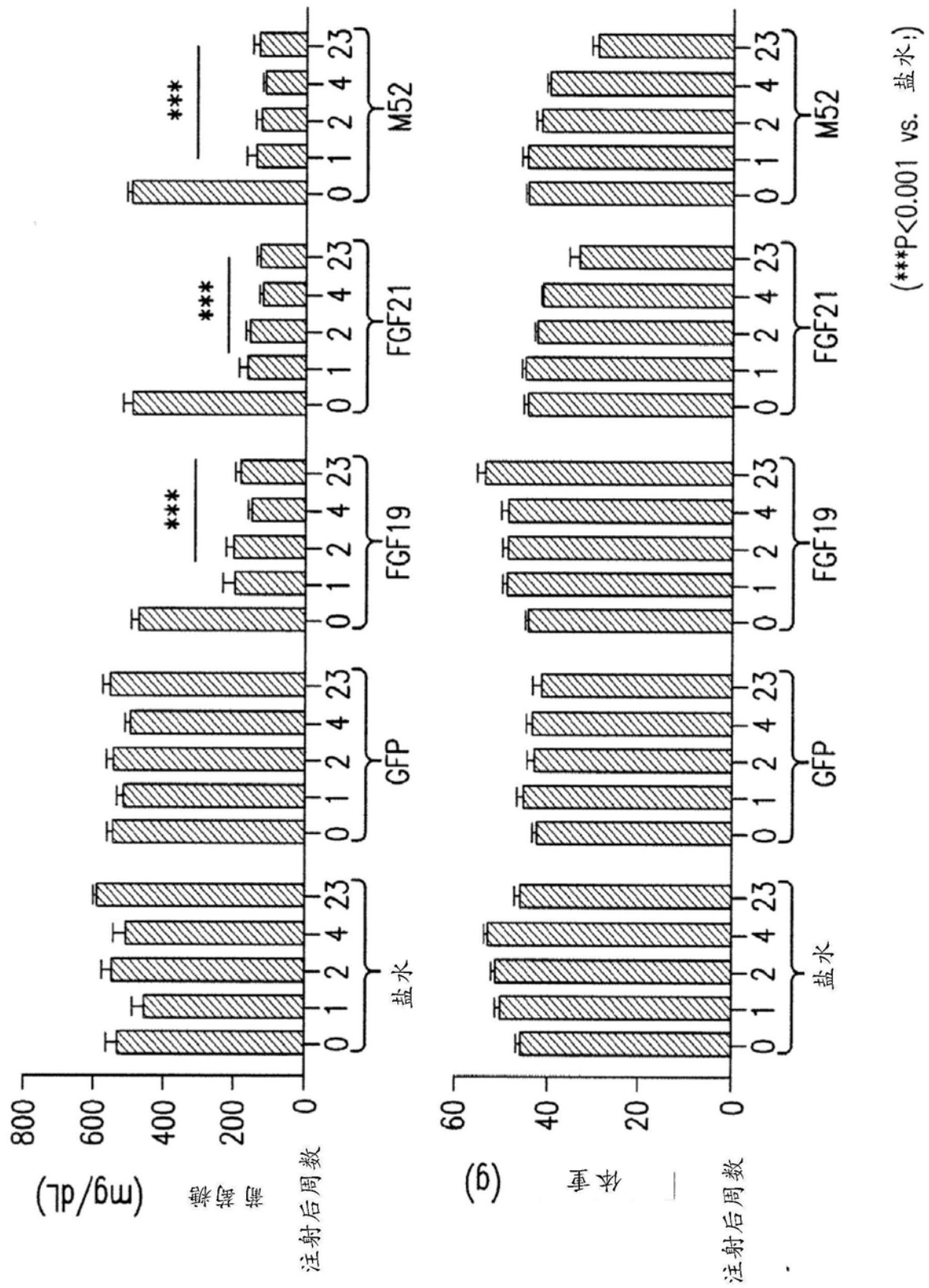


图3G

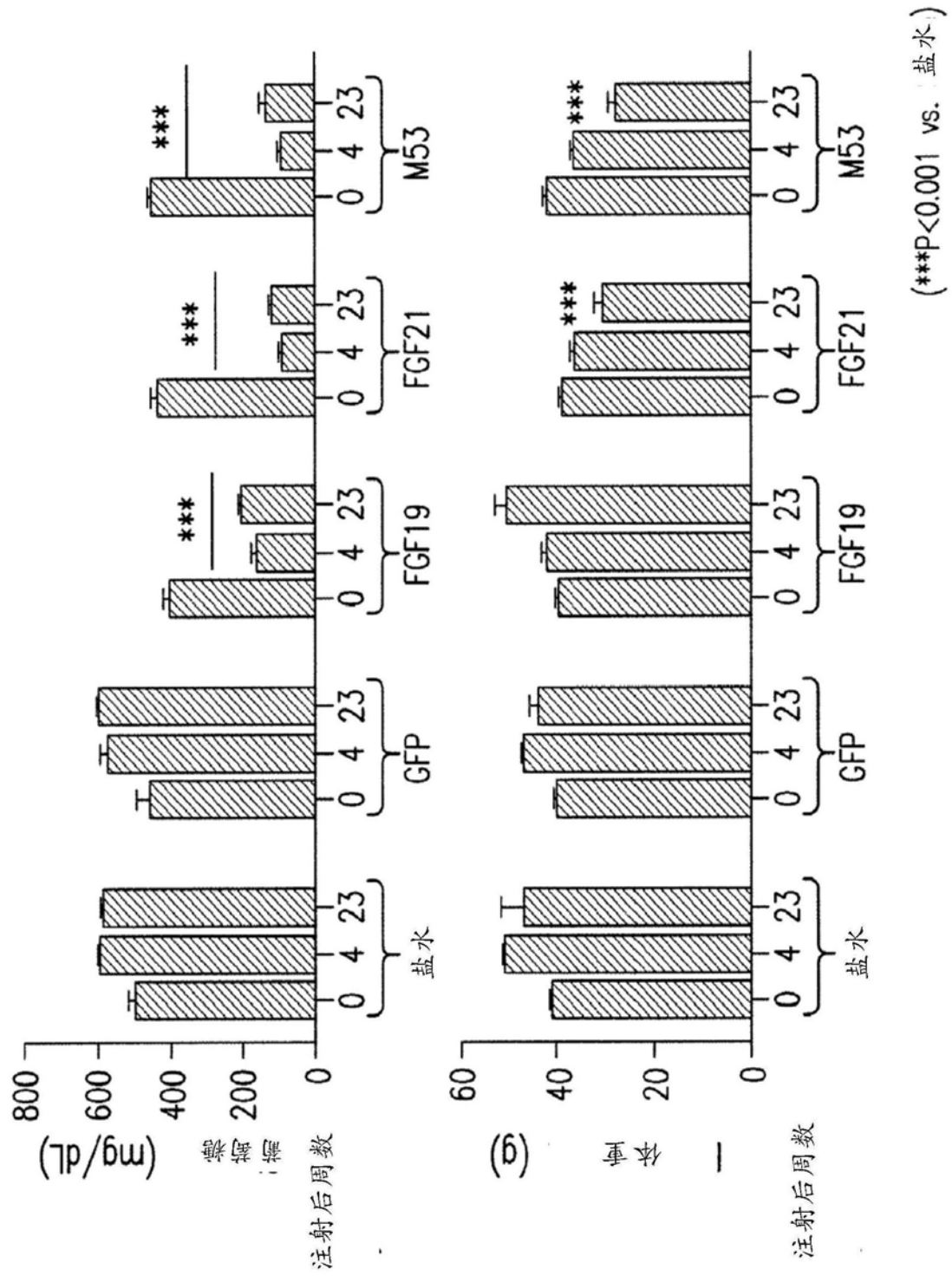


图3H

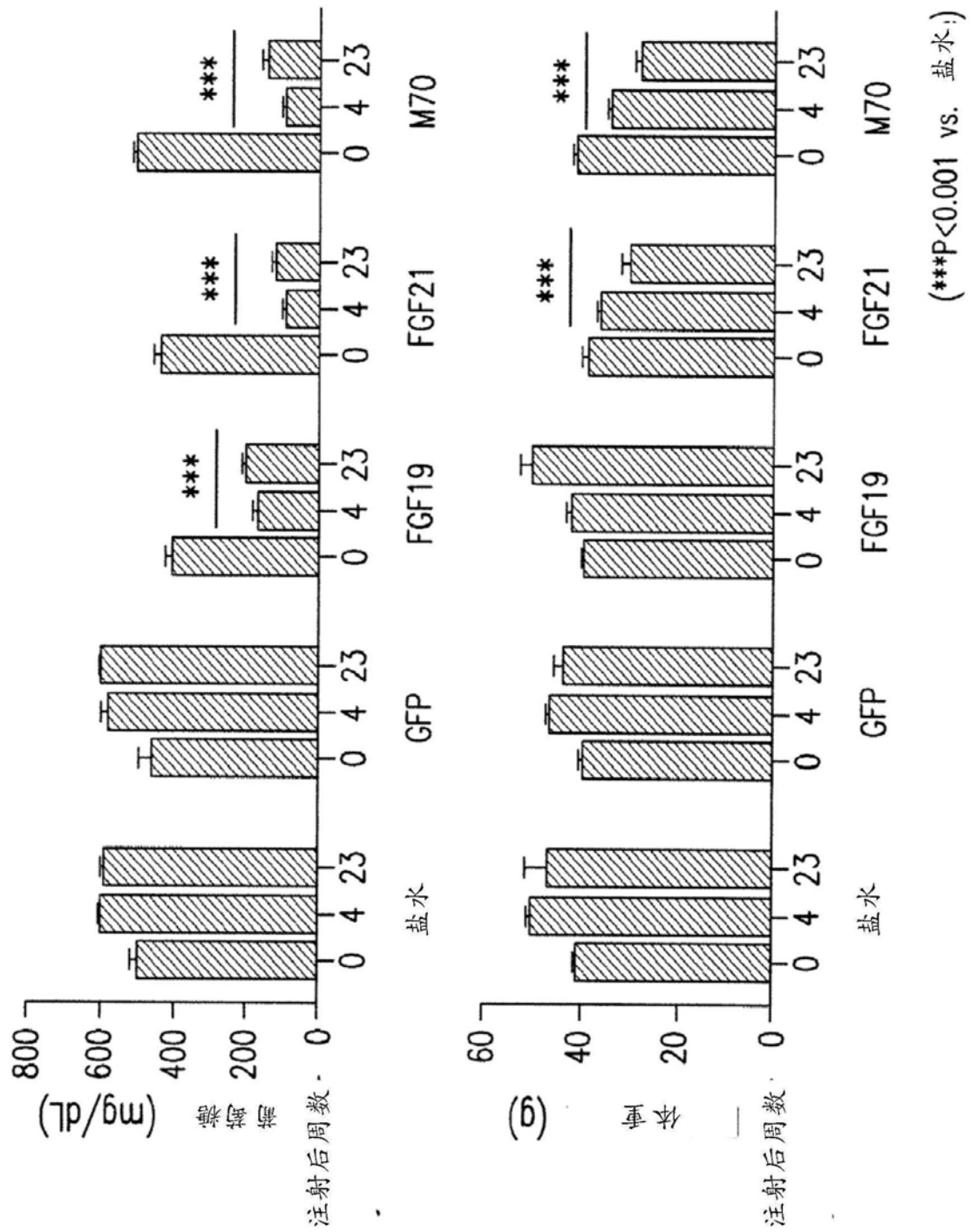


图3I

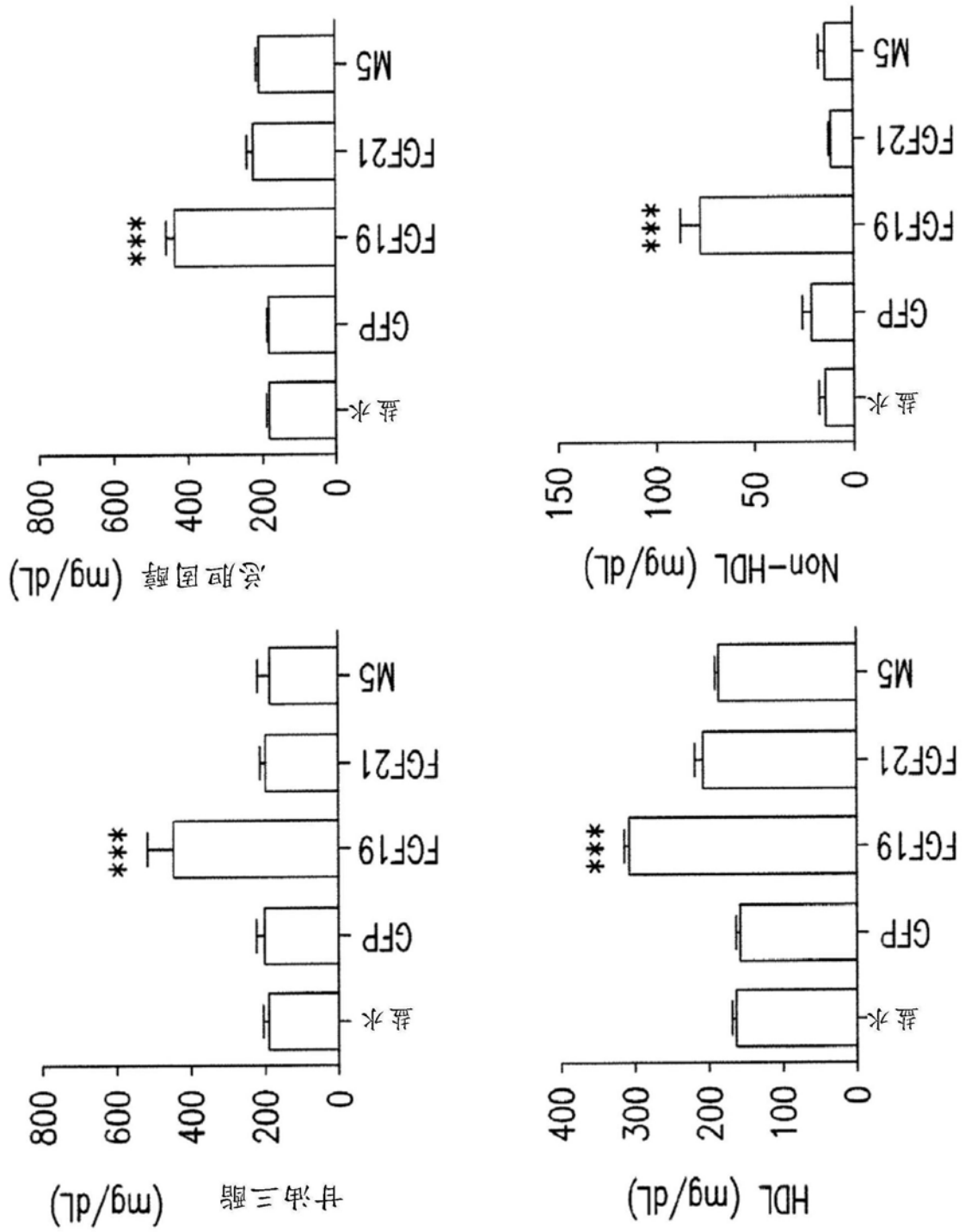


图4A

