



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I403519B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：098118662

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 06 月 04 日

(51)Int. Cl. : C07K14/50 (2006.01)

A61K38/18 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

A61P3/04 (2006.01)

(30)優先權：2008/06/04 美國

61/058,861

2008/06/04 美國

61/058,919

2009/03/27 美國

61/164,364

2009/05/05 美國

61/175,736

(71)申請人：安美基公司(美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：布勞斯基 艾德華 約翰 BELOUSKI, EDWARD JOHN (US)；伊利森 默瑞爾 瑪莉 ELLISON, MURIELLE MARIE (US)；漢伯格 艾吉斯 艾娃 HAMBURGER, AGNES EVA (US)；海傑特 蘭帝 怡拉 HECHT, RANDY IRA (US)；李由宣 LI, YUE-SHENG (US)；麥克斯 馬克 里歐 MICHAELS, MARK LEO (US)；宣廷 勳 SUN, JEONGHOON (KR)；徐京 XU, JING (CN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2005/061712A1

WO 2005/091944A2

WO 2006/091944A2

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：89 共 0 頁

(54)名稱

F G F 2 1 突變體及其用途

FGF21 MUTANTS AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明提供編碼 FGF21 突變體多肽之核酸分子，FGF21 突變體多肽，包含 FGF21 突變體多肽之醫藥組合物，及使用該等核酸、多肽或醫藥組合物治療代謝病症之方法。

The invention provides nucleic acid molecules encoding FGF21 mutant polypeptides, FGF21 mutant polypeptides, pharmaceutical compositions comprising FGF21 mutant polypeptides, and methods for treating metabolic disorders using such nucleic acids, polypeptides, or pharmaceutical compositions.

(無元件符號說明)

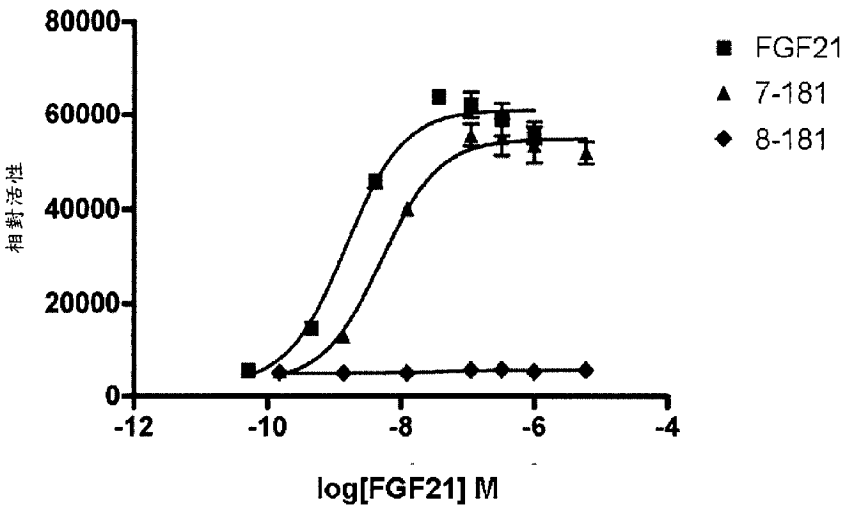


圖1A

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於編碼FGF21突變體多肽之核酸分子，FGF21突變體多肽，包含FGF21突變體多肽之醫藥組合物，及使用該等核酸、多肽或醫藥組合物治療代謝病症之方法。

本申請案主張2008年6月4日申請之美國臨時專利申請案第61/058,861號、2008年6月4日申請之美國臨時專利申請案第61/058,919號、2009年3月27日申請之美國臨時專利申請案第61/164,364號及2009年5月5日申請之美國臨時專利申請案第61/175,736號之優先權，該等申請案中之每一者皆以全文併入本文中。

【先前技術】

FGF21為屬於包括FGF19、FGF21及FGF23之纖維母細胞生長因子(FGF)亞族之分泌多肽(Itoh等人，2004, *Trend Genet.* 20: 563-69)。FGF21為非典型FGF，此係因為其具有肝素非依賴性且在葡萄糖、脂質及能量代謝之調節中起激素作用。

將FGF21以肝分泌因子自肝臟cDNA庫分離。其高度表現於肝臟及胰腺中且為主要表現於肝臟中之FGF家族之唯一成員。過度表現FGF21之轉殖基因小鼠展現緩慢生長速率、低血漿葡萄糖及甘油三酯含量以及不存在年齡相關性2型糖尿病、胰島增生及肥胖症之代謝表型。重組FGF21蛋白於齧齒動物及靈長類動物模型中之藥理學投與使得血

漿葡萄糖含量正常化、甘油三酯及膽固醇含量降低且葡萄糖耐受性及胰島素敏感性得以改良。此外，FGF21藉由增加能量消耗、身體活動及代謝率而減低體重及體脂肪。實驗研究為治療人類之2型糖尿病、肥胖症、血脂異常及其他代謝病狀或病症之FGF21的藥理學投與提供支持。

人類FGF21具有短的活體內半衰期。在小鼠中，人類FGF21之半衰期為1小時至2小時，且在食蟹獼猴(cynomolgus monkey)中，半衰期為2.5小時至3小時。在研發用作治療2型糖尿病之治療劑的FGF21蛋白時，半衰期之增加將合乎需要。具有增強半衰期之FGF21蛋白將允許對投與該蛋白質之患者的給藥頻率降低。該等蛋白質係描述於本文中。

【發明內容】

本揭示案提供一種經分離多肽，其包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列，進一步包含任何胺基酸對以下各殘基之取代：位置45之丙胺酸殘基、位置86之白胺酸殘基、位置98之白胺酸殘基、位置111之丙胺酸殘基、位置129之丙胺酸殘基、位置170之甘胺酸殘基、位置171之脯胺酸殘基或位置172之絲胺酸殘基及其組合。在一實施例中，經分離多肽包含任何胺基酸對以下各殘基之取代：位置98之白胺酸殘基、位置171之脯胺酸殘基，或位置98之白胺酸殘基與位置171之脯胺酸殘基。在另一實施例中，經分離多肽包含任何胺基酸對位置98之白胺酸殘基與位置171之脯胺酸殘基之取代。

本揭示案亦提供一種包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之經分離多肽，該胺基酸序列具有：(a)至少一種以下殘基之胺基酸取代：(i)位置19之麩醯胺酸、異白胺酸或離胺酸殘基；(ii)位置20之組胺酸、白胺酸或苯丙胺酸殘基；(iii)位置21之異白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或纈胺酸殘基；(iv)位置22之異白胺酸、苯丙胺酸或纈胺酸殘基；(v)位置150之丙胺酸或精胺酸殘基；(vi)位置151之丙胺酸或纈胺酸殘基；(vii)位置152之組胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或纈胺酸殘基；(viii)位置170之丙胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、脯胺酸或絲胺酸殘基；(ix)位置171之丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、甘胺酸、組胺酸、離胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸或酪胺酸殘基；(x)位置172之白胺酸或蘇胺酸殘基；或(xi)位置173之精胺酸或麩胺酸殘基；及(b)至少一種以下殘基之胺基酸取代：(i)位置26之精胺酸、麩胺酸或離胺酸殘基；(ii)位置45之精胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、離胺酸或蘇胺酸殘基；(iii)位置52之蘇胺酸殘基；(iv)位置58之半胱胺酸、麩胺酸、甘胺酸或絲胺酸殘基；(v)位置60之丙胺酸、精胺酸、麩胺酸或離胺酸殘基；(vi)位置78之丙胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸殘基；(vii)位置86之半胱胺酸或蘇胺酸殘基；(viii)位置88之丙胺酸、精胺酸、麩胺酸、離胺酸或絲胺酸殘基；(ix)位置98之精胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、離胺酸或蘇胺酸殘基；(x)位置99之精胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸或

麩胺酸殘基；(xi)位置111之離胺酸或蘇胺酸殘基；(xii)位置129之精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸或離胺酸殘基；或(xiii)位置134之精胺酸、麩胺酸、組胺酸、離胺酸或酪胺酸殘基；及其組合。在一實施例中，位置98之殘基為精胺酸且位置171之殘基為脯胺酸，且在另一實施例中，多肽可包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少85%一致的胺基酸序列，但其中(a)(i)-(xi)及(b)(i)-(xiii)中之至少一種胺基酸取代不經進一步修飾。

本揭示案另外提供一種包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的經分離多肽，該胺基酸序列具有至少一種以下殘基之胺基酸取代：(a)位置19之麩醯胺酸、離胺酸或異白胺酸殘基；(b)位置20之組胺酸、白胺酸或苯丙胺酸殘基；(c)位置21之異白胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或纈胺酸殘基；(d)位置22之異白胺酸、苯丙胺酸或纈胺酸殘基；(e)位置150之丙胺酸或精胺酸殘基；(f)位置151之丙胺酸或纈胺酸殘基；(g)位置152之組胺酸、白胺酸、苯丙胺酸或纈胺酸殘基；(h)位置170之丙胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸或脯胺酸殘基；(i)位置171之丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、甘胺酸、組胺酸、離胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸或酪胺酸殘基；(j)位置172之白胺酸殘基；或(k)位置173之精胺酸或麩胺酸殘基；及其組合。在一實施例中，位置171之殘基為脯胺酸，且在另一實施例中，多肽可包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少85%一致的胺基酸序列，但其中(a)-(k)中之至少一

種胺基酸取代不經進一步修飾。

本揭示案進一步提供一種包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的經分離多肽，該胺基酸序列具有至少一種以下殘基之胺基酸取代：(a)位置26之精胺酸、麩胺酸或離胺酸殘基；(b)位置45之精胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、離胺酸或蘇胺酸殘基；(c)位置52之蘇胺酸殘基；(d)位置58之麩胺酸、甘胺酸或絲胺酸殘基；(e)位置60之丙胺酸、精胺酸、麩胺酸或離胺酸殘基；(f)位置78之丙胺酸、精胺酸或組胺酸殘基；(g)位置88之丙胺酸殘基；(h)位置98之精胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、離胺酸或蘇胺酸殘基；(i)位置99之精胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸或麩胺酸殘基；(j)位置111之離胺酸或蘇胺酸殘基；(k)位置129之精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、組胺酸或離胺酸殘基；或(l)位置134之精胺酸、麩胺酸、組胺酸、離胺酸或酪胺酸殘基；及其組合。在一實施例中，位置98之殘基為精胺酸，且在另一實施例中，多肽可包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少85%一致的胺基酸序列，但其中(a)-(l)中之至少一種胺基酸取代不經進一步修飾。

在多個實施例中，本文所揭示之多肽可進一步包含至少一種以下殘基之胺基酸取代：(a)位置179之苯丙胺酸、脯胺酸、丙胺酸、絲胺酸或甘胺酸；(b)位置180之麩胺酸、甘胺酸、脯胺酸或絲胺酸；或(c)位置181之離胺酸、甘胺酸、蘇胺酸、丙胺酸、白胺酸或脯胺酸，且可進一步包含1至10個與多肽之C末端融合之胺基酸殘基，且可為任何胺

基酸，例如一或多個選自由甘胺酸、脯胺酸及其組合組成之群的殘基。

在多個實施例中，本文所揭示之多肽可包含(a)不多於8個胺基酸殘基之胺基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖；(b)不多於12個胺基酸殘基之羧基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖；或(c)不多於8個胺基酸殘基之胺基末端截短及不多於12個胺基酸殘基之羧基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖。

在一些實施例中，本文所揭示之多肽可與一或多種聚合物(諸如PEG)共價連接。在其他實施例中，可將本發明之多肽與異源胺基酸序列視情況經由連接子(諸如GGGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:23))融合。異源胺基酸序列可為IgG恆定結構域或其片段，諸如SEQ ID NO:13之胺基酸序列。本文所揭示之該等融合多肽亦可形成多聚體。

本揭示案亦提供包含本文所揭示之多肽及醫藥學上可接受之調配劑之醫藥組合物。該等醫藥組合物可用於治療代謝病症之方法中，且該方法包含向有需要的人類患者投與本發明之醫藥組合物。可治療之代謝病症包括糖尿病及肥胖症。

亦提供編碼本文所揭示之多肽之經分離核酸分子，以及包含該等核酸分子之載體及包含該等核酸分子之宿主細胞。

亦揭示SEQ ID NO:4之多肽之截短形式。在多個實施例

中，多肽可包含：(a)不多於8個胺基酸殘基之胺基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖；(b)不多於12個胺基酸殘基之羧基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖；或(c)不多於8個胺基酸殘基之胺基末端截短及不多於12個胺基酸殘基之羧基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖。

本揭示案另外提供一種經分離融合蛋白，該經分離融合蛋白質可包含：(a)IgG恆定結構域；(b)與IgG恆定結構域融合之連接子序列；及(c)與連接子序列融合且包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之FGF21突變體，其中已用精胺酸殘基取代位置98之白胺酸殘基且已用甘胺酸殘基取代位置171之脯胺酸殘基。在一實施例中，連接子序列可包含GGGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:23)，且在另一實施例中，IgG恆定結構域可包含SEQ ID NO:13。在另一實施例中，連接子序列包含GGGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:23)，且IgG恆定結構域包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列。在另一實施例中，連接子之N末端係與IgG恆定結構域之C末端融合且FGF21突變體之N末端係與連接子之C末端融合。所揭示之融合蛋白可形成多聚體。

在融合蛋白之多個實施例中，FGF21突變體組份可包含至少一種以下殘基之胺基酸取代：(a)位置179之苯丙胺酸、脯胺酸、丙胺酸、絲胺酸或甘胺酸；(b)位置180之麩胺酸、甘胺酸、脯胺酸或絲胺酸；或(c)位置181之離胺酸、甘胺酸、蘇胺酸、丙胺酸、白胺酸或脯胺酸，且可進

一步包含1至10個與FGF21突變體之C末端融合之胺基酸殘基及1至10個胺基酸殘基，且可為任何胺基酸，例如一或多個選自由甘胺酸、脯胺酸及其組合組成之群的殘基。

在融合蛋白之其他實施例中，FGF21突變體組份可包含：(a)不多於8個胺基酸殘基之胺基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖；(b)不多於12個胺基酸殘基之羧基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖；或(c)不多於8個胺基酸殘基之胺基末端截短及不多於12個胺基酸殘基之羧基末端截短，其中該多肽能夠降低哺乳動物之血糖。在另一實施例中，融合蛋白之FGF21突變體組份可包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少85%一致的胺基酸序列，但其中精胺酸及甘胺酸殘基不經進一步修飾。

本揭示案亦提供包含本文所揭示之融合蛋白及醫藥學上可接受之調配劑之醫藥組合物。該等醫藥組合物可用於治療代謝病症之方法中，該方法包含向有需要之人類患者投與本發明之醫藥組合物。可治療之代謝病症包括糖尿病及肥胖症。

亦提供編碼本文所揭示之融合蛋白之經分離核酸分子，以及包含該等核酸分子之載體及包含該等核酸分子之宿主細胞。

根據以下對某些實施例之更詳述描述及申請專利範圍，本發明之特定實施例將變得顯而易見。

【實施方式】

可使用本文所揭示之方法及標準分子生物學方法製備具

有增強之特性(諸如增加之半衰期及/或減少之聚集)的人類 FGF21 蛋白。視情況可藉由使抗體或其部分與野生型 FGF21 序列之 N 末端或 C 末端融合來進一步延長半衰期。亦有可能藉由向蛋白質中引入胺基酸取代來進一步延長野生型 FGF21 蛋白之半衰期或減少野生型 FGF21 蛋白之聚集。該等經修飾蛋白在本文中稱為突變體或 FGF21 突變體，且其構成本發明之實施例。

實例中所包括之本文所用之重組核酸方法一般為 Sambrook 等人 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 或 *Current Protocols in Molecular Biology*(Ausubel 等人編，Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994)中所述之彼等方法，該兩者均為任何目的以引用的方式併入本文中。

1. 通用定義

術語「經分離核酸分子」係指具有以下特徵之本發明之核酸分子：(1)已與至少約 50% 之當總核酸自源細胞分離時一起天然存在之蛋白質、脂質、碳水化合物或其他物質分離，(2)未與自然界中「經分離核酸分子」所連接之聚核苷酸之所有或一部分連接，(3)與自然界中不連接之聚核苷酸可操作地連接，或(4)在自然界中不會以較大聚核苷酸序列之一部分存在。較佳地，本發明之經分離核酸分子實質上不含在其自然環境中可見之會干擾其在多肽產生中之用途或其治療性、診斷性、預防性或研究用途的任何其他污染核酸分子或其他污染物。

術語「載體」係用於指用於將編碼資訊轉移至宿主細胞之任何分子(例如，核酸、質體或病毒)。

術語「表現載體」係指適於宿主細胞之轉化且含有指引及/或控制插入異源核酸序列之表現之核酸序列的載體。若存在內含子，則表現包括(但不限於)諸如轉錄、轉譯及RNA剪接之過程。

術語「可操作地連接」在本文中係用於指側接序列之排列，其中如此描述之側接序列經組態或裝配以便執行其常見功能。因此，與編碼序列可操作地連接之側接序列可能夠實現編碼序列之複製、轉錄及/或轉譯。舉例而言，當啟動子能夠指引彼編碼序列之轉錄時，使編碼序列與啟動子可操作地連接。側接序列無須與編碼序列相連，只要其準確發揮作用即可。因此，舉例而言，在啟動子序列與編碼序列之間可存在插入未轉譯但轉錄之序列且仍可將啟動子序列視為與編碼序列「可操作地連接」。

術語「宿主細胞」係用於指已用核酸序列轉化或能夠用核酸序列轉化且接著能夠表現所關注之經選擇基因的細胞。該術語包括親本細胞之子代，不管子代在形態學或遺傳構成上是否與原始親本細胞一致，只要所選基因存在即可。

術語「經分離多肽」係指具有以下特徵之本發明之多肽：(1)已與至少約50%之當自源細胞分離時一起天然存在之聚核苷酸、脂質、碳水化合物或其他物質分離，(2)未與自然界中「經分離多肽」所連接之多肽之所有或一部分連

接(藉由共價或非共價相互作用)，(3)與自然界中不連接之多肽可操作地連接(藉由共價或非共價相互作用)，或(4)在自然界中不存在。較佳地，經分離多肽實質上不含在其自然環境中可見之會干擾其治療性、診斷性、預防性或研究用途的任何其他污染多肽或其他污染物。

術語「天然存在」當關於諸如核酸分子、多肽、宿主細胞及其類似物之生物物質使用時係指在自然界中可見且不受人類操縱之物質。類似地，如本文所用之「非天然存在」係指在自然界中未發現或已由人類在結構上修飾或合成之物質。當關於核苷酸使用時，術語「天然存在」係指鹼腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)。當關於胺基酸使用時，術語「天然存在」係指20種胺基酸丙胺酸(A)、半胱胺酸(C)、天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)、苯丙胺酸(F)、甘胺酸(G)、組胺酸(H)、異白胺酸(I)、離胺酸(K)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、天冬醯胺(N)、脯胺酸(P)、麩醯胺酸(Q)、精胺酸(R)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)。

術語「FGF21多肽」係指人類中所表現之天然存在之野生型多肽。對本揭示案而言，術語「FGF21多肽」可互換使用以指代任何全長FGF21多肽，例如SEQ ID NO:2，其由209個胺基酸殘基組成且其係由SEQ ID NO:1之核苷酸序列編碼；多肽之任何成熟形式，例如SEQ ID NO:4，其由181個胺基酸殘基組成且其係由SEQ ID NO:3之核苷酸序列編碼，且其中已移除全長FGF21多肽之胺基末端之28個胺

基酸殘基(亦即，其構成信號肽)，及其變異體。

術語「FGF21多肽突變體」及「FGF21突變體」係指天然存在FGF21胺基酸序列已經修飾之FGF21多肽變異體。該等修飾包括(但不限於)一或多個胺基酸取代(包括用非天然存在之胺基酸類似物取代)及截短。因此，FGF21多肽突變體包括(但不限於)如本文所述之定點之FGF21突變體、截短之FGF21多肽、抗蛋白水解性FGF21突變體、聚集減少性FGF21突變體、FGF21組合突變體及FGF21融合蛋白。為鑑別本發明之FGF21突變體的特定截短及胺基酸取代，所截短或突變之胺基酸殘基之編號對應於成熟181個殘基之FGF21多肽之編號。

在本發明之其他實施例中，FGF21多肽突變體包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少約85%一致之胺基酸序列，但其中賦予FGF21多肽突變體以所需特性(例如抗蛋白水解性、增加之半衰期或聚集減少性及其組合)之特定殘基未經進一步修飾。換言之，除經修飾以賦予抗蛋白水解性、聚集減少性或其他特性之FGF21突變體序列中之殘基外，FGF21突變體序列中之所有其他胺基酸殘基之約15%可經修飾。舉例而言，在FGF21突變體Q173E中，除取代位置173之麩醯胺酸的麩胺酸殘基外之所有胺基酸殘基的至多15%可經修飾。在其他實施例中，FGF21多肽突變體包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少約90%或約95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列，但其中賦予FGF21多肽突變體以抗蛋白水解性或聚集減少性之特定殘

基未經進一步修飾。該等FGF21多肽突變體具有野生型FGF21多肽之至少一種活性。

本發明亦涵蓋編碼FGF21多肽突變體之核酸分子，該FGF21多肽突變體包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少約85%一致之胺基酸序列，但其中賦予FGF21多肽突變體以所需特性(例如抗蛋白水解性、增加之半衰期或聚集減少性及其組合)之特定殘基未經進一步修飾。換言之，除編碼經修飾以賦予抗蛋白水解性、聚集減少性或其他特性之FGF21突變體序列中之殘基的核苷酸外，FGF21突變體序列中之所有其他核苷酸之約15%可經修飾。舉例而言，在FGF21突變體Q173E中，除編碼取代位置173之麩氨胺酸的麩氨胺酸殘基之核苷酸外的所有核苷酸之至多15%可經修飾。本發明進一步涵蓋編碼FGF21多肽突變體之核酸分子，該FGF21多肽突變體包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列至少約90%或約95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列，但其中賦予FGF21多肽突變體以抗蛋白水解性或聚集減少性之特定殘基未經進一步修飾。該等FGF21突變體具有野生型FGF21多肽之至少一種活性。

本發明亦涵蓋包含與SEQ ID NO:3之核苷酸序列至少約85%一致之核苷酸序列的核酸分子，但其中編碼賦予經編碼FGF21多肽突變體以抗蛋白水解性、聚集減少性或其他特性之胺基酸殘基的核苷酸未經進一步修飾。換言之，除經修飾以賦予抗蛋白水解性、聚集減少性或其他特性之FGF21突變體序列中之殘基外，FGF21突變體序列中之所

有其他胺基酸殘基之約15%可經修飾。舉例而言，在FGF21突變體Q173E中，除取代位置173之麩醯胺酸的麩胺酸殘基外之所有胺基酸殘基的至多15%可經修飾。本發明進一步涵蓋包含與SEQ ID NO:3之核苷酸序列至少約90%或約95%、96%、97%、98%或99%一致之核苷酸序列的核酸分子，但其中編碼賦予經編碼FGF21多肽突變體以抗蛋白水解性或聚集減少性之胺基酸殘基的核苷酸未經進一步修飾。該等核酸分子編碼具有野生型FGF21多肽之至少一種活性的FGF21突變體多肽。

術語「生物學活性FGF21多肽突變體」係指不考慮引入FGF21多肽突變體中之修飾的類型或數目，具有野生型FGF21多肽之活性(諸如降低血糖、胰島素、甘油三酯或膽固醇；減低體重；及改良葡萄糖耐受性、能量消耗或胰島素敏感性之能力)的本文所述之任何FGF21多肽突變體。仍可將相對於野生型FGF21多肽具有程度略微降低之FGF21活性的FGF21多肽突變體視為生物學活性FGF21多肽突變體。

術語「有效量」及「治療有效量」各自係指用於維持可觀測程度之野生型FGF21多肽之一或多種生物活性(諸如降低血糖、胰島素、甘油三酯或膽固醇含量；減低體重；或改良葡萄糖耐受性、能量消耗或胰島素敏感性之能力)的FGF21多肽突變體之量。

如本文所用之術語「醫藥學上可接受之載體」或「生理學上可接受之載體」係指適於實現或增強FGF21多肽突變

體之傳遞的一或多種調配物質。

術語「抗原」係指能夠藉由抗體結合且另外能夠用於動物中以產生能夠結合彼抗原之抗原決定基之抗體的分子或分子之一部分。抗原可具有一或多個抗原決定基。

術語「天然Fc」係指包含由全抗體消化所得或由其他方式產生之非抗原結合片段之序列的分子或序列，無論其為單體或多聚體形式，且可含有鉸鏈區。天然Fc之原始免疫球蛋白來源較佳為人類來源且可為免疫球蛋白中之任一者，但IgG1及IgG2較佳。天然Fc分子由可藉由共價（亦即，雙硫鍵）及非共價締合連接成二聚體或多聚體形式之單體多肽組成。視種類（例如IgG、IgA及IgE）或子類（例如IgG1、IgG2、IgG3、IgA1及IgGA2）而定，天然Fc分子之單體次單元之間的分子間雙硫鍵之數目在1至4之範圍內。天然Fc之一實例為由IgG之木瓜蛋白酶消化所產生之雙硫鍵鍵結二聚體（參見Ellison等人，1982, *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9）。如本文所用之術語「天然Fc」為單體、二聚體及多聚體形式之總稱。Fc多肽序列之實例以SEQ ID NO:13呈現。

術語「Fc變異體」係指自天然Fc修飾但仍包含救助受體（salvage receptor）FcRn（新生兒Fc受體）結合位點之分子或序列。國際公開案第WO 97/34631號及第WO 96/32478號描述例示性Fc變異體，以及與救助受體之相互作用，且其係以引用的方式併入本文中。因此，術語「Fc變異體」可包含自非人類天然Fc人類化之分子或序列。此外，天然Fc

包含可移除之區域，此係因為該等區域提供非本發明之FGF21突變體之融合分子所需的結構特徵或生物活性。因此，術語「Fc變異體」包含缺乏一或多個天然Fc位點或殘基或其中一或多個Fc位點或殘基已經修飾之分子或序列，其影響或涉及以下方面：(1)雙硫鍵形成，(2)與所選宿主細胞之不相容性，(3)在所選宿主細胞中表現後之N末端不均一性，(4)糖基化作用，(5)與補體之相互作用，(6)結合除救助受體外之Fc受體，或(7)抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。Fc變異體描述於下文之其它細節中。

術語「Fc結構域」涵蓋如上所定義之天然Fc及Fc變異體及序列。如同Fc變異體及天然Fc分子一樣，術語「Fc結構域」包括由全抗體消化或由其他方式產生之單體或多聚體形式之分子。在本發明之一些實施例中，可使Fc結構域與FGF21或FGF21突變體(包括FGF21或FGF21突變體之截短形式)經由(例如)Fc結構域與FGF21序列之間的共價鍵來融合。該等融合蛋白可經由Fc結構域之締合來形成多聚體，且此等融合蛋白與其多聚體為本發明之一態樣。

2. 位點特異性FGF21突變體

術語「位點特異性FGF21突變體」或「經取代FGF21突變體」係指具有與天然存在之FGF21多肽序列之胺基酸序列不同的胺基酸序列(例如SEQ ID NO:2及SEQ ID NO:4及其變異體)之FGF21突變體多肽。可藉由在FGF21多肽之特定位置處引入保守性或非保守性胺基酸取代且使用天然或非天然存在之胺基酸來產生位點特異性FGF21突變體。

「保守性胺基酸取代」可涉及用非天然殘基(亦即野生型FGF21多肽序列之給定位置中未見之殘基)取代天然胺基酸殘基(亦即野生型FGF21多肽序列之給定位置中所見之殘基)以使得對彼位置之胺基酸殘基之極性或電荷存在少許影響或無影響。保守性胺基酸取代亦涵蓋通常藉由化學肽合成而非藉由生物系統中之合成併入的非天然存在之胺基酸殘基。此等胺基酸殘基包括肽模擬物，及胺基酸部分之其他反向或反相形式。

可基於常見側鏈特性將天然存在之殘基分成以下種類：

(1)疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr；

(3)酸性：Asp、Glu；

(4)鹼性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；

(5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；及

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

保守性取代可涉及將一個此等種類中之一成員換成同一種類之另一成員。非保守性取代可涉及將一個此等種類中之一成員換成另一種類中之一成員。

所要之胺基酸取代(保守性或非保守性)可在需要該等取代時由熟習此項技術者確定。胺基酸取代之例示性(但非限制性)清單闡述於表1中。

表 1

胺基酸取代

原始殘基	例示性取代
Ala	Val、Leu、Ile
Arg	Lys、Gln、Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser、Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro、Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe
Leu	Ile、Val、Met、Ala、Phe
Lys	Arg、Gln、Asn
Met	Leu、Phe、Ile
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr、Ala、Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr、Phe
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser
Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala

3. 經截短 FGF21 多肽

本發明之一實施例係針對成熟 FGF21 多肽之經截短形式。本發明之此實施例由鑑別能夠提供與成熟 FGF21 多肽之未截短形式類似且在一些情況下優於成熟 FGF21 多肽之未截短形式之活性的經截短 FGF21 多肽所進行之努力產生。

如本文所用之術語「經截短 FGF21 多肽」係指已自 FGF21 多肽之胺基末端(或 N 末端)移除胺基酸殘基、已自 FGF21 多肽之羧基末端(或 C 末端)移除胺基酸殘基或已自 FGF21 多肽之胺基末端與羧基末端移除胺基酸殘基之

FGF21多肽。本文所揭示之各種截短係如本文實例3及實例6所述製備。

可使用如實例4中所述之活體外ELK-螢光素酶檢定來檢定N末端截短之FGF21多肽及C末端截短之FGF21多肽之活性。可用以研究經截短FGF21多肽之活性之活體外檢定的特定細節可見於實例4中。

亦可在諸如如實例5及實例7所示之ob/ob小鼠之活體內檢定中分析本發明之經截短FGF21多肽之活性。一般而言，為分析經截短FGF21多肽之活體內活性，可將經截短FGF21多肽經腹膜內投與至測試動物。在所要之培育期(例如，一小時或一小時以上)之後，可抽取血樣且可量測血糖含量。可用以研究經截短FGF21多肽之活性之活體內檢定的特定細節可見於實例5及實例7中。

a. N末端截短

在本發明之一些實施例中，N末端截短包含來自成熟FGF21多肽之N末端的1、2、3、4、5、6、7或8個胺基酸殘基。如(例如)實例5及圖3中所示，具有少於9個胺基酸殘基之N末端截短之經截短FGF21多肽保持成熟FGF21多肽降低個體中血糖之能力。因此，在特定實施例中，本發明涵蓋具有1、2、3、4、5、6、7或8個胺基酸殘基之N末端截短之成熟FGF21多肽或FGF21多肽突變體之經截短形式。

b. C末端截短

在本發明之一些實施例中，C末端截短包含來自成熟FGF21多肽之C末端之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、

11或12個胺基酸殘基。如(例如)實例4及圖1B中所示，具有少於13個胺基酸殘基之C末端截短之經截短FGF21多肽展現在活體外ELK螢光素酶檢定中野生型FGF21功效之至少50%的功效，指示此等FGF21突變體保持成熟FGF21多肽降低個體中血糖之能力。因此，在特定實施例中，本發明涵蓋具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個胺基酸殘基之C末端截短的成熟FGF21多肽或FGF21多肽突變體之經截短形式。

c. N末端截短及C末端截短

在本發明之一些實施例中，經截短FGF21多肽可具有N末端截短與C末端截短之組合。具有N末端截短與C末端截短之組合的經截短FGF21多肽共有僅具有N末端截短或C末端截短之相應經截短FGF21多肽之活性。換言之，具有少於9個胺基酸殘基之N末端截短與少於13個胺基酸殘基之C末端截短之經截短FGF21多肽具有與具有少於9個胺基酸殘基之N末端截短的經截短FGF21多肽或具有少於13個胺基酸殘基之C末端截短的經截短FGF21多肽類似或更大之降血糖活性。因此，在特定實施例中，本發明涵蓋具有1、2、3、4、5、6、7或8個胺基酸殘基之N末端截短與1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個胺基酸殘基之C末端截短的成熟FGF21多肽或FGF21多肽突變體之經截短形式。

如同本發明之所有FGF21突變體一樣，經截短FGF21多肽可視情況包含胺基末端甲硫胺酸殘基，該胺基末端甲硫

胺酸殘基可藉由定向突變引入或由細菌表現過程而引入。

可如實例3及實例6中所述製備本發明之經截短FGF21多肽。熟悉標準分子生物學技術之一般熟習此項技術者可利用彼知識結合本揭示案來製造且使用本發明之經截短FGF21多肽。標準技術可用於重組DNA、寡核苷酸合成、組織培養及轉化(例如電穿孔、脂質體轉染(lipofection))。例如參見Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 同上, 其為任何目的以引用的方式併入本文中。可根據製造商之說明書、如在此項技術中通常所實現或如本文中所述, 執行酶促反應及純化技術。除非提供特定定義, 否則關於本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學所用之命名法及本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學之實驗程序與技術為此項技術中所熟知且常用之彼等命名法及程序與技術。標準技術可用於化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及傳遞, 以及患者之治療。

亦可將本發明之經截短FGF21多肽與另一實體融合, 該實體可賦予經截短FGF21多肽以其他特性。在本發明之一實施例中, 可將經截短FGF21多肽與Fc序列融合。可使用已知分子生物學方法及/或本文所提供之指導來實現該融合。本文更詳細討論該等融合多肽之益處以及製造該等融合多肽之方法。

4. 抗蛋白水解性FGF21突變體

如實例8中所述, 發現成熟FGF21經歷活體內降解, 最

終確定該降解係由蛋白水解攻擊引起。發現成熟FGF21之活體內降解導致較短有效半衰期，該較短有效半衰期可能不利地影響分子之治療潛能。因此，進行定向研究以鑑別展現抗蛋白水解性之FGF21突變體。由於此研究結果，確定對蛋白水解尤其敏感之成熟FGF21多肽中之位點包括位置4-5、20-21、151-152及171-172之胺基酸殘基之間的肽鍵。

進行廣泛但集中且定向之研究以鑑別消除所觀測到之蛋白水解效應而不會在不可接受的程度上影響蛋白質之活性的特定取代。表8及表11強調製備且測試之一些突變體。如(例如)實例13及實例14中所述，並非所有FGF21突變體皆展現理想概況；一些突變體賦予抗蛋白水解性，但卻以損害FGF21活性為代價。其他突變保持FGF21活性，但不賦予抗蛋白水解性。包括(例如)FGF21 P171G之若干種突變體保持與野生型FGF21類似之活性水準，同時亦展現對蛋白水解降解作用之抵抗性。

鑑別所需抗蛋白水解性FGF21突變體之一選擇準則為FGF21突變體之活性基本上與野生型FGF21之活性相同或大於野生型FGF21之活性。因此，本發明之另一實施例係針對具有抗蛋白水解性且仍保持基本上與野生型FGF21相同或更大之活性的FGF21突變體。儘管在某些狀況下較少需要，但具有抗蛋白水解性但展現略微降低活性之FGF21突變體構成本發明之另一實施例。在某些狀況下，可能需要維持一定程度之蛋白水解，且因此允許存在一定程度之

蛋白水解之FGF21突變體亦構成本發明之另一實施例。

如同本發明之所有FGF21突變體一樣，本發明之抗蛋白水解性FGF21突變體可如本文所述來製備。一般熟習此項技術者(例如熟悉標準分子生物學技術之一般熟習此項技術者)可利用彼知識結合本揭示案來製造且使用本發明之抗蛋白水解性FGF21突變體。標準技術可用於重組DNA、寡核苷酸合成及組織培養及轉化(例如電穿孔、脂質體轉染)。例如參見Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，同上，其為任何目的以引用的方式併入本文中。可根據製造商之說明書、如在此項技術中通常所實現或如本文所述，執行酶促反應及純化技術。除非提供特定定義，否則關於本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學所用之命名法及本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學之實驗程序與技術為此項技術中所熟知且常用之彼等命名法及程序與技術。標準技術可用於化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及傳遞，以及患者之治療。

可將本發明之抗蛋白水解性FGF21突變體與另一實體融合，該實體可賦予抗蛋白水解性FGF21突變體以其他特性。在本發明之一實施例中，可將抗蛋白水解性FGF21突變體與IgG Fc序列(例如SEQ ID NO:13)融合。可使用已知分子生物學方法及/或本文所提供之指導實現該融合。該等融合多肽之益處以及製造該等融合多肽之方法為已知的且在本文中更詳細討論。

5. 聚集減少性 FGF21 突變體

如實例 15 中所述，野生型 FGF21 多肽之一種特性為其聚集傾向。在大於約 5 mg/mL 之濃度下，在室溫下聚集率較高。如本文所示及所述，野生型 FGF21 多肽之聚集率具有濃度依賴性與溫度依賴性。

可證實諸如在治療性調配物之情形下當在此等濃度下操作野生型 FGF21 時，聚集為一問題。因此，進行定向研究以鑑別展現減低之 FGF21 聚集之 FGF21 突變體。接著在多種濃度下測試所得 FGF21 突變體之聚集傾向。

進行廣泛但集中且定向之研究以鑑別消除或減低所觀測到之野生型 FGF21 之聚集效應而不會在不可接受的程度上影響蛋白質之活性的特定取代。鑑別合適的聚集減少性突變體之方法描述於實例 15 中。表 16 強調製備且測試之一些突變體。如(例如)實例 17 中所述，並非所有 FGF21 突變體皆展現理想概況。諸如 FGF21 L58E 之一些突變體具有受損之 FGF21 活性且不進一步研究。諸如 FGF21 A134E 之其他突變保持 FGF21 活性，但並未賦予減低之聚集特性。諸如 FGF21 L98R 之若干突變體保持 FGF21 活性且亦展現減低之聚集。一種突變體 FGF21 A45K 令人驚奇地展現增加之 FGF21 活性，同時亦展現減低之聚集特性。

鑑別所需聚集減少性 FGF21 突變體之一選擇準則為 FGF21 突變體之活性基本上與野生型 FGF21 之活性類似或大於野生型 FGF21 之活性。因此，本發明之另一實施例係針對具有減低之聚集特性同時仍保持與野生型 FGF21 類似

或更大之FGF21活性的FGF21突變體。儘管在某些狀況下較少需要，但具有減低之聚集特性但展現略微降低之FGF21活性的FGF21突變體構成本發明之另一實施例。在某些狀況下，可能需要維持一定程度之聚集，且因此允許存在一定程度之聚集的FGF21突變體亦構成本發明之另一實施例。

如同本發明之所有FGF21突變體一樣，本發明之聚集減少性FGF21突變體可如本文所述來製備。熟悉標準分子生物學技術之一般熟習此項技術者可利用彼知識結合本揭示案來製造且使用本發明之聚集減少性FGF21突變體。標準技術可用於重組DNA、寡核苷酸合成、組織培養及轉化(例如電穿孔、脂質體轉染)。例如參見Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，同上，其為任何目的以引用的方式併入本文中。可根據製造商之說明書、如在此項技術中通常所實現或如本文中所述，執行酶促反應及純化技術。除非提供特定定義，否則關於本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學所用之命名法及本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學之實驗程序與技術為此項技術中所熟知且常用之彼等命名法及程序與技術。標準技術可用於化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及傳遞，以及患者之治療。

可將本發明之聚集減少性FGF21突變體與另一實體融合，該實體可賦予聚集減少性FGF21突變體以其他特性。在本發明之一實施例中，可將聚集減少性FGF21突變體與

IgG Fc序列(例如SEQ ID NO:13)融合。可使用已知分子生物學方法及/或本文所提供之指導來實現該融合。本文更詳細討論該等融合多肽之益處以及製造該等融合多肽之方法。

6. FGF21組合突變體

如本文所述，野生型FGF21序列具有當將FGF21用作治療性分子時可形成重要問題之若干種特性。此等問題包括蛋白質對降解之敏感性及其在高濃度下之聚集傾向。在進行徹底努力來鑑別克服此等問題中之每一者的FGF21多肽之後，進行定向研究以確定賦予抗蛋白水解性之胺基酸取代及賦予聚集減少性之胺基酸取代是否可以加和或協同方式組合於單一多肽序列中，同時維持等於或大於野生型FGF21之活性的活性水準。此舉表示一重要問題，因為此項技術中已知在給定多肽中引入多次突變有時可不利地影響蛋白質之表現、活性及後續製造。

令人驚奇地，如(例如)實例19及實例20中所示，發現若干種FGF21突變體之所需特性實際上可以加和或協同方式組合以產生具有增強之醫藥特性的FGF21突變體。本文揭示具有抗蛋白水解性、具有減低之聚集率且仍保持與野生型FGF21相同或更大之活性的FGF21突變體。

鑑別所需FGF21組合突變體之一選擇準則為FGF21突變體之活性與野生型FGF21之活性類似於或大於野生型FGF21之活性。因此，本發明之另一實施例係針對具有抗蛋白水解性且具有減低之聚集特性同時仍保持與野生型

FGF21類似或更大之FGF21活性的FGF21突變體。儘管在某些狀況下較少需要，但具有抗蛋白水解性且具有減低之聚集特性但展現略微降低之FGF21活性的FGF21突變體構成本發明之另一實施例。在某些狀況下，可能需要維持一定程度之蛋白水解及/或聚集，且因此允許一定程度之蛋白水解及/或聚集之FGF21突變體亦構成本發明之另一實施例。

如同本發明之所有FGF21突變體一樣，本發明之FGF21組合突變體可如本文所述來製備。熟悉標準分子生物學技術之一般熟習此項技術者可利用彼知識結合本揭示案來製造且使用本發明之FGF21組合突變體。標準技術可用於重組DNA、寡核苷酸合成、組織培養及轉化(例如電穿孔、脂質體轉染)。例如參見Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，同上，其為任何目的以引用的方式併入本文中。可根據製造商之說明書、如在此項技術中通常所實現或如本文中所述，執行酶促反應及純化技術。除非提供特定定義，否則關於本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學所用之命名法及本文所述之分析化學、合成有機化學及醫藥化學之實驗程序與技術為此項技術中所熟知且常用之彼等命名法及程序與技術。標準技術可用於化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及傳遞，以及患者之治療。

亦可將本發明之FGF21組合突變體與另一實體融合，該實體可賦予FGF21組合突變體以其他特性。在本發明之一

實施例中，可將FGF21組合突變體與IgG Fc序列(例如SEQ ID NO:13)融合。可使用已知分子生物學方法及/或本文所提供之指導來實現該融合。本文更詳細討論該等融合多肽之益處以及製造該等融合多肽之方法。

7. FGF21融合蛋白

如本文所用之術語「FGF21融合多肽」或「FGF21融合蛋白」係指一或多個胺基酸殘基(諸如異源蛋白質或肽)在本文所述之任何FGF21多肽突變體之N末端或C末端之融合。

異源肽及多肽包括(但不限於)允許偵測及/或分離FGF21多肽突變體之抗原決定基；跨膜受體蛋白或其部分，諸如細胞外結構域或跨膜及細胞內結構域；與跨膜受體蛋白結合之配位體或其部分；具催化活性之酶或其部分；促進寡聚反應之多肽或肽，諸如白胺酸拉鏈結構域；增加穩定性之多肽或肽，諸如免疫球蛋白恆定區；功能性或非功能性抗體，或其重鏈或輕鏈；及具有不同於本發明之FGF21多肽突變體之活性(諸如治療活性)的多肽。本發明亦涵蓋與人類血清白蛋白(HSA)融合之FGF21突變體。

可藉由在FGF21多肽突變體之N端或C端融合異源序列來製備FGF21融合蛋白。如本文所述，異源序列可為胺基酸序列或含非胺基酸之聚合物。可將異源序列與FGF21多肽突變體直接融合或經由連接子或銜接分子融合。連接子或銜接分子可為一或多個胺基酸殘基(或聚物)，例如1、2、3、4、5、6、7、8或9個殘基(或聚物)；較佳為10至50個胺

基酸殘基(或聚物)，例如10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50個殘基(或聚物)；更佳為15至35個胺基酸殘基(或聚物)。連接子或銜接分子亦可經設計具有DNA限制性核酸內切酶或蛋白酶之裂解位點以分離融合部分。

a. Fc融合

在本發明之一個實施例中，將FGF21多肽突變體與人類IgG之Fc區之一或多個結構域融合。抗體包含兩個功能上獨立之部分：稱為「Fab」之可變結構域，其與抗原結合；及稱為「Fc」之恆定結構域，其涉及諸如補體活化及吞噬細胞攻擊之效應功能。Fc具有長血清半衰期，而Fab壽命短(Capon等人，1989, *Nature* 337: 525-31)。當與治療性蛋白質連接在一起時，Fc結構域可提供較長半衰期或併入諸如Fc受體結合、蛋白質A結合、補體固定及可能甚至胎盤轉移之功能(Capon等人，1989)。

活體內藥物動力分析表明人類FGF21在小鼠中具有約1小時之短半衰期，歸因於快速清除及活體內降解。因此，為延長FGF21之半衰期，將Fc序列與FGF21多肽之N端或C端融合。Fc區與野生型FGF21之融合，尤其Fc與野生型FGF21之N端的融合，並未如預期延長半衰期，然而產生FGF21在活體內蛋白水解降解之研究結果，且鑑別出FGF21突變體對該降解有抵抗性。該等突變體描述於例如實例8及實例11中，且其展現比野生型FGF21長之半衰期。此等及其他FGF21融合蛋白構成本發明之實施例。

在整個揭示案中，Fc-FGF21係指將Fc序列與FGF21之N末端融合之融合蛋白。類似地，在整個揭示案中，FGF21-Fc係指將Fc序列與FGF21之C末端融合之融合蛋白。

可(例如)藉由使用蛋白質A親和管柱來純化所得FGF21融合蛋白。已發現與Fc區融合之肽及蛋白質展現與未融合對應物相比實質上較大之活體內半衰期。與Fc區之融合亦允許融合多肽之二聚/多聚。Fc區可為天然存在之Fc區，或可經改變以改良某些品質，諸如治療品質、循環時間或減低之聚集。

在國際公開案第WO 00/024782號中詳細討論藉由與抗體之「Fc」結構域融合對蛋白質治療劑之有用修飾，該公開案係以全文引用的方式併入本文中。此文獻討論與諸如聚乙二醇(PEG)、葡聚糖或Fc區之「媒劑」之鍵聯。

b.融合蛋白連接子

當形成本發明之融合蛋白時，可能(但無需)利用連接子。當連接子存在時，其化學結構可能並不關鍵，此係因為其主要充當間隔基。連接子可由藉由肽鍵連接於一起之胺基酸組成。在本發明之一些實施例中，連接子係由1至20個藉由肽鍵連接之胺基酸組成，其中該等胺基酸係選自20種天然存在之胺基酸。在多個實施例中，1至20個胺基酸係選自胺基酸甘胺酸，絲胺酸、丙胺酸、脯胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸及離胺酸。在一些實施例中，連接子係由大部分非位阻胺基酸(諸如甘胺酸及丙胺酸)組成。在一些實施例中，連接子為聚甘胺酸(諸如(Gly)₄(SEQ ID NO:29))

及(Gly)₅(SEQ ID NO:30))、聚丙胺酸、甘胺酸與丙胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ala))或甘胺酸與絲胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ser))。其他合適的连接子包括：(Gly)₅-Ser-(Gly)₃-Ser-(Gly)₄-Ser(SEQ ID NO:23)、(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser(SEQ ID NO:31)、(Gly)₃-Lys-(Gly)₄(SEQ ID NO:32)、(Gly)₃-Asn-Gly-Ser-(Gly)₂(SEQ ID NO:33)、(Gly)₃-Cys-(Gly)₄(SEQ ID NO:34)及Gly-Pro-Asn-Gly-Gly(SEQ ID NO:35)。儘管已發現對於FGF21融合蛋白而言具有15個胺基酸殘基之连接子運作尤其良好，但本發明涵蓋任何長度或組成之连接子。

本文所述之连接子為例示性的，且本發明涵蓋更長且包括其他殘基之连接子。本發明亦涵蓋非肽连接子。舉例而言，可使用諸如-NH-(CH₂)_s-C(O)-之烷基连接子，其中s=2至20。此等烷基连接子可進一步經任何非位阻基團取代，該基團包括(但不限於)低碳烷基(例如C1-C6)、低碳醯基、鹵素(例如Cl、Br)、CN、NH₂或苯基。例示性非肽连接子為聚乙二醇连接子，其中該连接子具有100 kD至5000 kD(例如100 kD至500 kD)之分子量。

8.經化學修飾之FGF21突變體

考慮到本文所述之揭示內容，熟習此項技術者可製備本文所述之FGF21多肽突變體之化學修飾形式(包括本文所述FGF21之經截短形式)。改變該等經化學修飾之FGF21突變體以使得經化學修飾之FGF21突變體在與FGF21突變體天然連接之分子之類型或位置上不同於未經修飾之FGF21突

變體。經化學修飾之FGF21突變體可包括由一或多個天然連接之化學基團之缺失而形成的分子。

在一實施例中，可藉由一或多種聚合物之共價連接來修飾本發明之FGF21多肽突變體。舉例而言，所選聚合物通常可溶於水以使得其所連接之蛋白質在諸如生理環境之水性環境中不沈澱。聚合物之混合物包括於合適聚合物之範疇內。較佳地，對於最終產品製劑之治療性用途而言，聚合物應為醫藥學上可接受。與本發明之FGF21多肽突變體結合之不溶於水之聚合物亦構成本發明之一態樣。

例示性聚合物各自可具有任何分子量且可為分枝或未分枝。聚合物通常各自具有約2 kDa至約100 kDa之間的平均分子量(術語「約」指示在水溶性聚合物之製劑中，一些分子將更重一些且一些分子將小於所述分子量)。各聚合物之平均分子量較佳在約5 kDa與約50 kDa之間，更佳在約12 kDa與約40 kDa之間且最佳在約20 kDa與約35 kDa之間。

合適的水溶性聚合物或其混合物包括(但不限於)N-連接或O-連接之碳水化合物、糖、磷酸鹽、聚乙二醇(PEG)(包括已用以衍生蛋白質之PEG形式，包括單(C₁-C₁₀)烷氧基-聚乙二醇或單(C₁-C₁₀)芳氧基-聚乙二醇)、單甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖(諸如(例如)約6 kD之低分子量葡聚糖)、纖維素或基於其他碳水化合物之聚合物、聚(N-乙烯基吡咯啶酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如丙三醇)及聚乙醇醇。本發明

亦涵蓋可用以製備共價連接之FGF21多肽突變體多聚體的雙官能交聯分子。本發明亦涵蓋與聚唾液酸共價連接之FGF21突變體。

在本發明之一些實施例中，FGF21突變體經共價或化學修飾以包括一或多種水溶性聚合物，該或該等水溶性聚合物包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、聚氧乙二醇或聚丙二醇。例如參見美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號及第4,179,337號。在本發明之一些實施例中，FGF21突變體包含一或多種聚合物，該或該等聚合物包括(但不限於)單甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、纖維素、基於另一碳水化合物之聚合物、聚(N-乙烯基吡咯啉酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如丙三醇)、聚乙烯醇或該等聚合物之混合物。

在本發明之一些實施例中，FGF21突變體係經PEG次單元共價修飾。在一些實施例中，一或多種水溶性聚合物在FGF21突變體之一或多個特定位置處(例如，N末端處)鍵結。在一些實施例中，將一或多種水溶性聚合物與FGF21突變體之一或多個側鏈隨機連接。在一些實施例中，使用PEG以改良FGF21突變體之治療能力。在(例如)美國專利第6,133,426號中討論某些該等方法，該專利為任何目的以引用的方式併入本文中。

在聚合物為PEG之本發明之實施例中，PEG基團可具有任何適宜分子量且可為線性或分枝。PEG基團之平均分子

量將較佳在約2 kD至約100 kDa之範圍內，且更佳為約5 kDa至約50 kDa，例如10 kDa、20 kDa、30 kDa、40 kDa或50 kDa。該等PEG基團一般將經由PEG部分上之反應性基團(例如醛基、胺基、硫醇基或酯基)與FGF21突變體上之反應性基團(例如醛基、胺基或酯基)的醯化或還原性烷基化與FGF21突變體連接。

可使用此項技術中已知之任何聚乙二醇化反應特定進行包括本發明之FGF21突變體之多肽的聚乙二醇化。該等反應描述於(例如)以下參考文獻中：Francis等人，1992, *Focus on Growth Factors* 3: 4-10；歐洲專利第0 154 316號及第0 401 384號；及美國專利第4,179,337號。舉例而言，可用如本文所述之反應性聚乙二醇分子(或類似反應性水溶性聚合物)經由醯化反應或烷基化反應來進行聚乙二醇化。對於醯化反應而言，所選聚合物應具有單一反應性酯基。對於還原性烷基化而言，所選聚合物應具有單一反應性醛基。反應性醛為(例如)具有水穩定性之聚乙二醇丙醛，或其單C₁-C₁₀烷氧基或芳氧基衍生物(例如參見美國專利第5,252,714號)。

在本發明之一些實施例中，適用於連接PEG基團與多肽之策略涉及經由在溶液中形成結合物鍵聯而組合肽與PEG部分，其各自帶有彼此相互反應之特殊官能基。肽可易於由習知固相合成製備。在特定位點處將肽用適當官能基「預先活化」。在與PEG部分反應之前純化且充分表徵前驅體。肽與PEG之連接通常發生在水相中且可易於由逆相

分析型HPLC監測。聚乙二醇化肽可易於由製備型HPLC純化且由分析型HPLC、胺基酸分析及雷射脫附質譜分析表徵。

多醣聚合物為可用於蛋白質修飾之另一類型之水溶性聚合物。因此，與多醣聚合物融合之本發明之FGF21突變體構成本發明之實施例。葡聚糖為由主要藉由 α 1-6鍵連接之葡萄糖之個別次單元組成的多醣聚合物。葡聚糖本身可以許多分子量範圍得到，且可易於以約1 kD至約70 kD之分子量得到。葡聚糖為獨立或與另一媒劑(例如Fc)組合用作媒劑之合適水溶性聚合物。例如參見國際公開案第WO 96/11953號。已報導與治療性或診斷性免疫球蛋白結合之葡聚糖的用途。例如參見歐洲專利公開案第0 315 456號，其以引用的方式併入本文中。本發明亦涵蓋使用約1 kD至約20 kD之葡聚糖。

一般而言，可在用以使蛋白質與活化聚合物分子反應之任何合適條件下進行化學修飾。製備經化學修飾多肽之方法一般將包含以下步驟：(a)使多肽與活化聚合物分子(諸如聚合物分子之反應性酯或醛衍生物)在一定條件下反應，藉此使FGF21多肽突變體與一或多個聚合物分子連接，及(b)獲得反應產物。將基於已知參數及所要結果確定最佳反應條件。舉例而言，聚合物分子與蛋白質之比率愈大，則所連接聚合物分子之百分比愈大。在本發明之一實施例中，經化學修飾之FGF21突變體可在胺基末端處具有單一聚合物分子部分(例如參見美國專利第5,234,784號)。

在本發明之另一實施例中，可使FGF21多肽突變體與生物素化學偶合。接著使生物素/FGF21多肽突變體與抗生物素蛋白結合，從而產生四價抗生物素蛋白/生物素/FGF21多肽突變體。亦可使FGF21多肽突變體與二硝基酚(DNP)或三硝基酚(TNP)及由抗DNP或抗TNP-IgM沈澱之所得結合物共價偶合以形成具有價態10之十聚結合物。

一般而言，可藉由投與本發明之經化學修飾之FGF21突變體而緩和或調節之條件包括本文關於FGF21多肽突變體所述之彼等條件。然而，與未經修飾之FGF21突變體相比，本文所揭示之經化學修飾之FGF21突變體可具有其他活性(增強或減低之生物活性)或其他特徵(諸如增加或降低之半衰期)。

9. FGF21突變體之治療組合物及其投與

包含FGF21突變體之治療組合物在本發明之範疇內，且其係根據展現增強特性之若干突變體FGF21序列之鑑別而特定涵蓋。該等FGF21突變體醫藥組合物可包含治療有效量之FGF21多肽突變體與醫藥學或生理學上可接受之關於投與模式適用性所選擇之調配劑的混合物。

可接受之調配物質較佳在所用劑量及濃度下對接受者無毒。

醫藥組合物可含有用於改變、維持或保存(例如)該組合物之pH值、容積滲透濃度(osmolarity)、黏度、澄清度、顏色、等張性(isotonicity)、氣味、無菌性、穩定性、溶解或釋放速率、吸附或穿透性的調配物質。合適的調配物質

包括(但不限於)：胺基酸(諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸或離胺酸)；抗菌劑；抗氧化劑(諸如抗壞血酸、亞硫酸鈉或亞硫酸氫鈉)；緩衝劑(諸如硼酸鹽、碳酸氫鹽、Tris-HCl、檸檬酸鹽、磷酸鹽或其他有機酸)；膨化劑(諸如甘露糖醇或甘胺酸)；螯合劑(諸如乙二胺四乙酸(EDTA))；錯合劑(諸如咖啡鹼、聚乙烷基吡咯啉酮、 β -環糊精或羥基丙基- β -環糊精)；填充劑；單糖；雙糖；及其他碳水化合物(諸如葡萄糖、甘露糖或糊精)；蛋白質(諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白)；著色劑、調味劑及稀釋劑；乳化劑；親水性聚合物(諸如聚乙烷基吡咯啉酮)；低分子量多肽；成鹽平衡離子(諸如鈉)；防腐劑(諸如氯化苯甲堿銨(benzalkonium chloride)、苯甲酸、水楊酸、硫柳汞(thimerosal)、苯乙醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、氯己定(chlorhexidine)、山梨酸或過氧化氫)；溶劑(諸如甘油、丙二醇或聚乙二醇)；糖醇(諸如甘露糖醇或山梨糖醇)；懸浮劑；界面活性劑或濕潤劑(諸如泊洛尼克(pluronic)、PEG、脫水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯(諸如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)、曲拉通(triton)、緩血酸胺(tromethamine)、卵磷脂、膽固醇或泰洛沙泊(tyloxapal)；穩定性增強劑(諸如蔗糖或山梨糖醇)；張力增強劑(諸如鹼金屬鹵化物(較佳為氯化鈉或氯化鉀)或甘露糖醇、山梨糖醇)；傳遞媒劑；稀釋劑；賦形劑及/或醫藥佐劑(例如參見 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(第18版，A.R. Gennaro編，Mack Publishing Company 1990)及其後續版

本，其為任何目的以引用的方式併入本文中)。

最佳醫藥組合物將由熟習此項技術者視(例如)預期投藥途徑、傳遞形式及所要劑量而確定(例如參見 *Remington's Pharmaceutical Sciences*，同上)。該等組合物可能影響 FGF21 多肽突變體之物理狀態、穩定性、活體內釋放速率及活體內清除速率。

醫藥組合物中之主要媒劑或載劑實際上可為水性或非水性。舉例而言，用於注射之合適媒劑或載劑可為水、生理食鹽水溶液或人工腦脊髓液，可能補充有供非經腸投與之組合物中所常用之其他物質。中性緩衝生理食鹽水或與血清白蛋白混合之生理食鹽水為另外的例示性媒劑。其他例示性醫藥組合物包含 pH 值為約 7.0-8.5 之 Tris 緩衝劑或 pH 值為約 4.0-5.5 之乙酸鹽緩衝劑，其可進一步包括山梨糖醇或合適替代物。在本發明之一實施例中，FGF21 多肽突變體組合物可藉由使具有所要純度之所選組合物與可選調配劑 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*，同上) 混合而以凍乾餅或水溶液形式製備儲存。此外，可使用適當賦形劑 (諸如蔗糖) 來調配呈凍乾物形式之 FGF21 多肽突變體產物。

FGF21 多肽突變體醫藥組合物可經選擇用以非經腸傳遞。或者，組合物可經選擇用以吸入或經由消化道 (諸如經口) 傳遞。該等醫藥學上可接受之組合物的製備在此項技術之技能範圍內。

調配組份係以投藥部位可接受之濃度存在。舉例而言，

緩衝劑係用以將組合物維持於生理 pH 值或略低之 pH 值下，通常在約 5 至約 8 之 pH 值範圍內。

當預期非經腸投藥時，用於本發明中之治療組合物可呈於醫藥學上可接受之媒劑中包含所要 FGF21 多肽突變體之無熱原質、非經腸可接受之水溶液形式。尤其適於非經腸注射之媒劑為無菌蒸餾水，在其中 FGF21 多肽突變體經調配為適當保存之無菌、等張溶液。另一種製備可涉及用諸如可注射微球體、生物可侵蝕性粒子、聚合化合物(諸如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠粒或脂質體之試劑調配所要分子，其提供接著可經由積存注射傳遞之產物的受控或持續釋放。亦可使用玻糖醛酸，且此物可具有促進循環中持續時間之作用。用於引入所要分子之其他合適方法包括可植入藥物傳遞裝置。

在一實施例中，醫藥組合物可經調配用於吸入。舉例而言，可將 FGF21 多肽突變體調配成用於吸入之乾粉。FGF21 多肽突變體吸入溶液亦可與推進劑一起調配用於氣霧劑傳遞。在又一實施例中，溶液可經霧化。肺部投藥進一步描述於國際公開案第 WO 94/20069 號中，其描述經化學修飾之蛋白質的肺部傳遞。

亦預期某些調配物可經口投與。在本發明之一實施例中，以此方式投與之 FGF21 多肽突變體可在存在或不存在諸如錠劑及膠囊之固體劑型之混配中通常所用載劑的情況下調配。舉例而言，膠囊可經設計以於胃腸道中生物可用性最大且全身循環前降解最小之時釋放調配物之活性部

分。可包括促進FGF21多肽突變體吸收之其他試劑。亦可利用稀釋劑、調味劑、低熔點蠟、植物油、潤滑劑、懸浮劑、錠劑崩解劑及黏合劑。

另一醫藥組合物可涉及有效量之FGF21多肽突變體與適於製造錠劑之無毒賦形劑的混合物。藉由將錠劑溶解於無菌水或另一適當媒劑中，可以單位劑量形式製備溶液。合適的賦形劑包括(但不限於)：惰性稀釋劑，諸如碳酸鈣、碳酸鈉或碳酸氫鈉、乳糖或磷酸鈣；或黏合劑，諸如澱粉、明膠或阿拉伯膠；或潤滑劑，諸如硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石。

其他FGF21多肽突變體醫藥組合物對熟習此項技術者而言顯而易見，包括持續或受控傳遞調配物中涉及FGF21多肽突變體之調配物。用於調配多種其它持續或受控傳遞手段(諸如脂質體載劑、生物可侵蝕性微粒或多孔珠粒及積存注射劑)之技術亦為熟習此項技術者所已知(例如參見國際公開案第WO 93/15722號，其描述用於傳遞醫藥組合物之多孔聚合物微粒之受控釋放；及 Wischke 及 Schwendeman, 2008, *Int. J. Pharm.* 364: 298-327與Freiberg及Zhu, 2004, *Int. J. Pharm.* 282: 1-18，其討論微球體/微粒製備及使用)。

持續釋放製劑之其他實例包括呈成形物件形式(例如薄膜或微膠囊)之半透性聚合物基質。持續釋放基質可包括聚酯、水凝膠、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號及歐洲專利第0 058 481號)、L-麩胺酸與L-麩胺酸- γ -乙酯之共

聚物(Sidman等人, 1983, *Biopolymers* 22: 547-56)、聚(2-羥基乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等人, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277及Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105)、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人, 同上)或聚-D(-)-3-羥基丁酸(歐洲專利第0 133 988號)。持續釋放組合物亦可包括可藉由此項技術中已知之若干種方法中之任一者製備的脂質體。例如參見Epstein等人, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3688-92; 及歐洲專利第0 036 676號、第0 088 046號及第0 143 949號。

待用於活體內投與之FGF21多肽突變體醫藥組合物通常應為無菌的。此可藉由經由無菌過濾膜過濾而實現。當組合物經凍乾時, 可於凍乾及復水之前或之後使用此方法進行滅菌。用於非經腸投藥之組合物可以凍乾形式或以溶液形式儲存。此外, 一般將非經腸組合物置於具有無菌取用口之容器中, 例如具有可由皮下注射針穿透之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶中。

醫藥組合物一經調配, 即可以溶液、懸浮液、凝膠、乳液、固體形式或脫水或凍乾粉末形式儲存於無菌小瓶中。該等調配物可以即用形式或以於投與前需復水之形式(例如凍乾形式)儲存。

在一特定實施例中, 本發明係針對產生單次劑量投藥單位之套組。該套組可各自含有具有乾燥蛋白質之第一容器與具有水性調配物之第二容器。本發明之範疇內亦包括含有單腔室及多腔室預填充注射器(例如, 液體注射器及藥

粉注射器(lyosyringe))之套組。

治療上待使用之FGF21多肽突變體醫藥組合物的有效量將視(例如)治療情形及目標而定。熟習此項技術者將瞭解，用於治療之適當劑量水準因此將在某種程度上視所傳遞之分子、使用FGF21多肽突變體所針對之適應症、投藥途徑及患者之體型(體重、體表或器官大小)及狀況(年齡及一般健康狀況)而改變。因此，臨床醫師可滴定劑量且改變投藥途徑以獲得最佳治療效果。典型劑量可在約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至至多約100 mg/kg 或100 mg/kg 以上之範圍內，視以上所提及之因素而定。在其它實施例中，劑量可在0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至至多約100 mg/kg 之範圍內；或1 $\mu\text{g/kg}$ 至至多約100 mg/kg ；或5 $\mu\text{g/kg}$ 、10 $\mu\text{g/kg}$ 、15 $\mu\text{g/kg}$ 、20 $\mu\text{g/kg}$ 、25 $\mu\text{g/kg}$ 、30 $\mu\text{g/kg}$ 、35 $\mu\text{g/kg}$ 、40 $\mu\text{g/kg}$ 、45 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ 、55 $\mu\text{g/kg}$ 、60 $\mu\text{g/kg}$ 、65 $\mu\text{g/kg}$ 、70 $\mu\text{g/kg}$ 、75 $\mu\text{g/kg}$ 、至多約100 mg/kg 。在其他實施例中，劑量可為50 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 、150 $\mu\text{g/kg}$ 、200 $\mu\text{g/kg}$ 、250 $\mu\text{g/kg}$ 、300 $\mu\text{g/kg}$ 、350 $\mu\text{g/kg}$ 、400 $\mu\text{g/kg}$ 、450 $\mu\text{g/kg}$ 、500 $\mu\text{g/kg}$ 、550 $\mu\text{g/kg}$ 、600 $\mu\text{g/kg}$ 、650 $\mu\text{g/kg}$ 、700 $\mu\text{g/kg}$ 、750 $\mu\text{g/kg}$ 、800 $\mu\text{g/kg}$ 、850 $\mu\text{g/kg}$ 、900 $\mu\text{g/kg}$ 、950 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 、200 $\mu\text{g/kg}$ 、300 $\mu\text{g/kg}$ 、400 $\mu\text{g/kg}$ 、500 $\mu\text{g/kg}$ 、600 $\mu\text{g/kg}$ 、700 $\mu\text{g/kg}$ 、800 $\mu\text{g/kg}$ 、900 $\mu\text{g/kg}$ 、1000 $\mu\text{g/kg}$ 、2000 $\mu\text{g/kg}$ 、3000 $\mu\text{g/kg}$ 、4000 $\mu\text{g/kg}$ 、5000 $\mu\text{g/kg}$ 、6000 $\mu\text{g/kg}$ 、7000 $\mu\text{g/kg}$ 、8000 $\mu\text{g/kg}$ 、9000 $\mu\text{g/kg}$ 或10 mg/kg 。

給藥頻率將視待使用之調配物中FGF21多肽突變體之藥物動力學參數而定。通常，臨床醫師將投與組合物直至達到達成所要效果之劑量。因此，可以單次劑量、隨時間以兩次或兩次以上劑量(其可含有或可不含相同量之所要分子)或經由植入裝置或導管連續輸注來投與組合物。適當劑量之進一步改進由一般熟習此項技術者按常規進行且在其常規進行之工作範圍內。可經由使用適當劑量-反應資料來確定適當劑量。

醫藥組合物之投藥途徑與已知方法一致，例如經口；經由藉由靜脈內、腹膜內、腦內(腦實質內(intraparenchymal))、腦室內(intracerebroventricular)、肌肉內、眼內、動脈內、門靜脈內或病灶內途徑注射；藉由持續釋放系統(其亦可注入)或藉由植入裝置。需要時，可藉由快速注射(bolus injection)或藉由連續輸注或藉由植入裝置投與該等組合物。

或者或另外，可經由植入已吸收或囊封所要分子之膜、海綿體或另一適當物質來局部投與組合物。使用植入裝置時，可將該裝置植入任何合適的組織或器官中，且可經由擴散、定時釋放大丸劑(timed-release bolus)或連續投藥來進行所要分子之傳遞。

10. FGF21多肽突變體之治療用途

FGF21多肽突變體可用於治療、診斷、改善或預防多種疾病、病症或病狀，包括(但不限於)代謝病症。在一實施例中，待治療之代謝病症為糖尿病，例如2型糖尿病。在

另一實施例中，代謝病症為肥胖症。其他實施例包括代謝病狀或病症，諸如血脂異常；高血壓；脂肪肝(hepatosteaotosis)，諸如非酒精性脂肪肝(NASH)；心血管疾病，諸如動脈粥樣硬化；及衰老。

在應用中，可藉由向有需要之患者投與治療有效劑量之如本文所述之FGF21多肽突變體來治療諸如糖尿病或肥胖症之病症或病狀。可如本文所述進行投藥，諸如藉由靜脈內注射、腹膜內注射、肌肉內注射或以錠劑或液體形成物形式經口投與。在大多數情況下，所要劑量可由臨床醫師如本文所述來確定且可表示FGF21突變體多肽之治療有效劑量。熟習此項技術者將易於認識到，FGF21突變體多肽之治療有效劑量將尤其視投藥進度、所投與抗原之單位劑量、是否將核酸分子或多肽與其他治療劑組合投與、接受者之免疫狀態及健康狀態而定。如本文所用之術語「治療有效劑量」意謂在組織系統、動物或人類中引起研究人員、醫生或其他臨床醫師所尋求之生物或醫學反應之FGF21突變體多肽的量，該生物或醫學反應包括待治療疾病或病症之症狀的減輕。

11. 抗體

與本發明之FGF21突變體多肽特異性結合但不與野生型FGF21多肽特異性結合之抗體及抗體片段係經涵蓋且在本發明之範疇內。抗體可為多株抗體，包括單特異性多株抗體；單株抗體(MAb)；重組抗體；嵌合抗體；人類化抗體，諸如互補決定區(CDR)接枝抗體；人類抗體；單鏈抗

體；及/或雙特異性抗體；以及其片段；其變異體；或其經化學修飾之分子。抗體片段包括與FGF21突變體多肽上之抗原決定基特異性結合的抗體之彼等部分。該等片段之實例包括由全長抗體之酶促裂解所產生之Fab及F(ab')片段。其他結合片段包括由重組DNA技術所產生之彼等片段，該等技術諸如含有編碼抗體可變區之核酸序列的重組質體之表現。

針對FGF21突變體多肽之多株抗體一般係藉助於FGF21突變體多肽及佐劑之多次皮下或腹膜內注射而在動物(例如，兔子或小鼠)中產生。使FGF21突變體多肽與在待免疫之物種中具免疫原性之載體蛋白(諸如匙孔螺血氫蛋白、血清、白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑)結合可為有用的。此外，使用諸如羧之聚集劑以增強免疫反應。在免疫之後，將該等動物放血且檢定血清之抗FGF21突變體抗體效價。

可使用提供在培養物中藉由連續細胞株產生抗體分子之任何方法產生針對FGF21突變體多肽之單株抗體。製備單株抗體之合適方法之實例包括融合瘤方法(Kohler等人，1975, *Nature* 256: 495-97)及人類B細胞融合瘤方法(Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; Brodeur等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63(Marcel Dekker, Inc., 1987))。本發明亦提供產生與FGF21突變體多肽反應之單株抗體之融合瘤細胞株。

本發明之單株抗體可經修飾以用作治療劑。在一實施例中，單株抗體為「嵌合」抗體，其中重(H)鏈及/或輕(L)鏈之一部分與來源於特定物種或屬於特定抗體種類或子類之抗體中之相應序列一致或同源，而其餘鏈與來源於另一物種或屬於另一抗體種類或子類之抗體中之相應序列一致或同源。亦包括該等抗體之片段，只要該等片段展現所要生物活性即可。例如參見美國專利第4,816,567號；Morrison等人，1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6851-55。

在另一實施例中，本發明之單株抗體為「人類化」抗體。在此項技術中熟知人類化非人類抗體之方法。例如參見美國專利第5,585,089號及第5,693,762號。一般而言，人類化抗體具有一或多個自非人類來源引入其中之胺基酸殘基。可(例如)使用此項技術中所述之方法(例如參見Jones等人，1986, *Nature* 321: 522-25；Riechmann等人，1998, *Nature* 332: 323-27；Verhoeyen等人，1988, *Science* 239: 1534-36)，藉由用至少一部分齧齒動物互補決定區取代人類抗體之相應區域來進行人類化。

本發明亦涵蓋與本發明之FGF21突變體多肽結合之人類抗體。使用能夠在不存在內源性免疫球蛋白產生之情況下產生人類抗體譜系之轉殖基因動物(例如小鼠)，藉由用視情況與載體結合之FGF21突變體抗原(亦即，具有至少6個連續胺基酸)免疫而產生此等抗體。例如參見Jakobovits等人，1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2551-55；Jakobovits等人，1993, *Nature* 362: 255-58；Bruggermann

等人，1993, *Year in Immuno.* 7: 33。在一種方法中，該等轉殖基因動物係藉由使編碼其中重免疫球蛋白鏈及輕免疫球蛋白鏈之內源性基因座失能且將編碼人類重鏈蛋白及輕鏈蛋白之基因座插入其基因組而產生。接著使部分修飾之動物(亦即具有少於全部補充修飾之動物)雜交以獲得具有所有所要免疫系統修飾之動物。當投與免疫原時，此等轉殖基因動物產生具有人類(而非例如鼠類)胺基酸序列之抗體，包括對此等抗原具免疫特異性之可變區。例如參見國際公開案第 WO 96/33735 號及第 WO 94/02602 號。其他方法描述於美國專利第 5,545,807 號、國際公開案第 WO 91/10741 號及第 WO 90/04036 號以及歐洲專利第 0 546 073 號中。人類抗體亦可如本文所述藉由重組 DNA 於宿主細胞中之表現或藉由重組 DNA 於融合瘤細胞中之表現而產生。

在一替代實施例中，人類抗體亦可自噬菌體展示庫產生(例如參見 Hoogenboom 等人，1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks 等人，1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581)。此等方法模擬經由抗體譜系於絲狀噬菌體表面上之展示的免疫選擇及藉由噬菌體與所選抗原結合之噬菌體的後續選擇。一種該技術描述於國際公開案第 WO 99/10494 號中，其描述使用該方法針對 MPL-受體及 msk-受體分離高親和力及功能促效抗體。

嵌合、CDR 接枝及人類化抗體通常係藉由重組方法產生。將編碼抗體之核酸引入宿主細胞中且使用本文所述之物質及程序表現。在一實施例中，抗體係於哺乳動物宿主

細胞(諸如CHO細胞)中產生。單株(例如，人類)抗體可如本文所述藉由重組DNA於宿主細胞中之表現或藉由重組DNA於融合瘤細胞中之表現而產生。

本發明之抗FGF21突變體抗體可用於用以偵測及定量FGF21突變體多肽之任何已知檢定方法中，該檢定方法諸如競爭性結合檢定，直接及間接夾心檢定(sandwich assay)及免疫沈澱檢定(例如參見Sola, *Monoclonal Antibodies : A Manual of Techniques* 147-158(CRC Press, Inc., 1987)，其以全文引用的方式併入本文中)。抗體將以適於所用檢定方法之親和力結合FGF21突變體多肽。

對於診斷性應用而言，在某些實施例中，抗FGF21突變體抗體可經可偵測部分標記。該可偵測部分可為任何能夠直接或間接產生可偵測信號之部分。舉例而言，可偵測部分可為放射性同位素，諸如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 或 ^{67}Ga ；螢光或化學發光化合物，諸如異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)或螢光素(luciferin)；或酶，諸如鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根過氧化酶(Bayer等人，1990, Meth. Enz. 184: 138-63)。

競爭性結合檢定依賴於經標記標準物(例如FGF21突變體多肽或其免疫反應性部分)與測試樣品分析物(例如FGF21突變體多肽)競爭結合有限量之抗FGF21突變體抗體之能力。測試樣品中FGF21突變體多肽之量與結合抗體之標準物的量成反比。為有助於確定所結合之標準物的量，通常使抗體在競爭之前或之後不溶解，以便使與抗體結合之標

準物及分析物可便利地與仍未結合之標準物及分析物分離。

夾心檢定通常涉及使用兩種抗體，各自皆能夠與待偵測及/或定量之蛋白質的不同免疫原性部分或抗原決定基結合。在夾心檢定中，測試樣品分析物通常由固定於固體支撐物上之第一抗體結合，且此後第二抗體與分析物結合，因此形成不溶性三部分複合物。例如參見美國專利第4,376,110號。第二抗體本身可經可偵測部分(直接夾心檢定)標記或可使用經可偵測部分標記之抗免疫球蛋白抗體來量測(間接夾心檢定)。舉例而言，一類夾心檢定為酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA)，在該種情況下可偵測部分為酶。

本發明之抗FGF21突變體抗體亦適用於活體內成像。可將經可偵測部分標記之抗體投與至動物，較佳投與至血流中，且檢定經標記抗體在宿主中之存在及位置。抗體可經在動物中可藉由核磁共振、放射學或此項技術中已知之其他偵測方法偵測之任何部分標記。

本發明之FGF21突變體抗體可用作治療劑。此等治療劑一般為促效劑或拮抗劑，此係由於其分別增強或減低FGF21突變體多肽之生物活性中之至少一者。在一實施例中，本發明之拮抗劑抗體為能夠特異性結合FGF21突變體多肽且能夠抑制或消除FGF21突變體多肽之活體內或活體外功能活性之抗體或其結合片段。在一些實施例中，拮抗劑抗體會將FGF21突變體多肽之功能活性抑制至少約

50%，且較佳至少約80%。在另一實施例中，抗FGF21突變體抗體能夠干擾FGF21突變體多肽與FGF受體之間的相互作用，藉此抑制或消除FGF21突變體多肽之活體外或活體內活性。促效劑及拮抗劑抗FGF21突變體抗體係藉由此項技術中熟知之篩檢檢定鑑別。

本發明亦係關於一種包含FGF21突變體抗體及適於偵測生物樣品中FGF21突變體多肽含量之其他試劑的套組。該等試劑可包括可偵測標記、阻斷血清、陽性及陰性對照樣品及偵測試劑。

實例

以下實例說明本發明之特定實施例及其各種用途。其僅為說明性目的闡述，且不應將其視為以任何方式限制本發明之範疇。

實例1

FGF21表現構築體之製備

編碼成熟FGF21多肽之核酸序列係藉由聚合酶鏈反應(PCR)擴增使用具有對應於成熟FGF21序列之5'端及3'端之核苷酸序列的引子獲得。表2列出用於擴增成熟FGF21序列之引子。

表2

用於製備FGF21構築體之PCR引子

引子	序列	SEQ ID NO:
正義	5'-AGGAGGAATAACATATGCATCCAATTCCAGATTCTTCTCC-3'	5
反義	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	6

使用該等引子以製備將用於定向選殖序列之限制性核酸內切酶位點併入合適表現載體(例如 pET30(Novagen/EMD Biosciences; San Diego, CA)或 pAMG33(Amgen; Thousand Oaks, CA))中之FGF21表現構築體。表現載體 pAMG33含有低複本數R-100複製起始點、經修飾 *lac* 啟動子及抗康黴素基因。表現載體 pET30含有 pBR322 衍生之複製起始點、誘導性 T7 啟動子及抗康黴素基因(kanamycin-resistance gene)。儘管發現自 pAMG33 之表現較高,但發現 pET30 為更可靠選殖載體。因此,大多數本申請案中所述之構築體首先係在 pET30 中產生且接著針對功效對其進行篩檢。接著將所選序列轉移至用於進一步擴增之 pAMG33 中。

將 FGF21 序列在含有 40.65 μ L dH₂O、5 μ L PfuUltra II 反應緩衝劑(10 $\times$)、1.25 μ L dNTP 混合物(40 mM-4 $\times$ 10 mM)、0.1 μ L 模板(100 ng/mL)、1 μ L 引子 1(10 μ M)、1 μ L 引子 2(10 μ M)及 1 μ L PfuUltra II 融合 HS DNA 聚合酶(Stratagene; La Jolla, CA)之反應混合物中擴增。擴增反應係藉由以下步驟進行:在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 2 分鐘;繼之以 10 個以下週期:每千鹼基之所要產物在 95 $^{\circ}$ C 下歷時 20 秒、在 60 $^{\circ}$ C 下歷時 20 秒(其中每週期再減去 1 $^{\circ}$ C)及在 72 $^{\circ}$ C 下歷時 15 秒;繼之以 20 個以下週期:每千鹼基之所要產物在 94 $^{\circ}$ C 下歷時 20 秒、在 55 $^{\circ}$ C 下歷時 20 秒及在 72 $^{\circ}$ C 下歷時 15 秒;繼之以在 72 $^{\circ}$ C 下歷時 3 分鐘。將擴增產物用限制性核酸內切酶 NdeI、DpnI 及 EcoRI 消化;與合適載體連接;且接著轉化至勝任細胞中。

實例 2

FGF21 蛋白自細菌之純化

在以下實例中，將包括野生型 FGF21 多肽、經截短 FGF21 多肽、FGF21 突變體及 FGF21 融合蛋白之各種 FGF21 蛋白於細菌表現系統中表現。除非另外指出，否則在以下所述之表現之後，如此實例中所述將 FGF21 蛋白純化。

為自細菌包涵體純化野生型 FGF21 多肽、經截短 FGF21 多肽及 FGF21 突變體，將雙重洗滌之包涵體 (DWIB) 溶解於含有於 Tris 緩衝劑中之鹽酸胍及 DTT 的溶解緩衝液 (pH 8.5) 中且接著在室溫下混合 1 小時，且將溶解混合物添加至含有尿素、精胺酸、半胱胺酸及胱胺鹽酸鹽之重折疊 (refold) 緩衝液 (pH 9.5) 中且接著在 5°C 下混合 24 小時 (例如參見 Clarke, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157-63; Mannall 等人, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1523-34; Rudolph 等人, 1997, "Folding proteins," *Protein Function: A Practical Approach* (Creighton 編, New York, IRL Press) 57-99; 及 Ishibashi 等人, 2005, *Protein Expr. Purif.* 42: 1-6)。

在溶解及重折疊之後，將混合物經由 0.45 微米過濾器過濾。接著將重折疊彙集物用 10 kD 分子量截止 Pall Omega 卡匣在 20 psi 之跨膜壓力 (TMP) 下濃縮約 10 倍，且在 20 psi 之 TMP 下用 3 管柱體積之 20 mM Tris (pH 8.0) 滲濾。

接著使用 Q 瓊脂糖 HP 樹脂使澄清樣品經受陰離子交換 (AEX) 層析。在 5°C 下在 pH 8.0 下操作於 20 mM Tris 中之 0 至 250 mM NaCl 之線性鹽梯度。將峰溶離份藉由 SDS-PAGE

分析且彙集。

接著使用苯基瓊脂糖HP樹脂使AEX溶離液彙集物經受疏水性相互作用層析(HIC)。在pH 8.0及周圍溫度下使用0.7 M至0 M硫酸銨之降低線性梯度溶離蛋白質。將峰溶離份藉由SDS-PAGE(Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85)分析且彙集。

將HIC彙集物在20 psi之TMP下用10 kD分子量截止Pall Omega 0.2 m²卡匣濃縮至7 mg/mL。將濃縮物在20 psi之TMP下用5管柱體積之10 mM KPO₄、5%山梨糖醇(pH 8.0)滲濾，且將所回收之濃縮物稀釋至5 mg/mL。最終，經由Pall mini-Kleenpac 0.2 μM Posidyne膜過濾溶液。

為自細菌包涵體純化FGF21融合蛋白及FGF21融合突變體蛋白，將雙重洗滌之包涵體(DWIB)溶解於含有於Tris緩衝劑中之鹽酸胍及DTT的溶解緩衝液(pH 8.5)中且接著在室溫下混合1小時，且將溶解混合物添加至含有尿素、精胺酸、半胱胺酸及胱胺鹽酸鹽之重折疊緩衝液(pH 9.5)中且接著在5°C下混合24小時(例如參見Clarke, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 157-63 ; Mannall等人, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1523-34 ; Rudolph等人, 1997, 「Folding proteins,」 *Protein Function: A Practical Approach*(Creighton編, New York, IRL Press)57-99 ; 及 Ishibashi等人, 2005, *Protein Expr. Purif.* 42: 1-6)。

在溶解及重折疊之後，將混合物使用10 kD透析管用5體積之20 mM Tris(pH 8.0)透析。用50%乙酸將經透析重折疊

物之pH調節至5.0，且接著藉由在4 K下離心30分鐘來澄清。

接著使用Q瓊脂糖HP樹脂使澄清樣品經受陰離子交換(AEX)層析。在5°C下在pH 8.0下操作於20 mM Tris中之0至250 mM NaCl之線性鹽梯度。將峰溶離份藉由SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *Nature* 227: 680-85)分析且彙集。

接著使用苯基瓊脂糖HP樹脂使AEX溶離液彙集物經受疏水性相互作用層析(HIC)。在周圍溫度下在pH 8.0下使用0.6 M至0 M硫酸銨之降低線性梯度溶離蛋白質。將峰溶離份藉由SDS-PAGE分析且彙集。

在HIC步驟之後，接著將彙集物用60體積之10 mM Tris、2.2%蔗糖、3.3%山梨糖醇(pH 8.5)透析。使用jumbosep將經透析彙集物濃縮至5 mg/mL。最終，經由Pall mini-Kleenpac 0.2 μ M Posidyne膜過濾溶液。