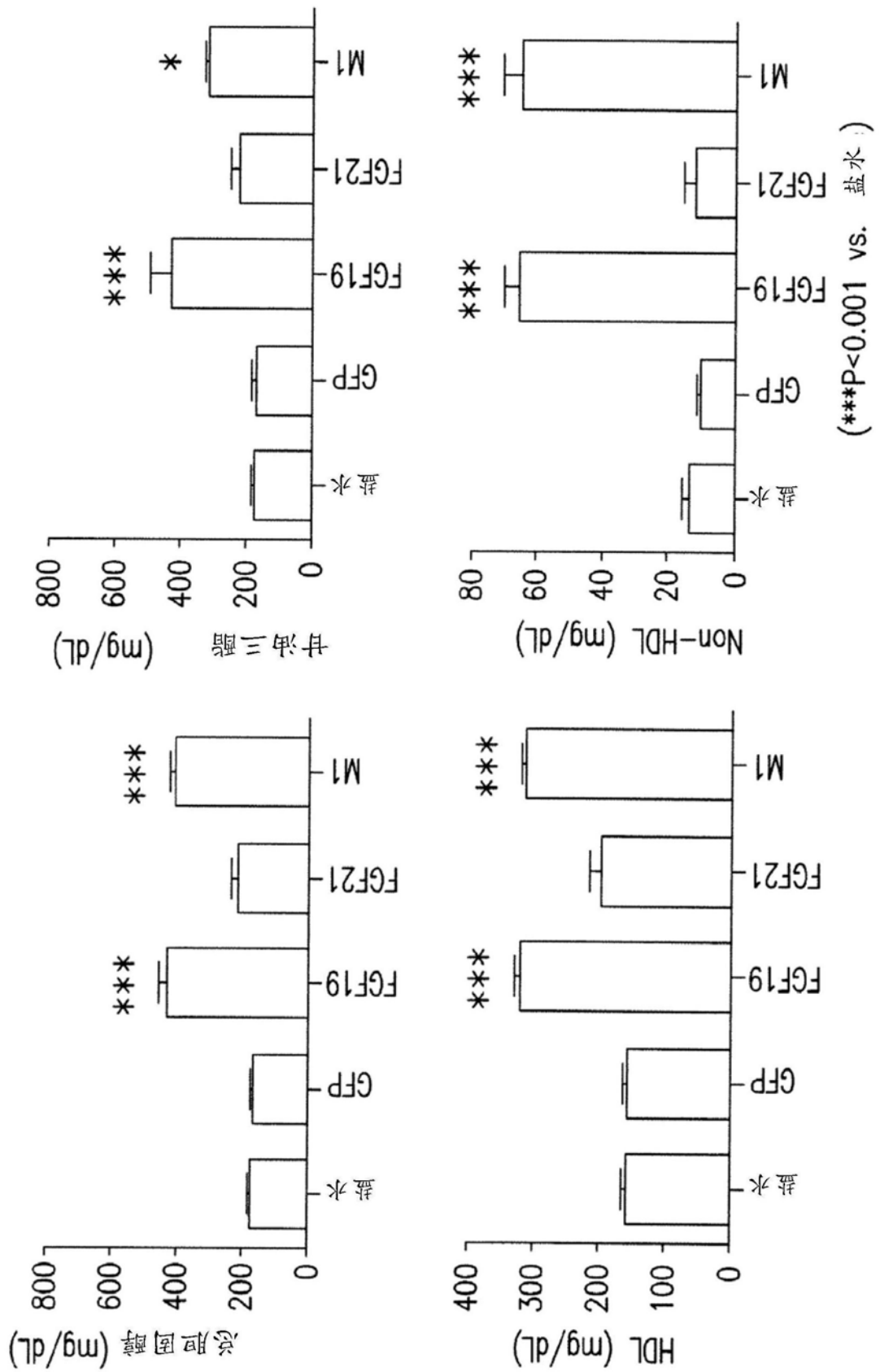


图4B

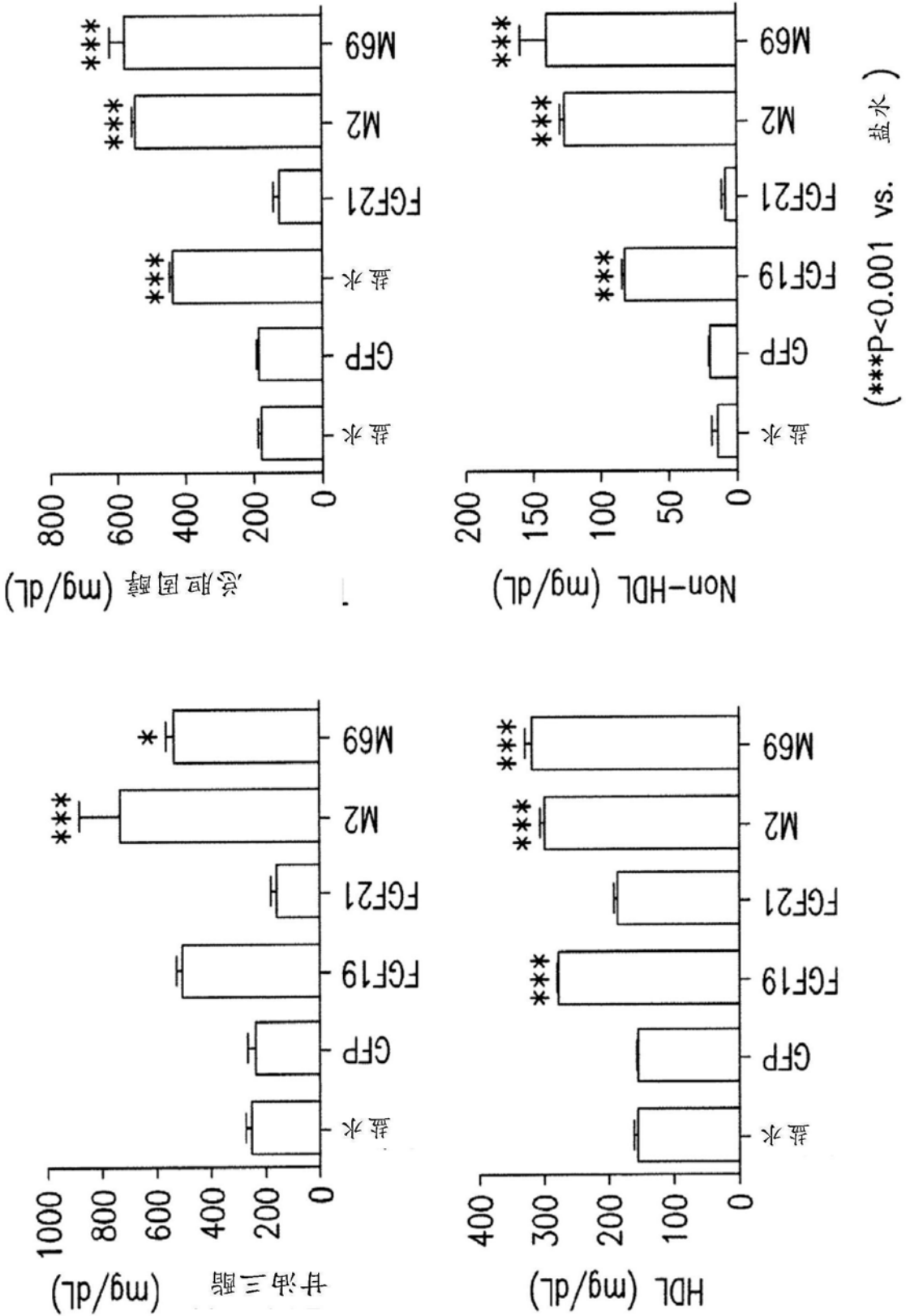


图4C

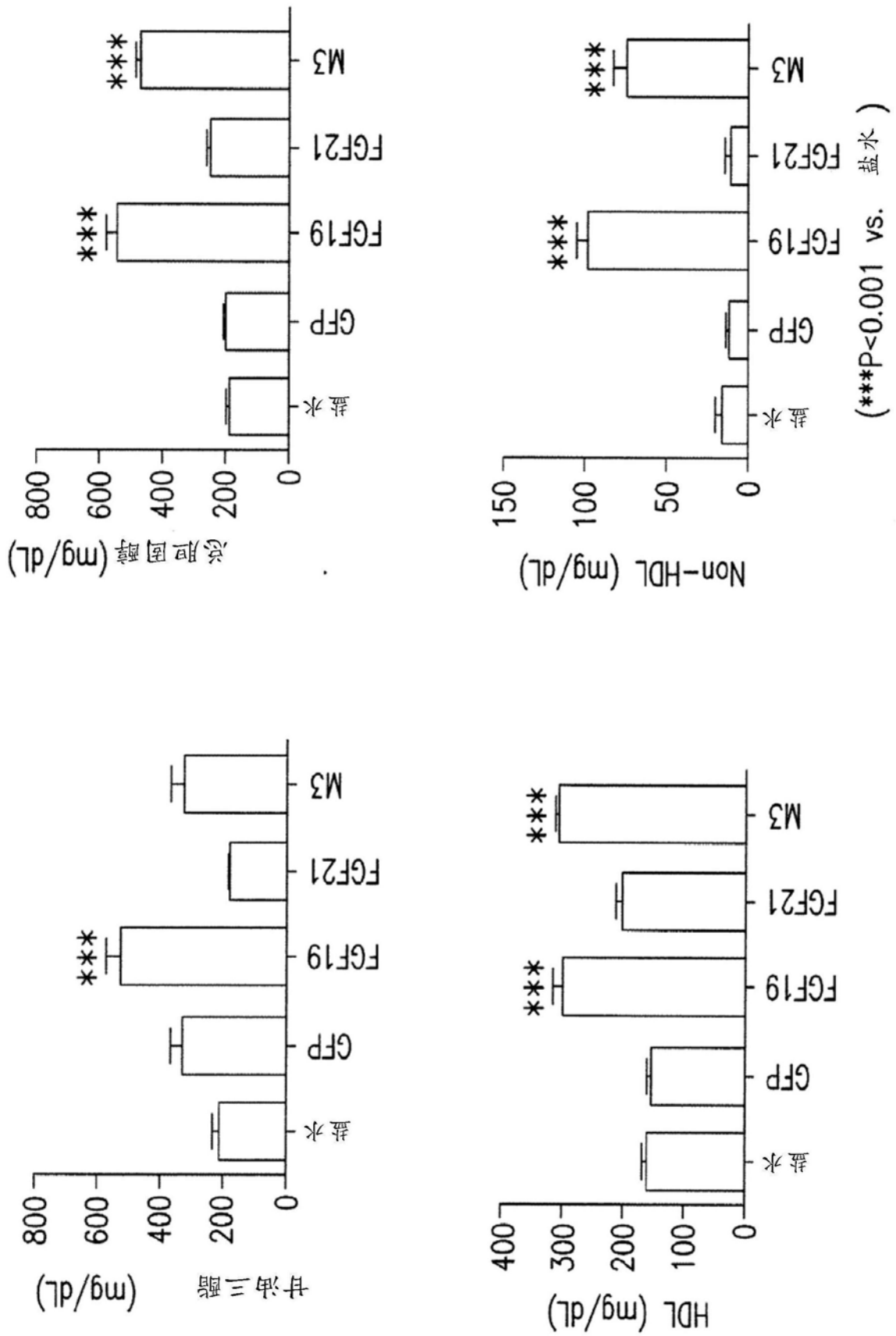


图4D

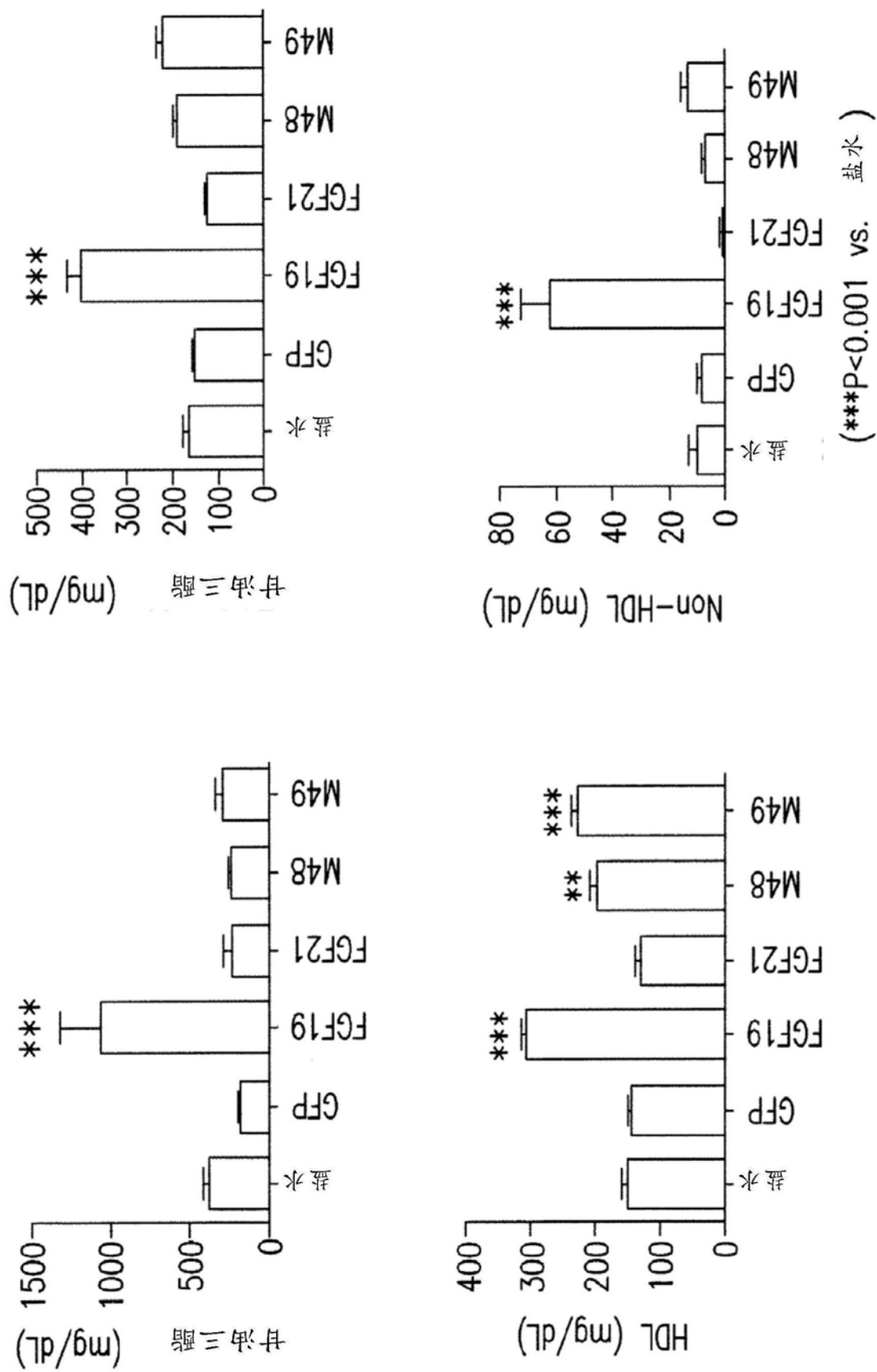


图4E

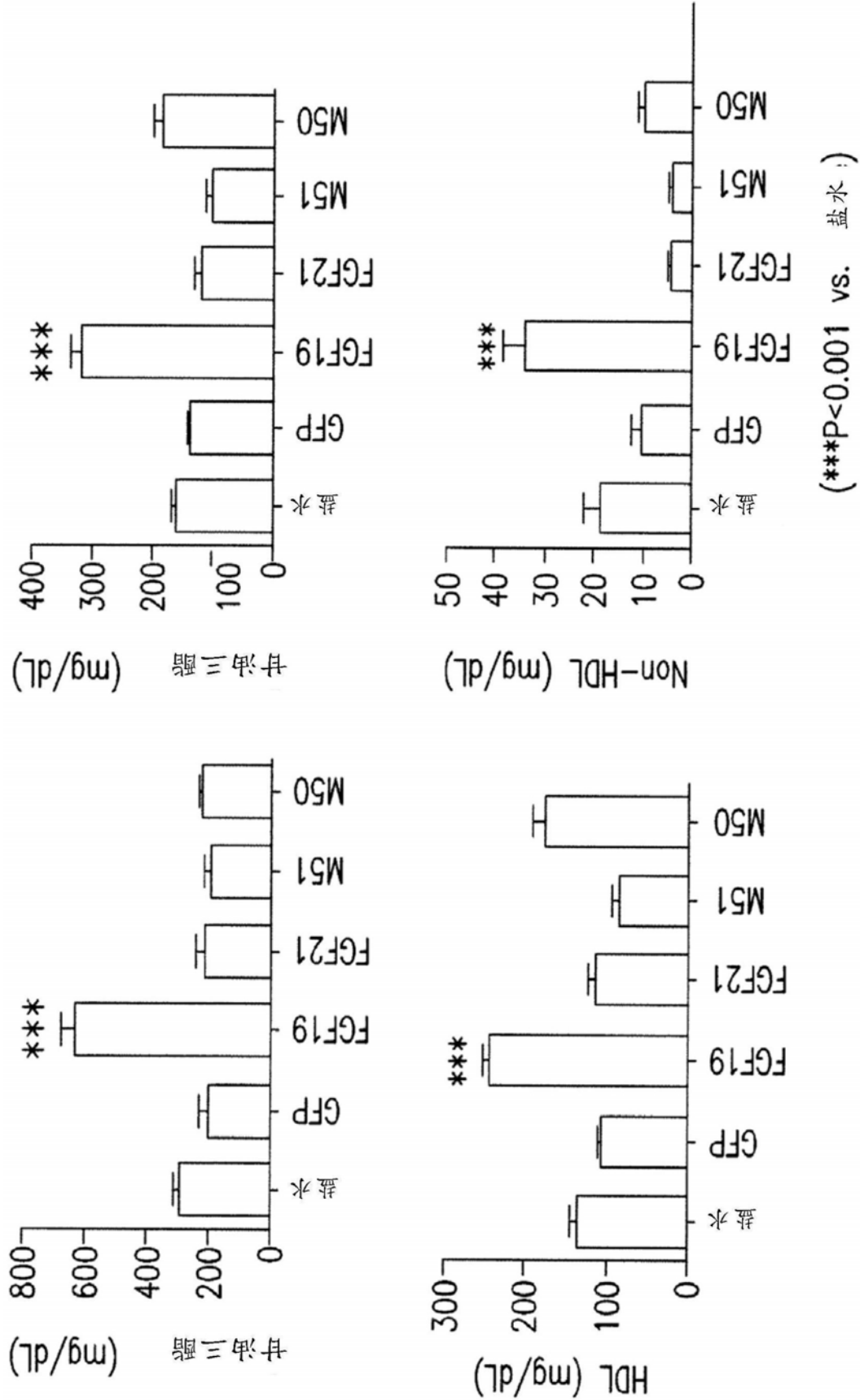


图4F

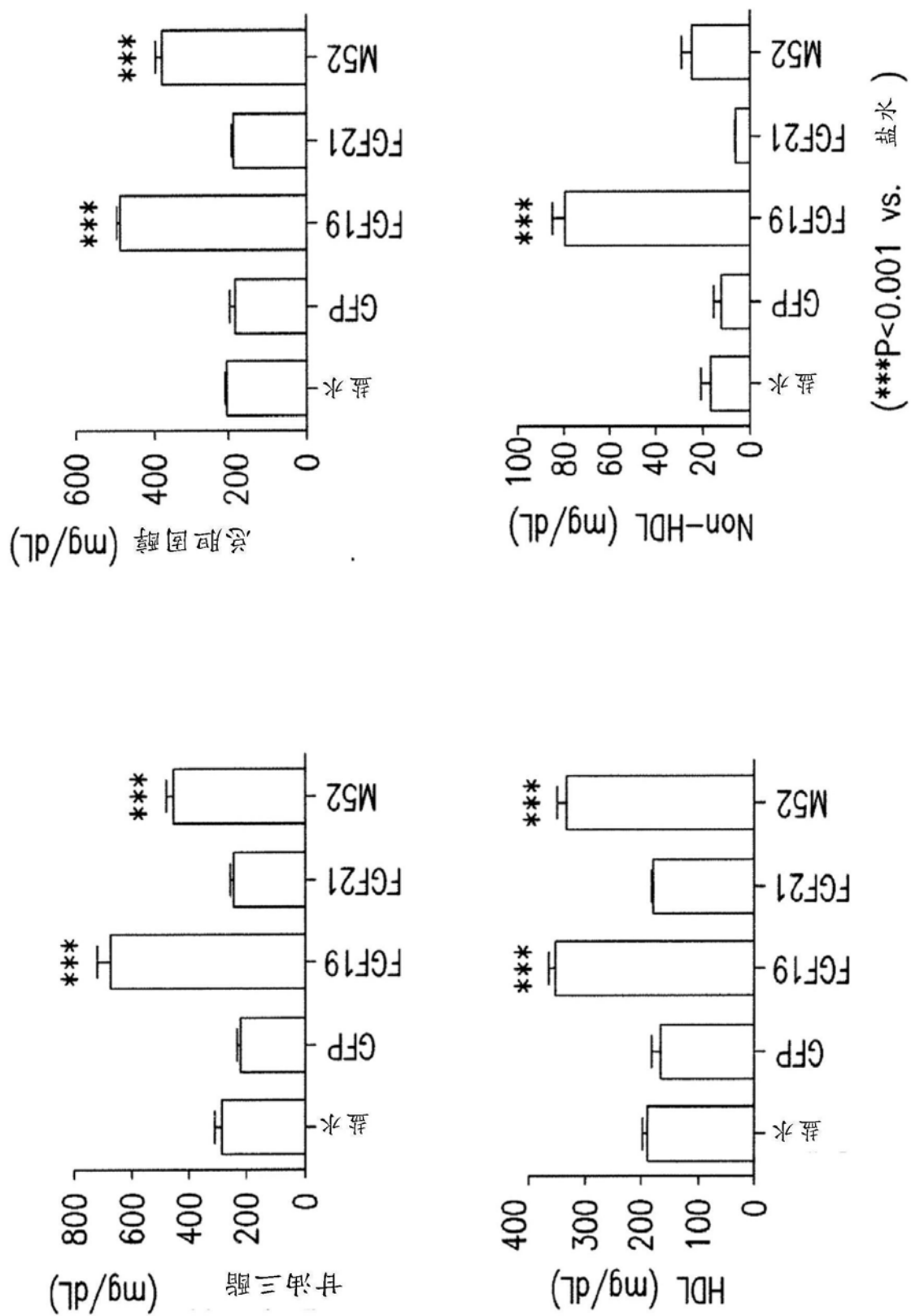


图4G

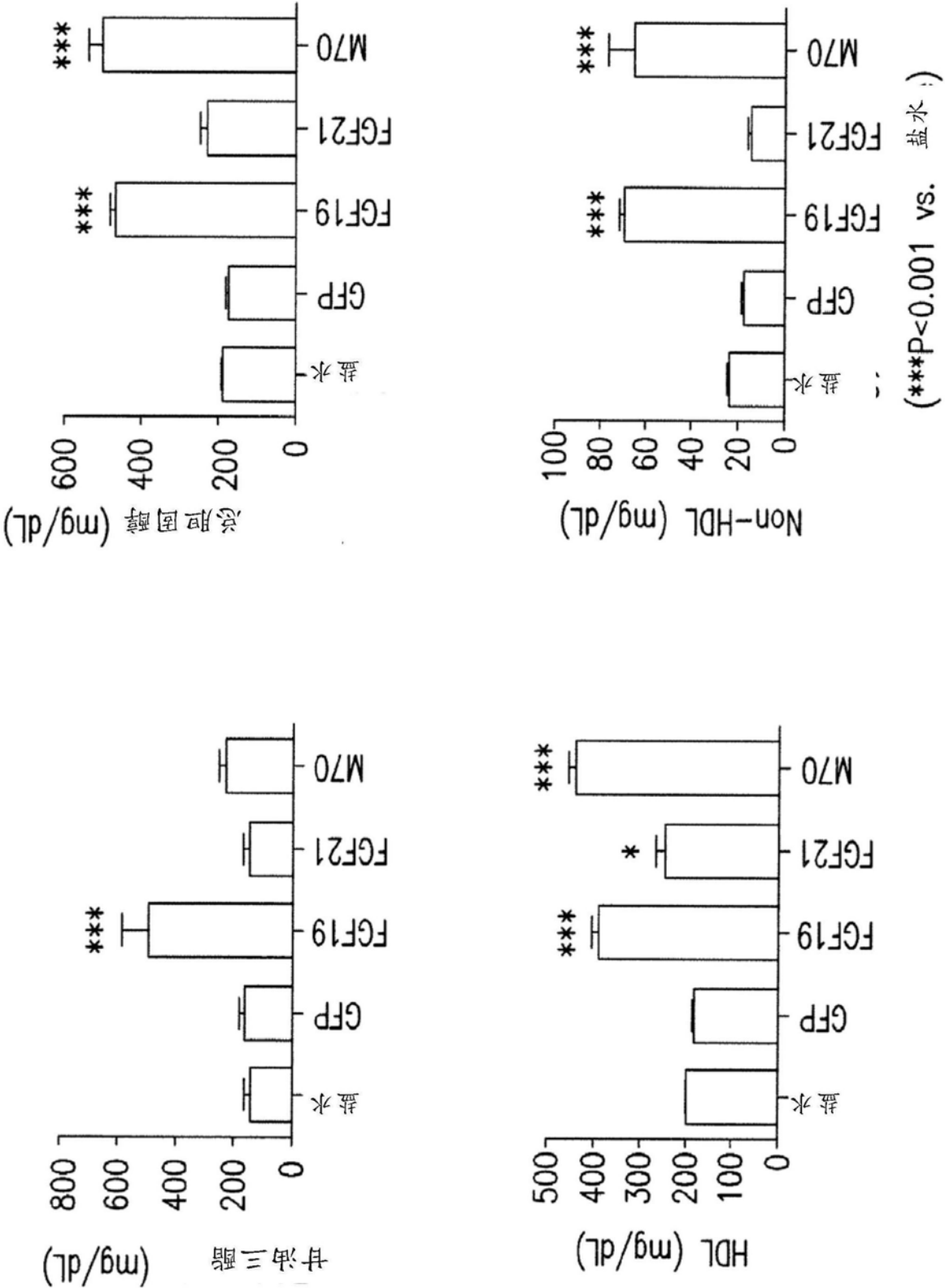


图4H

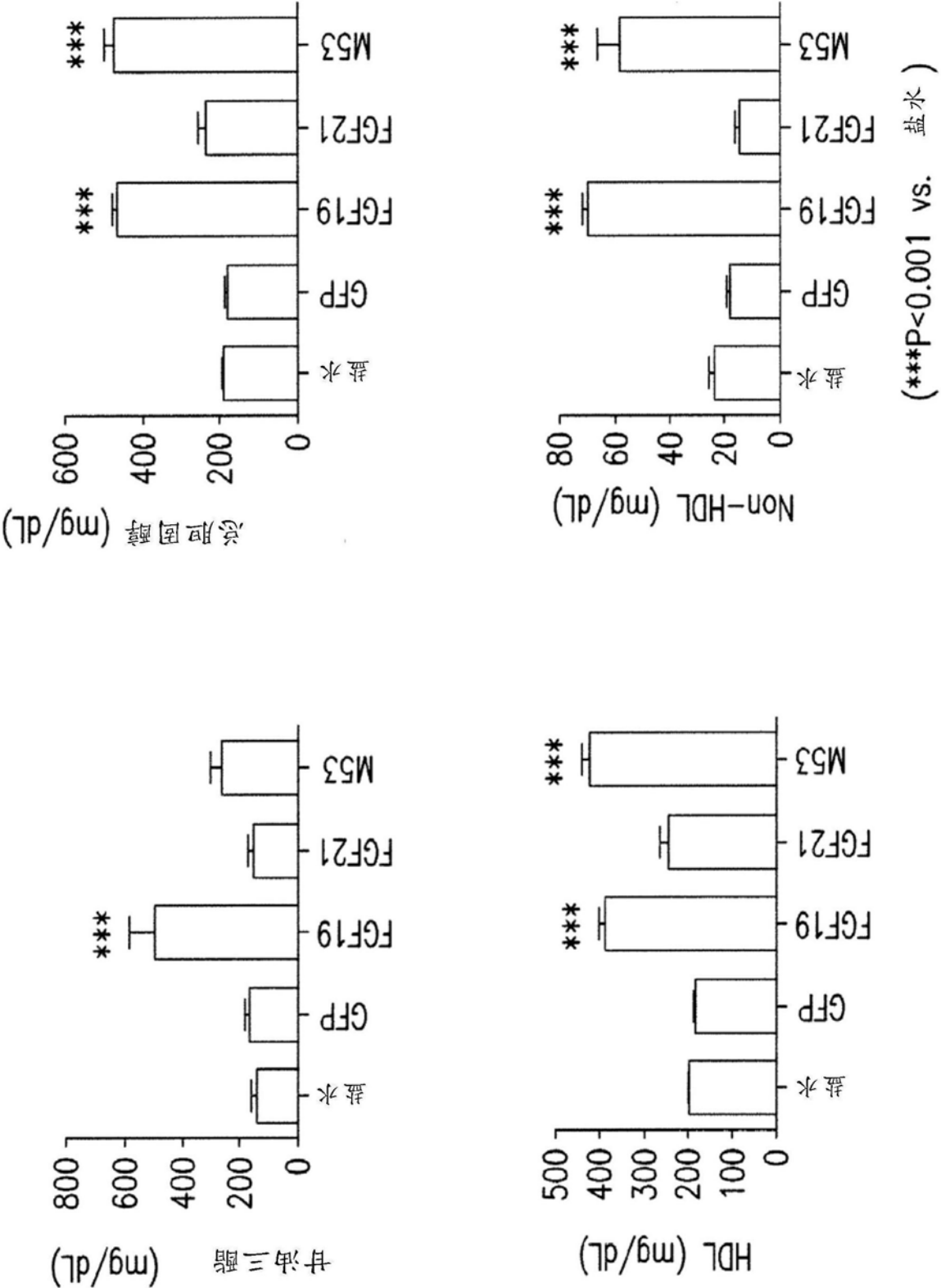


图4I