實例3

截短FGF21蛋白之製備及表現

編碼列於表3中之經截短FGF21蛋白之構築體係如下所述藉由野生型FGF21表現載體之PCR擴增來製備(野生型FGF21表現載體之構造描述於實例1中)。

表 3

FGF21 截 短

胺基酸殘基	所截短殘基之數目*
C末端截短	
1-180	1
1-179	2
1-178	3
1-177	4
1-176	5
1-175	6
1-174	7
1-173	8
1-172	9
1-171	10
1-169	12
1-168	13
1-167	14
1-166	15
1-165	16
1-164	17
1-160	21
1-156	25
1-152	29
1-149	32
1-113	68
N末端截短	
2-181	1
3-181	2
4-181	3
5-181	4
6-181	5
7-181	6
8-181	7
9-181	8
C末端截短及N末端截短	
5-174	11
7-172	17
9-169	20
9-149	40
15-169	26
15-149	46
15-113	82

*相對於成熟 FGF21 多肽

經截短 FGF21 蛋白構築體係使用具有與一或多個待缺失

(產生截短)密碼子之上游及下游區域同源之序列的引子來製備。用於該等擴增反應中之引子亦提供約15個核苷酸之重疊序列以使經擴增產物重新環化，亦即使整個載體目前具有所要突變體。

編碼缺乏成熟FGF21序列之位置1之組胺酸殘基的FGF21蛋白(亦即，2-181截短突變體)之例示性截短FGF21構築體係使用表4中所示之引子製備。

表 4
用於製備例示性截短FGF21突變體之PCR引子

引子	序列	SEQ ID NO:
正義	5'-GGAGATATACATATGCCAATTCCAGATTCTTCTCCATTATT-3'	7
反義	5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAA-3'	8

表4中所示之引子允許如下所示組胺酸殘基之缺失，其中上部序列(SEQ ID NO: 10)為包含N末端甲硫胺酸之成熟FGF21多肽之一部分，第二序列為正義引子(SEQ ID NO: 7)，第三及第四序列(SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12)為FGF21表現構築體之部分，且第五序列為反義引子(SEQ ID NO: 9)：

MetHisProIleProAspSerSerProLeu
5'-GGAGATATACATATG---CCAATTCCAGATTCTTCTCCATTATT
TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCATCCAATTCCAGATTCTTCTCCATTATT
AAAACAAATTGAAATTCTTCCTCTATATGTATACGTAGGTTAAGGTCTAAGAAGAGGTAATAA
AAAACAAATTGAAATTCTTCCTCTATATGTATAC-5'

經截短FGF21蛋白構築體係基本上使用實例1中所述之PCR條件來製備。將擴增產物用限制性核酸內切酶DpnI消化，且接著轉化至勝任細胞中。將所得純系定序以確認不

存在由聚合酶產生之錯誤。

經截短FGF21蛋白係藉由用編碼特定經截短FGF21蛋白之構築體轉化勝任BL21(DE3)或BL21 Star(Invitrogen; Carlsbad, CA)細胞來表現。使轉化株在有限通氣下於補充有40 $\mu\text{g/mL}$ 康徽素之TB培養基中生長隔夜，次日早晨通氣，且在短恢復期後於0.4 mM IPTG中誘導。在誘導之後藉由離心18-20小時收集FGF21突變體。

實例 4

經截短FGF21蛋白之活體外活性

進行實驗以鑑別在ELK-螢光素酶活體外檢定中保留野生型FGF21活性之經截短FGF21蛋白。表5概述針對具有N末端截短、C末端截短或N末端截短與C末端截短之FGF21蛋白所獲得之結果。ELK-螢光素酶檢定係使用重組人類293T腎臟細胞系統來進行，其中該等293T細胞過度表現 β -klotho及螢光素酶報導體構築體。此等構築體亦含有編碼GAL4-ELK1及5xUAS-Luc之序列，GAL4-ELK1及5xUAS-Luc為由含有5個串聯複本之Gal4結合位點之啟動子驅動的螢光素酶報導體。 β -klotho為FGF21關於其FGF受體之活化及細胞內信號轉導之誘導所需之輔助受體，該輔助受體轉而導致Erk及ELK磷酸化。螢光素酶活性係由磷酸化Erk/ELK1之含量調節，且用以間接監測及量化FGF21活性。

藉由在不同濃度之野生型FGF21或FGF21突變體多肽之存在下培養293T細胞歷時6小時且接著針對螢光素酶活性檢定細胞溶菌液來進行ELK-螢光素酶檢定。圖1A-1B展示

對 FGF21 截短突變體 7-181 及 8-181 (圖 1A) 及 FGF21 截短突變體 1-172、1-171、1-169 及 1-164 (圖 1B) 進行之 ELK-螢光素酶活性檢定之結果。FGF21 截短突變體 3-181、4-181、5-181、7-181、8-181、1-180、1-178、1-177、1-176、1-175、1-174、1-173、1-172、9-181 及 1-149 中之每一者在 ELK-螢光素酶檢定中所獲得之發光性展示於圖 2 中。

將 FGF21 突變體多肽與野生型 FGF21 標準物及突變體進行比較，展示野生型 FGF21 功效之至少 50% 之功效視為未損失 FGF21 活性且在表 5 中指定為「+」。

表 5

經截短 FGF21 蛋白：活體外檢定

C 末端截短		
胺基酸殘基	功效	活性(+/-)
1-180	93.2%	+
1-178	95.0%	+
1-177	112.0%	+
1-176	104.8%	+
1-174	104.6%	+
1-173	96.1%	+
1-172	97.5%	+
1-171	113.0%	+
1-169	84.9%	+
1-167	20%	-
1-166	20%	-
1-165	10%	-
N 末端截短		
胺基酸殘基	功效	活性(+/-)
2-181	112.5%	+
3-181	130.3%	+
4-181	117.0%	+
5-181	119.6%	+
7-181	74.2%	+
8-181	24.9%	-
9-181	12.5%	-

總體而言，表 5 中所呈現之結果指示 14 個或 14 個以上胺

基酸殘基之C末端缺失(亦即由胺基酸殘基1-167及更短蛋白質組成之C末端截短FGF21蛋白)消除FGF21之活性。此外，表5指示7個或7個以上胺基酸殘基之N末端缺失(亦即由胺基酸殘基8-181及更短蛋白質組成之N末端截短FGF21蛋白)消除FGF21之活性。並不令人驚奇地，發現具有8至14個殘基之N末端截短與12或32個殘基之C末端截短的經截短FGF21蛋白在ELK-螢光素酶檢定中缺乏活性。

與表5中所呈現之資料一致，具有少於7個胺基酸殘基之N末端截短之經截短FGF21多肽構成本發明之實施例。類似地，具有少於13個胺基酸殘基之C末端截短之經截短FGF21多肽構成本發明之實施例。

實例5

經截短FGF21蛋白之活體內活性

FGF21具有多種生物活性，包括降低血糖、胰島素、甘油三酯或膽固醇含量；減低體重；或改良葡萄糖耐受性、能量消耗或胰島素敏感性之能力。藉由將經截短FGF21多肽引入抗胰島素ob/ob小鼠中且量測特定截短FGF21多肽降低血糖之能力來進一步分析經截短FGF21多肽之活體內FGF21活性。將待測試之經截短FGF21多肽經腹膜內注射入8週齡ob/ob小鼠(Jackson Laboratory)中，且在單次注射之後在多個時間點(例如在注射之後0小時、6小時、24小時、72小時、120小時及168小時)獲取血樣。用OneTouch血糖儀(LifeScan, Inc. Milpitas, CA)量測血糖含量，且結果表示為相對於血糖之基線含量(亦即，在0小時時)的血糖

變化百分比。

圖3中提供一實驗之結果，其展示在注射有FGF21截短突變體8-181及9-181之小鼠中所偵測到之血糖的量。此實驗證實包含胺基酸殘基8-181之經截短FGF21融合蛋白展現活體內降血糖活性，然而該活性略小於在注射之後3小時及6小時時野生型FGF21之活性，但包含胺基酸殘基9-181之經截短FGF21融合蛋白不展現該活性。因此，經截短FGF21多肽之活體內分析指示至多7個胺基酸自成熟FGF21之N末端缺失不會消除分子之生物活性(與活體外分析形成對比，該活體外分析表明7個胺基酸自成熟FGF21之N末端缺失將消除活性)。

在活體外及活體內檢定中由特定N末端截短FGF21多肽(例如FGF21 8-181)得到之不同結果可由在實現信號轉導時FGF21與 β -klotho及FGF受體之相互作用來解釋。詳言之，FGF21活化包含輔助受體 β -klotho及FGF受體(FGFR)之雙受體複合物，該複合物起始涉及酪胺酸激酶之信號級聯。已展示FGF21之N末端牽涉於FGFR之結合及活化中，而FGF21之C末端為 β -klotho相互作用所需(Yie等人，2009 *FEBS Lett.* 583:19-24)。在293腎臟細胞中進行ELK-螢光素酶活體外檢定，其中輔助受體 β -klotho經過度表現且FGFR以正常水準表現。相對於 β -klotho之量而言FGFR之量較低，且因此293細胞中 β -klotho與FGFR之比率具非生理性，其可影響FGFR之受體複合物形成及最終配位體結合及活化。293活體外系統似乎更易受N末端截短FGF21多肽

損害且因此對於少許所測試之N末端截短突變體(諸如 FGF21 8-181)可能已產生活性結果損失。因此，在確定特定N末端截短FGF21突變體是否仍保留野生型FGF21活性時，將彼FGF21突變體在活體內檢定中之活性視為決定性的。因此，本發明涵蓋具有少於8個胺基酸殘基之N末端截短之經截短FGF21多肽。

實例 6

經截短FGF21融合蛋白之製備及表現

因為可藉由使蛋白質與Fc序列融合來增加蛋白質之半衰期，所以製備且分析包含經截短FGF21多肽之融合蛋白。表6中所列之經截短FGF21融合蛋白係藉由SOE(藉由重疊延伸之基因剪接)PCR由經擴增FGF21序列製備。製備FGF21融合蛋白以便使人類免疫球蛋白IgG1基因(SEQ ID NO: 13)之Fc部分與FGF21蛋白之N末端或C末端融合。

表 6

經截短FGF21融合蛋白

胺基酸殘基	Fc位置	連接子
C末端截短		
1-178	-NH ₂	15
1-175	-NH ₂	14
1-175	-COOH	15
1-171	-NH ₂	15
1-171	-COOH	15
1-170	-COOH	15
N末端截短		
5-181	-NH ₂	15
5-181	-COOH	15
7-181	-NH ₂	15
7-181	-COOH	15
C末端截短及N末端截短		
5-175	-NH ₂	15

5-175	-COOH	15
5-171	-NH ₂	15
5-171	-COOH	15
6-170	-COOH	15
7-178	-COOH	35
7-175	-NH ₂	15
7-175	-COOH	15
7-174	-COOH	35
7-172	-COOH	35
7-171	-NH ₂	15
7-171	-COOH	35
7-171	-COOH	15

詳言之，FGF21融合蛋白構築體(包括編碼經截短FGF21融合蛋白之彼等構築體)係基本上使用實例1中所述之反應條件以一系列三個擴增反應來製備。在第一反應中，設計一對引子以產生含有NdeI選殖位點、Fc區及連接子序列之序列。在第二反應中，設計一對引子以產生含有連接子之重疊部分、FGF21編碼序列之一部分及EcoRI選殖位點之序列。最終，在第三反應中，設計一對引子以達到連接前兩個反應之產物的目的。用於構築Fc-FGF21 1-181之一組例示性引子列於表7中。

表 7

用於製備例示性FGF21融合蛋白構築體之PCR引子

引子	序列	SEQ ID NO:
反應1		
正義	5'-AGGAGGAATAACATATGGACAAAACCTCACACATG-3'	14
反義	5'-GGATCCACCACCACCGCTACCAC-3'	15
反應2		
正義	5'-GGTGGTGGTGGATCCCATCCAATTCAGATTCTTCTCCA-3'	16
反義	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	17
反應3		
正義	5'-AGGAGGAATAACATATGGACAAAACCTCACACATG-3'	14
反義	5'-TAGTGAGCTCGAATTCTTAGGAAGCGTAGCTGG-3'	17

將最終反應之產物用限制性核酸內切酶NdeI及EcoRI消

化，接合至pET30載體，且接著轉化至勝任細胞中。將所得純系定序以確認不存在由聚合酶產生之錯誤。

實例 7

經截短 FGF21 融合蛋白之活體內活性

產生包含與Fc序列融合之經截短FGF21序列之融合蛋白且檢定其活體內活性。藉由使IgG1 Fc分子與經截短FGF21蛋白之N末端或C末端融合以形成單一連續序列來製備經截短FGF21融合蛋白。為區分N末端融合與C末端融合，將使Fc分子與FGF21蛋白之N末端融合之FGF21融合蛋白指定為Fc-FGF21，且將使Fc分子與FGF21蛋白之C末端融合之融合蛋白指定為FGF21-Fc。

FGF21具有多種生物活性，包括降低血糖、胰島素、甘油三酯或膽固醇含量；減低體重；或改良葡萄糖耐受性、能量消耗或胰島素敏感性之能力。為分析活體內FGF21活性，將FGF21多肽、FGF21突變體多肽及FGF21融合多肽引入抗胰島素ob/ob小鼠中，且量測特定FGF21蛋白降低血糖含量之能力。將待測試之FGF21多肽、FGF21突變體多肽或FGF21融合多肽經腹膜內注射入8週齡ob/ob小鼠(Jackson Laboratory)中，且在單次注射之後在多個時間點(例如在注射之後0小時、6小時、24小時、72小時、120小時及168小時)獲取血樣。用OneTouch血糖儀(LifeScan, Inc. Milpitas, CA)量測血糖含量，且結果表示為相對於血糖之基線含量(亦即，在0小時時)的血糖變化百分比。

圖4中提供一實驗之結果，其展示注射有PBS對照、包

含胺基酸殘基 1-181 之野生型 Fc-FGF21 對照或包含胺基酸殘基 5-181 或 7-181 之經截短 Fc-FGF21 融合蛋白之小鼠中所觀測到之血糖含量變化百分比。此實驗證實包含胺基酸殘基 5-181 或 7-181 之經截短 Fc-FGF21 融合蛋白展現與注射之後 6 小時時野生型 Fc-FGF21 之活性類似的降血糖活性。因此，經截短 FGF21 多肽之活體內分析指示至多 6 個胺基酸自成熟 FGF21 之 N 末端缺失不會影響分子之生物活性。然而，活體內分析亦指示經截短 FGF21 多肽降低血糖之能力減低且在注射之後 24 小時時血糖含量恢復至基線值(野生型 FGF21 獲得類似結果)。如實例 8 中所述，發現短期活體內活性為 FGF21 之蛋白水解降解之結果。

圖 5 中提供另一實驗之結果，其展示在注射有 PBS 對照、包含胺基酸殘基 1-181 之野生型 Fc-FGF21 對照、包含殘基 1-175 之經截短 FGF21-Fc 融合蛋白或包含胺基酸殘基 1-171 之經截短 Fc-FGF21 蛋白之小鼠中所觀測到之血糖含量變化百分比。此實驗證實包含胺基酸殘基 1-181 之野生型 FGF21-Fc 具有持續的降葡萄糖活性，從而導致在注射之後 24 小時至 120 小時之時期內血糖含量降低約 30%。包含胺基酸殘基 1-171 之經截短 Fc-FGF21 蛋白展現僅在注射之後 72 小時時明顯之延遲的降血糖活性。然而，所觀測到之活性與野生型 FGF21-Fc 之活性相同。包含殘基 1-175 之經截短 FGF21-Fc 融合蛋白不具活體內降低血糖之活性。

總體而言，本文所述之截短實驗證實具有 N 末端截短之經截短 FGF21 融合蛋白展現類似於野生型 FGF21 融合蛋白

之活性的降血糖活性，且進一步證實已使Fc分子與經截短FGF21蛋白之N末端融合之經截短FGF21融合蛋白展現與已使Fc分子與經截短FGF21蛋白之C末端融合之融合蛋白相比更強之活性。

實例 8

所觀測到之FGF21之活體內降解

最初由如實例7中所述之FGF21 Fc融合蛋白構築體觀測到FGF21降解。活體內藥物動力學分析指示人類FGF21在小鼠中具有約1小時之短半衰期，此係歸因於快速清除及活體內降解。因此，為延長FGF21之半衰期，將Fc序列與FGF21多肽之N末端或C末端融合。然而，Fc區之融合並未完全解決半衰期問題，因為使Fc序列與FGF21多肽之N末端或C末端融合之融合蛋白(且尤其為Fc-FGF21融合，亦即其中使Fc序列與成熟FGF21之N末端融合)並未展現預期活體內功效，且反而發現在ob/ob小鼠中維持降血糖活性歷時不超過24小時。如圖4中所述，Fc-FGF21融合蛋白在注射之後6小時時減低血糖含量約30%-40%，而在24小時時血糖含量恢復至基線含量。

隨後研究野生型FGF21之蛋白水解降解，且發現Fc-FGF21融合蛋白之活體內活性的快速損失為FGF21活體內降解之結果。蛋白水解降解導致活體內分子之生物活性降低且因此導致較短有效半衰期，且該降解不利地影響該分子之治療性用途。因此，所觀測到之FGF21 Fc融合蛋白之降解產生FGF21在活體內蛋白水解降解之研究結果且鑑別

出對該降解有抵抗性之FGF21突變體。

為測定降解位點，對注射入雄性C57B6小鼠之後多個時間點所獲得之野生型人類FGF21及FGF21 Fc融合蛋白進行LC-MS分析及艾德曼定序(Edman sequencing)。艾德曼定序有助於確認蛋白質之N端或C端是否經歷降解。當Fc序列與人類FGF21之N端融合時，發現降解發生於融合分子之人類FGF21部分之胺基酸殘基151與152之間及胺基酸殘基171與172之間的肽鍵(以上編號之殘基係基於成熟FGF21序列且不包括融合蛋白之Fc部分)。發現171-172之降解首先發生，接著151-152之降解發生。171-172之降解似乎為速率限制步驟且在分子之半衰期中起作用。當Fc序列與FGF21之C端融合時，發現降解發生於胺基酸殘基4與5之間及胺基酸殘基20與21之間的肽鍵。由於此等實驗，確定Fc序列似乎保護鄰接Fc序列之FGF21序列的一部分免於降解。進一步在食蟹獼猴中進行野生型FGF21及Fc-FGF21融合蛋白之活體內降解之分析。此等研究證實在猴子中FGF21在胺基酸殘基171-172之裂解位點為降解之主要位點，且在鼠類與靈長類動物之間此降解位點為保守的。

實例9

FGF21抗蛋白水解突變體之鑑別

藉由實驗測定野生型FGF21序列之主要蛋白水解活性位點之位置來鑑別適合的FGF21突變體，且將特定胺基酸取代引入此等位點。胺基酸取代係基於其他物種(如實例8中所述)之FGF21序列保守性及其他胺基酸殘基之生物化學保

守性。表8中提供經引入或可引入野生型FGF21蛋白中之胺基酸取代的清單，但表8僅為例示性的且可進行其他取代。表8中所示位置的編號對應於181個胺基酸殘基組成之成熟FGF21蛋白中之殘基位置。

表 8

突變之FGF21殘基

胺基酸位置	天然殘基	突變
19	Arg	Gln、Ile、Lys
20	Tyr	His、Leu、Phe
21	Leu	Ile、Phe、Tyr、Val
22	Tyr	Ile、Phe、Val
150	Pro	Ala、Arg
151	Gly	Ala、Val
152	Ile	His、Leu、Phe、Val
170	Gly	Ala、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Pro、Ser
171	Pro	Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Lys、Ser、Thr、Trp、Tyr
172	Ser	Leu、Thr
173	Gln	Arg、Glu

實例 10

Fc-FGF21及FGF21-Fc降解之活體內分析

藉由向小鼠注射融合蛋白，在多個時間點自該小鼠抽血且藉由液相層析-質譜分析(LC-MS)分析血清來測定活體內FGF21 Fc融合蛋白之穩定性。詳言之，經腹膜內向小鼠注射10 mg/kg Fc(5)FGF21(表現於大腸桿菌中且如實例2中所述純化)或FGF21(3)Fc(表現於哺乳動物細胞中且根據標準程序純化)。在注射之後6小時、24小時及48小時時(表9)自小鼠抽取血液且將其收集至用蛋白酶抑制劑混合液(Roche

Diagnostics)預先處理之EDTA管中。藉由在12,000 g下將該等樣品離心10分鐘來分離血漿。使用抗人類-Fc瓊脂糖樹脂自血液親和純化FGF21蛋白。

表 9

FGF21樣品

樣品	所投與之蛋白質	抽取血液
D6	Fc-FGF21	6小時
D24	Fc-FGF21	24小時
D48	Fc-FGF21	48小時
E6	FGF21-Fc	6小時
E24	FGF21-Fc	24小時
E48	FGF21-Fc	48小時

在藉由LC-MS分析親和純化樣品之前，分析作為參考之Fc-FGF21及FGF21-Fc蛋白標準物。將蛋白質標準物用參[2-羧乙基]膦(TCEP)還原或其未經還原。藉由LC-MS使用ACE 氨基0.3 mm×30 mm管柱分析經還原標準物及未經還原標準物，其中使管柱流出物噴霧至LCQ Classic離子阱質譜儀中。因為經還原樣品之去卷積譜更乾淨，所以在LC-MS分析之前將親和純化樣品還原。

經還原Fc(5)FGF21標準物及樣品D6、D24及D48之所觀測質量展示於圖6A-圖6D中。經還原FGF21(3)Fc標準物及樣品E6、E24及E48之所觀測質量展示於圖7A-圖7D中。使一些標準物及樣品溶離液經受艾德曼定序以確認蛋白質之N末端及如LC-MS所測定之片段。表10中提供標準物及樣品之LC-MS分析之結果。

表 10

LC-MS分析之結果及預測片段

FGF21樣品	所觀測之主要質量	片段	是否為完整N末端?
Fc(5)FGF21標準物	45,339 Da	1-414	是
D6	45,338 Da 44,317 Da	1-414 1-404	是
D24	44,321 Da	1-404	是
D48	44,327 Da 42,356 Da	1-404 ?	是
FGF21(3)Fc標準物	46,408 Da(糖基化, G0F) 44,964 Da(非糖基化)	1-410 1-410	是
E6	45,963 Da(糖基化, G0F) 44,516 Da(非糖基化)	5-410 5-410	否
E24	45,963 Da(糖基化, G0F) 44,526 Da(非糖基化) 44,130 Da(糖基化, G0F)	5-410 5-410 21-410	否
E48	45,984 Da 44,130 Da 44,022 Da	5-410? 21-410 ?	否

如表 10 中所示，所有親和純化樣品在僅循環 6 小時之後均展示一定程度之降解。在循環 24 小時之後，Fc-FGF21 之主要產物為由胺基酸殘基 1-404 組成之片段，該片段可見於 D 與 E 樣品中。然而，在 E 樣品中，FGF21-Fc 之主要產物為由胺基酸殘基 5-410 組成之片段。對於所測試之兩種融合蛋白而言，與蛋白質之 Fc 部分相比融合蛋白之 FGF21 部分更易於降解。

實例 11

抗蛋白水解性 FGF21 突變體及融合蛋白之製備及表現

編碼列於表 11 中之 FGF21 突變體之構築體係藉由如下所述野生型 FGF21 表現載體之 PCR 擴增來製備(野生型 FGF21 表現載體之構造描述於實例 1 中)。此等實驗之目的為產生

具有抗蛋白水解性且展現較長半衰期之FGF21突變體。

表 11

抗蛋白水解性FGF21突變體

突變	Fc	連接子
R19I		
R19I	-COOH	15
R19K		
R19K	-COOH	15
R19Q		
R19Q	-COOH	15
R19K、Y20H		
R19K、Y20H	-COOH	15
R19K、L21I		
R19K、L21I	-COOH	15
R19K、Y20H、L21I		
R19K、Y20H、L21I	-COOH	15
Y20F		
Y20F	-COOH	15
Y20H		
Y20H	-COOH	15
Y20L		
Y20L	-COOH	15
Y20H、L21I		
Y20H、L21I	-COOH	15
L21I		
L21I	-COOH	15
L21F		
L21F	-COOH	15
L21V		
L21V	-COOH	15
L21Y		
L21Y	-COOH	15
Y22F		
Y22F	-COOH	15
Y22I		
Y22I	-COOH	15
Y22V		
Y22V	-COOH	15
P150A		
P150A	-NH ₂	15
P150R	-NH ₂	15
P150A、G151A		
P150A、G151A	-NH ₂	15
P150A、I152V		

P150A、I152V	-NH ₂	15
P150A、G151A、I152V		
P150A、G151A、I152V	-NH ₂	15
G151A		
G151A	-NH ₂	15
G151V		
G151V	-NH ₂	15
G151A、I152V		
G151A、I152V	-NH ₂	15
I152F		
I152F	-NH ₂	15
I152H		
I152H	-NH ₂	15
I152L		
I152L	-NH ₂	15
I152V		
G170A		
G170A	-NH ₂	15
G170C		
G170C	-NH ₂	15
G170D		
G170D	-NH ₂	15
G170E		
G170E	-NH ₂	15
G170N		
G170N	-NH ₂	15
G170P		
G170P	-NH ₂	15
G170Q		
G170Q	-NH ₂	15
G170S		
G170S	-NH ₂	15
G170E、P171A		
G170E、P171A	-NH ₂	15
G170E、S172L		
G170E、S172L	-NH ₂	15
G170E、P171A、S172L		
G170E、P171A、S172L	-NH ₂	15
P171A		
P171A	-NH ₂	15
P171C	-NH ₂	15
P171D	-NH ₂	15
P171E	-NH ₂	15
P171G	-NH ₂	15
P171H	-NH ₂	15
P171K	-NH ₂	15
P171N	-NH ₂	15
P171Q	-NH ₂	15

P171S	-NH ₂	15
P171T	-NH ₂	15
P171W	-NH ₂	15
P171Y	-NH ₂	15
P171A、S172L		
P171A、S172L	-NH ₂	15
S172L	-NH ₂	15
S172T		
S172T	-NH ₂	15
Q173E		
Q173E	-NH ₂	15
Q173R		
Q173R	-NH ₂	15

使用具有與一或多個待突變密碼子之上游及下游區域同源之序列的引子來製備FGF21突變體構築體。用於該等擴增反應中之引子亦提供約15個核苷酸之重疊序列以使經擴增產物重新環化，亦即使整個載體目前具有所要突變體。

使用表12中所示之引子來製備編碼在位置170處具有麩胺酸殘基而非天然甘胺酸殘基之FGF21突變體(亦即，G170E突變體)的例示性FGF21突變體構築體。

表 12

用於製備例示性FGF21突變體之PCR引子

引子	序列	SEQ ID NO:
正義	5'-ATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGC-3'	18
反義	5'-GGAAGGTTCCACCATGCTCAGAGGGTCCGA-3'	19

如下所示表12中所示之引子允許用麩胺酸殘基取代甘胺酸殘基，其中上部序列為正義引子(SEQ ID NO: 18)，第二及第三序列(SEQ ID NO: 20及SEQ ID NO: 22)為FGF21表現構築體之部分，且第四序列為反義引子(SEQ ID NO: 21)：

5'-ATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGC
 CTCCTCGGACCCTCTGAGCATGGTGGAACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCA
 GAGGAGCCTGGGAGACTCGTACCACCCTTGGAAGGGTCCCGGCTTCGGGGT
 AGCCTGGGAGACTCGTACCACCTTTGGAAGG-5'

FGF21突變體構築體系基本上使用實例1中所述之PCR條件來製備。將擴增產物用限制性核酸內切酶DpnI消化，且接著轉化至勝任細胞中。將所得純系定序以確認不存在由聚合酶產生之錯誤。Fc-FGF21及FGF21-Fc融合蛋白係如本文所述(例如實例6中)產生。

FGF21突變體係藉由用編碼特定突變體之構築體轉化勝任BL21(DE3)或BL21 Star(Invitrogen; Carlsbad, CA)細胞來表現。使轉化株在有限通氣下於補充有40 µg/mL康徽素之TB培養基中生長隔夜，次日早晨通氣，且在短恢復期後於0.4 mM IPTG中誘導。在誘導之後藉由離心18-20小時收集FGF21突變體多肽。

亦分析FGF21突變體之預測免疫原性。藉由抗原處理及在主要組織相容性複合物(MHC)II類結合位點中之呈遞來增強對抗蛋白質之免疫反應。此相互作用為識別蛋白質之抗體之成熟中的T細胞輔助所需。因為已表徵MHC II類分子之結合位點，所以有可能預測蛋白質是否具有可與一系列常見人類等位基因結合之特定序列。已基於參考文獻及MHC II類晶體結構產生電腦演算法以確定線性胺基酸肽序列是否具有破壞免疫耐受性之潛能。使用TEPITOPE電腦程式以確定在大部分人類中點變異(尤其FGF21突變體)是否將增加抗原特異性T細胞。基於各FGF21突變體之線性

蛋白質序列之分析，預測無一突變體增強免疫原性。

實例 12

連接子序列對 FGF21 降解之影響

為測定 Fc 序列與 FGF21 序列之間的較長胺基酸連接子之存在是否影響 FGF21 降解，向小鼠注射 FGF21 融合蛋白，其中藉由具有序列 GGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23) 之 15 個胺基酸的連接子使 Fc 區與 FGF21 序列分離，在多個時間點自小鼠抽取血液，且藉由 LC-MS 分析血清。詳言之，向小鼠注射 23 mg/kg 之 Fc(15)FGF21 或 FGF21(15)Fc (獲自大腸桿菌 (*E. coli*))，在 6 小時、24 小時及 48 小時時抽取血液，且使用抗人類-Fc 瓊脂糖樹脂將所抽取之血液親和純化。

在藉由 LC-MS 分析純化樣品之前，分析作為參考之 Fc(15) FGF21 及 FGF21(15)Fc 蛋白質標準物。將蛋白質標準物用 TCEP 還原或其未經還原。藉由 LC-MS 使用 ACE 氰基 0.3 mm×30 cm 管柱分析經還原標準物與未經還原標準物，其中使管柱流出物噴霧至 LCQ Classic 離子阱質譜儀中。因為經還原樣品之去卷積譜更乾淨，所以在 LC-MS 分析之前將親和純化樣品還原。

經還原 Fc(15)FGF21 標準物及在多個時間點所抽取之相應親和純化樣品的所觀測質量展示於圖 8A-圖 8D 中。經還原 FGF21(15) Fc 標準物及在多個時間點所抽取之相應親和純化樣品的所觀測質量展示於圖 9A-圖 9D 中。使一些標準物及樣品溶離液經受艾德曼定序以確認蛋白質之 N 末端且

輔助預測由LC-MS所觀測到之片段的身分。表13中提供標準物及樣品之LC-MS分析之結果及預測片段之表示。

表 13
LC-MS分析之結果及預測片段

FGF21樣品	所觀測之主要質量	總百分比	片段	是否為完整N末端?
Fc(15)FGF21 標準物	46,002 Da	100%	1-424	是
Fc(15)FGF21 6小時	46,000 Da 44,978 Da	65% 35%	1-424 1-414	是
Fc(15)FGF21 24小時	44,978 Da 43,022 Da	85% 15%	1-414 1-394	是
Fc(15)FGF21 48小時	44,976 Da 43,019 Da	60% 40%	1-414 1-394	是
FGF21(15)Fc 標準物	45,999 Da	100%	1-424	是
FGF21(15)Fc 6小時	45,870 Da	100%	1-423	是
FGF21(15)Fc 24小時	45,869 Da 45,301 Da 43,460 Da	40% 35% 25%	1-423 6-423 22-423	一些
FGF21(15)Fc 48小時	45,870 Da 45,297 Da 43,461 Da	15% 20% 65%	1-423 6-423 22-423	一些

如表13中所示，所有親和純化樣品在僅循環6小時之後均展示一定程度之降解。在循環24小時之後，Fc(15)FGF21之主要產物為由胺基酸殘基1-414(樣品之85%)及1-394(樣品之15%)組成之片段，且FGF21(15)Fc之主要產物為由胺基酸殘基1-423(樣品之40%)、6-423(樣品之35%)及22-423(樣品之25%)組成之片段。Fc(15)FGF21及FGF21(15)Fc蛋白之經鑑別裂解點分別展示於圖10A及圖10B中。

實例 13

在注射之後1日-7日抗蛋白水解性Fc(15)FGF21突變體之活

體內活性

如本文所述，FGF21 Fc融合蛋白之蛋白水解裂解視Fc序列之定向而定，其中與融合蛋白之FGF21端相比融合蛋白之Fc端更穩定(亦即，發現Fc-FGF21融合蛋白之N末端部分及FGF21 -Fc融合蛋白之C末端部分更穩定)。舉例而言，鑑別FGF21-Fc在位置5及21之裂解及Fc-FGF21在位置151及171之裂解。

由於此等觀測結果，進行研究以鑑別抗蛋白水解性FGF21突變體。對Fc-FGF21之LC-MS分析證實活體內蛋白水解降解首先在胺基酸殘基171-172之間發生，接著在胺基酸殘基151-152之間發生降解。藉由阻斷位置171之蛋白水解降解，可防止位置151之裂解，從而有效延長分子之半衰期。然而，防止位置151之裂解的抗蛋白水解性突變體仍可具有在位置171處對蛋白酶攻擊敏感之殘基，藉此導致分子失去最後10個胺基酸，已知該等胺基酸牽涉於輔助受體 β -klotho之結合中，該輔助受體 β -klotho為配位體受體親和力及活體外及活體內效能之決定子。因此，對於改良分子之活體內穩定性、效能及功效而言成熟FGF21中位置171周圍之胺基酸殘基之突變誘發似乎更關鍵。

藉由經腹膜內向ob/ob小鼠注射FGF21突變體，在注射之後0、0.25、1、3、5及7日自經注射小鼠抽取血樣且接著量測樣品中之血糖含量來檢定特定抗蛋白水解性Fc(15)FGF21突變體之活體內活性。圖11中提供一實驗之結果，其展示注射有PBS對照、Fc(15)FGF21對照或Fc(15)FGF21

突變體 Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 P171A、Fc(15)FGF21 S172L、Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L或Fc(15)FGF21 G151A之小鼠中所量測之血糖含量。圖12展示如此實驗中所測定之血糖含量變化百分比。此實驗證實Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 P171A、Fc(15)FGF21 S172L及Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L突變體展現持續的降血糖活性歷時長達5日，其優於野生型Fc-FGF21之活性。與野生型Fc-FGF21融合蛋白相比，Fc(15)FGF21 G151A突變體僅部分地改良降血糖活性之持續時間。令人驚奇地，儘管Fc(15)-FGF21 S172L突變體不為抗蛋白水解性突變體，且因此具有與野生型Fc(15)-FGF21多肽類似之降解概況，但發現此突變體與野生型Fc(15)-FGF21多肽相比展現改良之活體內功效。

圖13中提供另一實驗之結果，其展示注射有PBS對照、Fc(15)FGF21對照或Fc(15)FGF21突變體Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V、Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 G170E/P171A或Fc(15)FGF21 G170E/S172L之小鼠中所量測之血糖含量。圖14展示如此實驗中所測定之血糖含量變化百分比。如以上所述實驗中，野生型Fc-FGF21融合蛋白及Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V突變體不展現持續的降血糖活性，此可能係因為171位點之降解可能仍存在，且在注射之後24小時時注射有此等蛋白質之動物中之血糖含量恢復至基線值。然而，Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 G170E/P171A或Fc(15) FGF21 G170E/S172L

在注射之後至多5日展現最大降血糖活性，其優於野生型Fc-FGF21融合蛋白及Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V突變體。

圖15中提供另一實驗之結果，其展示注射有PBS對照或Fc(15)FGF21突變體Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 G170A、Fc(15)FGF21 G170C、Fc(15)FGF21 G170D、Fc(15)FGF21 G170N或Fc(15)FGF21 G170S之小鼠中所量測之血糖含量。圖16展示如此實驗中所測定之血糖含量變化百分比。此實驗中所測試之所有FGF21突變體在注射之後展現持續的降血糖活性歷時至多5日。

圖17中提供另一實驗之結果，其展示在注射有PBS或Fc(17)FGF21突變體Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 P171E、Fc(15)FGF21 P171H、Fc(15)FGF21 P171Q、Fc(15)FGF21 P171T或Fc(15)FGF21 P171Y之小鼠中所量測之血糖含量。圖18展示如此實驗中所測定之血糖含量變化百分比。與野生型Fc-FGF21相比，此實驗中所測試之所有FGF21突變體皆展現改良之降血糖活性。

實例14

在注射之後6小時至120小時時抗蛋白水解性Fc(15)FGF21

突變體之活體內降解

藉由向小鼠注射FGF21突變體，在多個時間點自小鼠抽取血液且藉由LC-MS分析血清來分析所選FGF21突變體之活體內穩定性。詳言之，向小鼠注射Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 P171A或Fc(15)FGF21 S172L突變體

(如實例2中所述獲自大腸桿菌)，其中每一者在注射之前於約180 μ L 10 mM HCl中稀釋，且在6小時、24小時、48小時、72小時及120小時時抽取血液。使用抗人類Fc瓊脂糖樹脂管柱自抽取之血液中親和純化FGF21蛋白。使用10 mM HCl自管柱溶離樣品。所有FGF21構築體在FGF21蛋白之胺基末端處皆包含Fc區及15個胺基酸之連接子。亦向小鼠注射野生型FGF21對照。

在藉由LC-MS分析親和純化樣品之前，分析作為參考之未加工野生型FGF21及未加工FGF21突變體。將所有標準物及時間點樣品用TCEP還原，且接著藉由LC-MS使用ACE 氟基0.3 mm $\times$ 30 cm管柱分析，其中使管柱流出物噴霧至LCQ Classic離子阱質譜儀中。將親和純化樣品用乙酸銨稀釋，用TCEP還原且接著如上所述藉由LC-MS分析。

在注射之後0小時、6小時、24小時及48小時時野生型Fc(15)FGF21之所觀測之質量分別展示於圖19A-圖19D中。在注射之後0小時、6小時、24小時及48小時時Fc(15)FGF21 G170E之所觀測之質量分別展示於圖20A-圖20D中。在注射之後0小時、6小時、24小時及48小時時Fc(15)FGF21 P171A之所觀測之質量分別展示於圖21A-圖21D中。在注射之後0小時、6小時、24小時及48小時時Fc(15)FGF21 S172L之所觀測之質量分別展示於圖22A-圖22D中。

發現在72小時及120小時時之所有所抽取樣品皆含有與剩餘Fc(15)FGF21融合蛋白相比更大量之高分子量(根據非

還原 SDS-PAGE 為 > 200 kDa) 血纖維蛋白原組份。表 14 中提供其他標準物及樣品之 LC-MS 分析之結果。

表 14

LC-MS 分析之結果及預測片段

FGF21 樣品	觀測到之主要質量	總百分比	片段	艾德曼定序
Fc(15)FGF21 WT 標準物	45,994 Da	100%	1-424	-
Fc(15)FGF21 WT 6小時	46,001 Da 44,987 Da	80% 20%	1-424 1-414	否
Fc(15)FGF21 WT 24小時	44,979 Da	約100%	1-414	否
Fc(15)FGF21 WT 48小時	44,980 Da	約100%	1-414	-
Fc(15)FGF21 G170E 標準物	46,068 Da	100%	1-424	-
Fc(15)FGF21 G170E 6小時	46,078 Da	100%	1-424	否
Fc(15)FGF21 G170E 24小時	46,074 Da 45,761 Da	80% 20%	1-424 1-421	否
Fc(15)FGF21 G170E 48小時	46,072 Da 45,760 Da	約60% 約40%	1-424 1-421	否
Fc(15)FGF21 P171A 標準物	45,970 Da	100%	1-424	-
Fc(15)FGF21 P171A 6小時	45,980 Da	100%	1-424	否
Fc(15)FGF21 P171A 24小時	45,973 Da 45,657 Da	約70% 約30%	1-424 1-421	否
Fc(15)FGF21 P171A 48小時	45,992 Da 45,673 Da	約50% 約50%	1-424 1-421	否
Fc(15)FGF21 S172L 標準物	46,022 Da	100%	1-424	-
Fc(15)FGF21 S172L 6小時	46,027 Da	100%	1-424	否

Fc(15)FGF21 S172L 24小時	44,984 Da	100%	1-414	否
Fc(15)FGF21 S172L 48小時	44,985 Da	100%	1-414	否

如表 14 中所示，野生型 Fc(15)FGF21 與 S172L 突變體之降解似乎類似，此係因為在循環 24 小時之後，融合蛋白之主要產物為由胺基酸殘基 1-414 組成之片段。Fc(15)FGF21 G170E 與 Fc(15)FGF21 P171A 突變體之降解產物亦似乎類似，此係因為在循環 24 小時之後所抽取之樣品含有 70%-80% 之完整蛋白質(胺基酸 1-424)及 20%-30% 之由胺基酸殘基 1-421 組成之片段。甚至在 48 小時之後，Fc(15)FGF21 G170E 及 Fc(15)FGF21 P171A 突變體仍保留完整蛋白質，同時展示由胺基酸殘基 1-421 組成之片段之量的增加。如在 Fc-FGF21 構築體之先前分析中所觀測，偵測到融合蛋白之 FGF21 部分之降解且發現 Fc 部分仍穩定。針對野生型、Fc(15)FGF21 G170E、Fc(15)FGF21 P171A 及 Fc(15)FGF21 S172L 所鑑別之裂解位點分別展示於圖 23A-圖 23D 中。

實例 15

聚集減少性 FGF21 突變體之鑑別

野生型 FGF21 之一種特性為其聚集傾向。聚集減少性 FGF21 突變體係基於兩種假定來鑑別。第一種假定為：關於 FGF21，聚集(或二聚)係藉由暴露於親水性水基溶劑環境中之疏水性殘基所引起之 FGF21 分子之間的疏水性相互作用及凡得瓦爾力(van der Waals)相互作用來引發。第二種假定為：此等所暴露疏水性殘基可經取代以產生聚集減

少性點突變變異體而不損害FGF21活性。

使用系統性理性蛋白質工程改造方法以鑑別FGF21中之所暴露疏水性殘基。因為不存在可用以鑑別所暴露疏水性殘基之FGF21之已知X射線或NMR結構，所以使用獲自蛋白質資料庫(Protein Databank, PDB)之FGF19(1PWA)的高解析度(1.3 Å)X射線晶體結構以使用MOE(分子操作環境(Molecular Operating Environment); Chemical Computing Group; Montreal, Quebec, Canada)模型化軟體產生FGF21之3D同源性模型。選擇FGF19作為模板，此係因為在寄存於PDB中之蛋白質中，就胺基酸序列同源性而言FGF19為與FGF21最緊密相關之蛋白質。