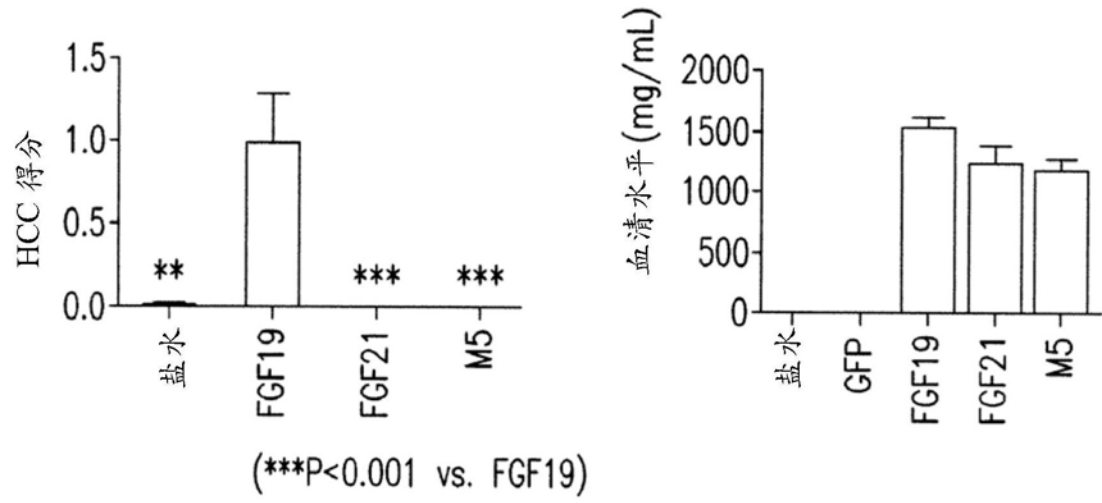


图5A

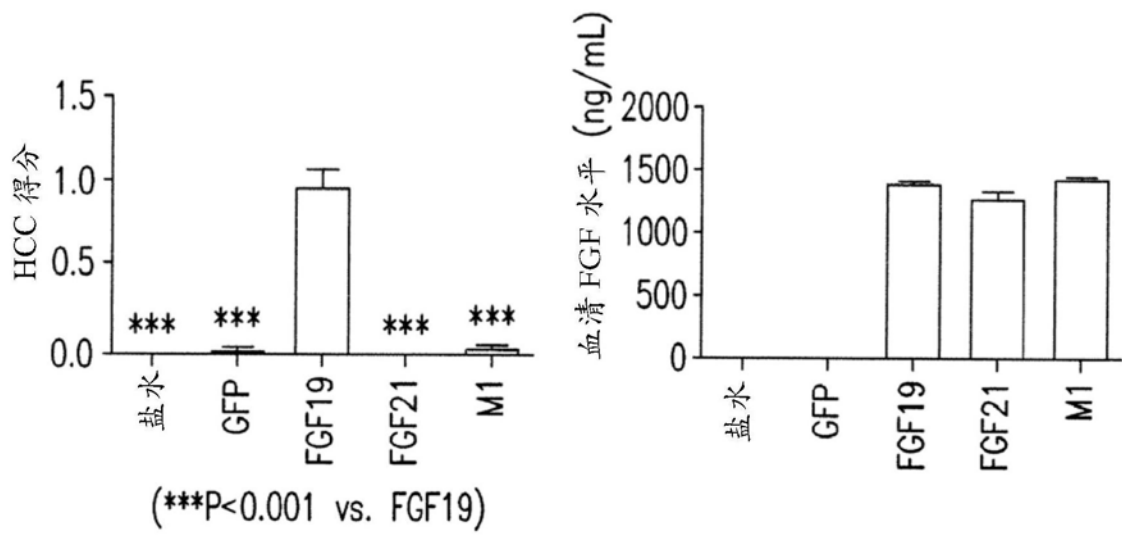


图5B

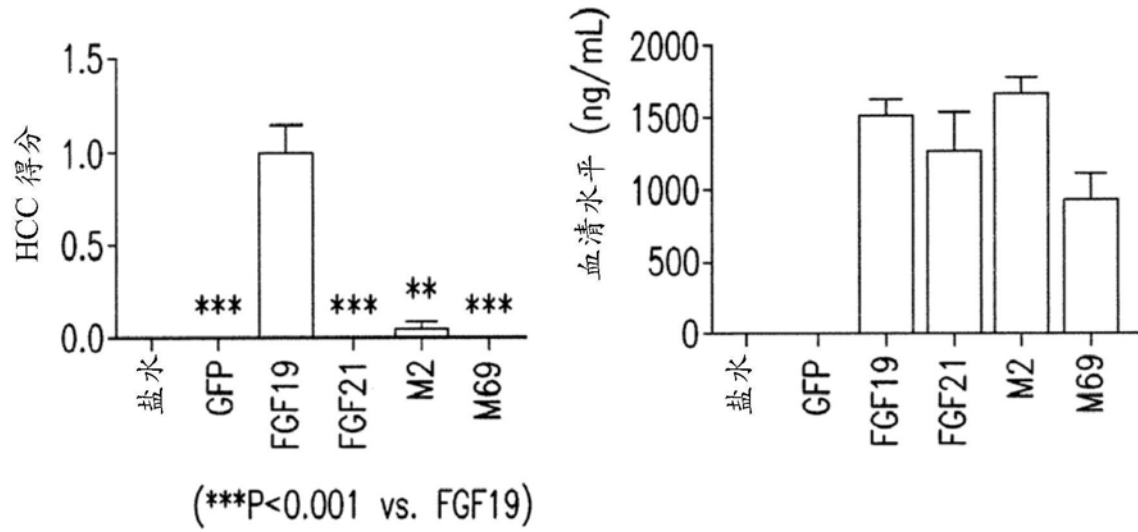


图5C

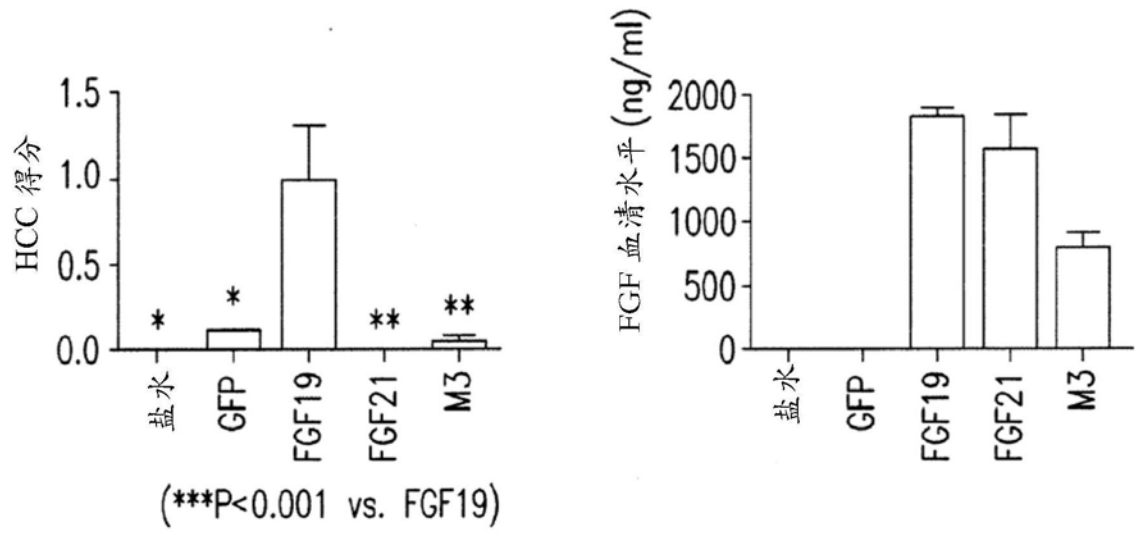


图5D

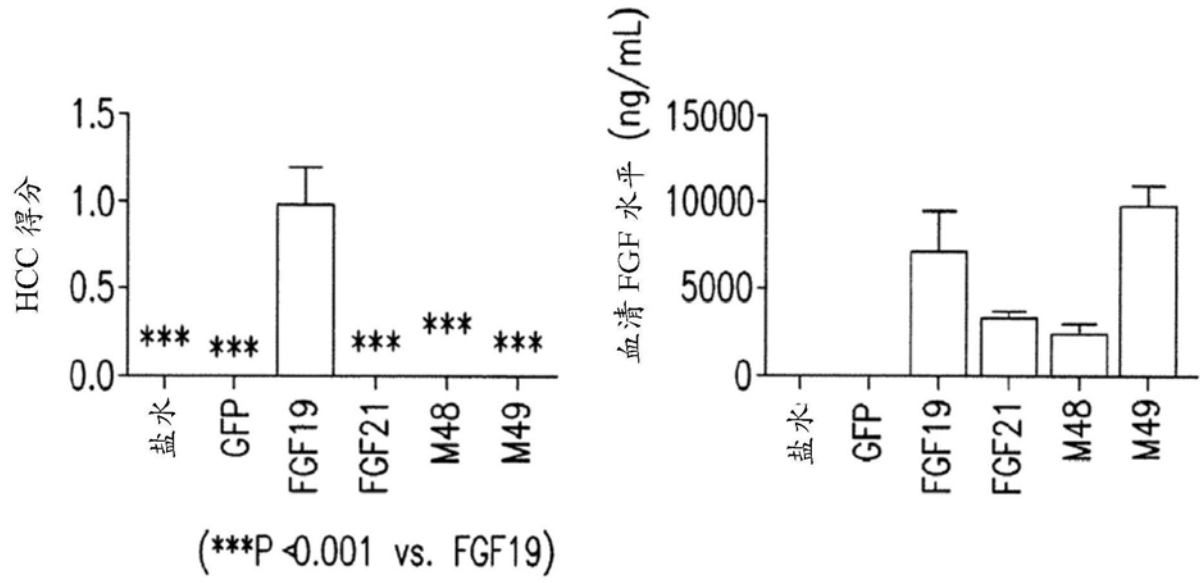


图5E

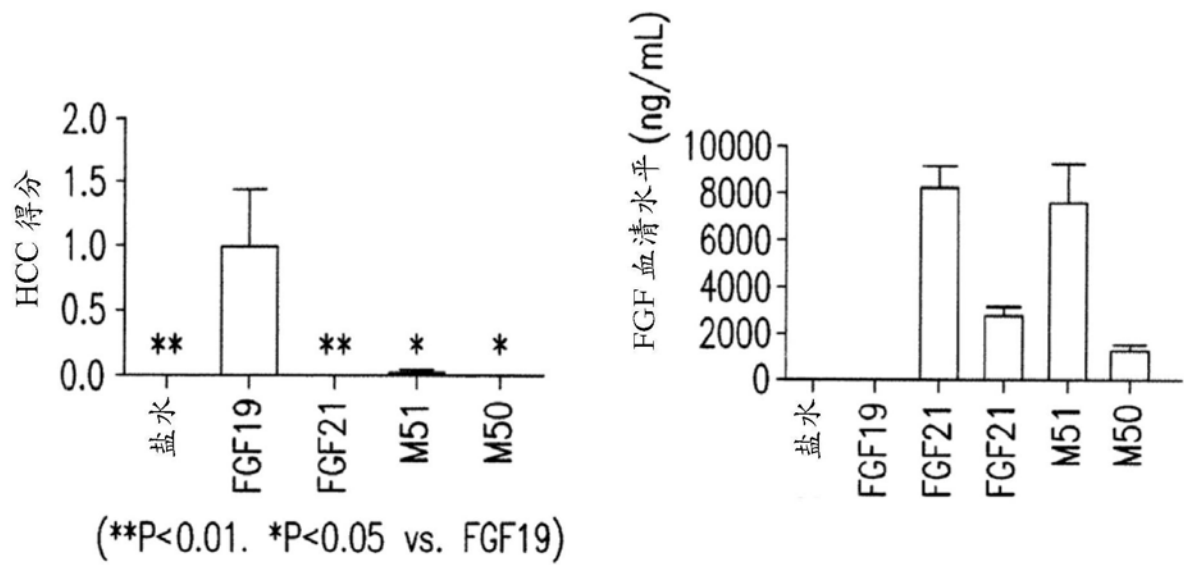


图5F

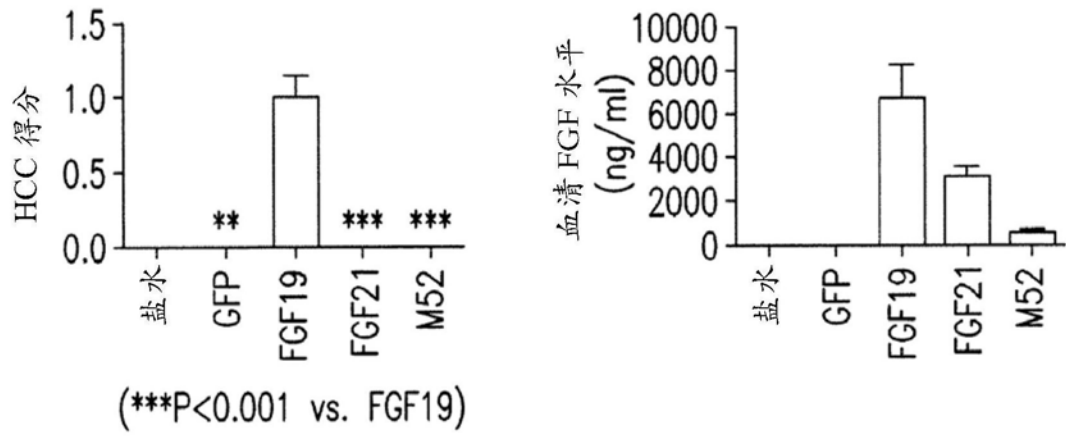


图5G

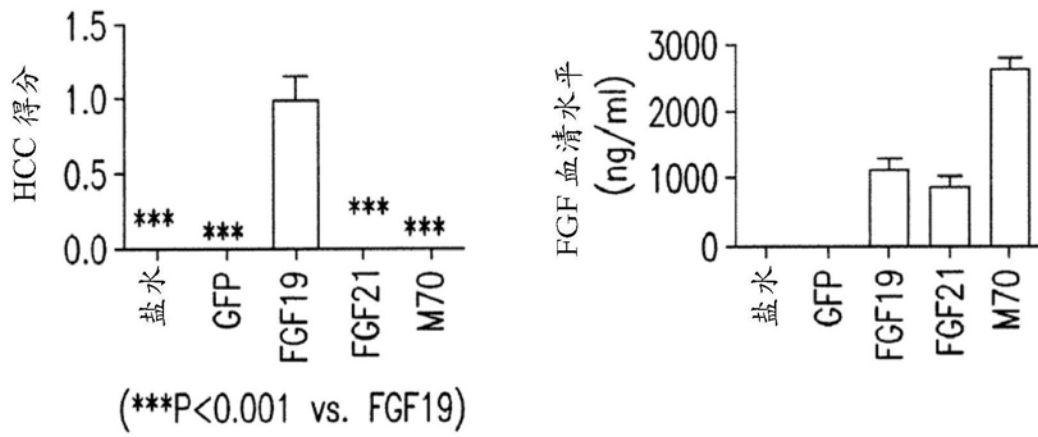


图5H