藉由以下方法使用MOE來計算溶劑可接近性。將表面積之第一量度(SA1)定義為以Å²計之殘基之可接近表面的面積。當特定胺基酸殘基在蛋白質之一級序列中出現多次時，殘基之每一次出現均可具有不同表面積，此係歸因於以下方面之差異：尤其殘基與蛋白質表面之接近度、殘基之側鏈之定向及相鄰胺基酸殘基之空間位置。因此，獲得表面積之第二量度(SA2)，其中將所關注之殘基以及該殘基之鄰近或相鄰殘基自蛋白質結構取出。將此等空間相鄰殘基經電腦虛擬(*in silico*)突變為甘胺酸以移除其側鏈，且接著計算所關注之殘基之SA2，從而得到彼殘基在其特定構形中之可能總表面積之量測。接著SA1與SA2之比率(SA1/SA2)可給出實際上暴露之彼殘基的可能表面積之百分比的量測。

選擇高度暴露於溶劑中之若干疏水性殘基以進一步分析，且對此等殘基進行電腦虛擬點突變以用其他天然存在之胺基酸殘基置換所選殘基。根據CUPSAT網站所提供之說明書使用FGF21模型及基於網路之互動式程式CUPSAT (科隆大學蛋白質穩定性分析工具(Cologne University Protein Stability Analysis Tools))來計算由不同取代引起之蛋白質熱穩定性的變化。參見Parthiban等人，2006, *Nucleic Acids Res.* 34: W239-42；Parthiban等人，2007, *BMC Struct. Biol.* 7:54。在聚集減少性點突變變異體之設計中不包括顯著失穩或疏水性突變。將引入改良之親水性及/或離子特徵之穩定(或偶爾略微失穩)取代視為聚集減少性FGF21突變體之候選者。

表15中提供經由此理性蛋白質工程改造方法產生之資料的概述，其亦列出預期具有減低之蛋白質聚集及改良之穩定性的例示性FGF21突變體。

表 15

所計算之FGF21突變體對穩定性之影響

殘基編號	WT殘基	突變	穩定性 (Kcal/mol)
26	A	K	1.25
		E	1.54
		R	2.016
45	A	T	0.66
		Q	0.71
		K	1.8
		E	2.34
		R	1.59
52	L	T	-0.33
58	L	G	0.16
		S	-0.15
		C	1.0

		E	0.08
60	P	A	1.3
		K	1.51
		E	0.66
		R	1.31
78	P	A	0.14
		C	2.48
		R	0.08
		H	0.13
86	L	T	0.18
		C	4.1
88	F	A	2.52
		S	3.08
		K	2.88
		E	1.48
98	L	T	0.49
		Q	0.17
		K	-0.19
		C	3.08
		E	0.84
		R	3.4
99	L	C	7.34
		E	2.0
		D	1.01
		R	1.61
111	A	T	0.47
		K	-0.12
129	A	Q	3.93
		K	1.02
		N	3.76
		E	3.01
		D	3.76
		R	1.68
134	A	H	2.9
		K	5.37
		Y	4.32
		E	5.13
		R	6.18
		H	2.86

實例 16

聚集減少性 FGF21 突變體及融合蛋白之製備及表現

編碼列於表 16 中之 FGF21 突變體之構築體係藉由如實例 11 中所述之野生型 FGF21 表現載體之 PCR 擴增來製備 (野生型 FGF21 表現載體之構造描述於實例 1 中)。如本文 (例如實

例6中)所述產生融合蛋白。

表 16

聚集減少性FGF21突變體

突變	Fc	連接子
A26E		
A26K		
A26R		
A45E		
A45K		
A45K	-NH ₂	15
A45R	-NH ₂	15
A45Q	-NH ₂	15
A45T	-NH ₂	15
A45K、L98R	-NH ₂	15
L52T		
L58C		
L58E		
L58G		
L58S		
P60A		
P60E		
P60K		
P60R		
P78A		
P78C		
P78H		
P78R		
L86C		
L86T		
F88A		
F88E		
F88K		
F88R		
F88S		
L98C		
L98E	-NH ₂	15
L98K	-NH ₂	15
L98Q	-NH ₂	15
L98R		
L98R	-NH ₂	15
L99C		
L99D		
L99E		
L99R		
A111K	-NH ₂	15

A111T		
A129D		
A129E	-NH ₂	15
A129H	-NH ₂	15
A129K		
A129N	-NH ₂	15
A129R	-NH ₂	15
A129Q		
A134E		
A134H	-NH ₂	15
A134K		
A134Y		

藉由尺寸大小排阻層析法 (SEC) 來檢定包括野生型 FGF21、經截短 FGF21 多肽、FGF21 突變體及 FGF21 融合蛋白之各種 FGF21 蛋白之聚集。使待分析之樣品在 4℃、室溫或 37℃ 下培育歷時多個時間點，且接著經受 SEC 分析。用裝備有 SEC 管柱之 Beckman HPLC 系統進行實驗。對於野生型 FGF21 而言，將 TOSOHAAS TSK-Gel G2000 SEC 管柱與作為移動相之含有 2% 異丙醇之 2×PBS 一起使用。對於 FGF21 Fc 融合蛋白及 FGF21 突變體多肽而言，將 TOSOHAAS TSK-Gel G3000 SEC 管柱與作為移動相之 2×PBS 一起使用。

實例 17

聚集減少性 FGF21 突變體之活體外活性

進行實驗以鑑別在 ELK-螢光素酶活體外檢定中保留野生型 FGF21 活性之聚集減少性突變體。如實例 4 中所述進行 ELK-螢光素酶檢定。圖 24A-圖 24C 展示對 FGF21 突變體 FGF21 L99R、FGF21 L99D 及 FGF21 A111T (圖 24A)；FGF21 突變體 FGF21 A129D、FGF21 A129Q 及 FGF21 A134K (圖 24B)；及 FGF21 突變體 FGF21 A134Y、FGF21

A134E及FGF21 A129K(圖 24C)所進行之ELK-螢光素酶活性檢定的結果。此等實驗之結果表明一些聚集減少性突變並未不利地影響如在ELK-螢光素酶檢定中所檢定之FGF21活性。

實例 18

展示較長半衰期及較低程度聚集之Fc(15)FGF21組合突變體的製備及表現

製備含有展示藉由破壞蛋白水解降解而減低聚集以及增加半衰期之突變的多種FGF21組合突變體且將其與IgG1 Fc分子結合。此等FGF21突變體係基本上如實例11中所述製備。

實例 19

展示較長半衰期及較低程度聚集之Fc(15)FGF21突變體的活體外研究

進行實驗以鑑別在ELK-螢光素酶活體外檢定中保留野生型FGF21活性之FGF21組合突變體。如實例4中所述進行ELK-螢光素酶檢定。

圖 25A-圖 25D展示對Fc-FGF21突變體Fc-FGF21 P171G、Fc-FGF21 P171S及Fc-FGF21 P171T(圖 25A)；Fc-FGF21突變體Fc-FGF21 P171Y、Fc-FGF21 P171W及Fc-FGF21 P171C(圖 25B)；Fc(15)FGF21、Fc(15)FGF21 A45K/G170E及FGF21 A45K(圖 25C)；及Fc(15)FGF21、Fc(15)FGF21 P171E及Fc(15)FGF21 A45K/G170E(圖 25D)所進行之ELK-螢光素酶活性檢定的結果。此等實驗之結果表明旨在改良

穩定性或改良穩定性與溶解性之突變並不損害活體外活性(與野生型Fc-FGF21相比)。有趣地，FGF21 A45K突變體展示相對於野生型Fc-FGF21改良之效能。

圖 26A 展示對於 FGF21 對照 (WT) 及 FGF21 A45K 而言在 4°C 下將 65 mg/mL 蛋白質培育 1 日、2 日及 4 日之後的聚集百分比之變化。該等資料指示：與野生型蛋白質相比，A45K 突變導致蛋白質之聚集降低。

圖 26B 展示對於 FGF21 對照 (WT) 及 FGF21 P78C、P78R、L86T、L86R、L98C、L98R、A111T、A129D、A129Q、A129K、A134K、A134Y 及 A134E 而言在 4°C 下將 65 mg/mL 蛋白質培育 1 日、6 日及 10 日之後的聚集百分比之變化。該等資料指示：與野生型蛋白質相比，L86R、L98C、L98R、A111T、A129Q 及 A129K 導致蛋白質之聚集降低。

圖 27 展示對人類 FGF21 對照及 FGF21 突變體 FGF21 A45K、FGF21 L52T 及 FGF21 L58E 所進行之 ELK-螢光素酶活性檢定之結果。此實驗證實 FGF21 A45K 突變體保留野生型 FGF21 之全部功效且展現甚至大於野生型 FGF21 之效能。然而，FGF21 L52T 及 FGF21 L58E 突變體展示與野生型 FGF21 相比減低之效能及功效。

圖 28A-圖 28B 展示 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 6-181/G170E、Fc(15)FGF21 A45K/G170E、Fc(15)FGF21 P171E、Fc(15)FGF21 P171A、Fc(15)FGF21 G170E 及 FGF21 對照在 4°C 下培育 1 日、4 日及 8 日之後的聚集程度之變化。此實驗表明：在 8 天時期內，與 Fc(15)FGF21 G170E

用本文所述之技術將其檢定。表19概述活體外ELK螢光素酶檢定之結果。

合適胺基酸蓋長度可在1與15個胺基酸之間，例如長度為1、2、3、4、5、10或15個胺基酸。任何數目及類型之胺基酸均可用作蓋，例如單個脯胺酸殘基及單個甘胺酸殘基、2個甘胺酸殘基、5個甘胺酸殘基，以及其他組合。本實例及表19中提供蓋之其他實例。

另外，為處理胺基酸殘基178及179之明顯蛋白酶攻擊，研究位置179、180及181之胺基酸殘基的突變。此外，製備包括表19中所呈現之構築體的多種構築體，且使用本文所述之技術將其檢定。亦研究蓋及突變之組合在此等位點之影響。表19概述製備且在活體外ELK-螢光素酶檢定中研究之例示性構築體，該過程係如本文所述進行。與本文所用之術語一致，hFc意謂人類Fc序列（亦即SEQ ID NO:13），L15係指具有15個殘基之連接子（亦即，SEQ ID NO:23）。

表 19

包含C末端修飾之FGF21多肽之功效及EC50值

構築體	功效	EC50(nM)
huFGF21	0.4	100.0%
hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G)	2.5	76.1%
hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、Y179F)	2.6	78.3%
hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、I-180)		
hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、I-179)	7.8	77.4%
hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、A180E)	1.9	79.6%
hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、S181K)	130	87.9%
GSGSGSGSGS.hFGF21.L15.hFc		
MKEDD.hFGF21.L15.hFc	834	83.1%

樣且將其用以量測葡萄糖、胰島素、甘油三酯含量以及測試化合物之含量。亦在3週洗脫期內每週採集血樣。

基線 OGTT1及 OGTT2展示如正常動物可見之預期葡萄糖概況(其中最大血漿葡萄糖在30分鐘時獲得)，且證實3個不同組之穩定AUC。

血漿化學之空腹基線值展示於表20中。對在治療起始之前所採集之血樣進行血漿化學量測。

表 20

三組恆河猴之體重、空腹血漿葡萄糖、胰島素及甘油三酯含量之基線值

	媒劑	FGF21	Fc-FGF21(RG)
N	10	10	10
體重(kg)	8.5 ± 0.5	8.7 ± 0.4	8.5 ± 0.4
血漿葡萄糖(mg/dL)	91.9 ± 4.8	94.8 ± 5.3	82.2 ± 3.7
胰島素(pg/mL)	942.6 ± 121.4	976.1 ± 107.7	1023.4 ± 205.1
甘油三酯(mg/dL)	44.4 ± 4.8	58.6 ± 5.2	71.7 ± 9.8

選擇3種不同劑量水準，分別對於FGF21及Fc-FGF21(RG)而言，低劑量為0.1 mg/kg及0.3 mg/kg，中劑量為0.3 mg/kg及1 mg/kg且高劑量為1 mg/kg及5 mg/kg。劑量水準係基於小鼠中所觀測到之劑量-反應進行選擇，其中給藥方案基於在人類中之預期注射頻率。對於低劑量及中劑量而言使用等莫耳劑量之FGF21，且將Fc-FGF21(RG)高劑量升至5 mg/kg(亦即並非3 mg/kg，其與1 mg/kg FGF21劑量等莫耳)。

22.2測試化合物對體重之影響

在此實驗中，為量測測試化合物對每週所量測之體重的

影響，在3個不同恆河猴組中每週計算與基線相比之體重變化百分比。在3週之洗脫期內亦量測體重。表20中包括每一組之基線體重值。

在整個研究中，在測試化合物投與前與投與後追蹤體重。如圖39中所示，媒劑動物之體重與基線相比之變化百分比隨時間而增加，而用Fc-FGF21(RG)及FGF21治療之動物的體重在6週治療期之過程內以劑量依賴性方式降低。如先前在齧齒動物中所觀測(Xu等人，*Diabetes* 58(1):250-9 (2009))，用FGF21治療在統計上顯著降低體重。Fc-FGF21(RG)具有比FGF21大的暴露(分別為圖48及圖47)，其為以下觀測結果提供可能的解釋：Fc-FGF21(RG)展示比FGF21更明顯的體重降低。

22.3.測試化合物對胰島素含量之影響

在隔夜禁食之後或在下午進食之後所採集之血樣中量測胰島素含量。

每週在用媒劑、FGF21或Fc-FGF21(RG)治療之動物中及在3週洗脫期內量測恆河猴中的空腹血漿胰島素含量。在最後Fc-FGF21(RG)注射之後約5日及在最後FGF21注射之後約21小時抽取空腹血樣。

在高劑量治療期間在用媒劑或FGF21治療之第5週及第6週內量測恆河猴中之飽食血漿胰島素含量。在Fc-FGF21(RG)注射之後約3日及在最後FGF21注射之後約2小時抽取飽食血樣。圖40展示在全部9週研究內媒劑、FGF21及Fc-FGF21(RG)對空腹胰島素含量之影響，而圖41

描述由在第5週及第6週期間所獲取之樣品測定的飽食胰島素含量。

概括地說，在兩個最高劑量下，FGF21與Fc-FGF21(RG)在統計上顯著降低空腹血漿胰島素含量及飽食血漿胰島素含量。用FGF21及Fc-FGF21(RG)治療之動物的胰島素含量降低而未觀測到葡萄糖含量增加的觀測結果指示胰島素敏感性增加。

22.4 測試化合物對 OGTT(葡萄糖及胰島素)之影響

在治療起始之後進行三次 OGTT(OGTT3、OGTT4 及 OGTT5)。在用媒劑、FGF21 或 Fc-FGF21(RG)治療 6 週(對應於高劑量遞增方案之最後兩週)之動物中量測 OGTT5 葡萄糖及胰島素含量概況。在最後 Fc-FGF21(RG)注射之後約 7 日及在最後 FGF21 注射之後約 21 小時進行 OGTT5。OGTT5 葡萄糖及胰島素概況分別展示於圖 42 及圖 43 中。如圖 42 所示，僅在最高劑量及在最後量測時間點與經媒劑治療之動物相比，用 Fc-FGF21(RG)治療之動物展示改良之葡萄糖清除率。在最後給藥結束時，Fc-FGF21(RG)展示最強的葡萄糖清除率改良。FGF21 展示無葡萄糖清除率之改良。Fc-FGF21(RG)具有比 FGF21 大的暴露(分別為圖 48 及圖 47)，其為以下觀測結果提供可能的解釋：Fc-FGF21(RG)展示比 FGF21 更明顯的葡萄糖清除率影響。與用媒劑治療之動物相比，在用 Fc-FGF21(RG)治療之動物中所量測之最後時間點，OGTT5 期間之胰島素含量在統計上顯著降低。

如圖 44 中所示，關於在三組不同恆河猴組中在低劑量、

中劑量及高劑量之每一者結束時進行的三次 OGTT (OGTT3、OGTT4及OGTT5)來計算葡萄糖AUC與基線相比之變化百分比。OGTT5係在最後Fc-FGF21(RG)注射之後約7天及在最後FGF21注射之後21小時進行且展示Fc-FGF21(RG)在統計上顯著減低AUC5。各組之基線OGTT值展示於圖38C中。

空腹血漿葡萄糖含量係於未進行OGTT之日量測。在三組動物中在所量測之空腹血漿葡萄糖含量中未觀測到有意義之統計學差異。

22.5測試化合物對甘油三酯含量之影響

每週在用媒劑、FGF21或Fc-FGF21(RG)治療之動物中及在3週洗脫期內計算恆河猴中之空腹血漿甘油三酯含量變化百分比。在最後Fc-FGF21(RG)注射之後約5日及在最後FGF21注射之後約21小時抽取空腹血樣。在治療起始之後每週量測甘油三酯含量且與基線相比之變化百分比展示於圖45中，空腹基線值展示於表20中。

如圖45中所述，用Fc-FGF21(RG)或FGF21治療之動物展示甘油三酯含量之劑量依賴性降低，其中Fc-FGF21(RG)具有與FGF21相比最大的降低作用。

圖46展示在用媒劑或Fc-FGF21(RG)或FGF21治療之第5週及第6週期間獲自飽食狀態之恆河猴的樣品中之血漿甘油三酯含量。在最後Fc-FGF21(RG)注射之後約3日及在最後FGF21注射之後約2小時抽取飽食血樣。與用媒劑治療之動物的甘油三酯含量相比，用FGF21及Fc-FGF21(RG)治

療之動物的飽食血漿甘油三酯含量在統計上顯著減低(圖46)。

22.6 測試化合物之濃度

在整個研究時期中分析以大約等莫耳劑量水準所投與之測試化合物之暴露。在給藥前及在最後注射之後約5日量測Fc-FGF21(RG)之濃度。在給藥前及在5日、12日、19日及26日量測FGF21含量。在最後注射之後約21小時時抽取血樣。

每一猴子中測試化合物之個別濃度展示於圖47及圖48中。如圖47中所示，FGF21治療組中之大多數動物具有低於定量限度之濃度。圖48展示Fc-FGF21(RG)治療組中之動物在每一給藥階段(以相同劑量強度之兩次每週給藥)中具有可偵測含量之Fc-FGF21(RG)。對於Fc-FGF21(RG)而言，每一給藥階段之平均濃度大約與劑量成比例地自0.3 mg/kg增加至5 mg/kg。對於兩種化合物而言，在第一及第二每週給藥之後在每一劑量遞增階段內存在如由穩定濃度所證實之少量積聚。在無治療階段(洗脫期)中，Fc-FGF21(RG)含量直至約第47日(最後給藥後12日)均可偵測且隨後低於定量下限(LLOQ)。

在各OGTT期間亦監測測試化合物之暴露。在低劑量及中劑量FGF21治療之後，在OGTT3及OGTT4期間不可偵測到FGF21。然而，在高劑量治療之後，在OGTT5期間觀測到可量測含量。如圖49中所示，在具有遞增劑量水準之第3 OGTT至第5 OGTT中觀測到Fc-FGF21(RG)含量的劑量成

比例性增加。

化合物含量資料證實動物係以劑量遞增方式暴露於預期量之每一化合物(亦即FGF21及Fc-FGF21(RG))中。觀測到所量測之FGF21量具有大的可變性，此為考慮到取樣係在最後給藥之後約21小時進行且FGF21之半衰期為約1小時的預期結果。

22.7 結論

FGF21在最高劑量下降低空腹及飽食血漿甘油三酯及胰島素含量且降低體重。Fc-FGF21(RG)在最高劑量下改良OGTT且降低胰島素含量，且劑量依賴性地降低降低空腹及飽食血漿甘油三酯含量以及體重。在非糖尿病性恆河猴中，FGF21與Fc-FGF21(RG)均降低許多代謝參數。在飽食條件下，當循環化合物含量在類似範圍內時，FGF21與Fc-FGF21(RG)之間的胰島素及甘油三酯含量降低一致。由於其改良之特性，故Fc-FGF21(RG)在大多數所量測之參數上優於FGF21，且可一週一次投與以觀測對代謝參數之功效。

儘管已根據多個實施例描述本發明，但應瞭解對於熟習此項技術者仍存在變化及修改。因此，希望隨附申請專利範圍涵蓋在所主張之本發明範疇內的所有該等等效變化。此外，本文所用之分節標題係僅出於組織性目的且不應視為限制所述標的物。

本申請案中所引用之所有參考文獻均明確地以引用的方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖 1A-圖 1B 展示對 FGF21 截短突變體 7-181 及 8-181(圖 1A) 及 FGF21 截短突變體 1-172、1-171、1-169 及 1-164(圖 1B) 進行之 ELK-螢光素酶活性檢定之結果；各圖展示針對人類 FGF21 對照所獲得之結果；

圖 2 展示對人類 FGF21 對照及 FGF21 截短突變體 3-181、4-181、5-181、7-181、8-181、1-180、1-178、1-177、1-176、1-175、1-174、1-173、1-172、9-181 及 1-149 進行之 ELK-螢光素酶活性檢定之結果；

圖 3 展示注射有 PBS(實心條)、人類 FGF21 對照(空心條)或 FGF21 截短突變體 8-181(灰色條)及 9-181(點畫條)之小鼠中所量測之血糖含量；

圖 4 展示注射有 PBS(實心圓)、Fc-FGF21 對照(WT)(空心圓)或包含胺基酸殘基 5-181 之經截短 Fc-FGF21 融合蛋白(實心三角形)或包含胺基酸殘基 7-181 之經截短 Fc-FGF21 融合蛋白(空心三角形)的小鼠中所量測之血糖含量變化百分比；

圖 5 展示注射有 PBS(實心圓)、FGF21-Fc 對照(WT)(空心圓)、包含殘基 1-175 之經截短 FGF21-Fc 融合蛋白(實心三角形)或包含胺基酸殘基 1-171 之經截短 Fc-FGF21 蛋白(空心三角形)的小鼠中所量測之血糖含量變化百分比；

圖 6A-圖 6D 展示人類 Fc(5)FGF21 對照樣品(圖 6A)及在注射之後 6 小時自小鼠抽取之 Fc(5)FGF21 之樣品(樣品 D6；圖 6B)、在注射之後 24 小時自小鼠抽取之 Fc(5)FGF21 之樣品

圖 12 展示注射有 PBS(實心圓)、Fc(15)FGF21(空心圓)或 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 G170E(實心三角形)、Fc(15)FGF21 P171A(空心三角形)、Fc(15)FGF21 S172L(實心菱形)、Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L(空心菱形)或 Fc(15)FGF21 G151A(實心正方形)之小鼠中所量測之血糖含量變化百分比；

圖 13 展示注射有 PBS(實心條)、Fc(15)FGF21(空心條)或 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V(灰色條)、Fc(15)FGF21 G170E(空心對角交叉影線條)、Fc(15)FGF21 G170E/P171A(灰色對角交叉影線條)或 Fc(15)FGF21 G170E/S172L(空心對角交叉影線條)之小鼠中所量測之血糖含量；

圖 14 展示注射有 PBS(實心正方形)、Fc(15)FGF21(空心正方形)或 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 P150A/G151A/I152V(實體倒三角形)、Fc(15)FGF21 G170E(空心倒三角形)、Fc(15)FGF21 G170E/P171A(實心圓)或 Fc(15)FGF21 G170E/S172L(空心圓)之小鼠中所量測之血糖含量變化百分比；

圖 15 展示注射有 PBS(實心條)或 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 G170E(空心條)、Fc(15)FGF21 G170A(灰色條)、Fc(15)FGF21 G170C(空心交叉影線條)、Fc(15)FGF21 G170D(灰色及白色條)、Fc(15)FGF21 G170N(實心交叉影線條)或 Fc(15)FGF21 G170S(空心交叉影線條)之小鼠中所量測之血糖含量；

圖 16 展示注射有 PBS(實心圓)或 Fc(15)FGF21 突變體

Fc(15)FGF21 G170E(空心圓)、Fc(15)FGF21 G170A(實心三角形)、Fc(15)FGF21 G170C(空心三角形)、Fc(15)FGF21 G170D(實心菱形)、Fc(15)FGF21 G170N(空心菱形)或Fc(16)FGF21 G170S(實心倒三角形)之小鼠中所量測之血糖含量變化百分比；

圖 17 展示注射有 PBS(實心條)或 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 G170E(空心條)、Fc(15)FGF21 P171E(灰色條)、Fc(15)FGF21 P171H(實心交叉影線條)、Fc(15)FGF21 P171Q(空心交叉影線條)、Fc(15)FGF21 P171T(點畫條)或 Fc(15)FGF21 P171Y(灰色交叉影線條)之小鼠中所量測之血糖含量；

圖 18 展示注射有 PBS(實心圓)或 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 G170E(空心圓)、Fc(15)FGF21 P171E(實心三角形)、Fc(15)FGF21 P171H(空心三角形)、Fc(15)FGF21 P171Q(實心菱形)、Fc(15)FGF21 P171T(空心菱形)或 Fc(18)FGF21 P171Y(實心正方形)之小鼠中所量測之血糖含量變化百分比；

圖 19A-圖 19D 展示 Fc(15)FGF21 對照樣品(圖 19A)及在注射之後 6 小時(圖 19B)、24 小時(圖 19C)及 48 小時(圖 19D)自小鼠所抽取之樣品之 LC-MS 分析的結果；

圖 20A-圖 20D 展示 Fc(15)FGF21 G170E 對照樣品(圖 20A)及在注射之後 6 小時(圖 20B)、24 小時(圖 20C)及 48 小時(圖 20D)自小鼠所抽取之 Fc(15)FGF21 G170E 之樣品的 LC-MS 分析之結果；

P171E及Fc(15)FGF21 A45K/G170E(圖 25D)所進行之ELK-螢光素酶活性檢定之結果；各圖展示針對人類FGF21對照所獲得之結果；

圖 26A-圖 26B展示野生型成熟FGF21及多種FGF21突變體之作為時間之函數的聚集；圖 26A展示在65 mg/mL蛋白質在4°C下培育1日、2日及4日之後FGF21對照(WT，實心菱形)及FGF21 A45K(實心圓)之聚集百分比之變化，而圖 26B展示在65 mg/mL蛋白質在4°C下培育1日、6日及10日之後FGF21對照(WT)及FGF21 P78C、P78R、L86T、L86R、L98C、L98R、A111T、A129D、A129Q、A129K、A134K、A134Y及A134E(所有皆標記於圖上)之聚集百分比之變化；

圖 27展示對人類FGF21對照及FGF21突變體FGF21 A45K、FGF21 L52T及FGF21 L58E所進行之ELK-螢光素酶活性檢定之結果；

圖 28A為展示在4°C下培育1日、4日及8日之後Fc(15)FGF21突變體Fc(15)FGF21 6-181/G170E(實心菱形)、Fc(15)FGF21 A45K/G170E(空心正方形)、Fc(15)FGF21 P171E(實心三角形)、Fc(15)FGF21 P171A(交叉十字形)、Fc(15)FGF21 G170E(空心三角形)及FGF21對照(實心圓)之聚集程度變化之圖，且圖 28B為亦展示培育結果之條形圖；

圖 29展示注射有PBS(媒劑)(實心圓)或Fc(15)FGF21突變體Fc(15)FGF21 A45K/G170E(空心圓)、Fc(15)FGF21 A45K/P171G(實心三角形)或Fc(15)FGF21 L98R/P171G(空

畫條7、點畫條8及點畫條9對應於洗脫期中之第7週-第9週；

圖40為展示在恆河猴中媒劑、FGF21及Fc-FGF21(RG)對空腹胰島素含量造成之空腹胰島素相對於基線之變化百分比的圖；陰影條1及陰影條2對應於低劑量之第1週及第2週，空心條3及空心條4對應於中劑量之第3週及第4週，實心條5及實心條6對應於高劑量之第5週及第6週且點畫條7及點畫條8對應於洗脫期中之第7週及第8週；

圖41為展示媒劑、FGF21及Fc-FGF21(RG)(假定在高劑量下)對在研究之第5週及第6週期間獲得之恆河猴的飽食胰島素含量之影響的圖；實心條對應於第5週且陰影條對應於第6週；

圖42為展示在兩週高劑量Fc-FGF21(RG)治療結束時所進行之OGTT5之葡萄糖概況的圖；實心圓、實線對應於媒劑，空心正方形、點線對應於FGF21且實心三角形、實線對應於Fc-FGF21(RG)；

圖43為展示在兩週高劑量Fc-FGF21(RG)治療結束時所進行之OGTT5之胰島素概況的圖；實心圓、實線對應於媒劑，空心正方形、點線對應於FGF21且實心三角形、實線對應於Fc-FGF21(RG)；

圖44為展示在恆河猴之每一劑量時期(低劑量、中劑量及高劑量)結束時所測定之葡萄糖OGTT AUC1-3的圖；空心條對應於在OGTT3期間根據葡萄糖量測結果所計算之AUC3，實心條對應於在OGTT4期間根據葡萄糖量測結果

[S]

所計算之AUC4且陰影條對應於在OGTT5期間根據葡萄糖量測結果所計算之AUC5；

圖45為展示媒劑、FGF21、Fc-FGF21(RG)對各恆河猴組之空腹血漿甘油三酯含量與基線相比之變化百分比之影響的圖；陰影條1及陰影條2對應於低劑量之第1週及第2週，空心條3及空心條4對應於中劑量之第3週及第4週，實心條5及實心條6對應於高劑量之第5週及第6週且點畫條7、點畫條8及點畫條9對應於洗脫期內之第7週-第9週；

圖46為展示如在高劑量下用媒劑、FGF21或Fc-FGF21(RG)治療之第5週及第6週期間所量測之各恆河猴組的飽食血漿甘油三酯含量之圖；陰影條對應於第5週且實心條對應於第6週；

圖47為展示在給藥前及在5日、12日、19日及26日所量測之個別猴FGF21含量之圖，其中樣品在每次注射之後約21小時時獲得；

圖48為展示在給藥前及在5日、12日、19日及26日所量測之個別猴Fc-FGF21(RG)含量之圖，其中樣品在每次注射之後約5日時獲得；及

圖49為展示由在每一低劑量、中劑量及高劑量之後所進行之三次OGTT所量測的FGF21及Fc-FGF21(RG)含量之平均濃度的圖；陰影條對應於在低劑量下之OGTT3，實心條對應於在中劑量下之OGTT4且空心條對應於在高劑量下之OGTT5。

發明專利說明書**公告本**

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98118662

A61K 38/18 (2006.01)

※申請日：98.6.4

※IPC 分類：C07K 14/50 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

FGF21突變體及其用途

A61P 3/00 (2006.01)

FGF21 MUTANTS AND USES THEREOF

A61P 3/04 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明提供編碼 FGF21 突變體多肽之核酸分子，FGF21 突變體多肽，包含 FGF21 突變體多肽之醫藥組合物，及使用該等核酸、多肽或醫藥組合物治療代謝病症之方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides nucleic acid molecules encoding FGF21 mutant polypeptides, FGF21 mutant polypeptides, pharmaceutical compositions comprising FGF21 mutant polypeptides, and methods for treating metabolic disorders using such nucleic acids, polypeptides, or pharmaceutical compositions.