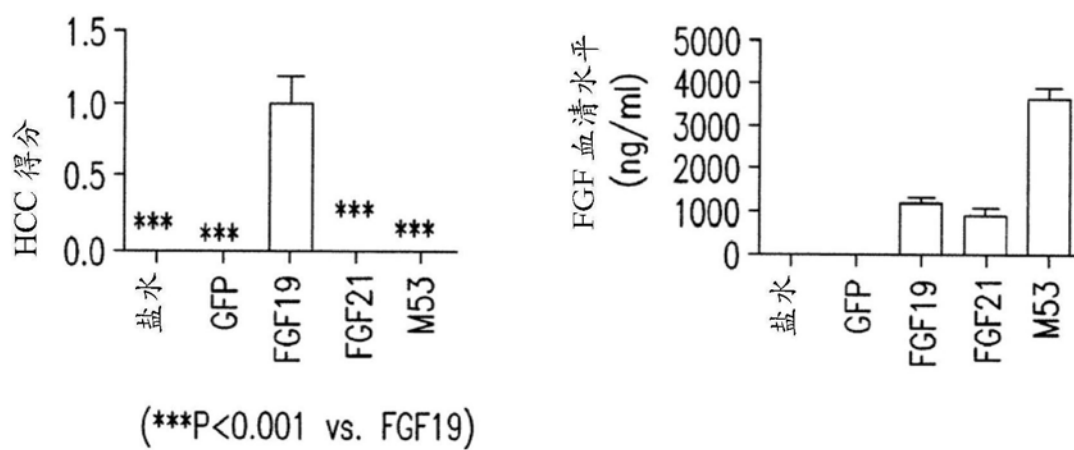


图5I

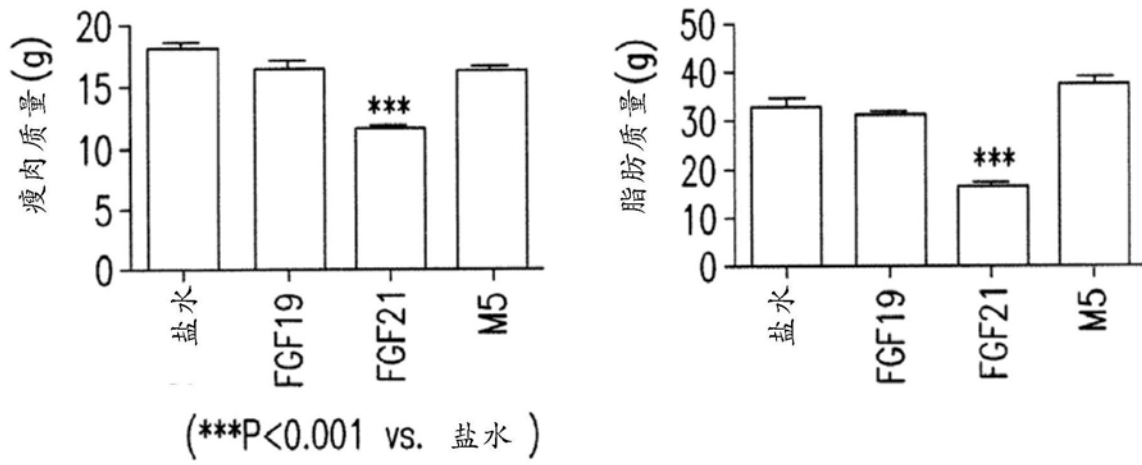


图6A

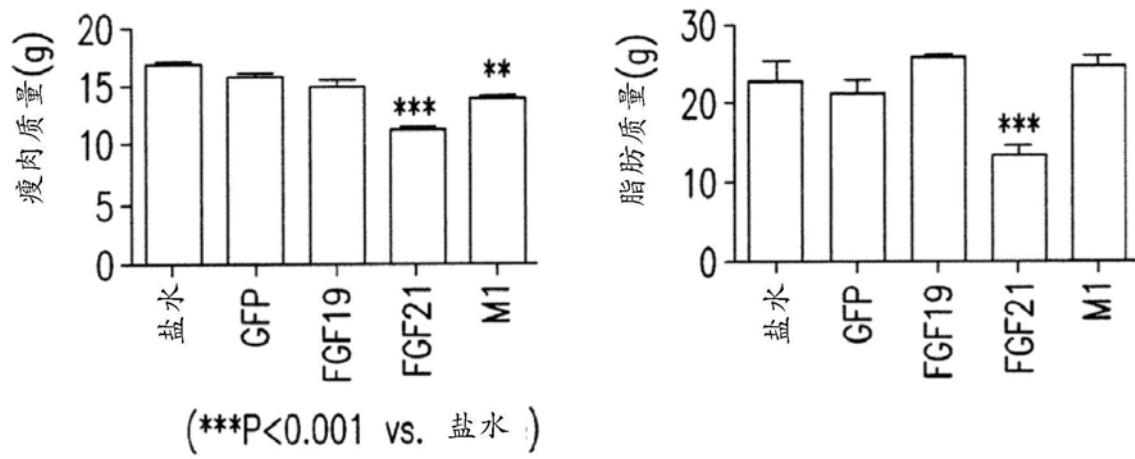


图6B

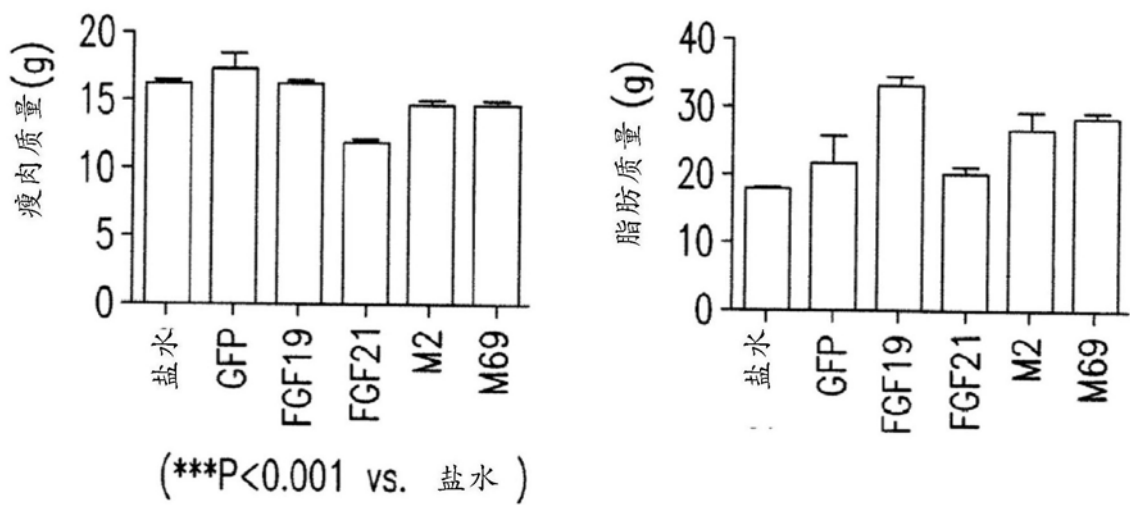


图6C

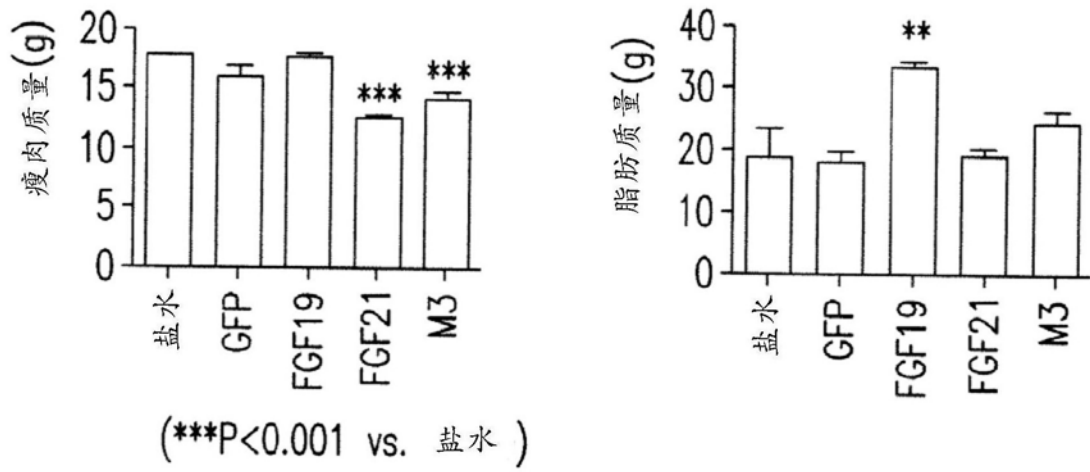