八、圖式：

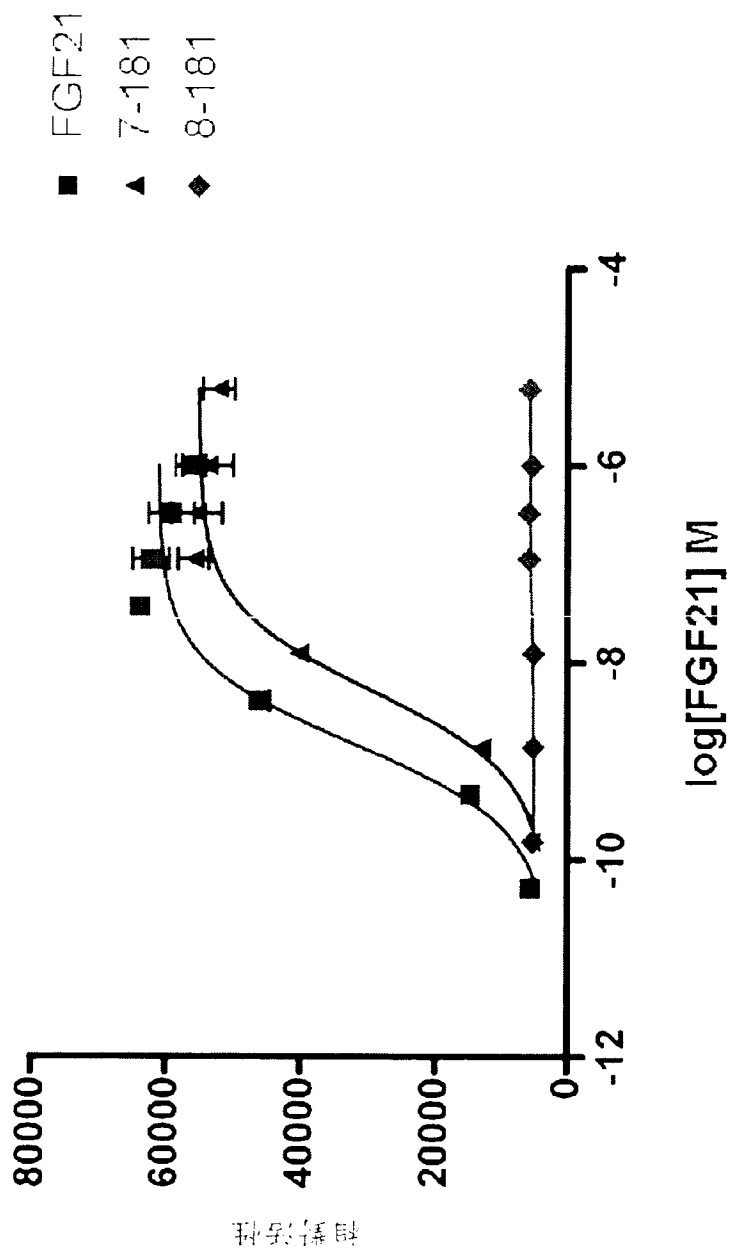


圖 1A

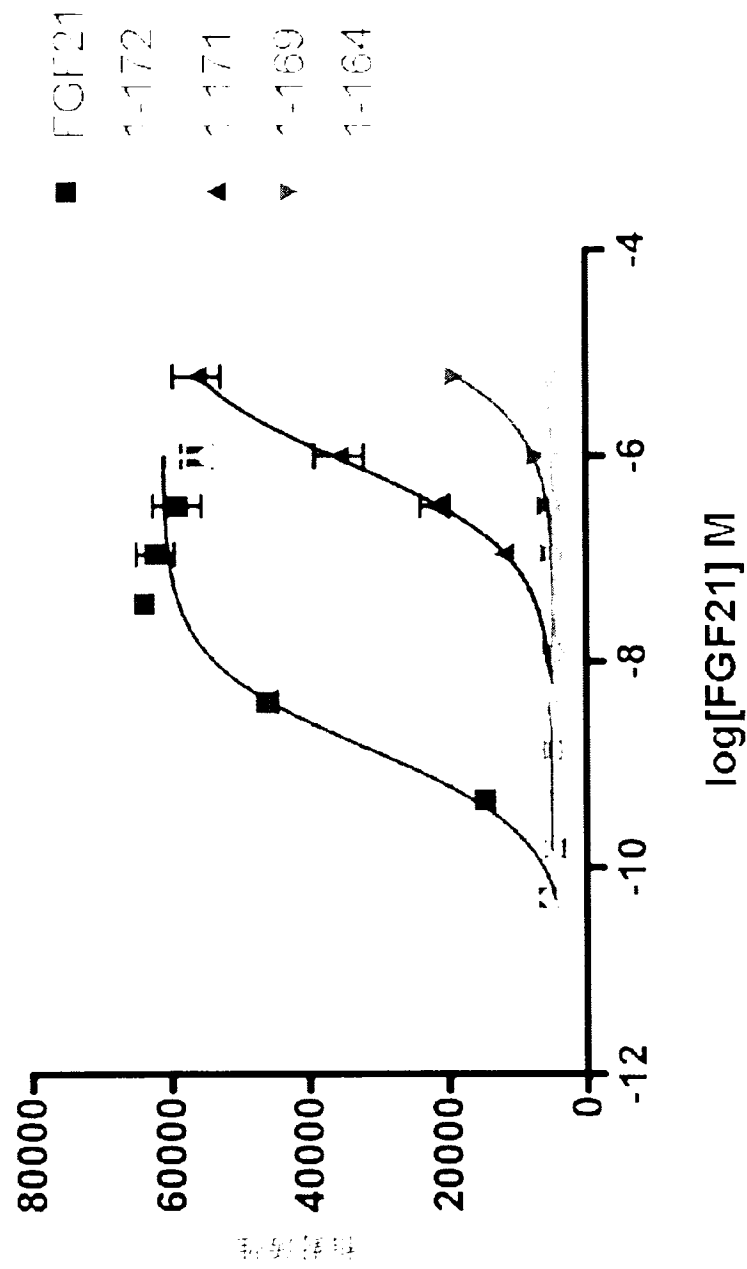


图 1B

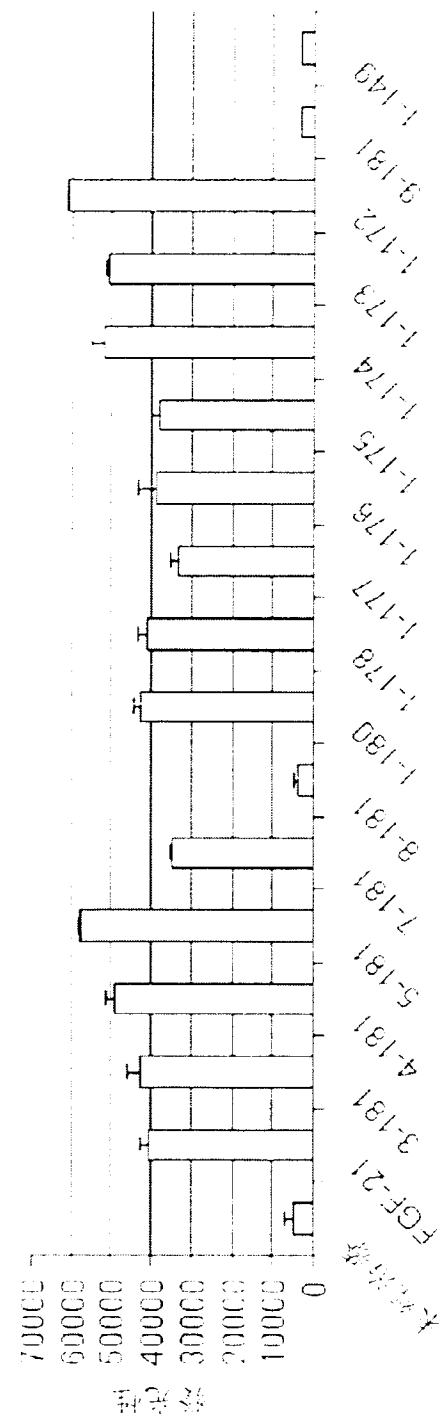


図2

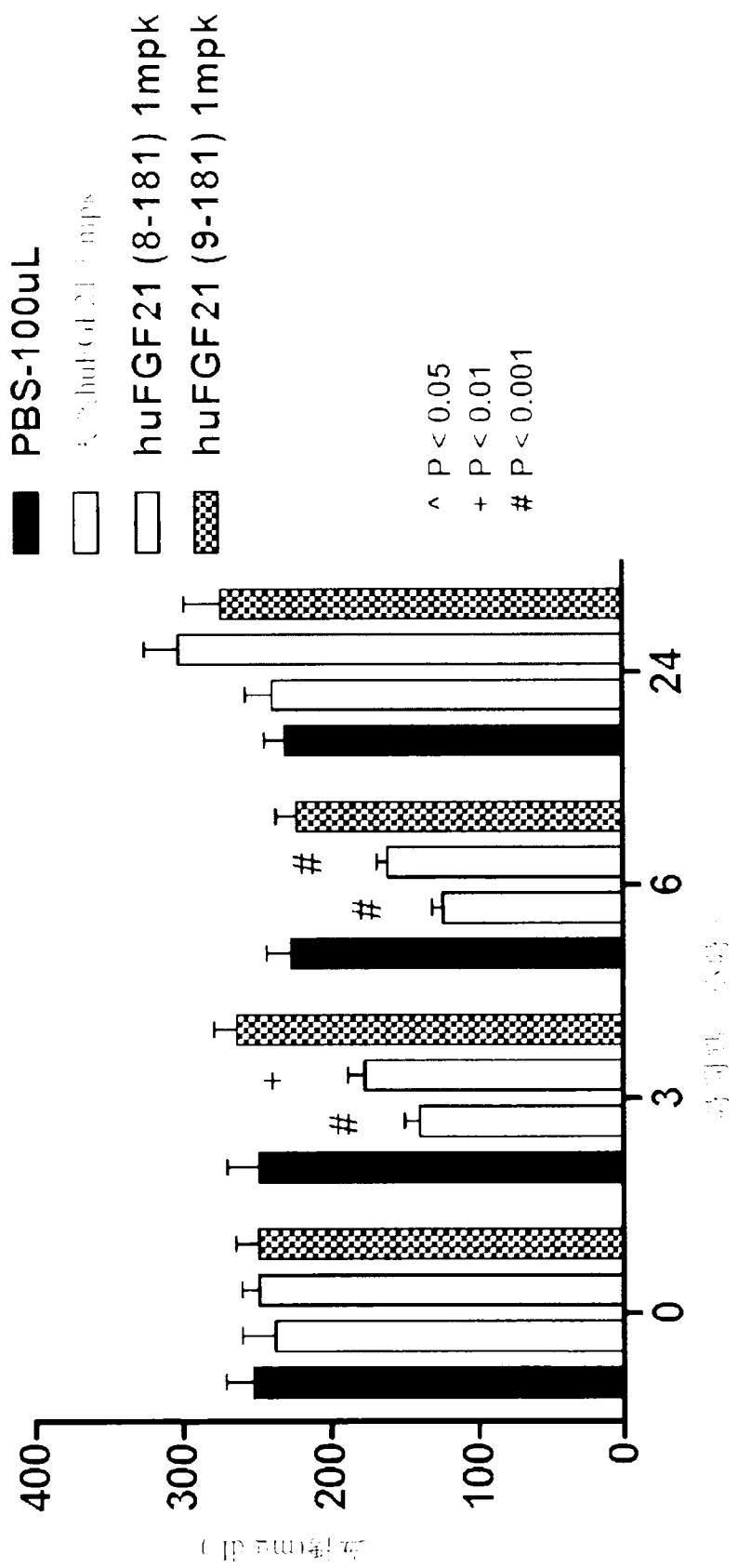


圖3

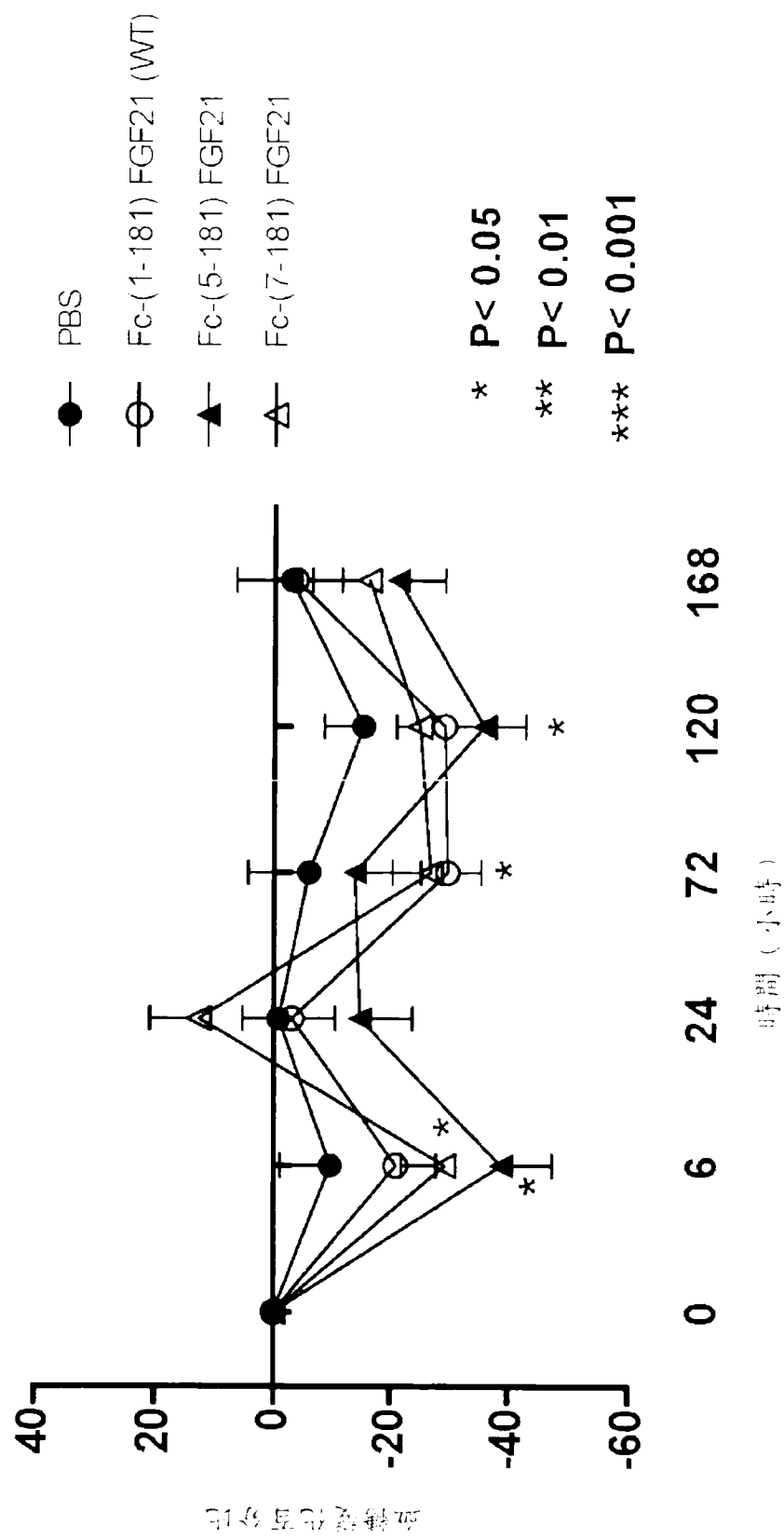


圖4

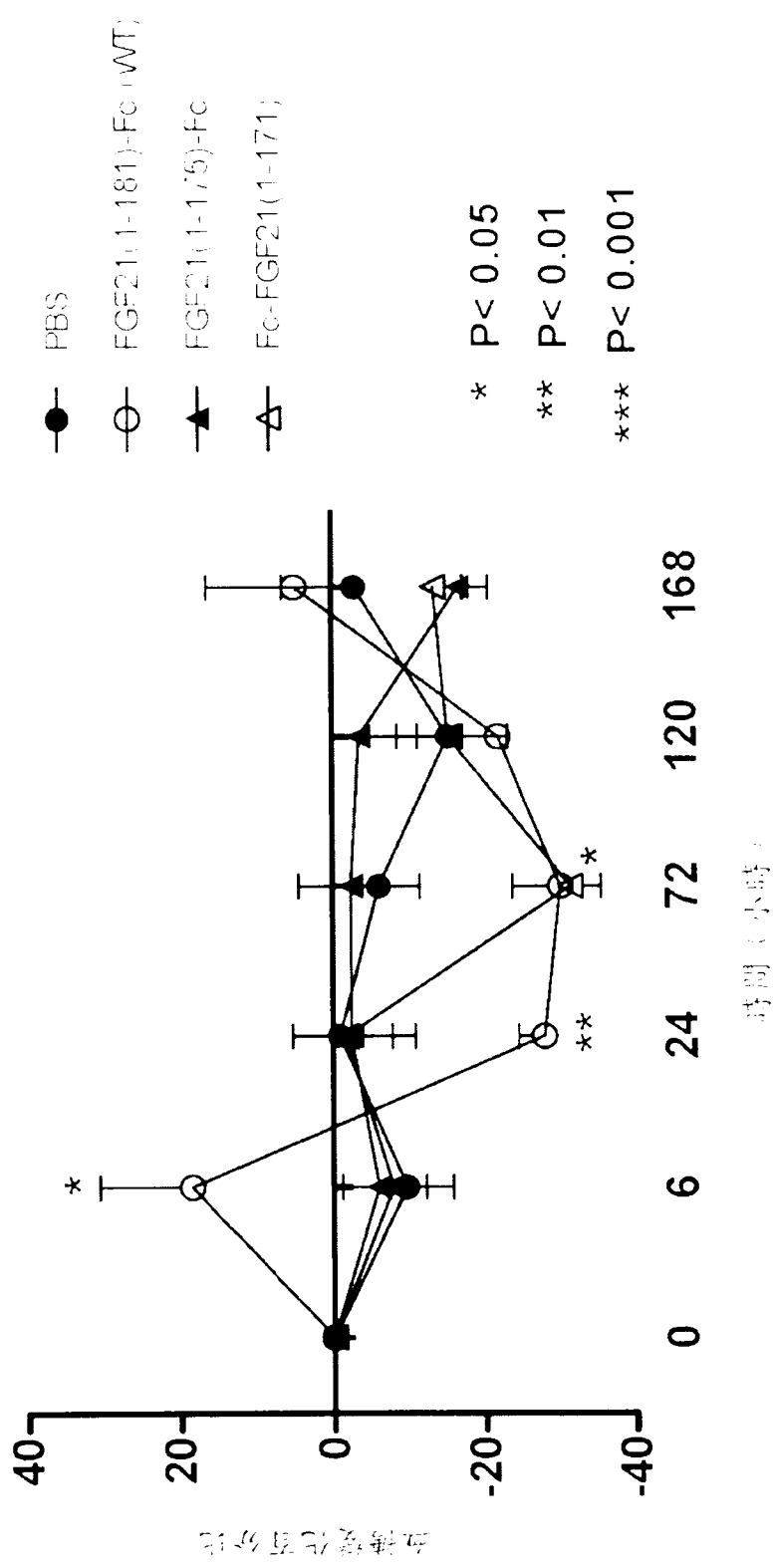


圖5

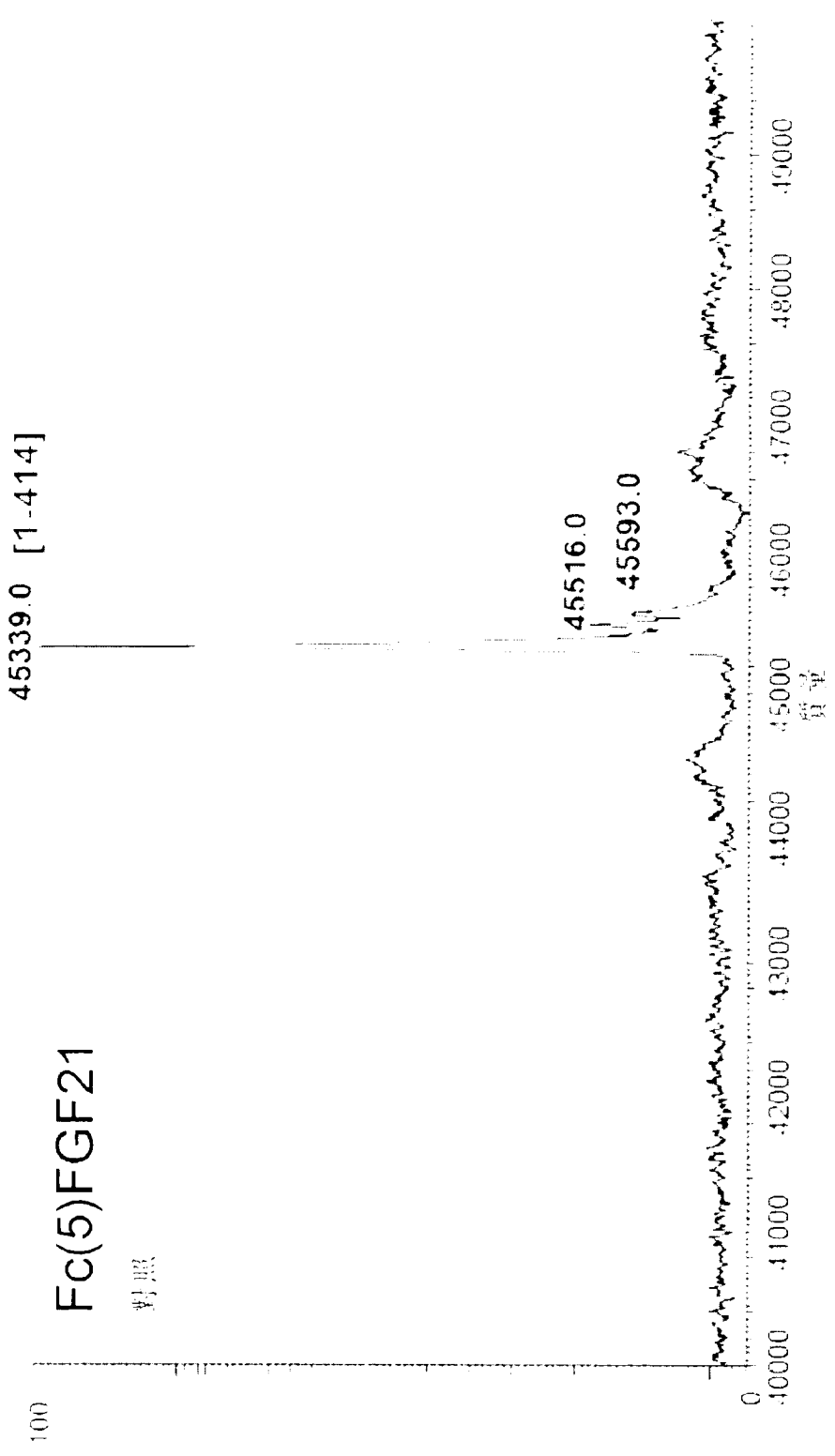


圖6A

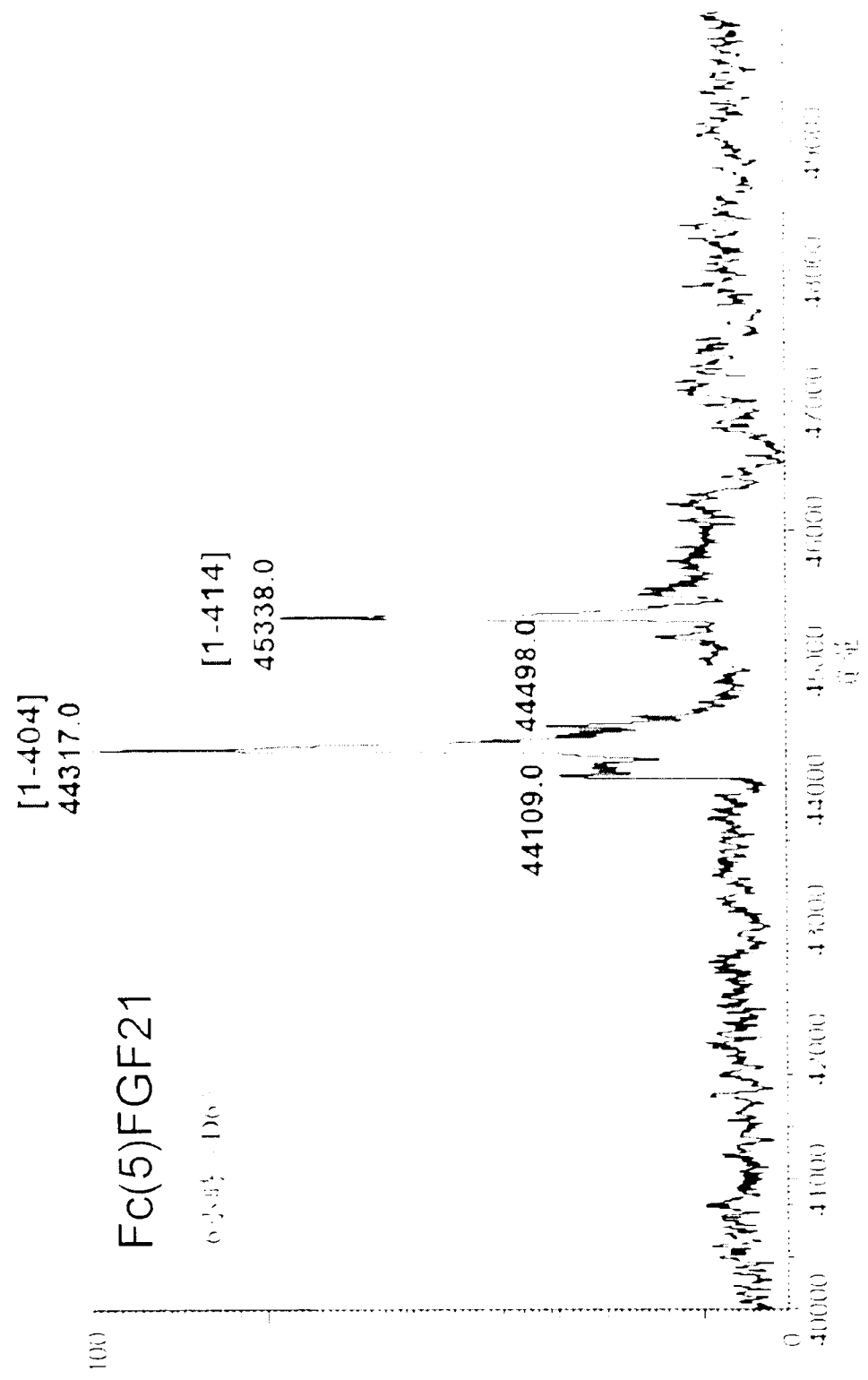


圖 6B

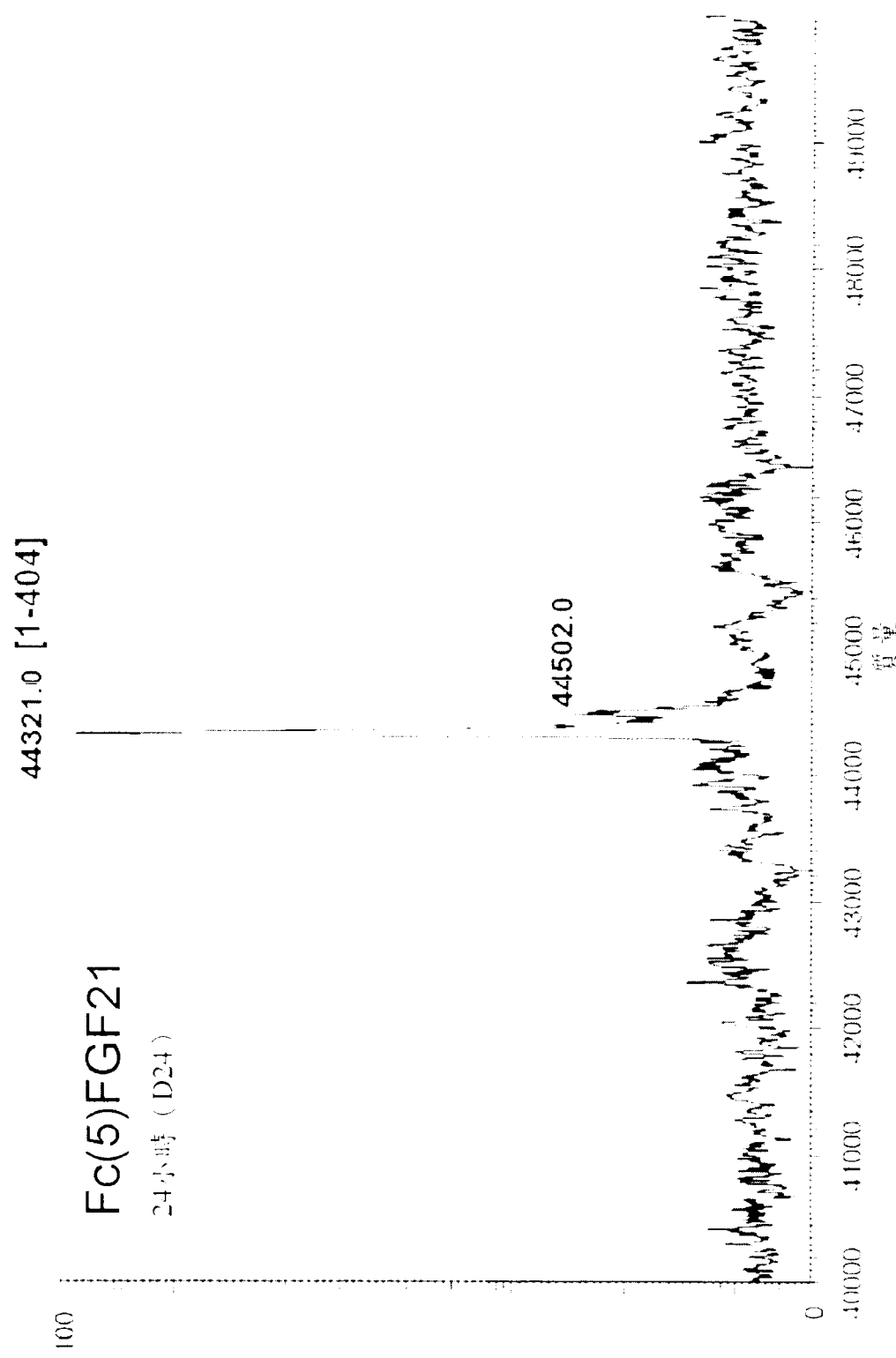


圖6C

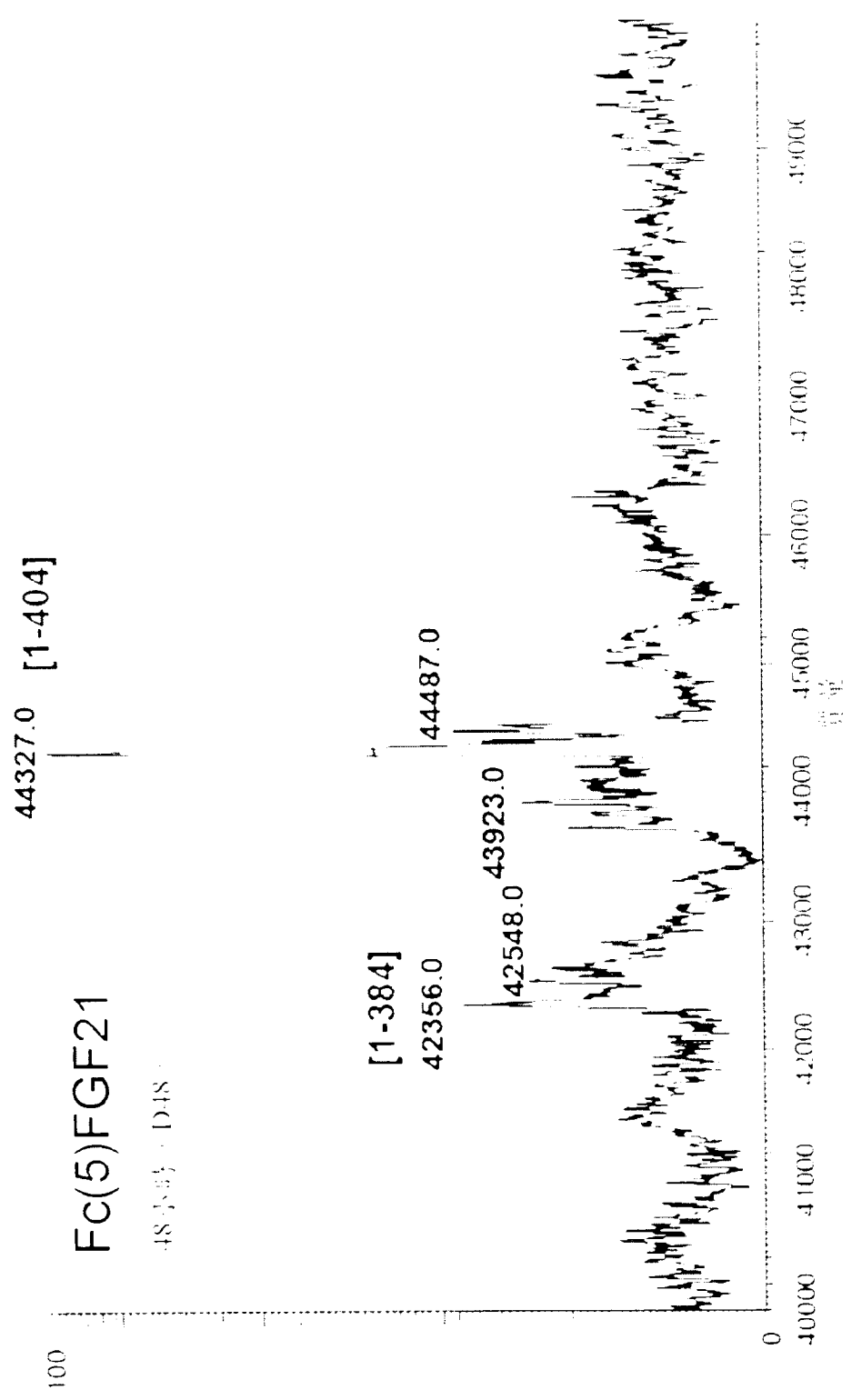


圖 6D

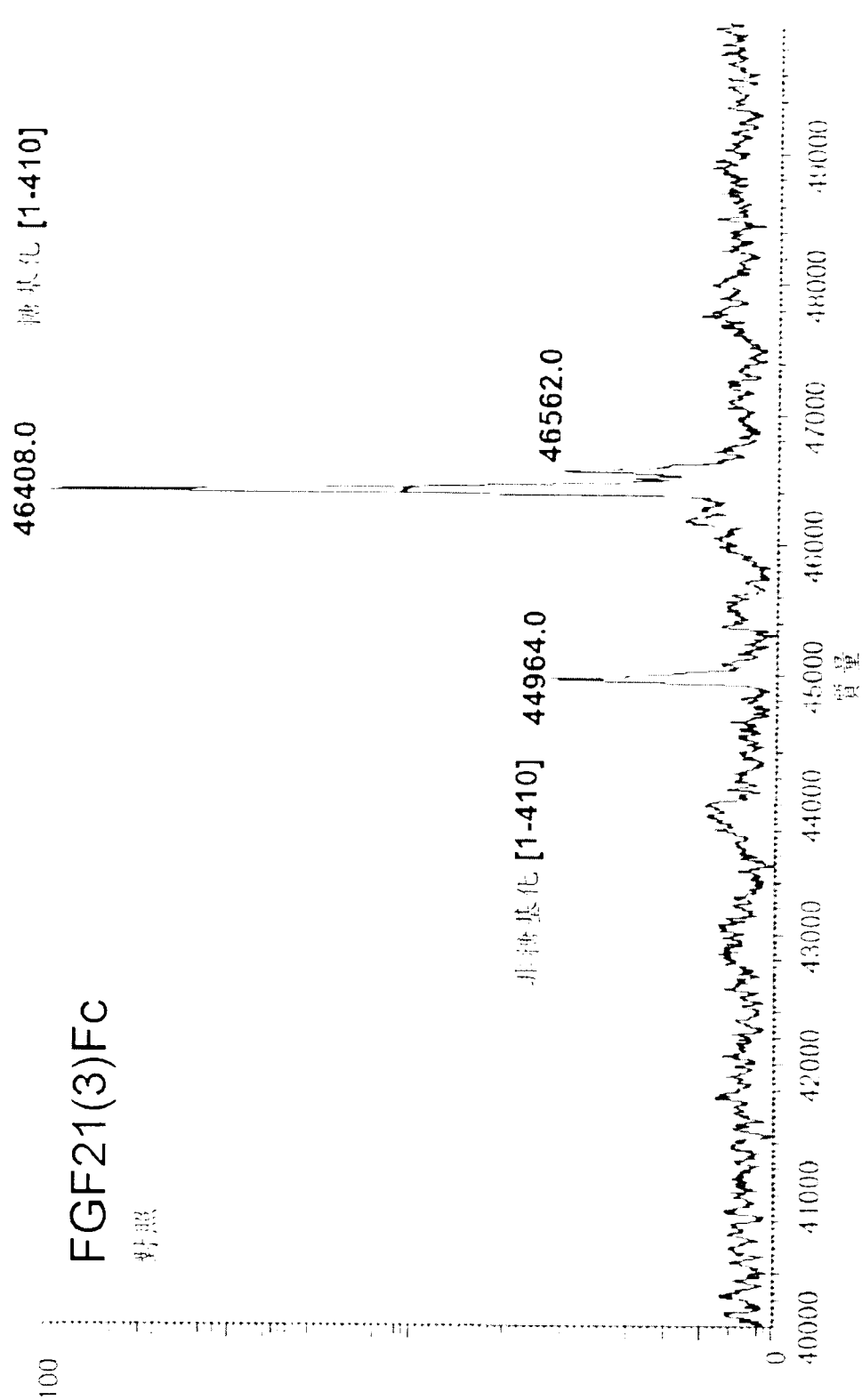


圖 7A

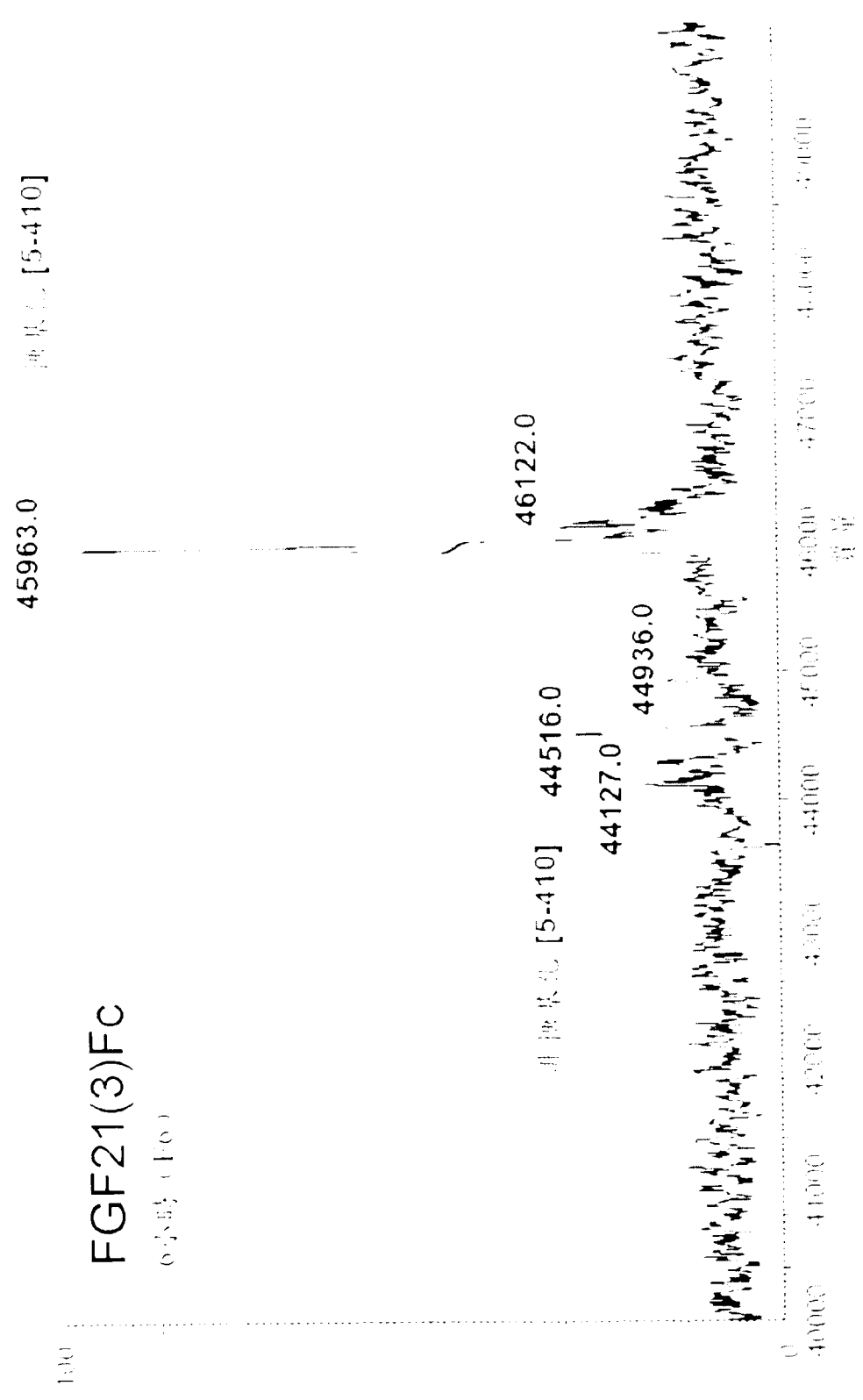


圖 7B

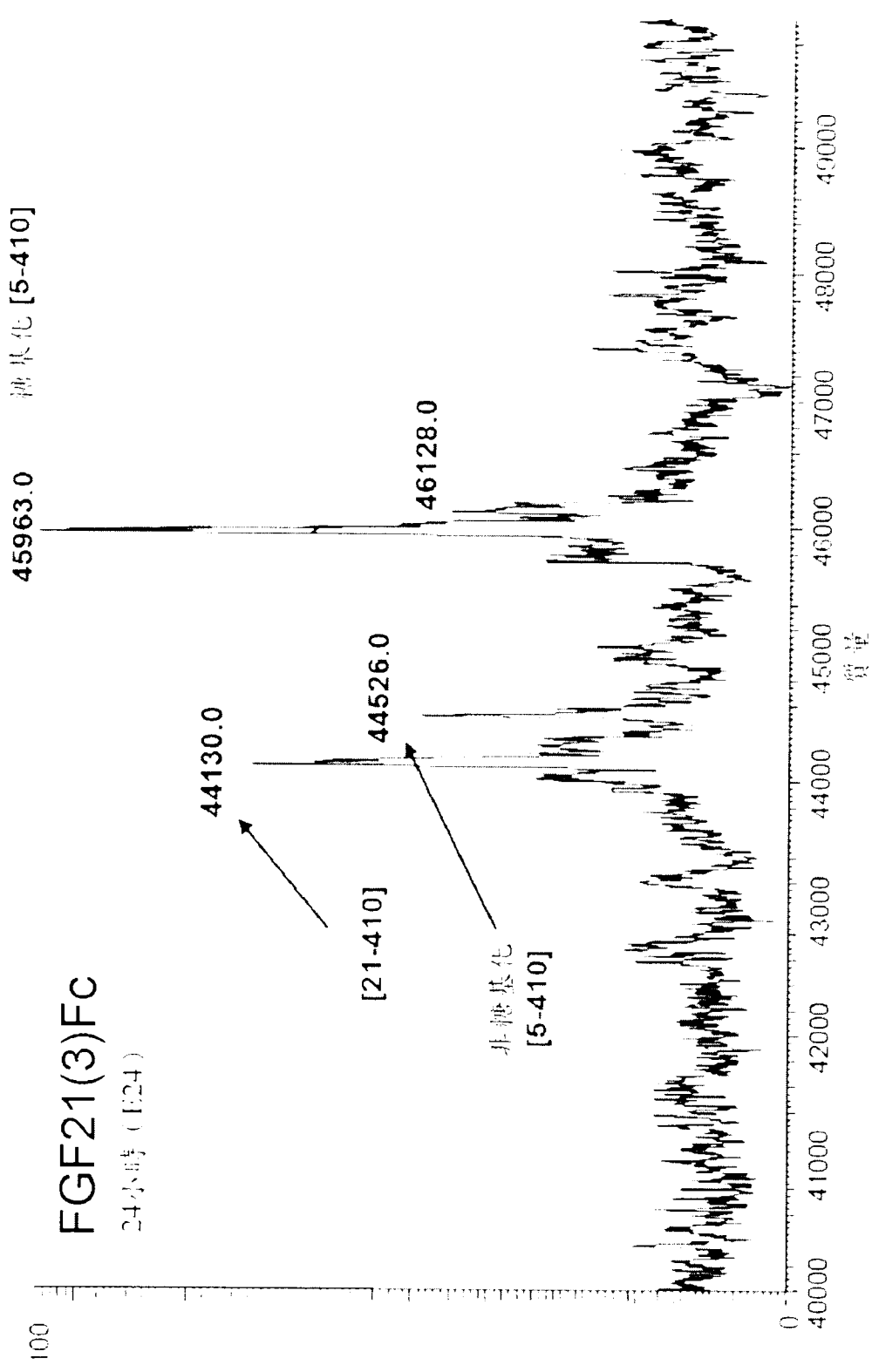


圖7C

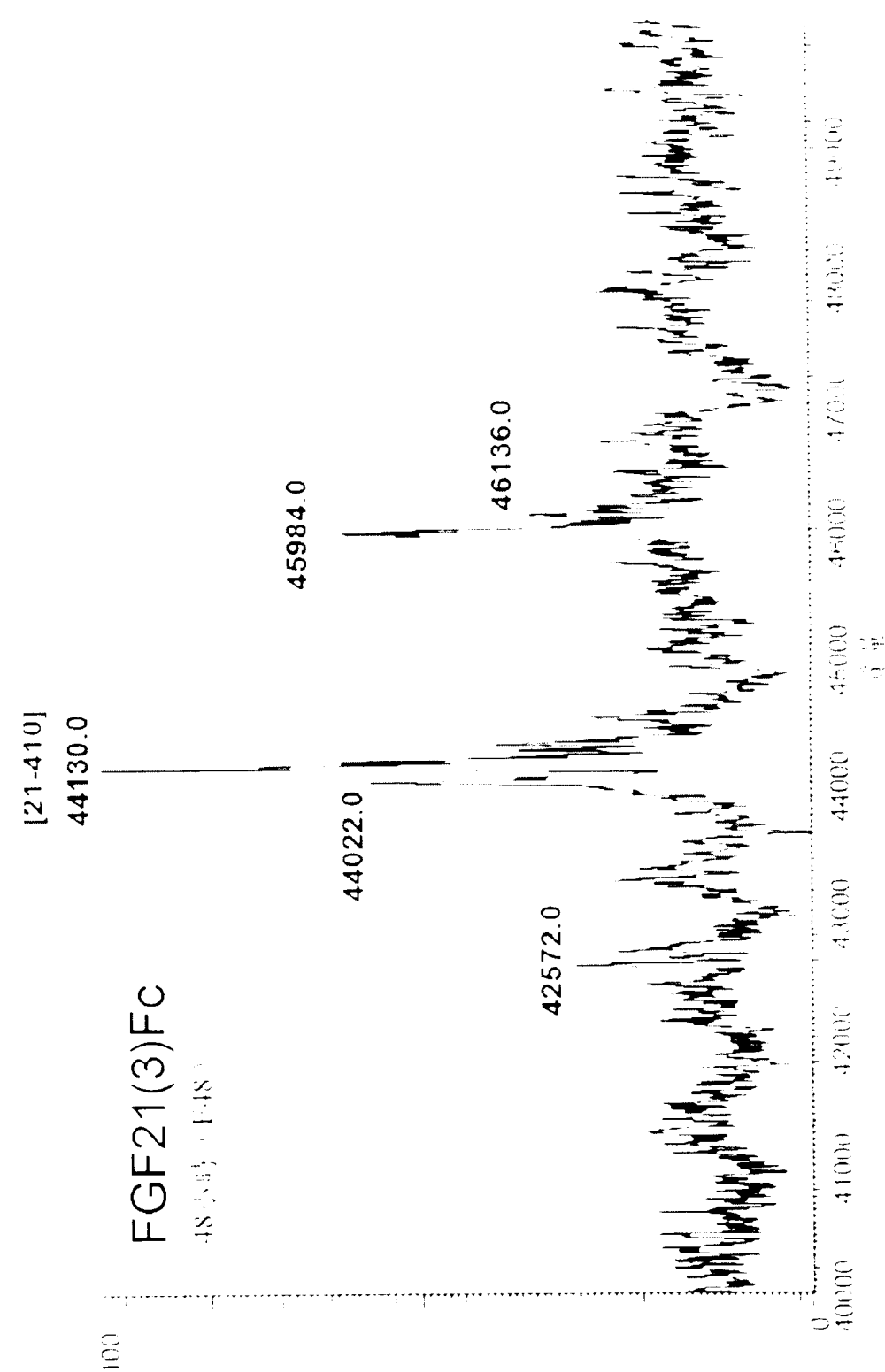


圖 7D

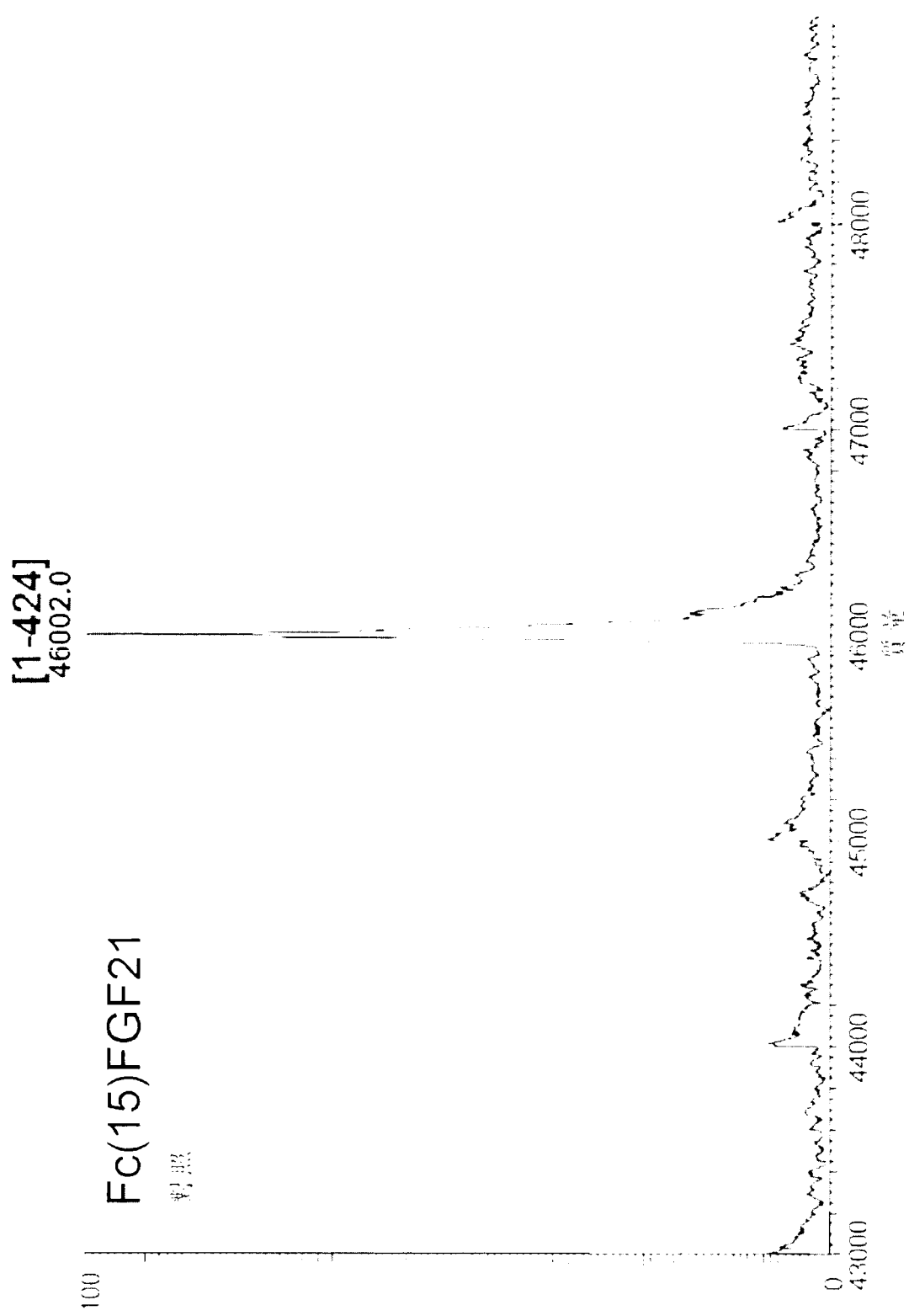


圖 8A

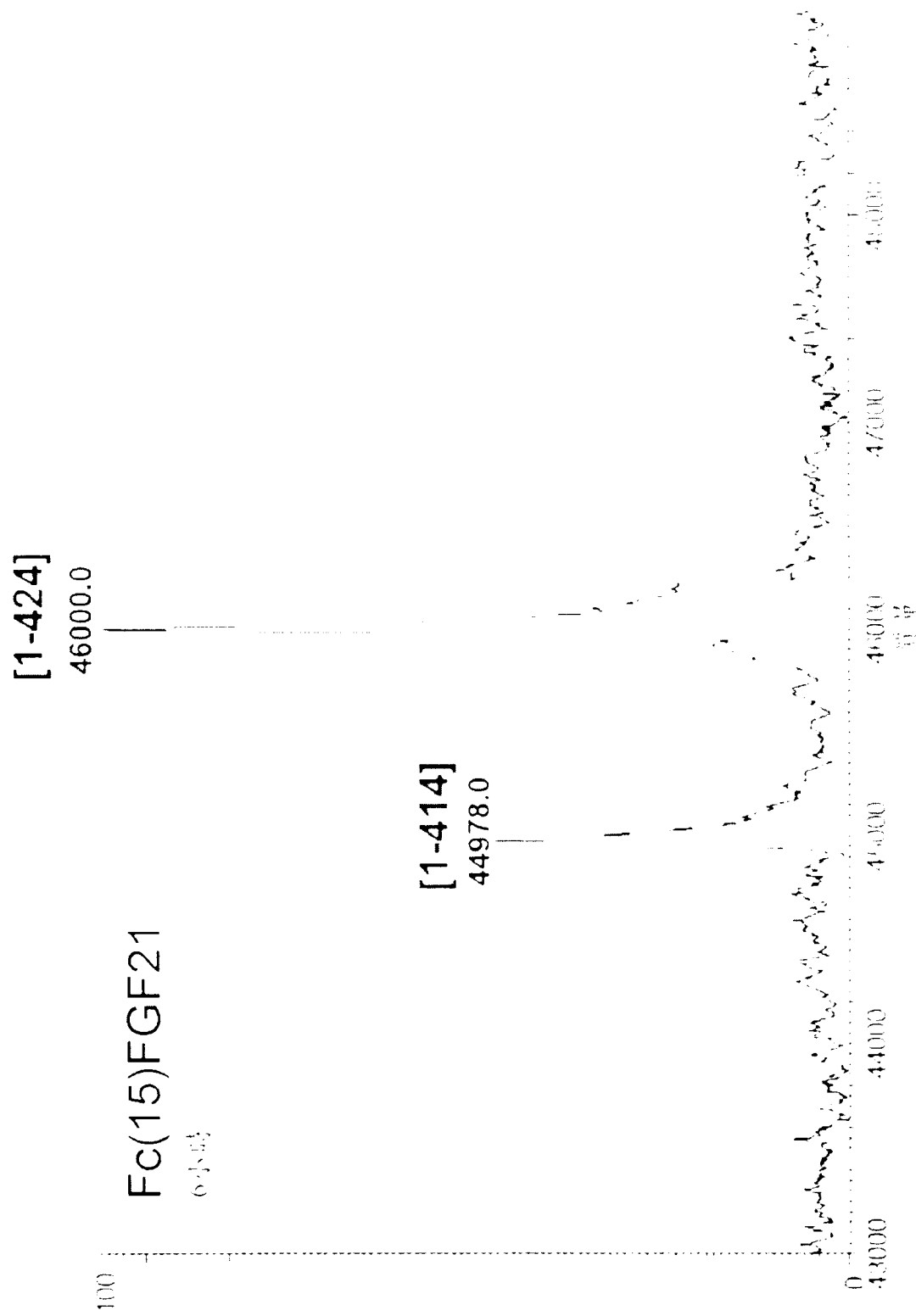


圖 8B

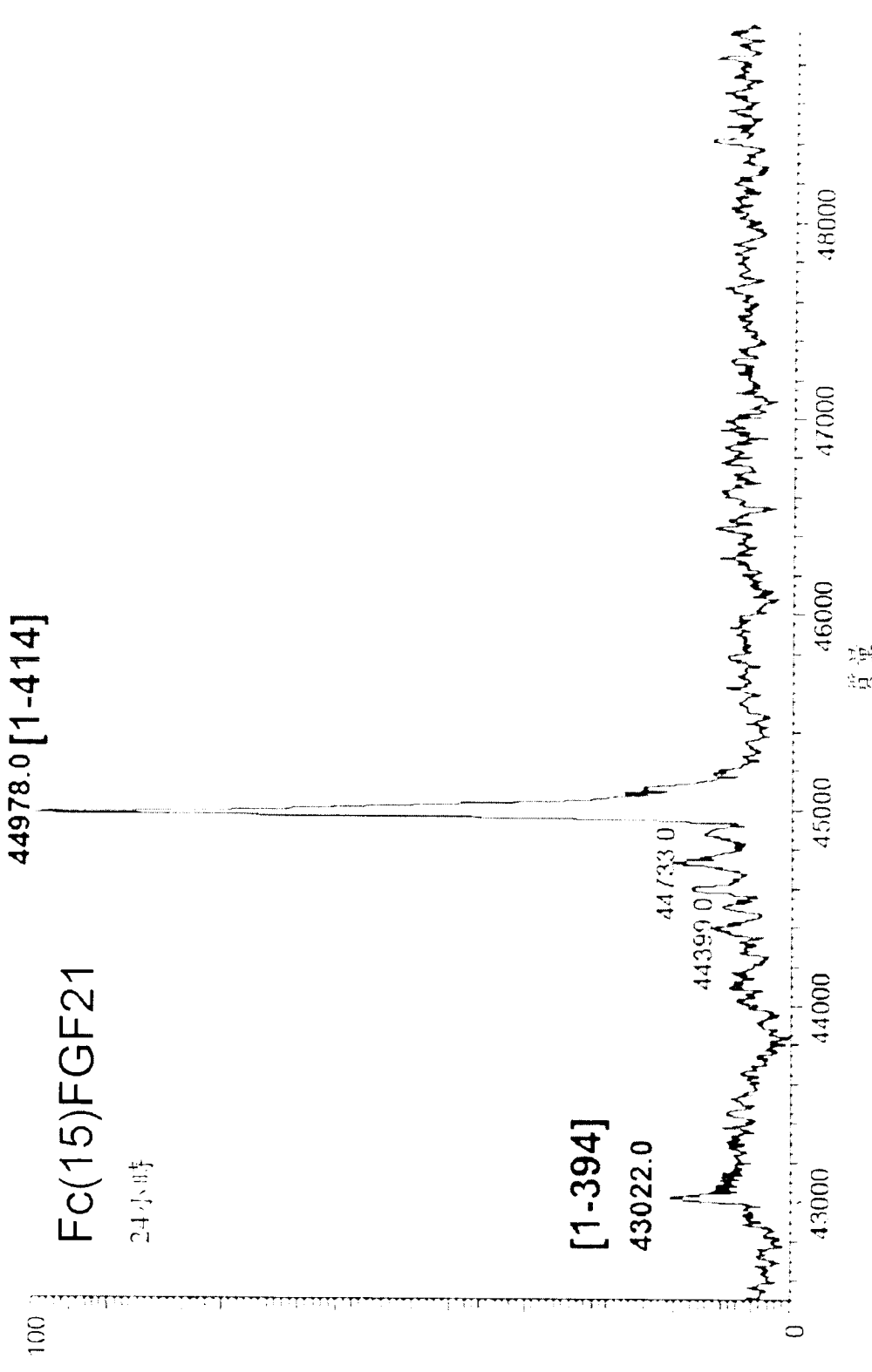
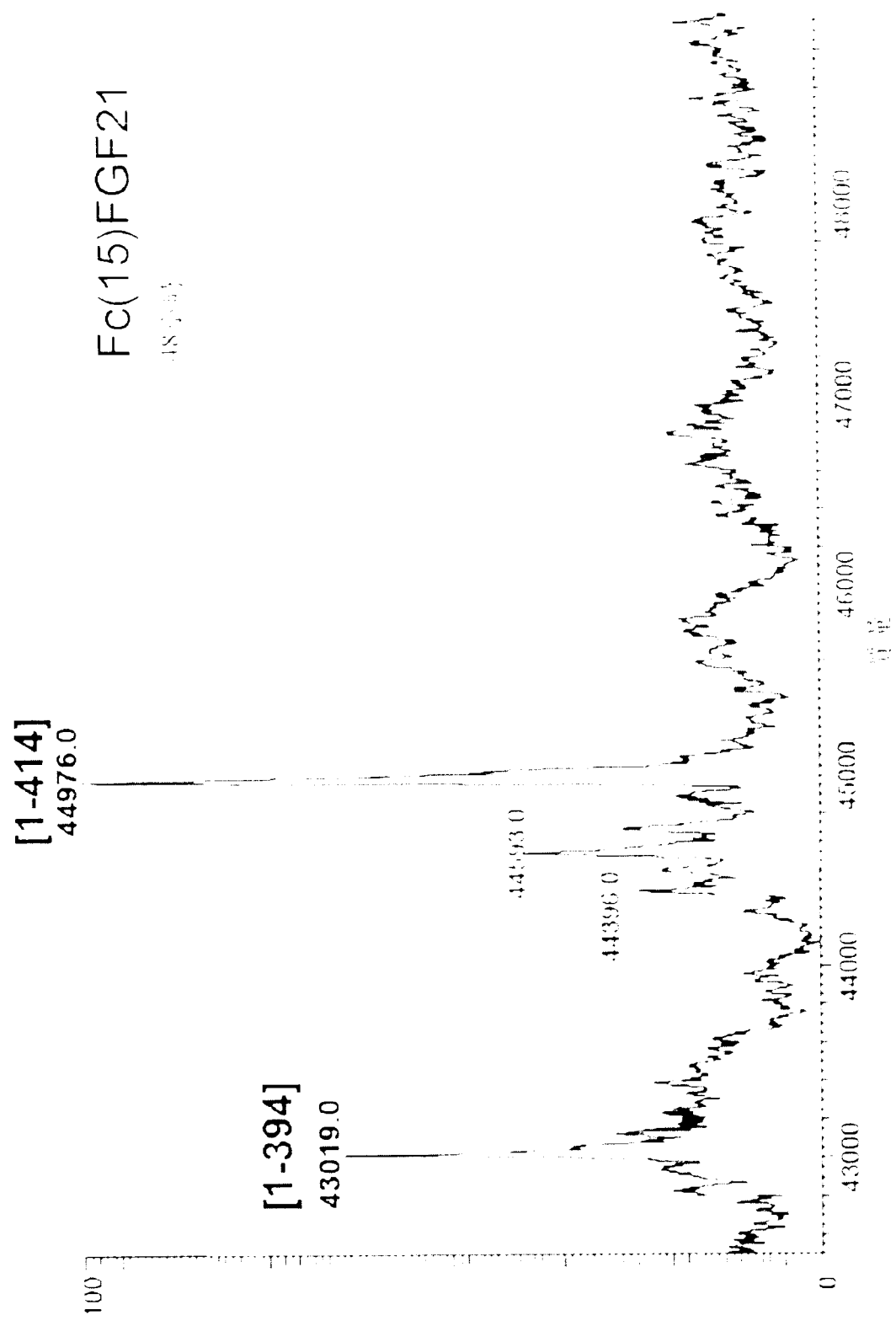


圖 8C



Fc(15)FGF21
(18 kDa)

圖 8D

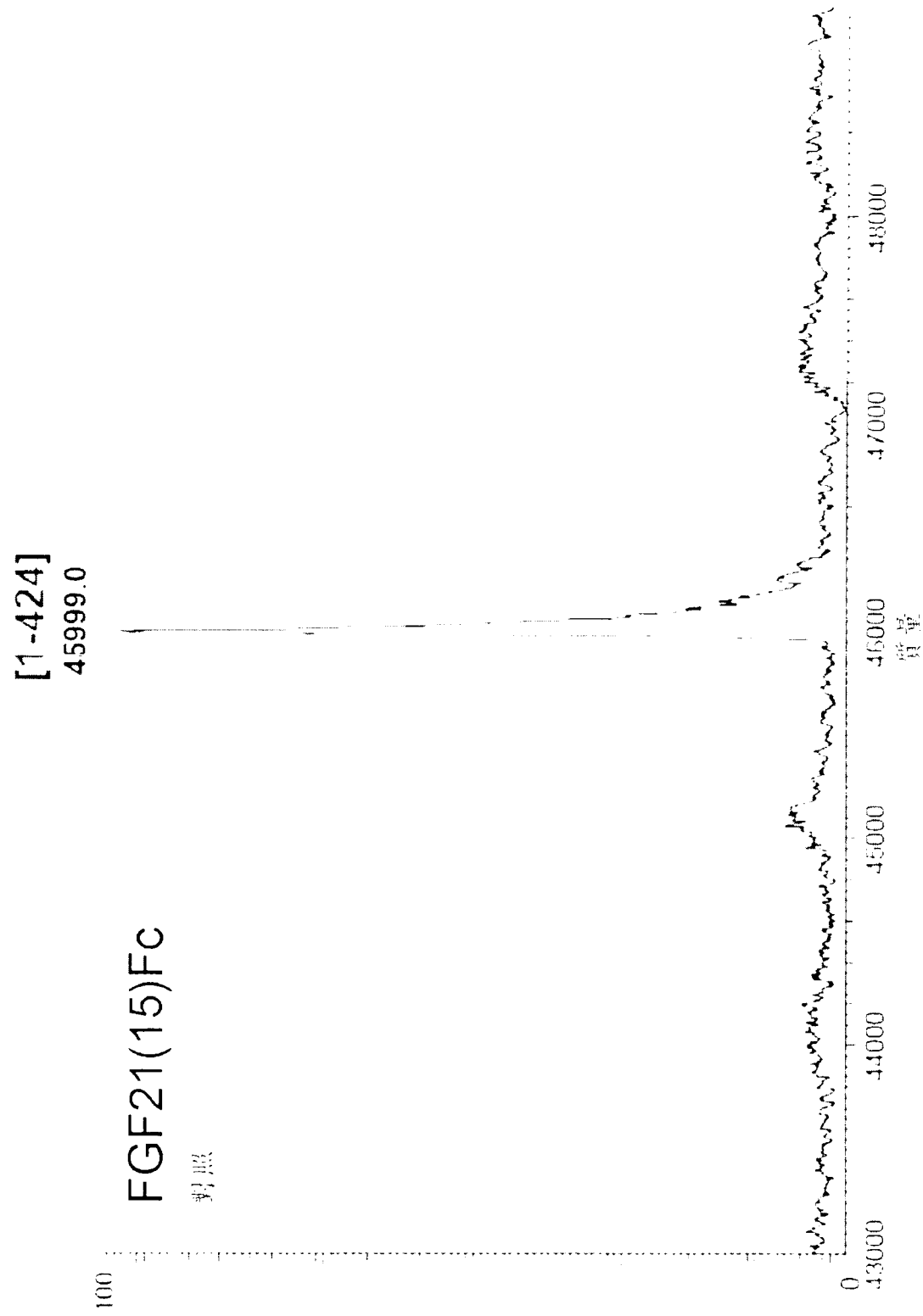


圖 9A

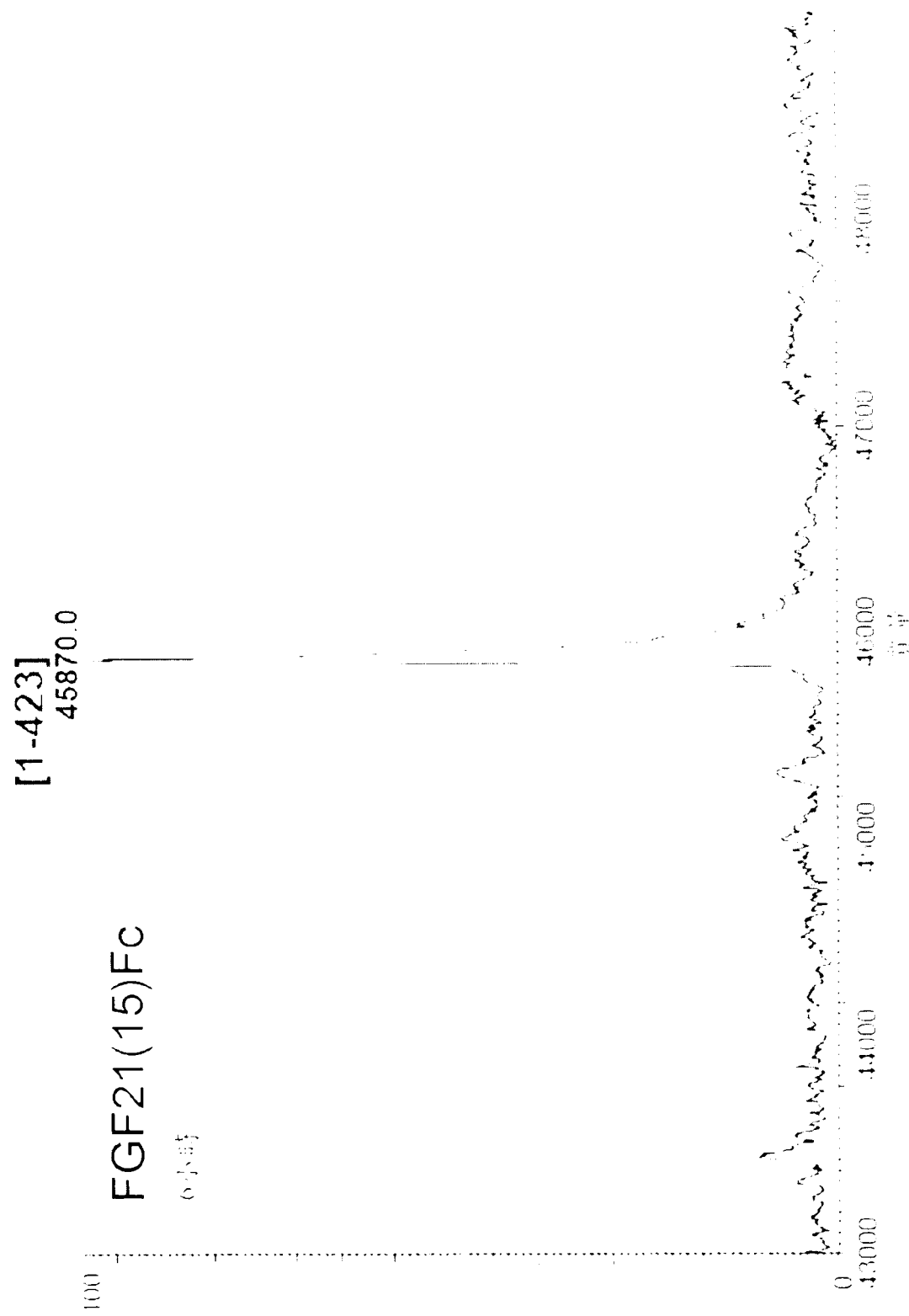


圖 9B

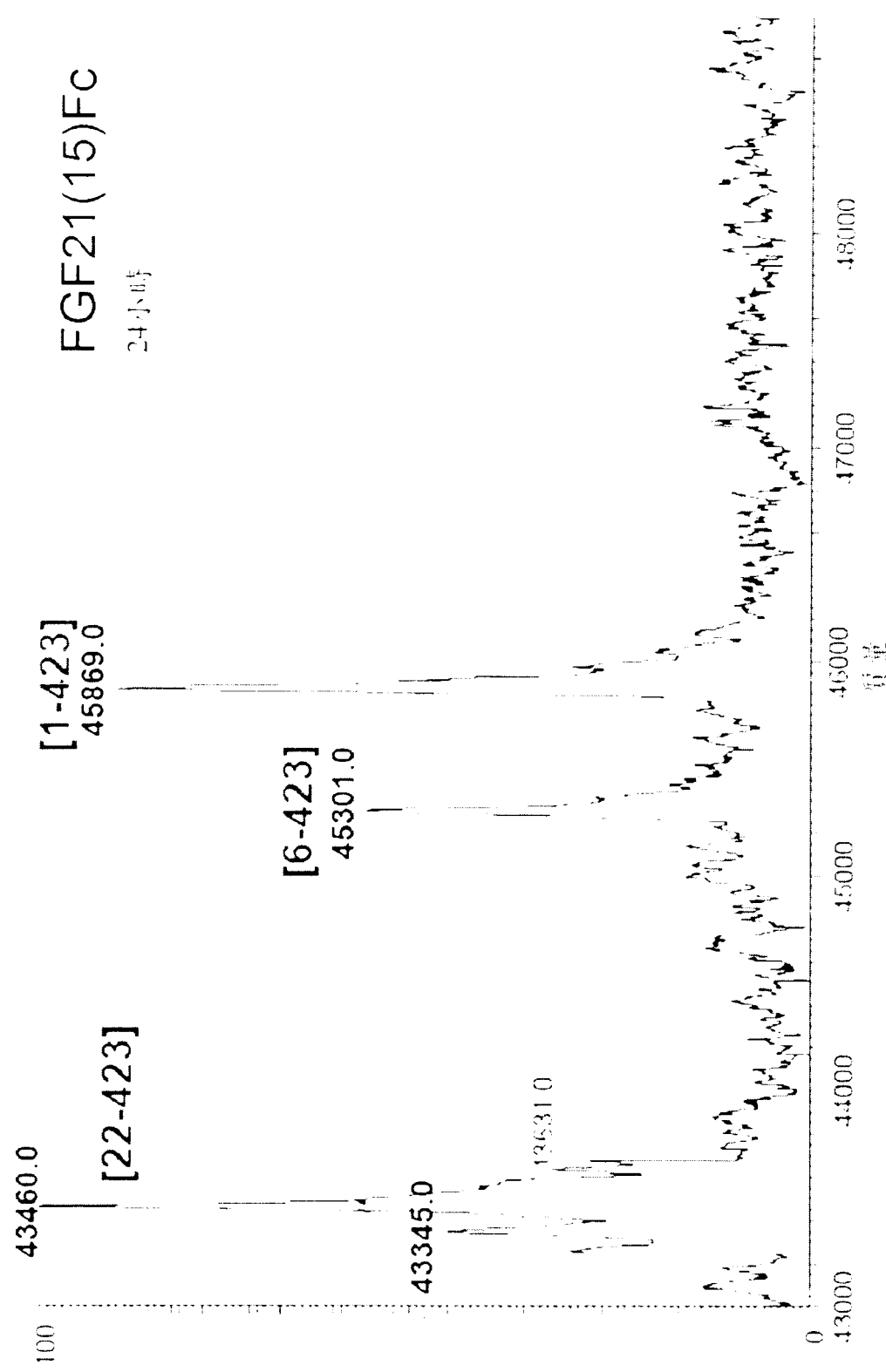


圖9C

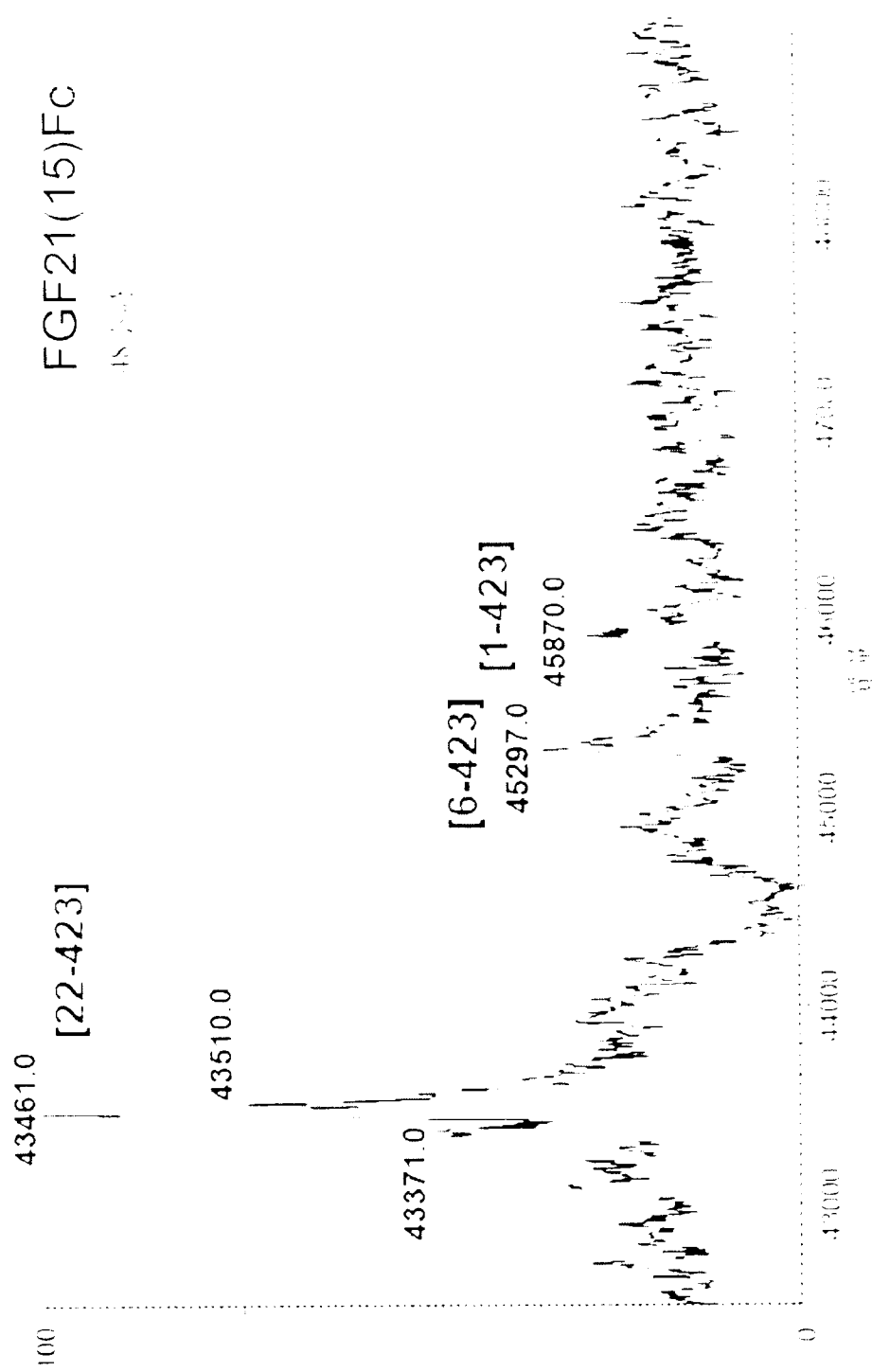


圖 9D

Fc(15)FGF21

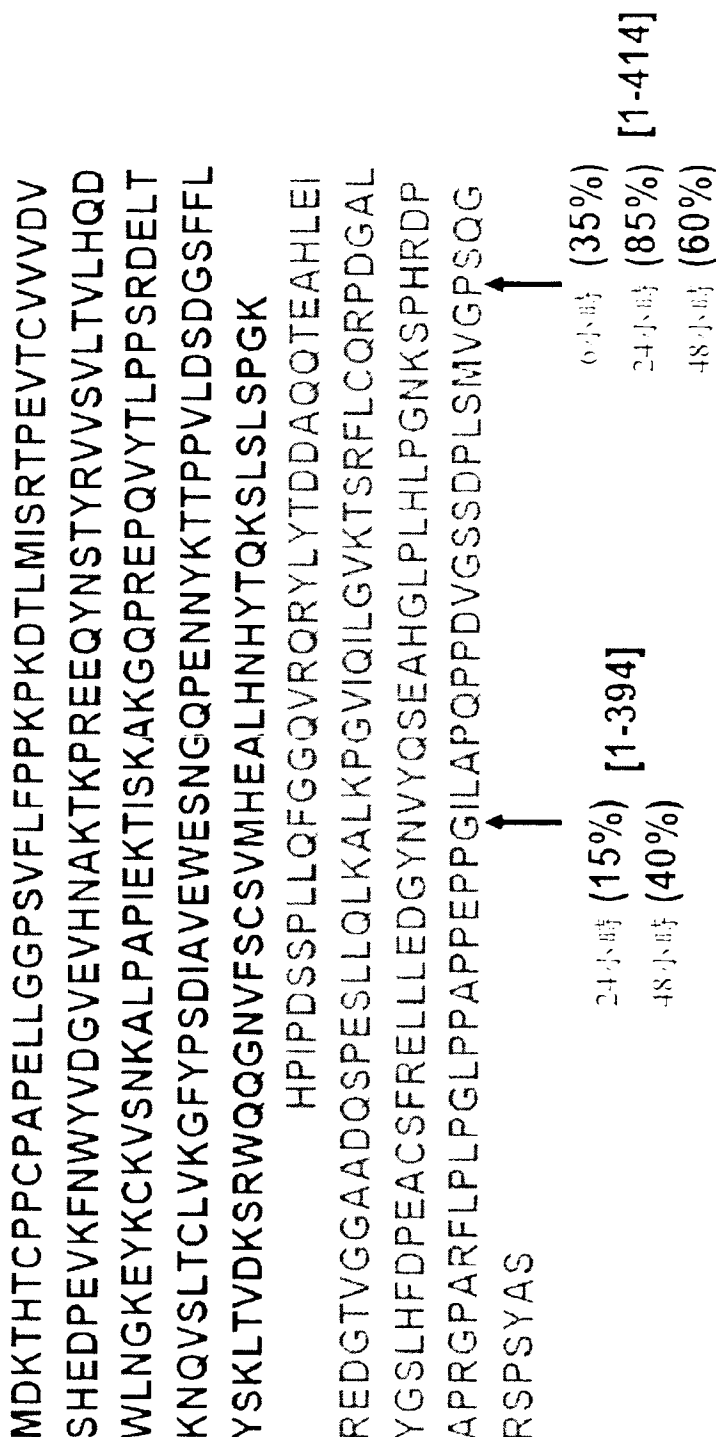


圖10A

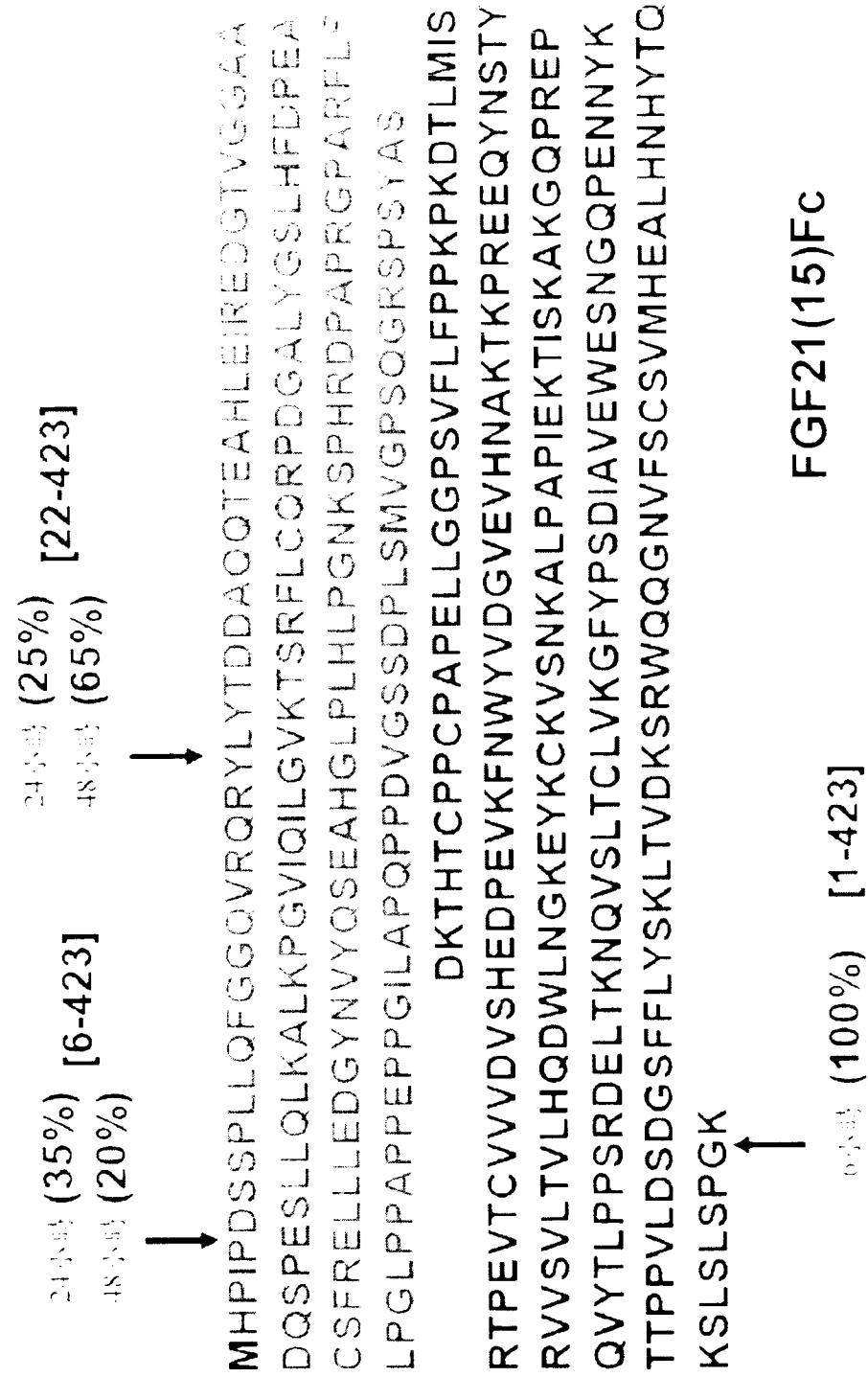


圖 10B

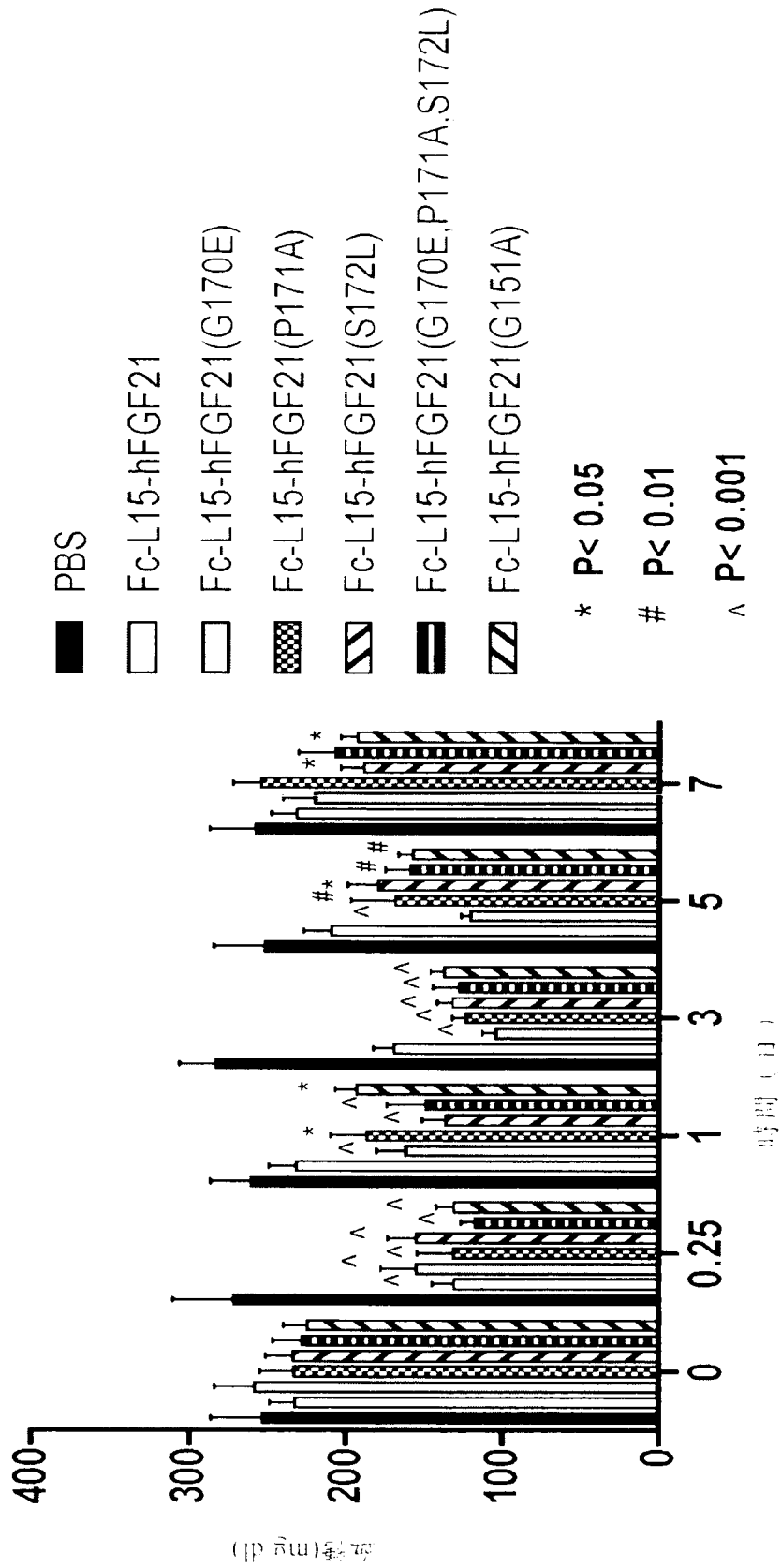


圖 11

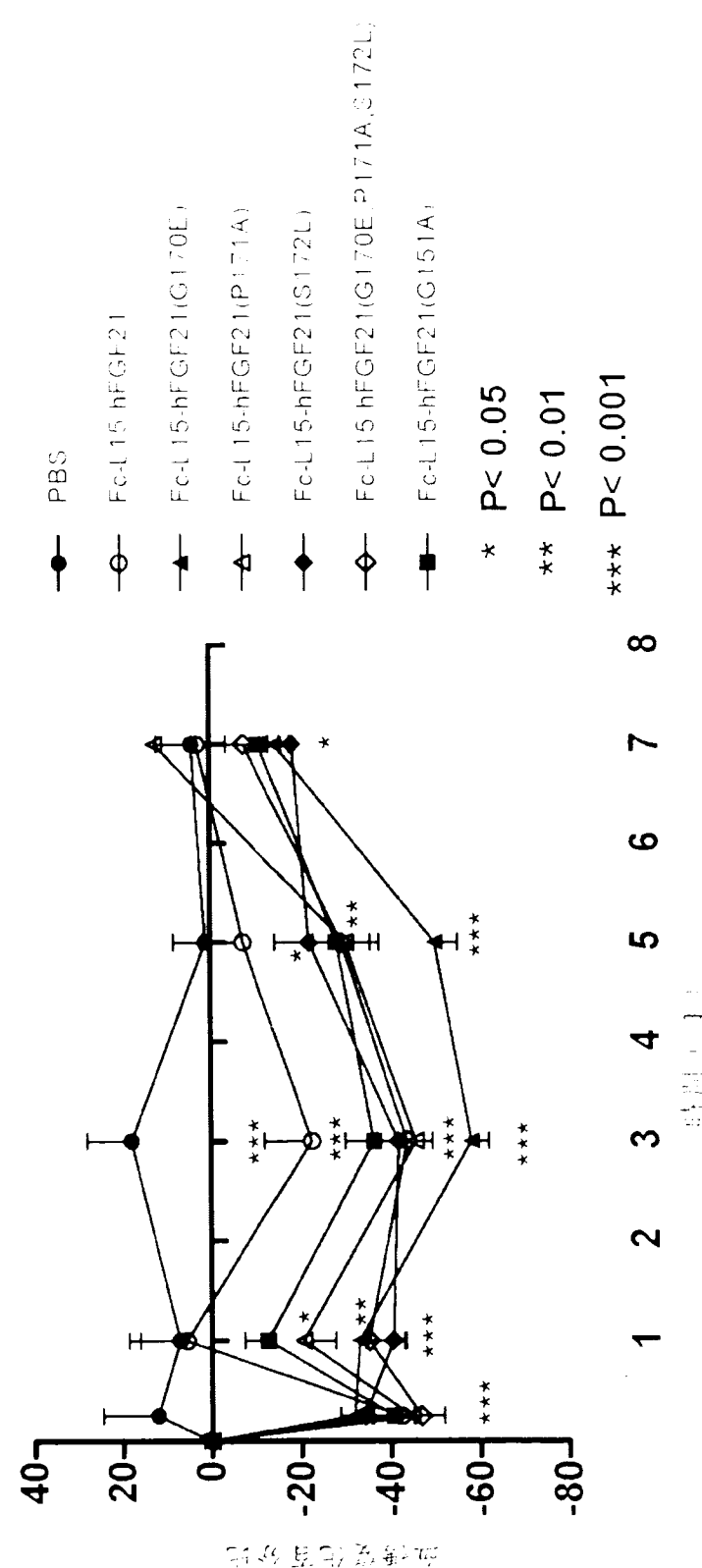


圖12

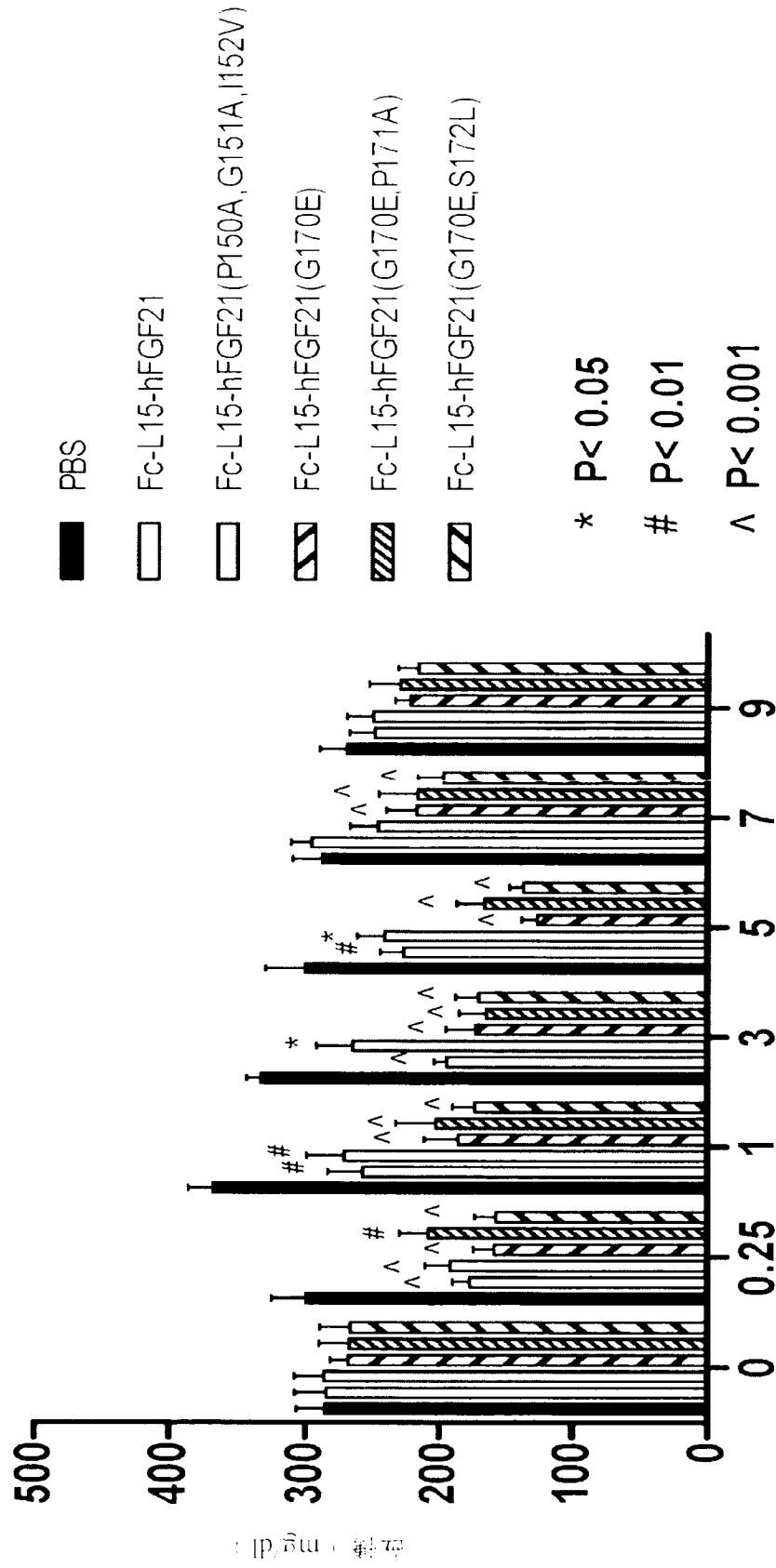


圖13

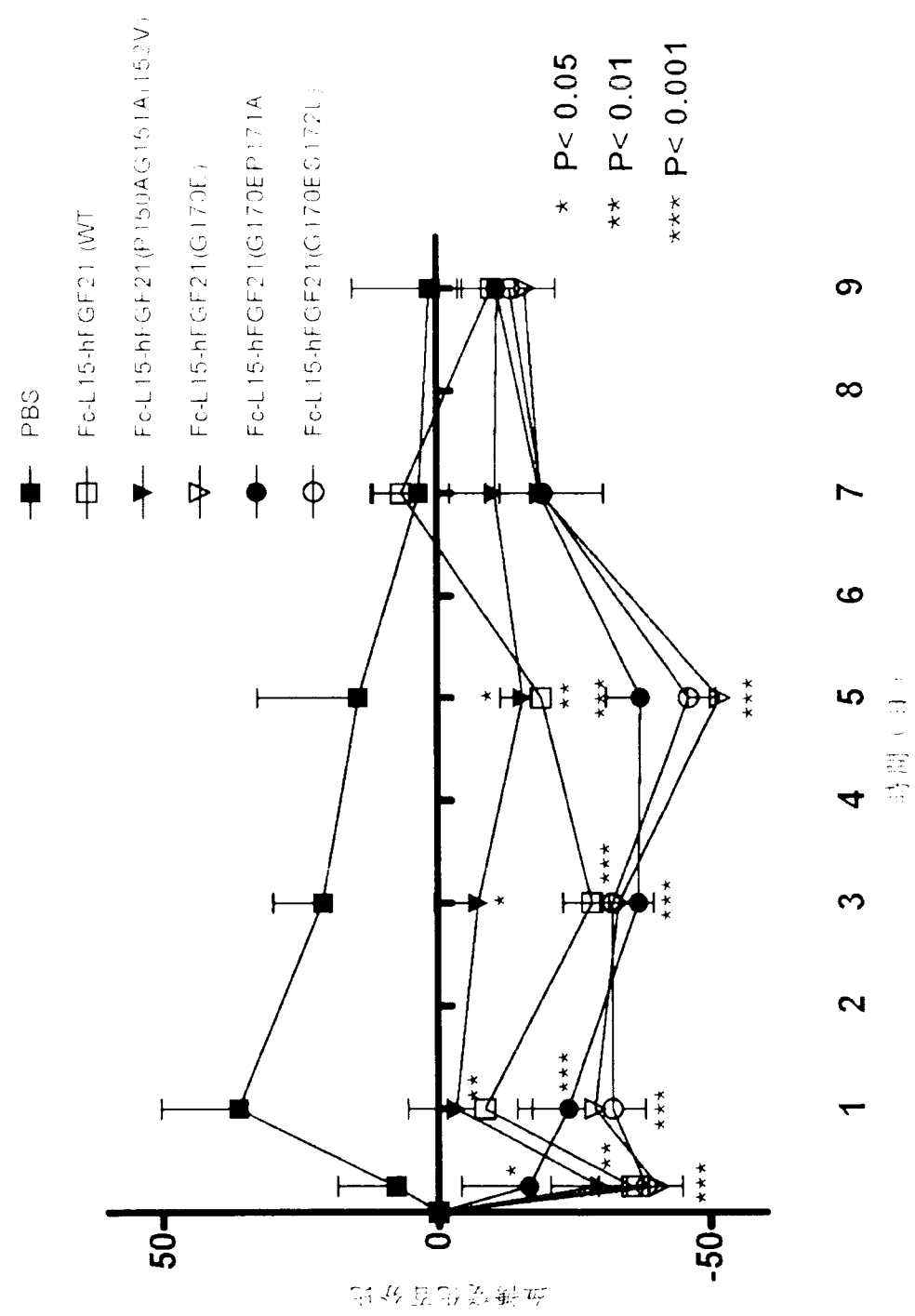


圖 14

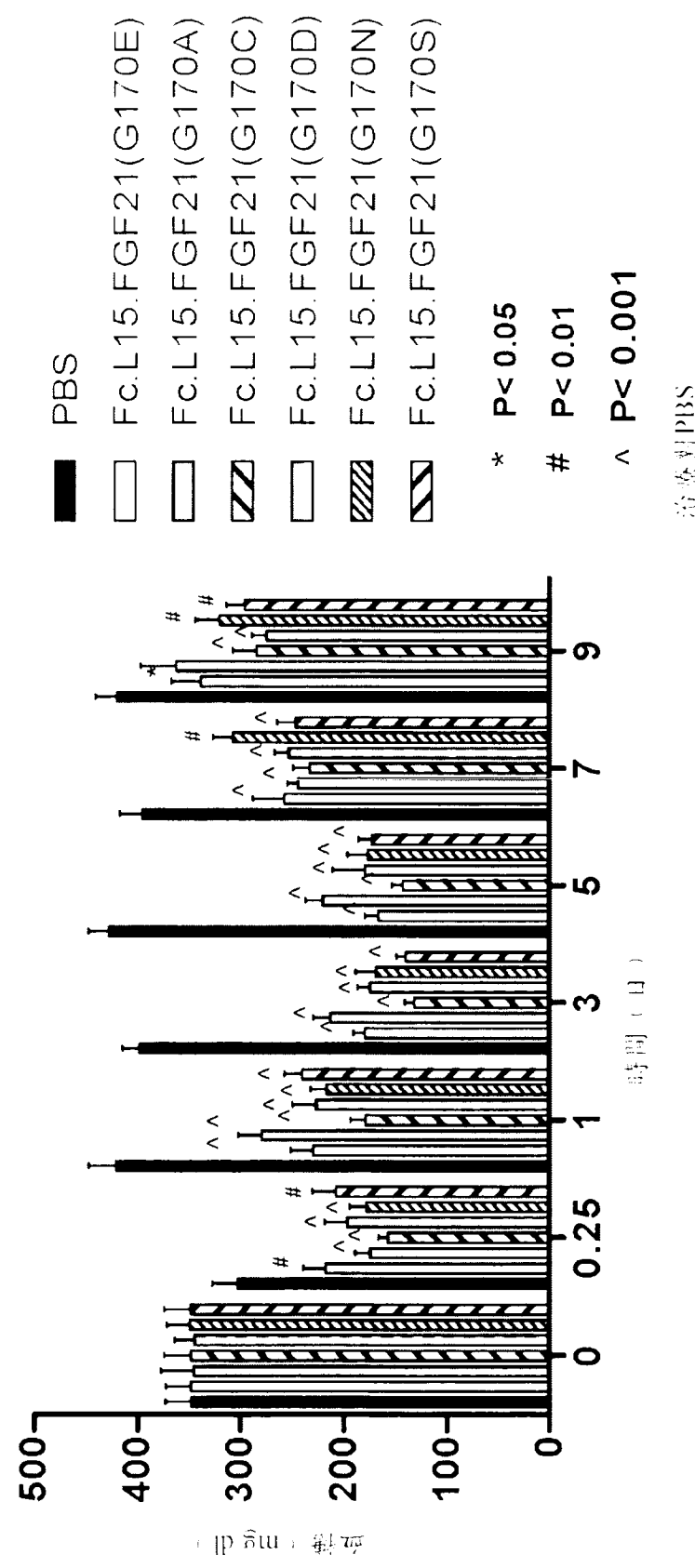


圖 15

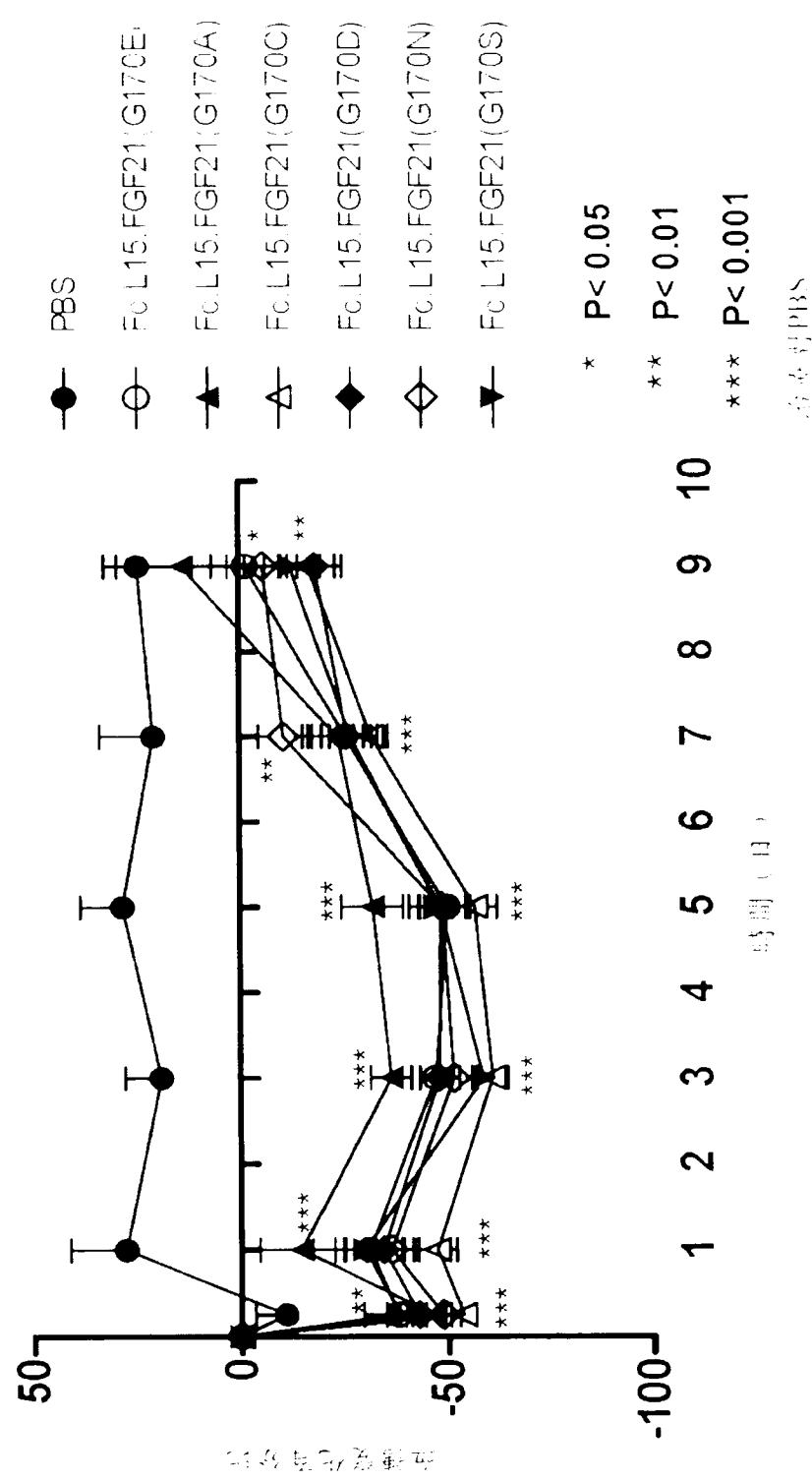


圖16

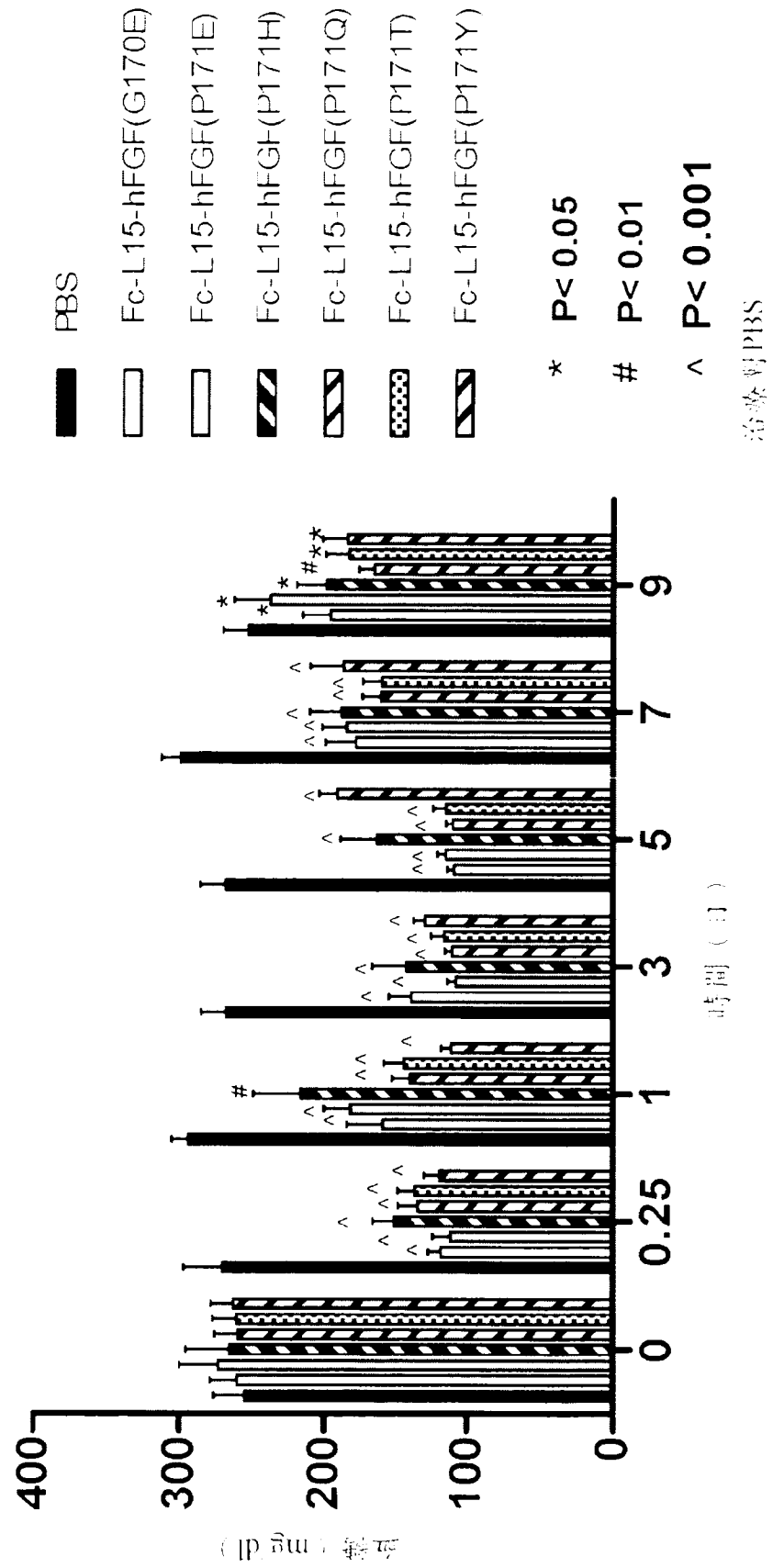


圖 17

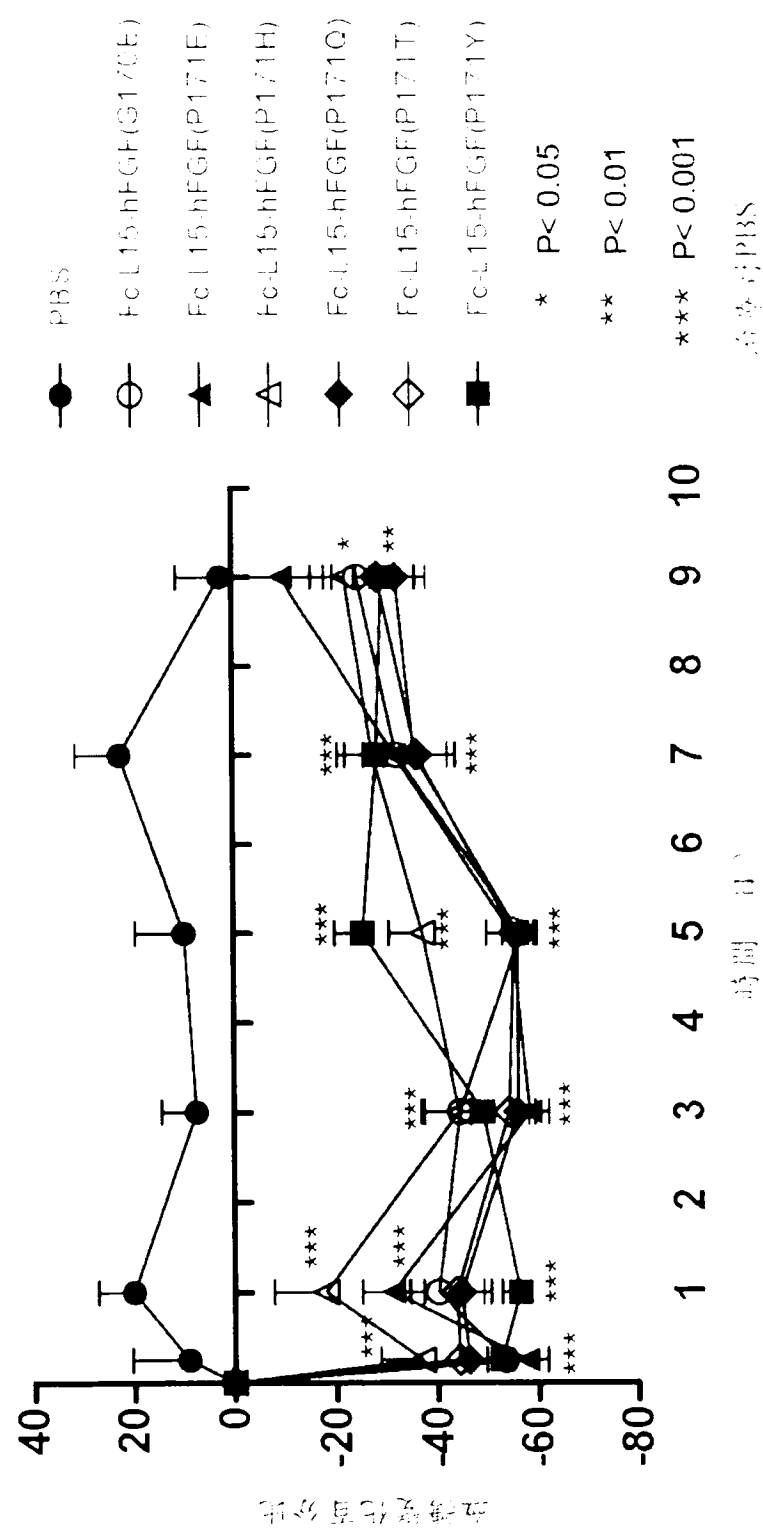


圖18

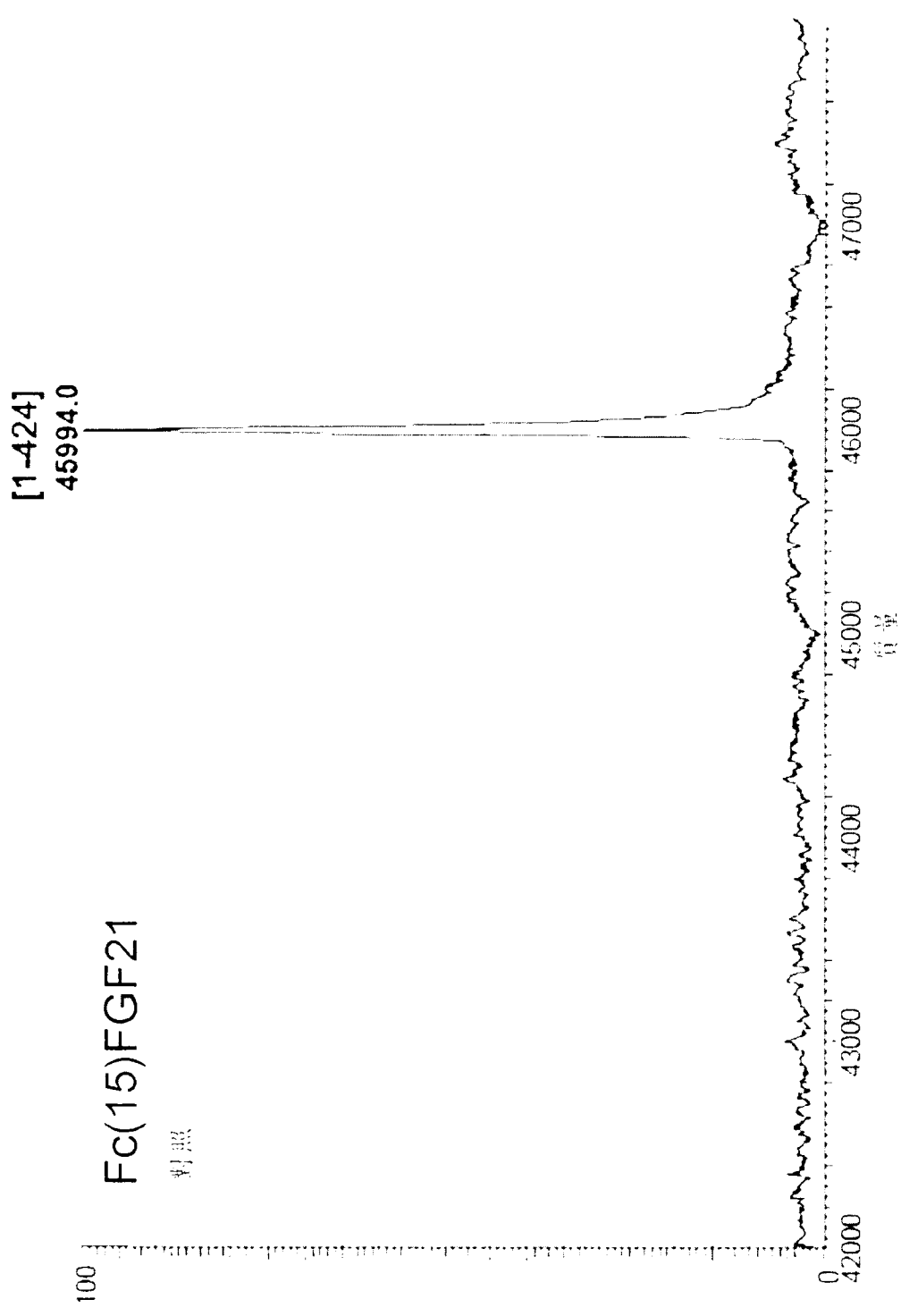


圖19A

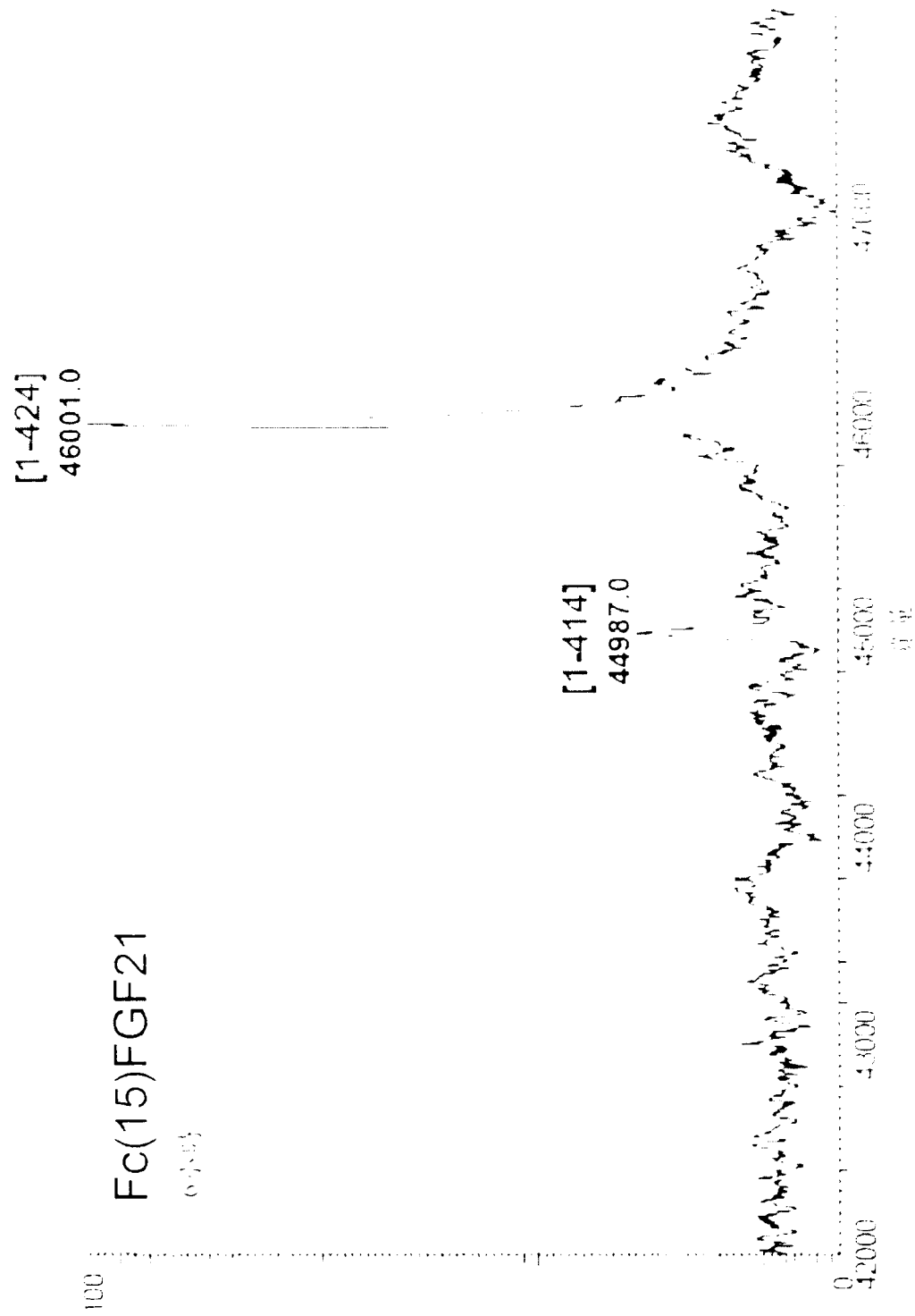


圖 19B

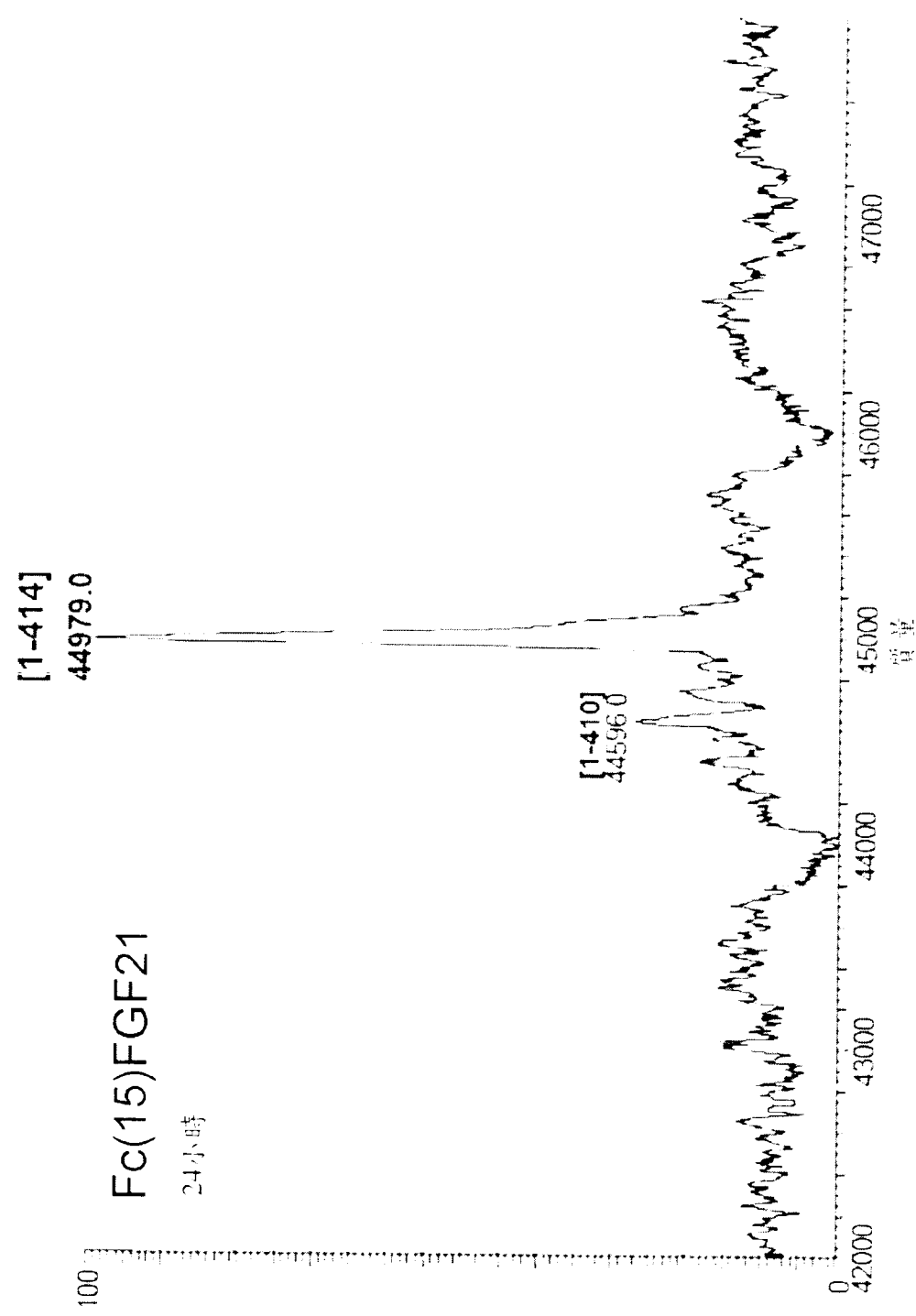


圖 19C

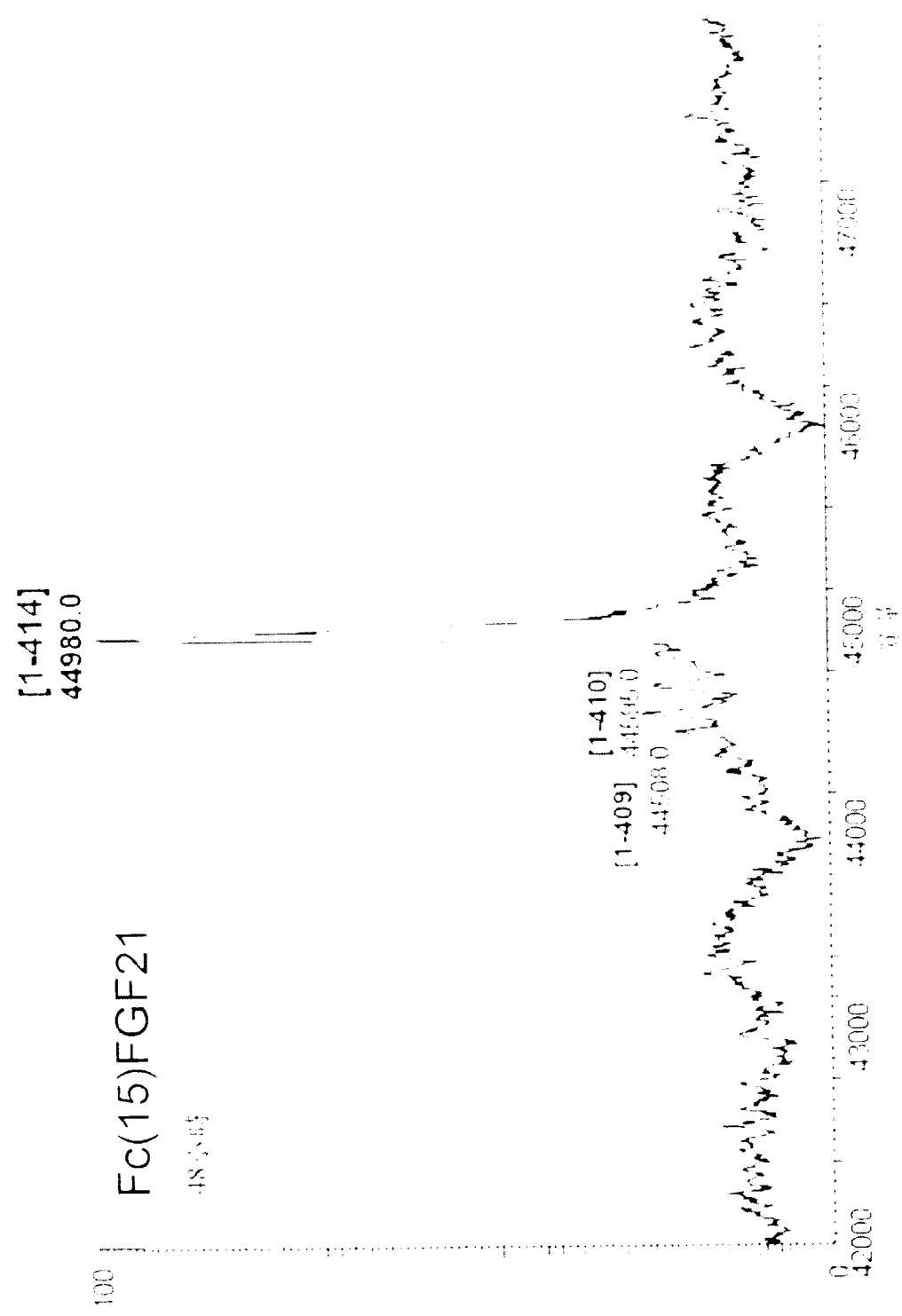


圖 19D

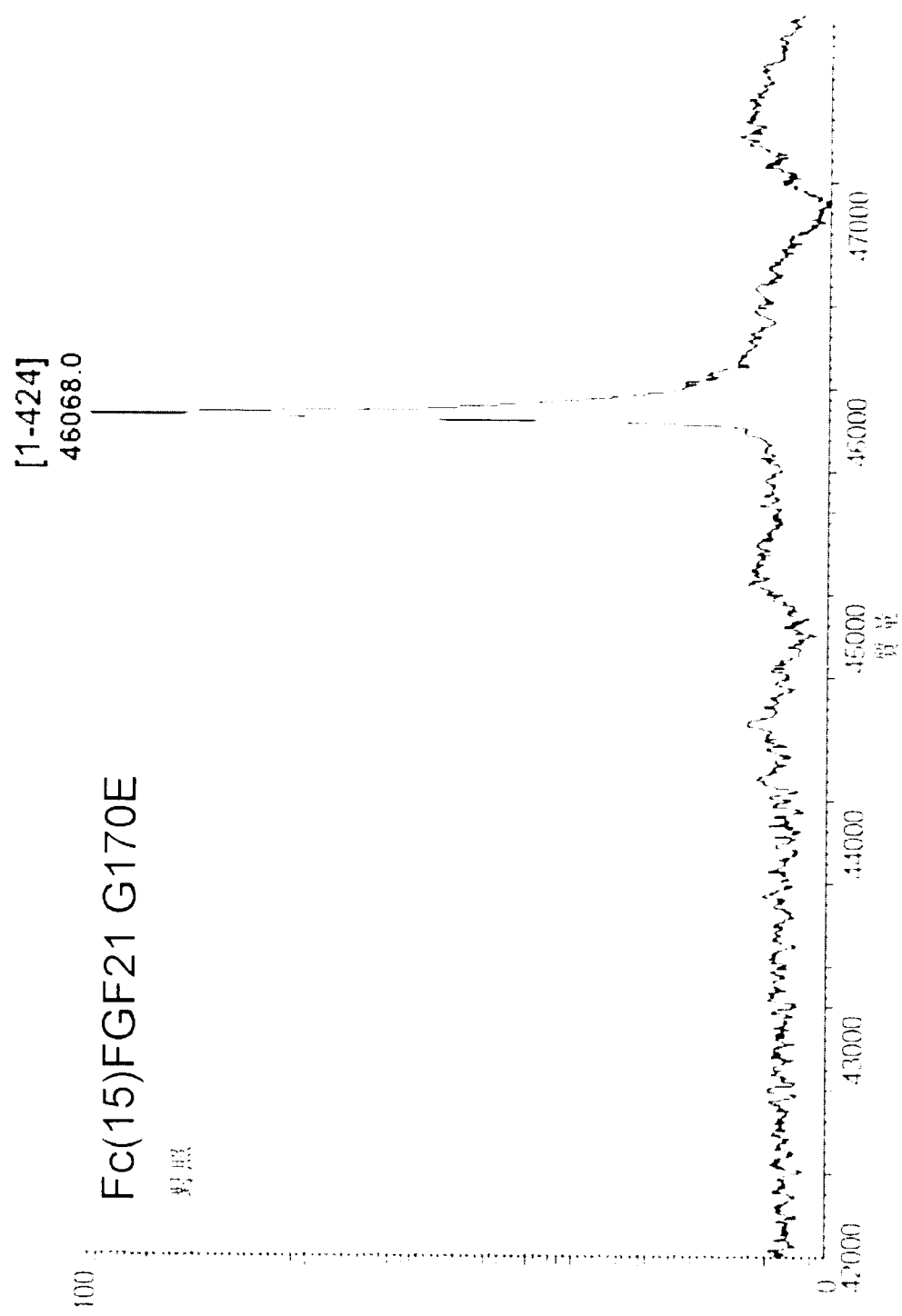


圖 20A



圖20B