图6D

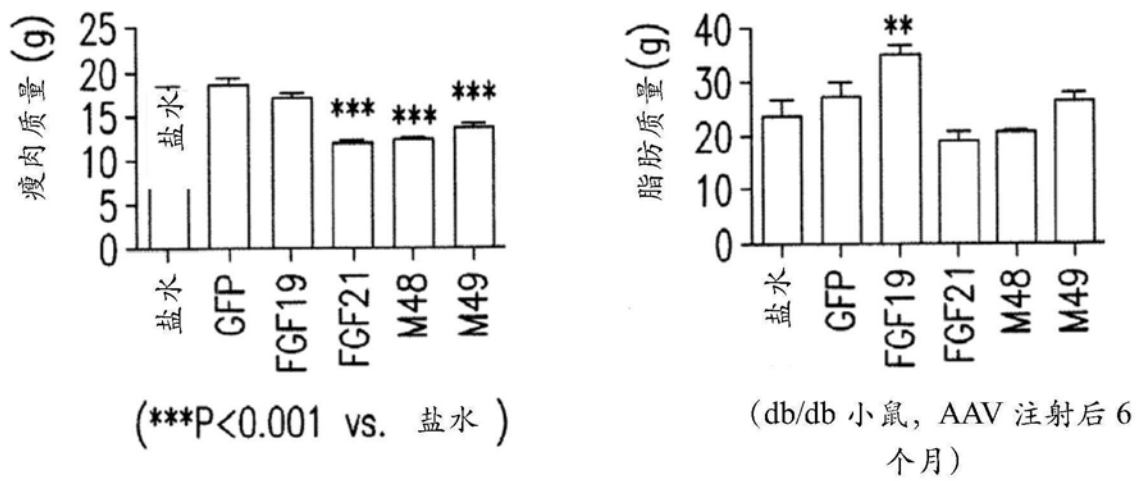


图6E

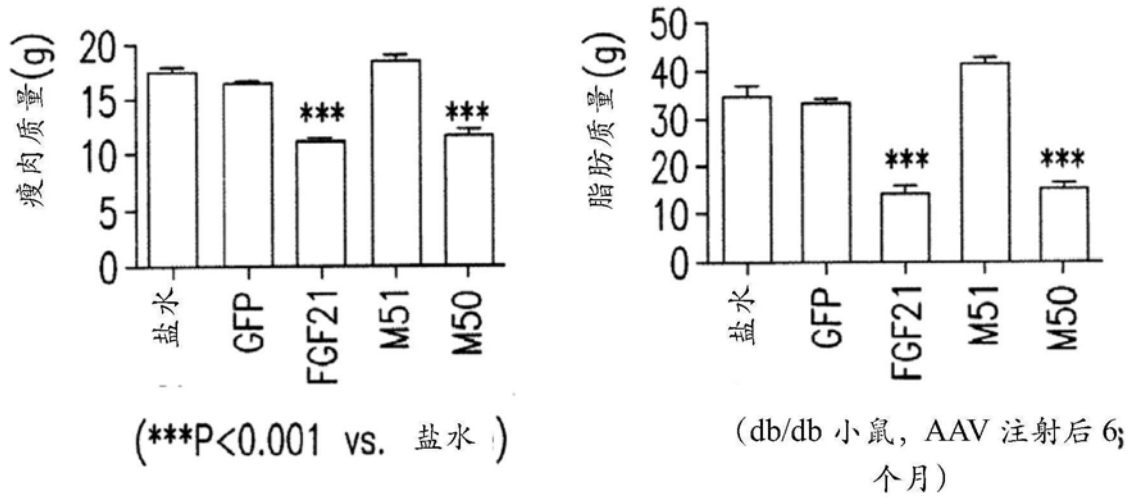


图6F

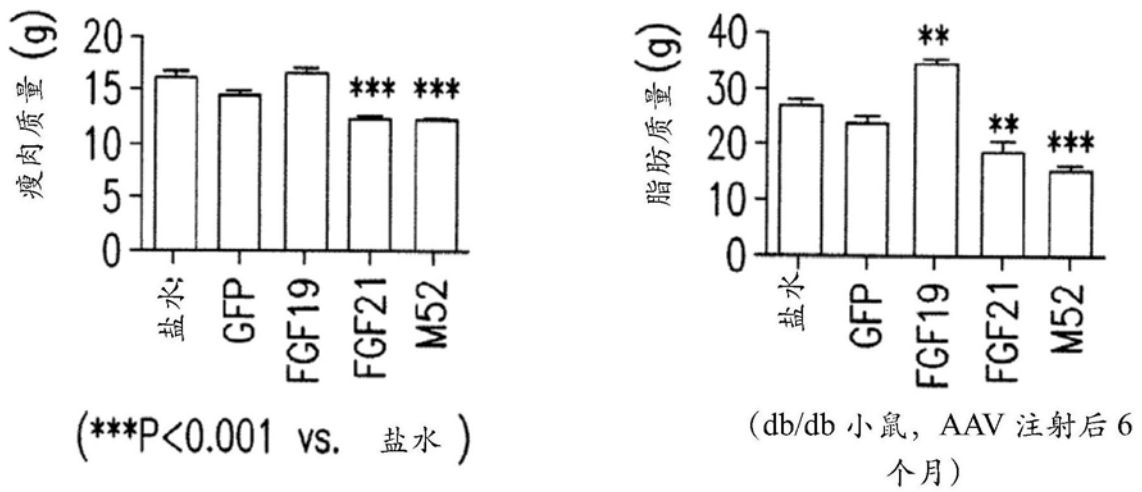


图6G

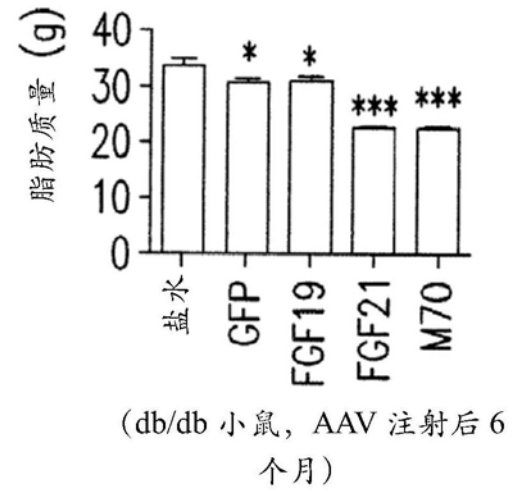