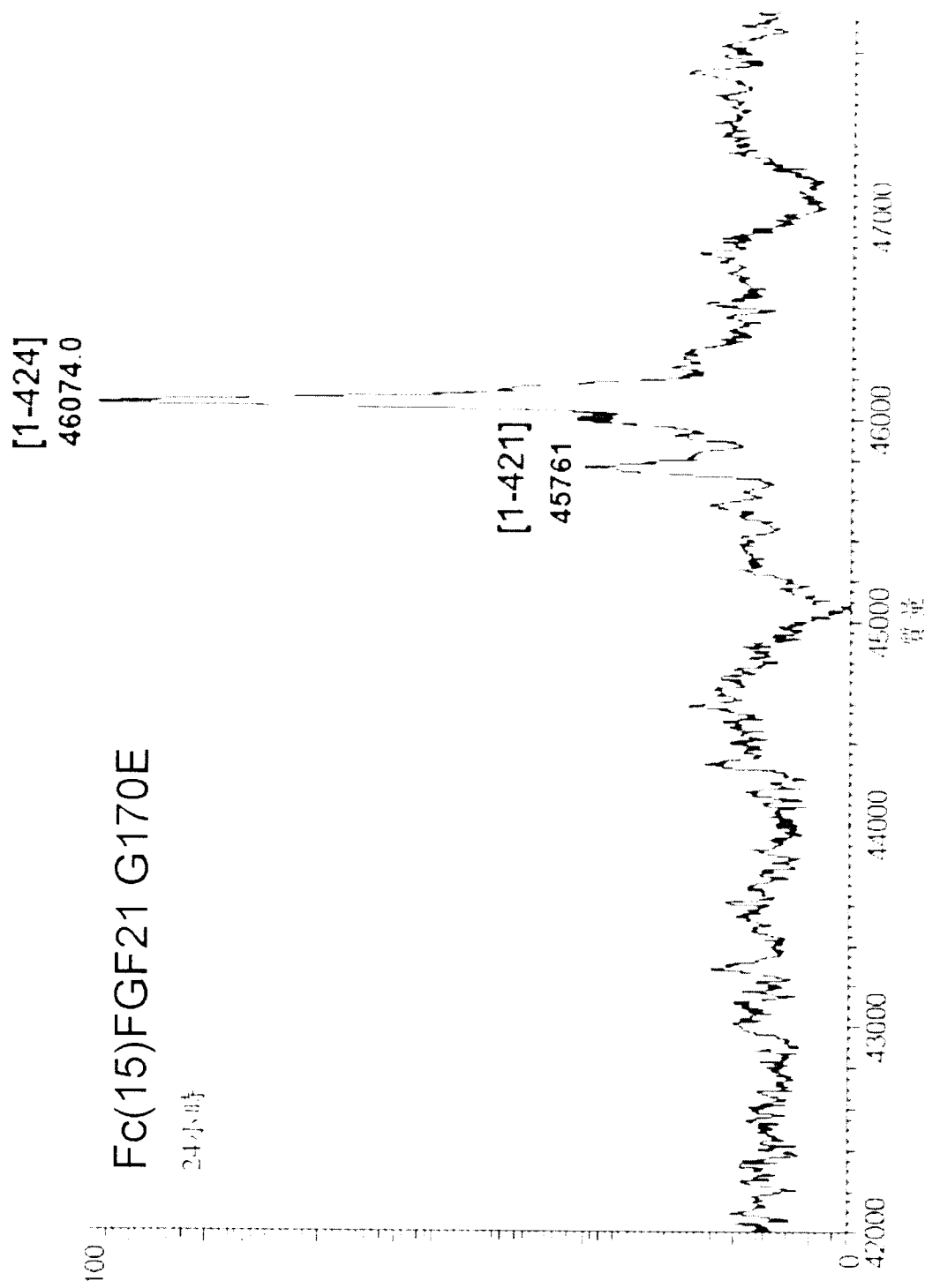


圖 20C

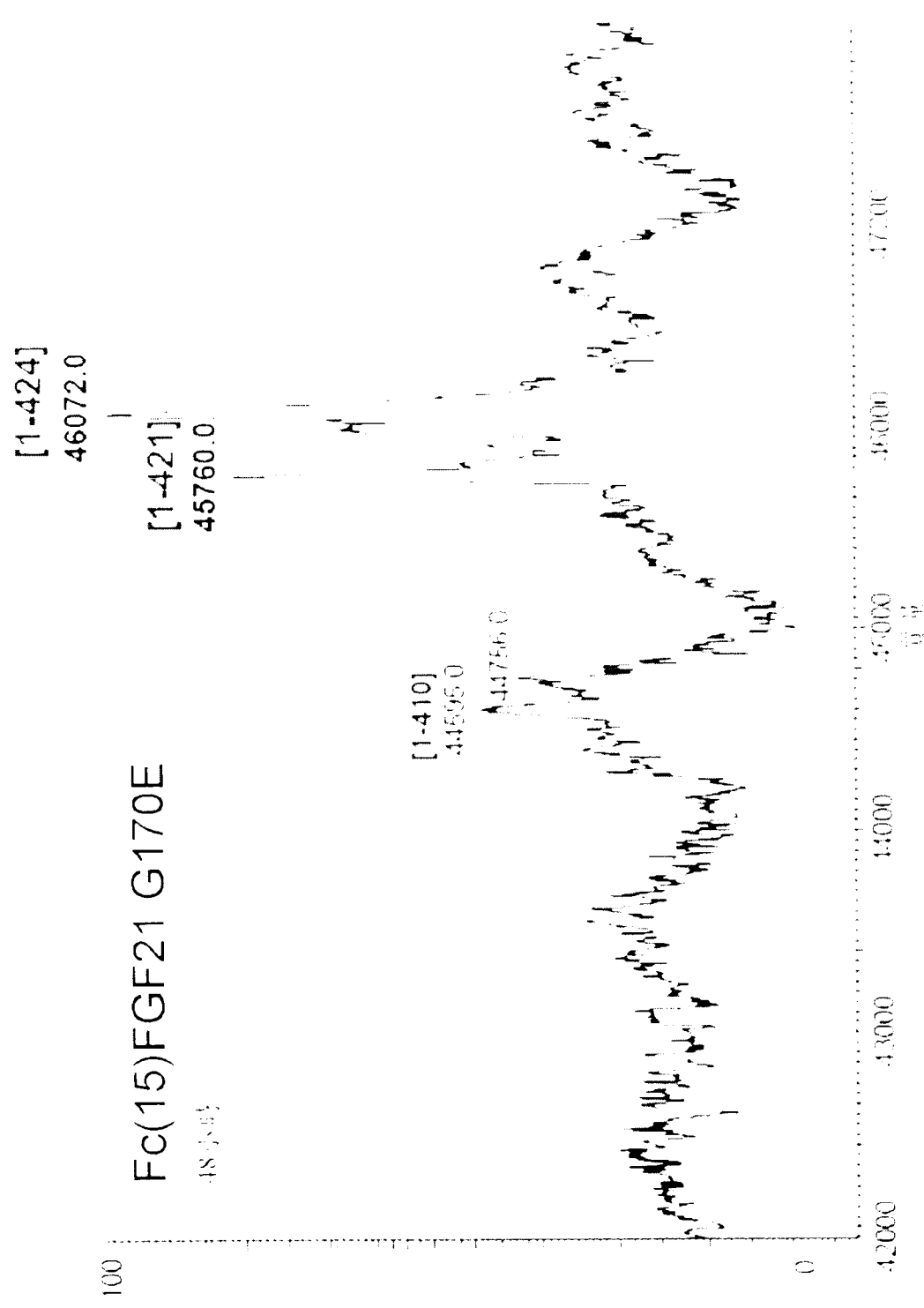


圖 20D

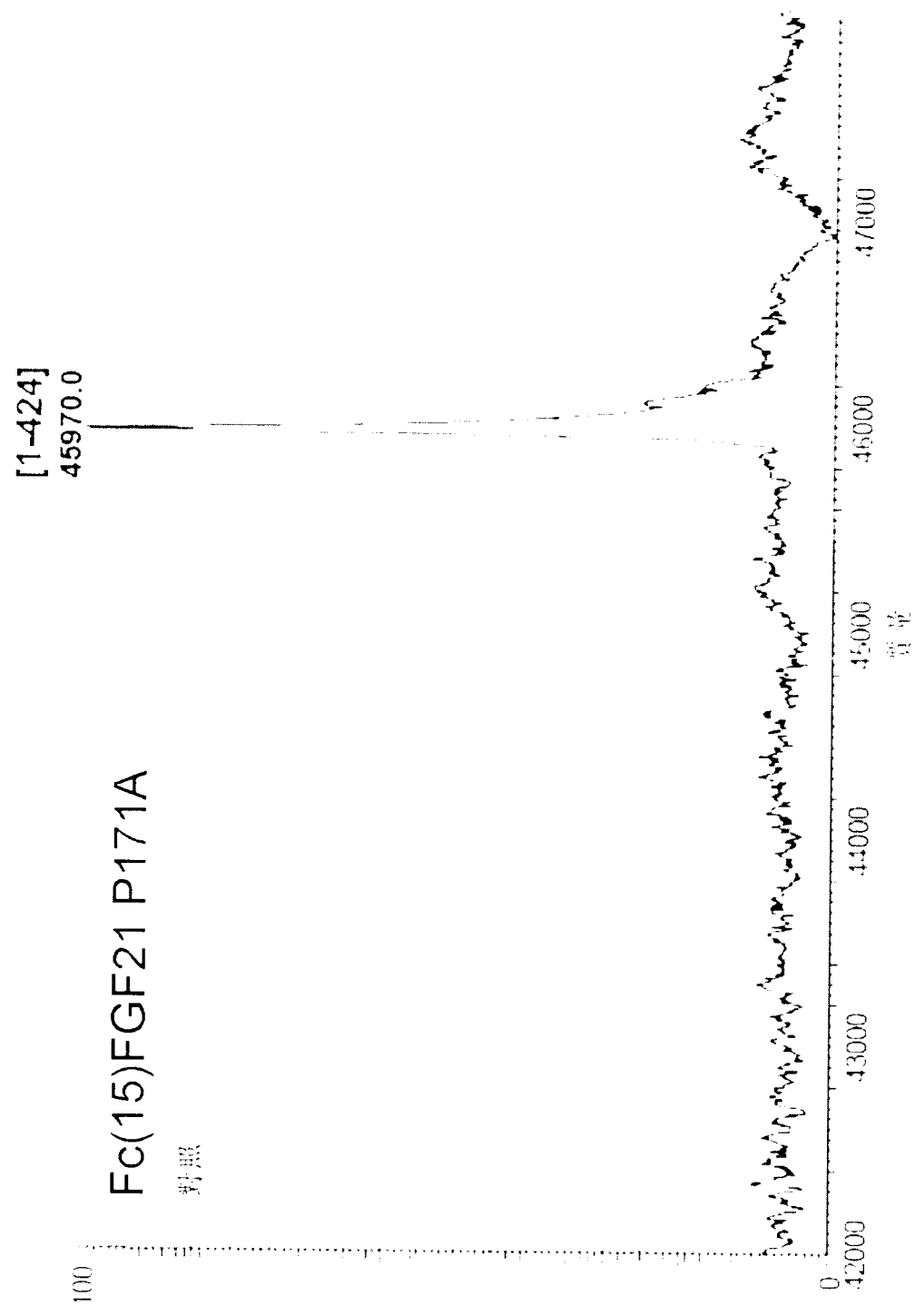
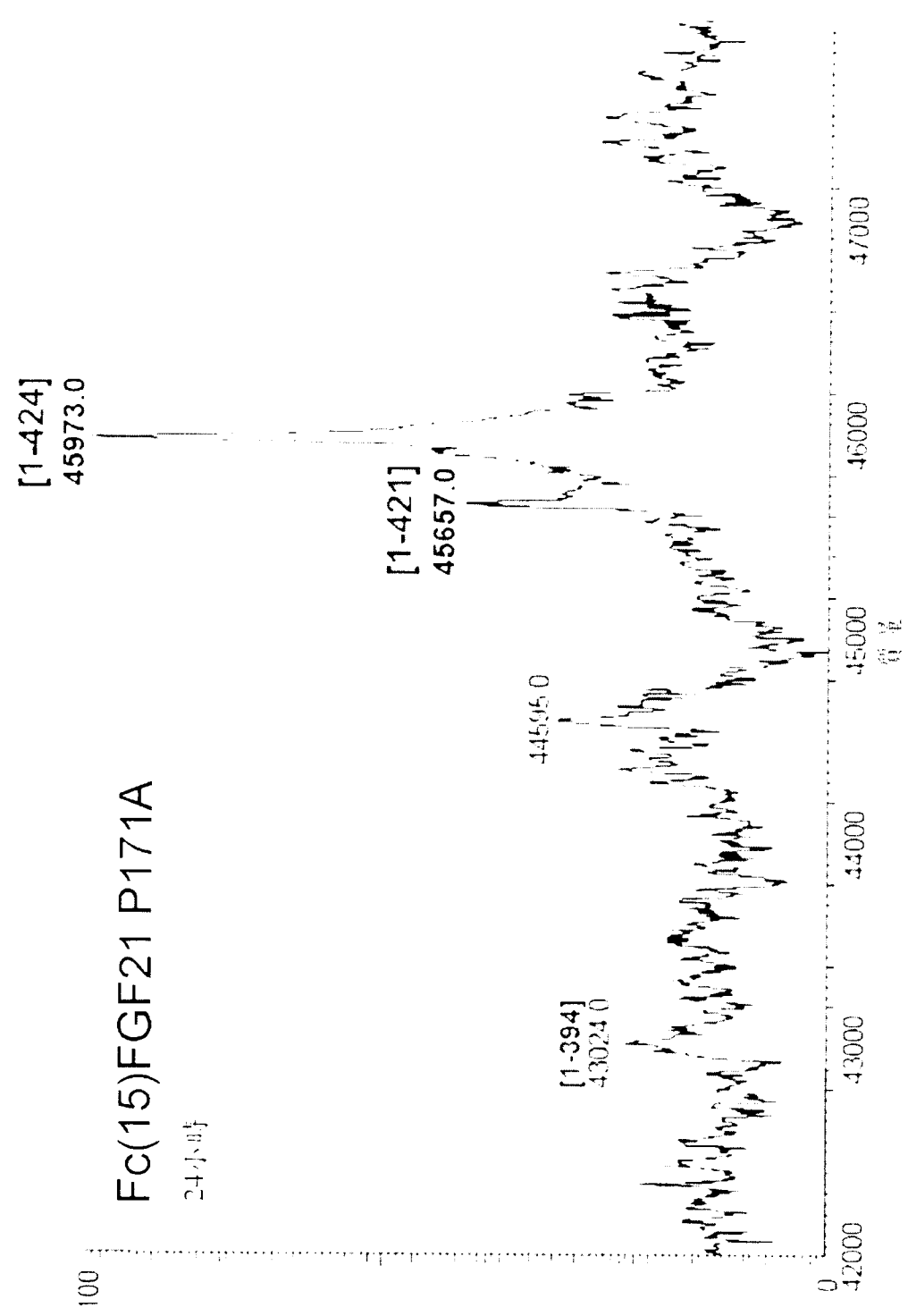


圖21A



圖21B



Fc(15)FGF21 P171A
24小时

圖21C

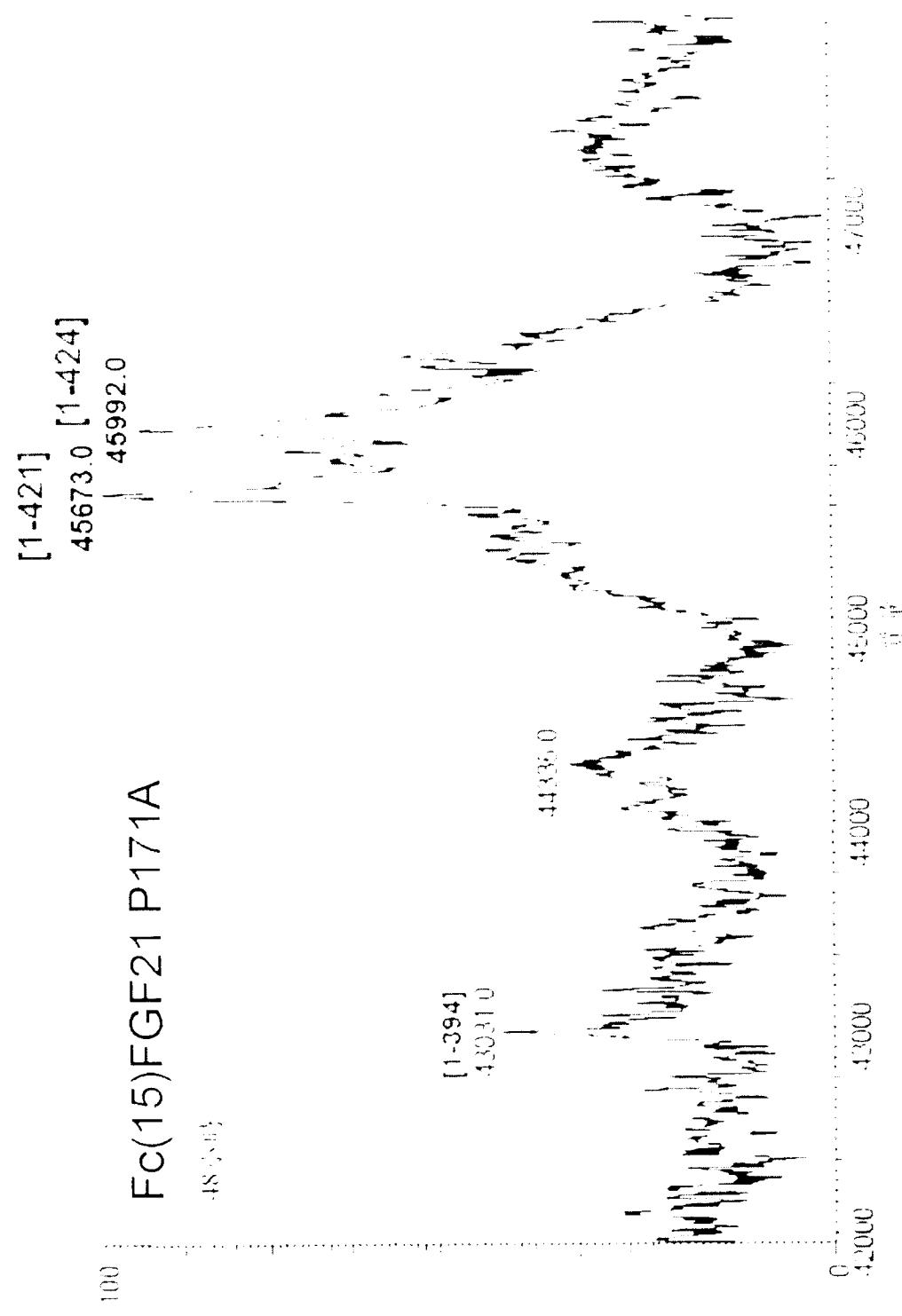


圖 21D

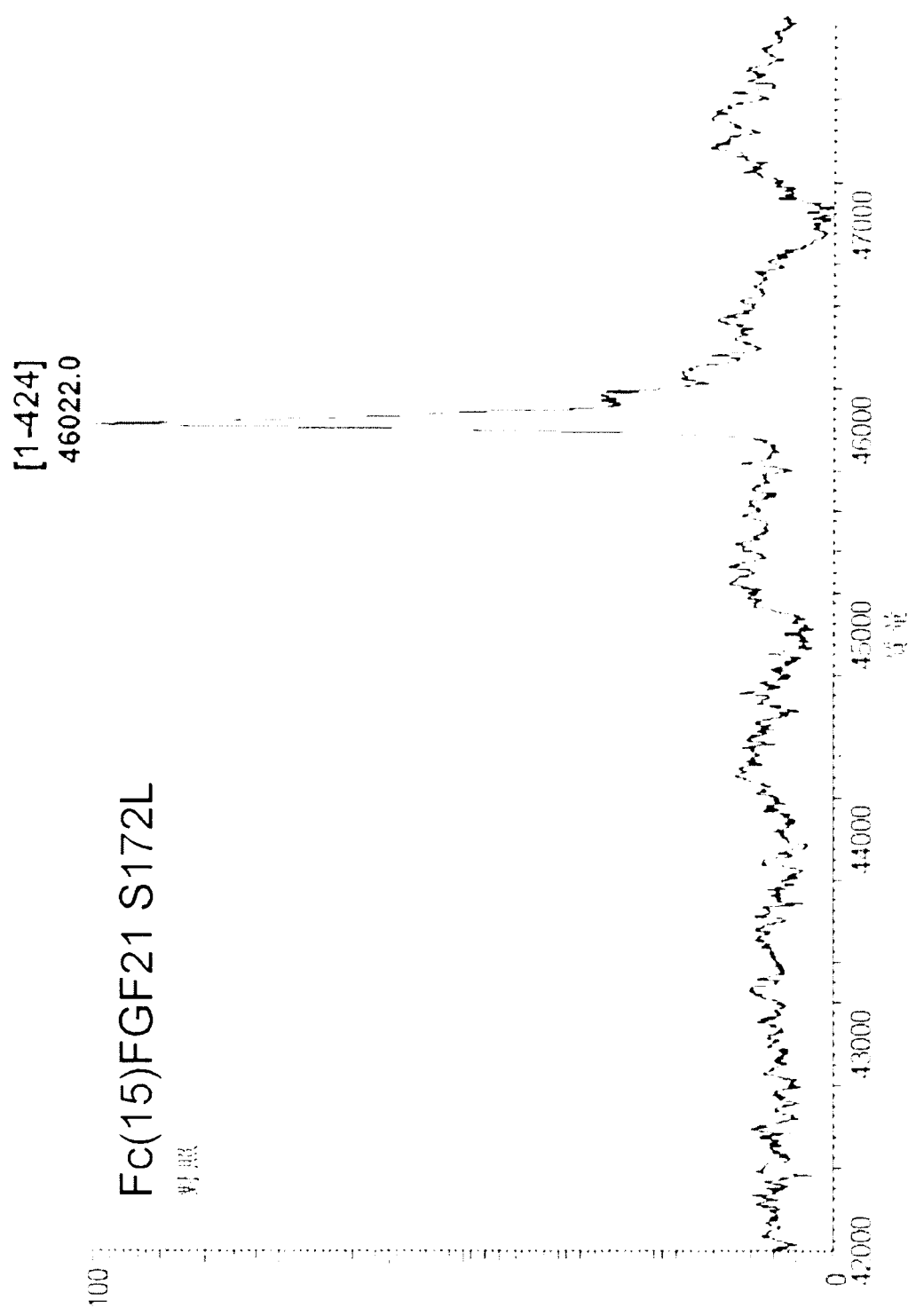


圖 22A

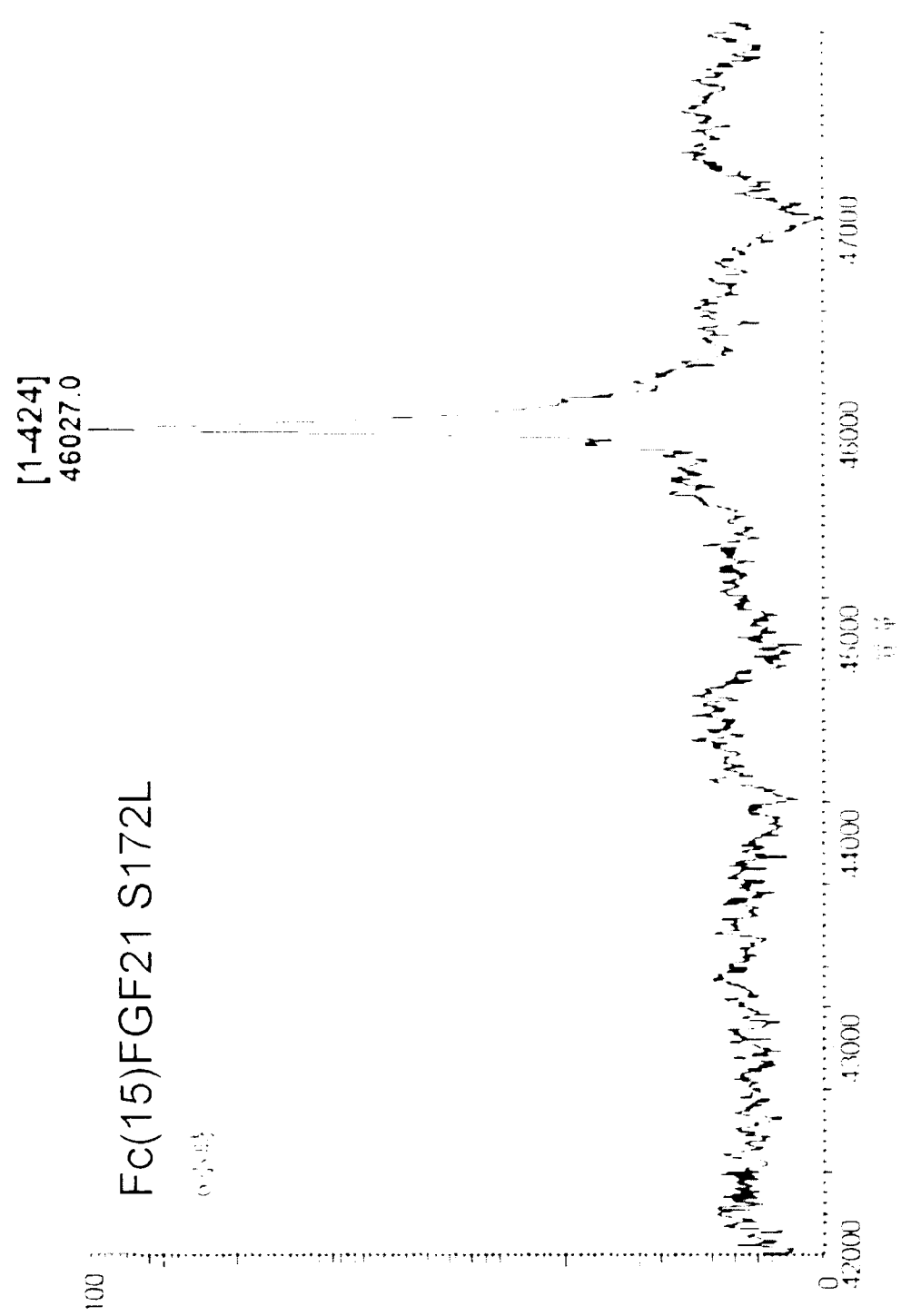


圖 22B

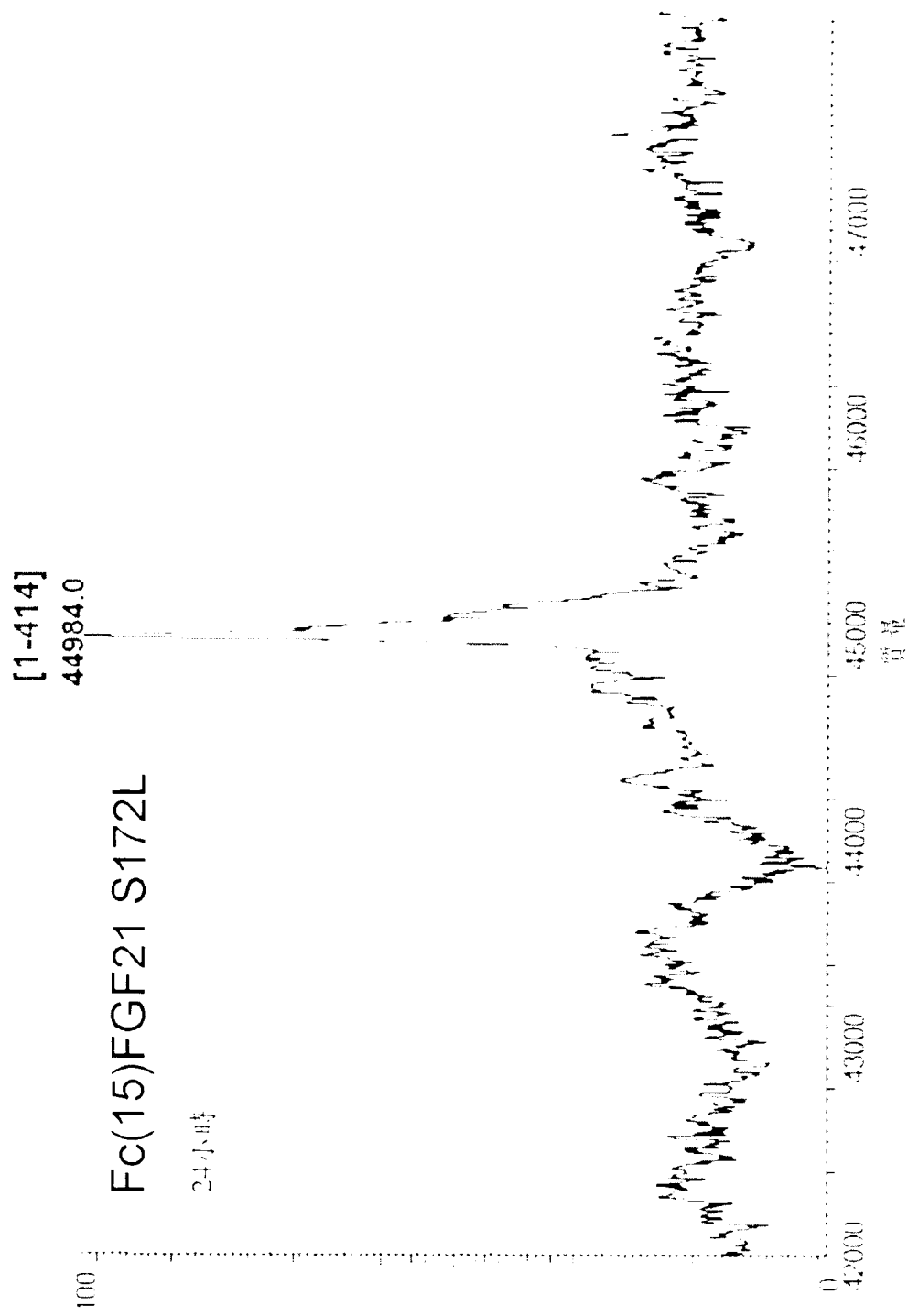


圖 22C

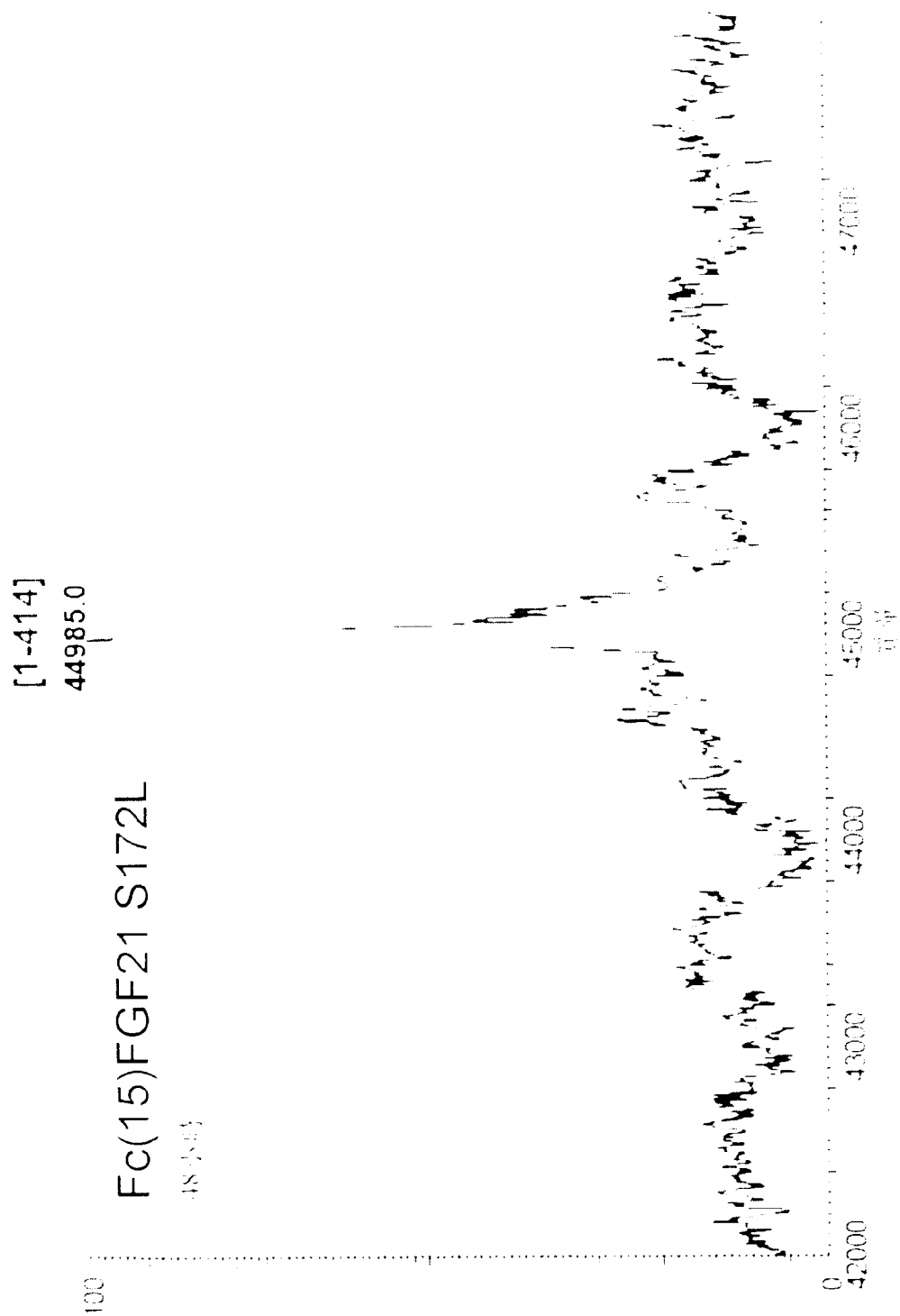


圖 22D

Fc(15)FGF21

MDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAL
YGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
APRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQG
RSPSYAS

6 小时 (20%)
24 小时 (100%) [1-414]
48 小时 (约 100%)

图 23A

Fc(15)FGF21 G170E

MDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAAHLEI
REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA
YGSLLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
APRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSNIVEPSOG