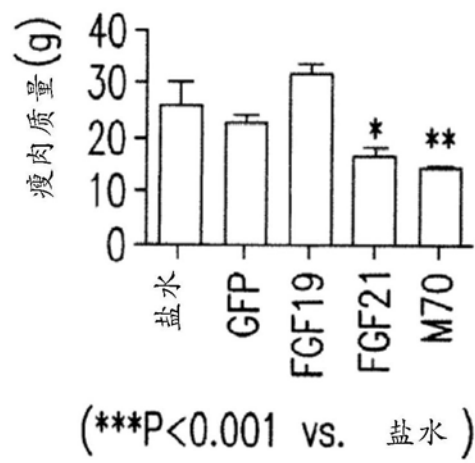


图6H

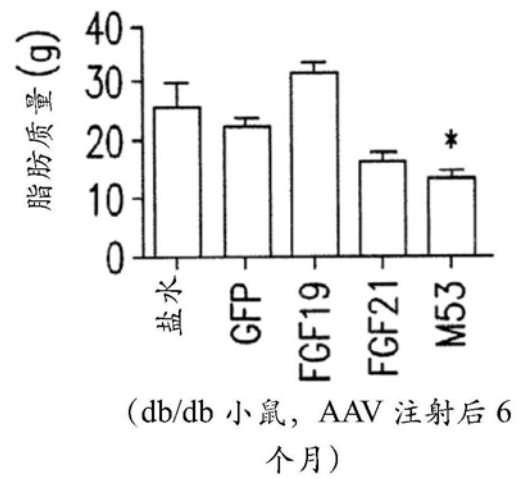
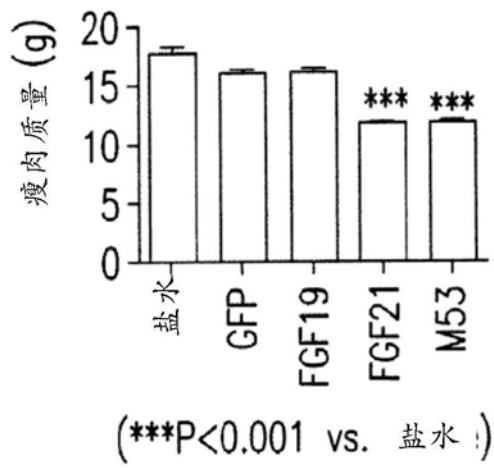


图6I



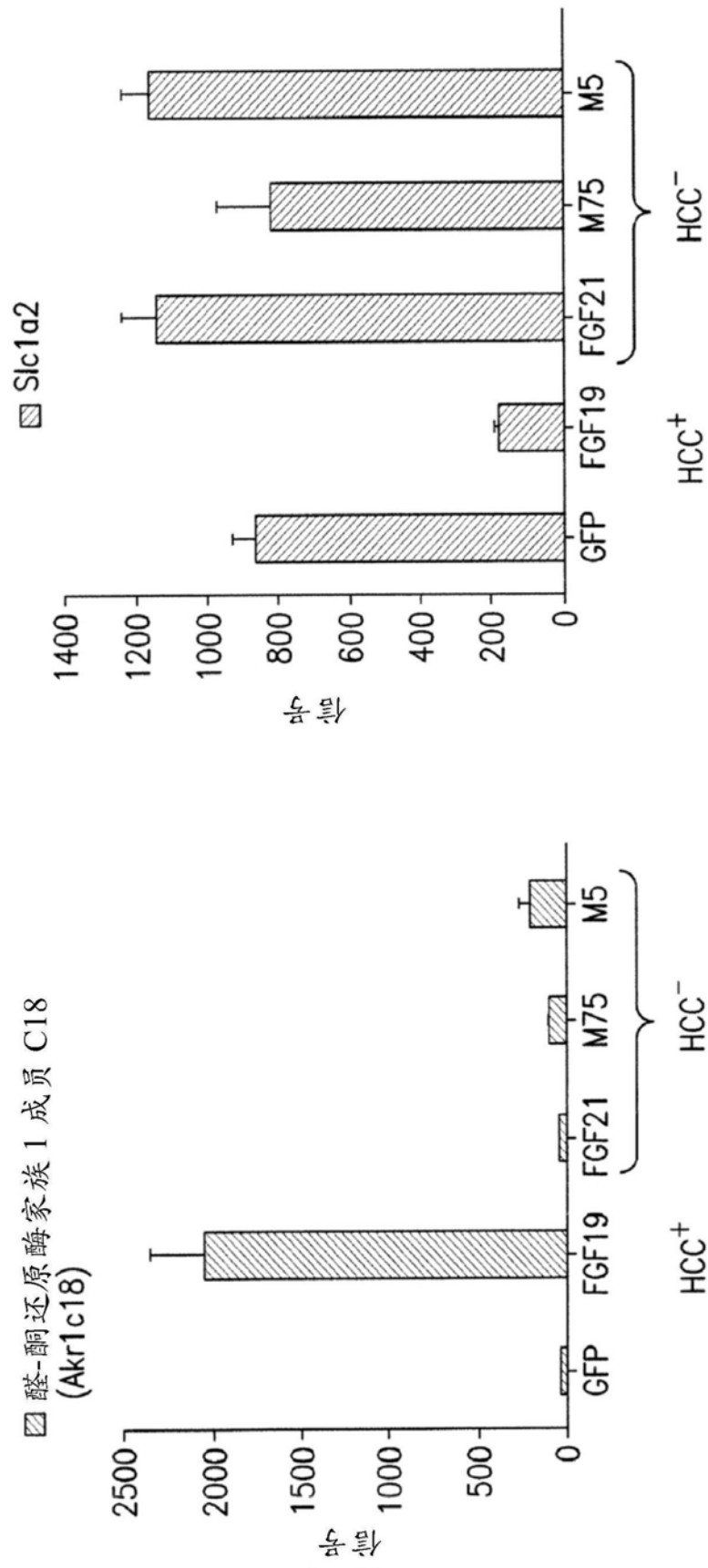


图8