RSPSYAS

6小时 (0%)
24小时 (20%) [1-421]
48小时 (约40%)

图 23B

Fc(15)FGF21 P171A

MDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI
REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPQVILGVKTSRFLCQRPDGAL
YGS^LHFDP^EACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
APRGP^ARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG^ASSQG
RSPSYAS



6小时 (0%)
24小时 (約30%) **[1-421]**
48小时 (約50%)

 23C

Fc(15)FGF21 S172L

MDKTHTCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQOTEAHLEI
REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIOILGVKTSRFLCQRPDGAL
YGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP
APRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPLQG
RSPSYAS



0 300 600
[1-414] 31 303 1000
48 303 1000

圖 23D

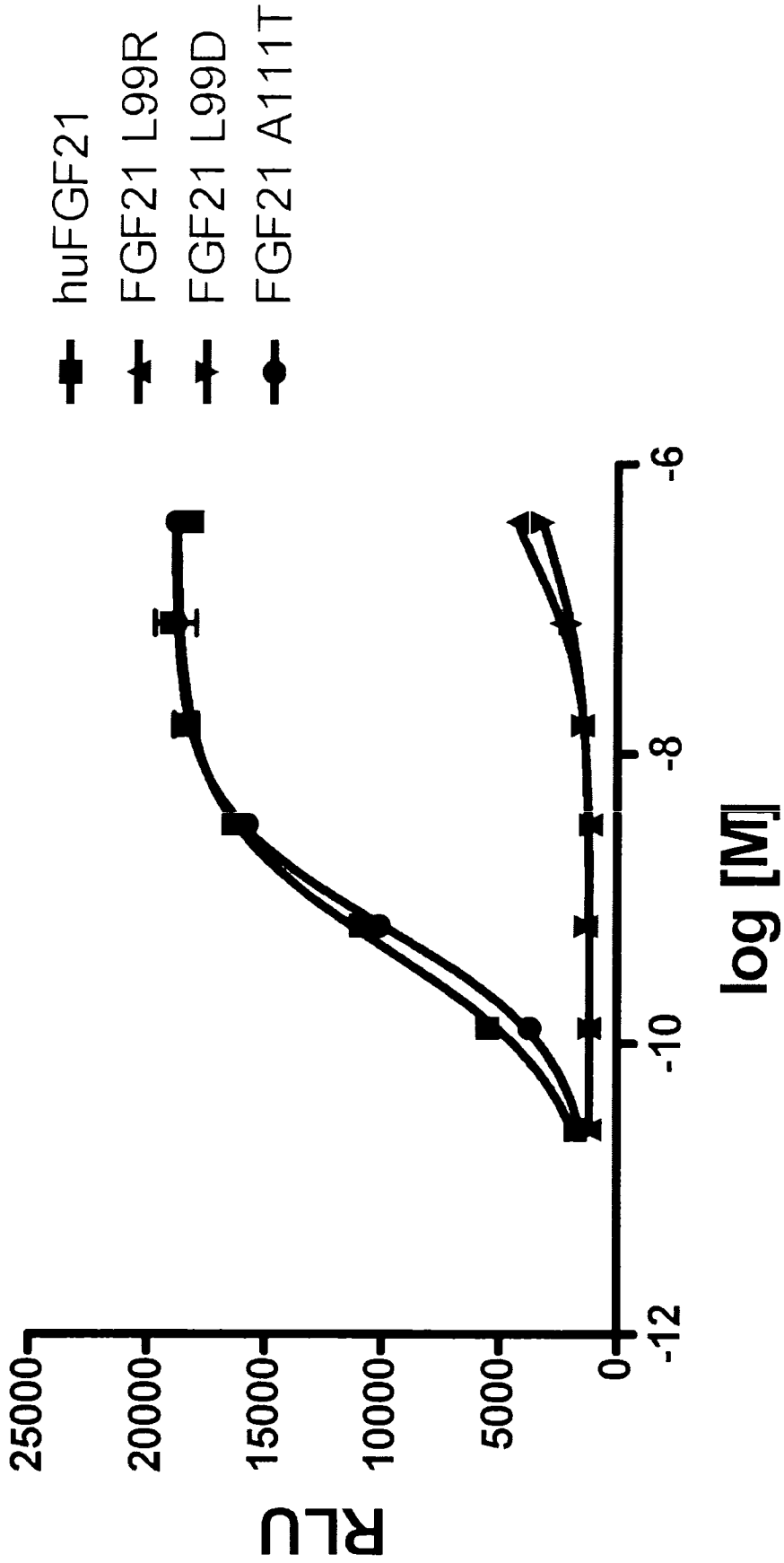


圖 24A

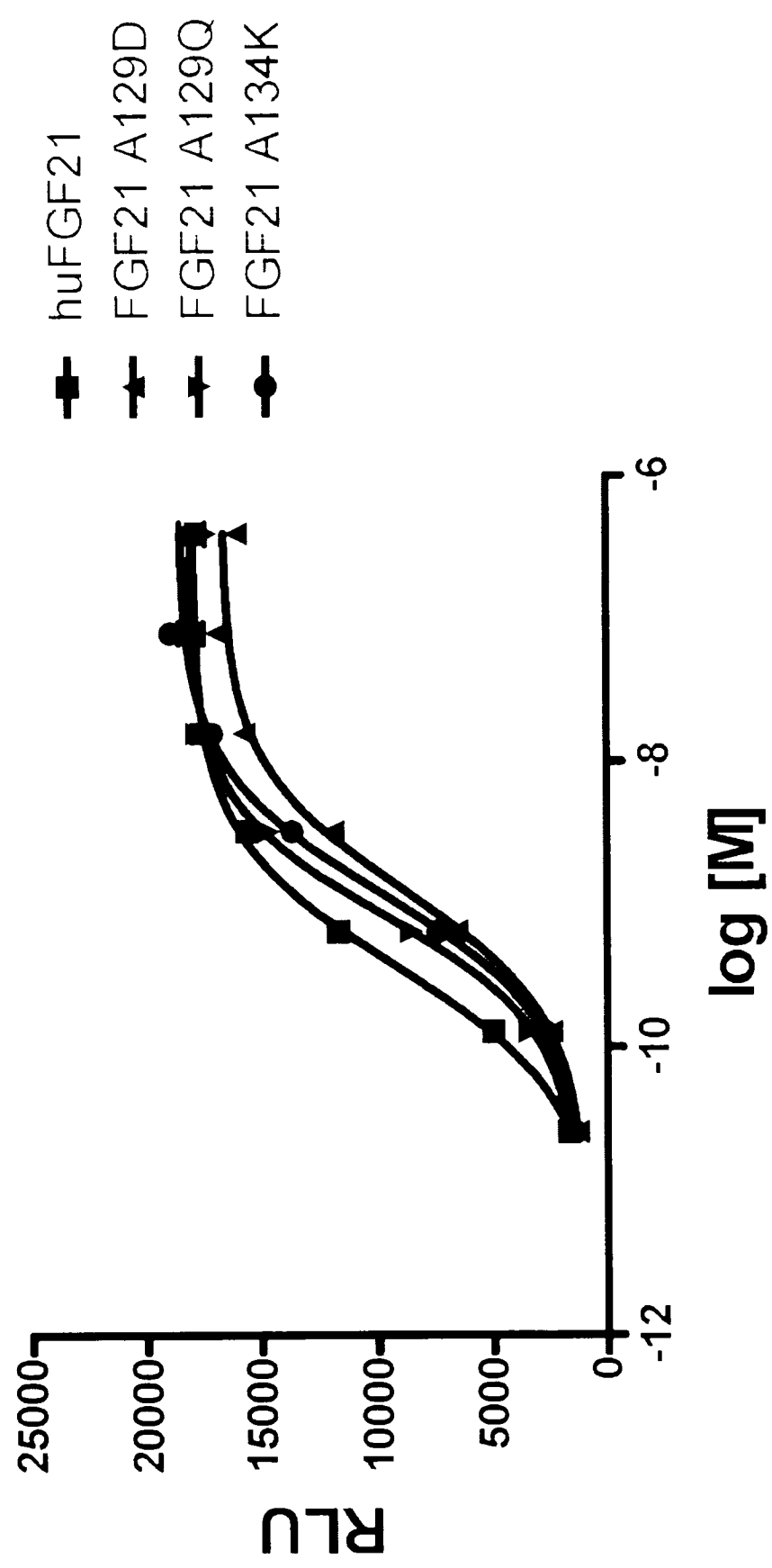


圖 24B

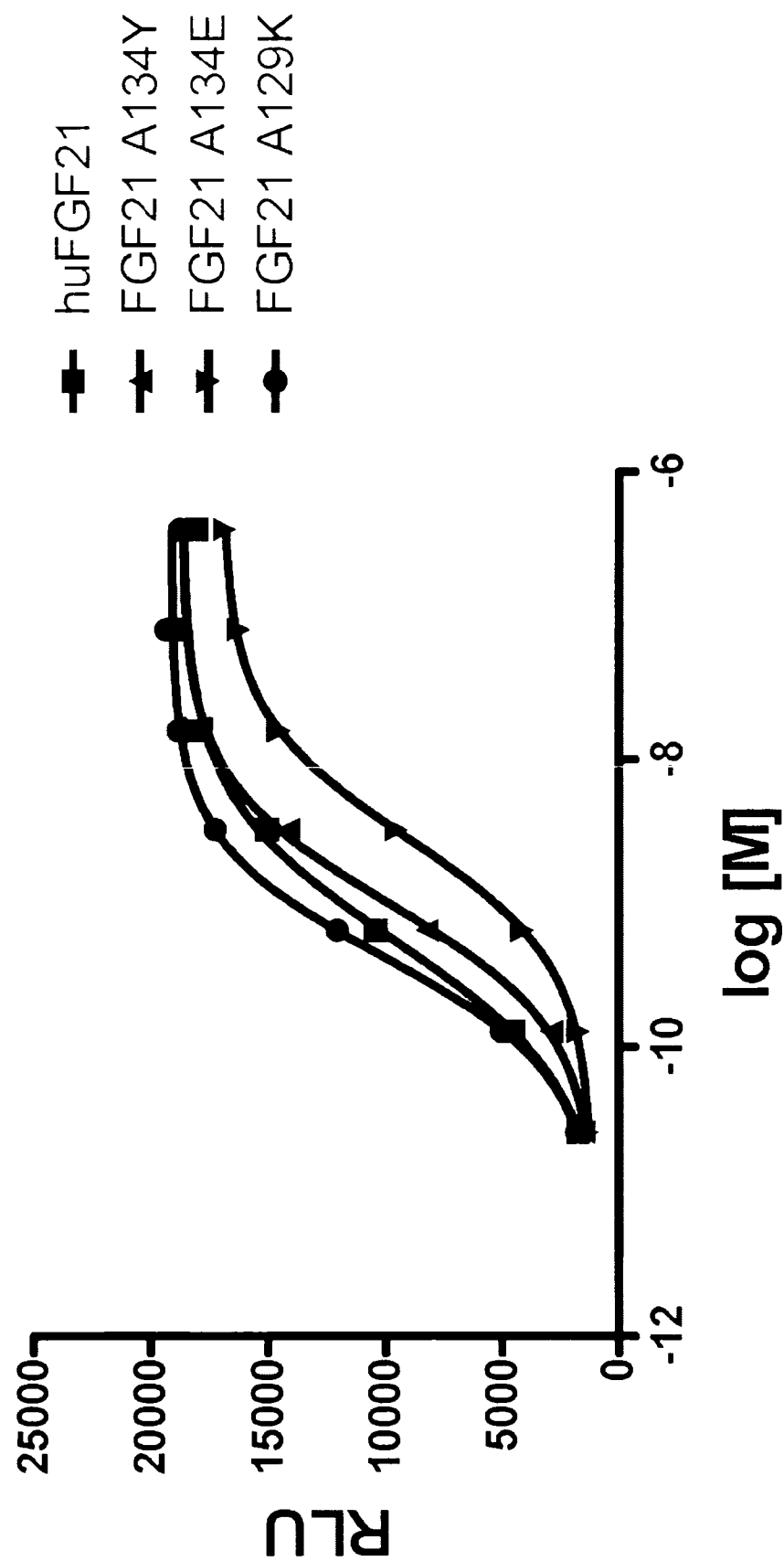


圖 24C

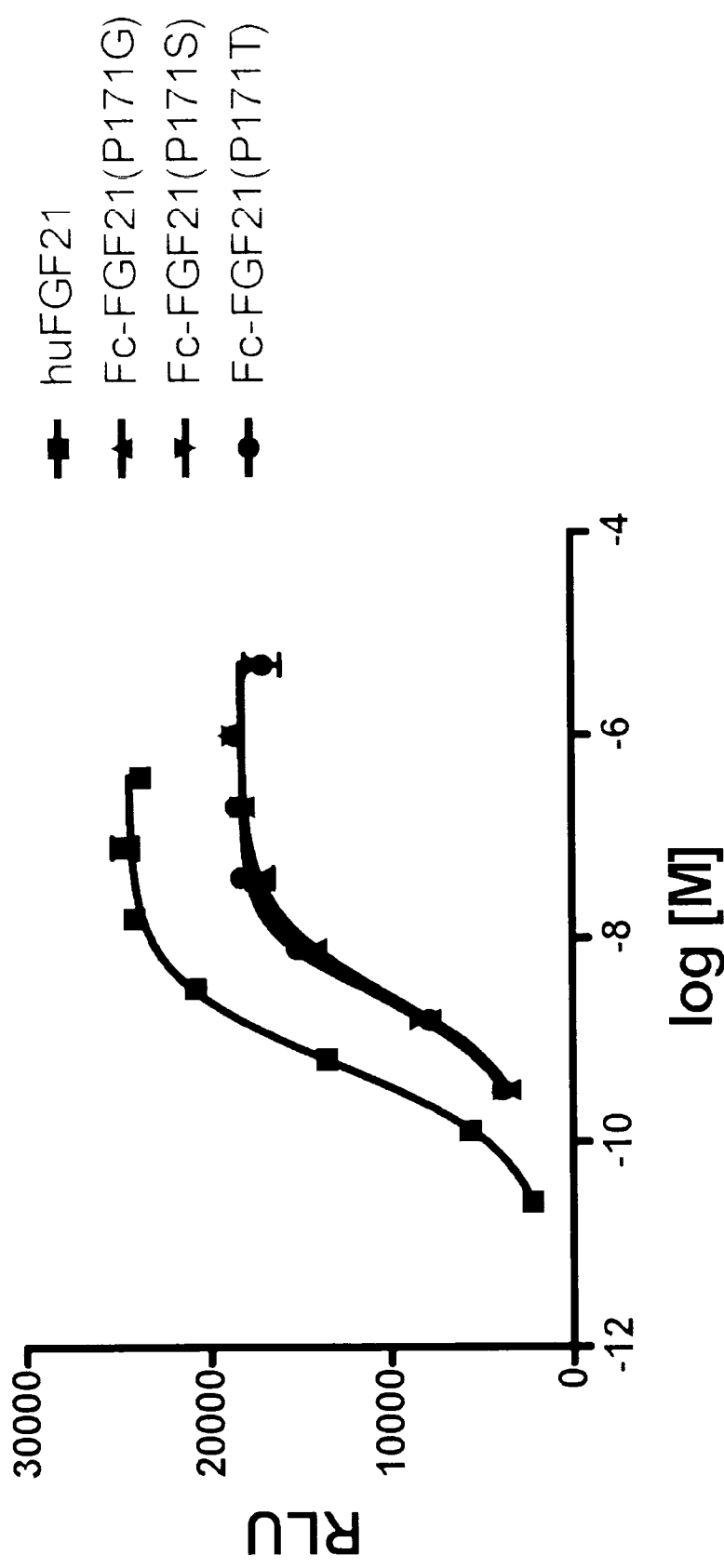


圖 25A

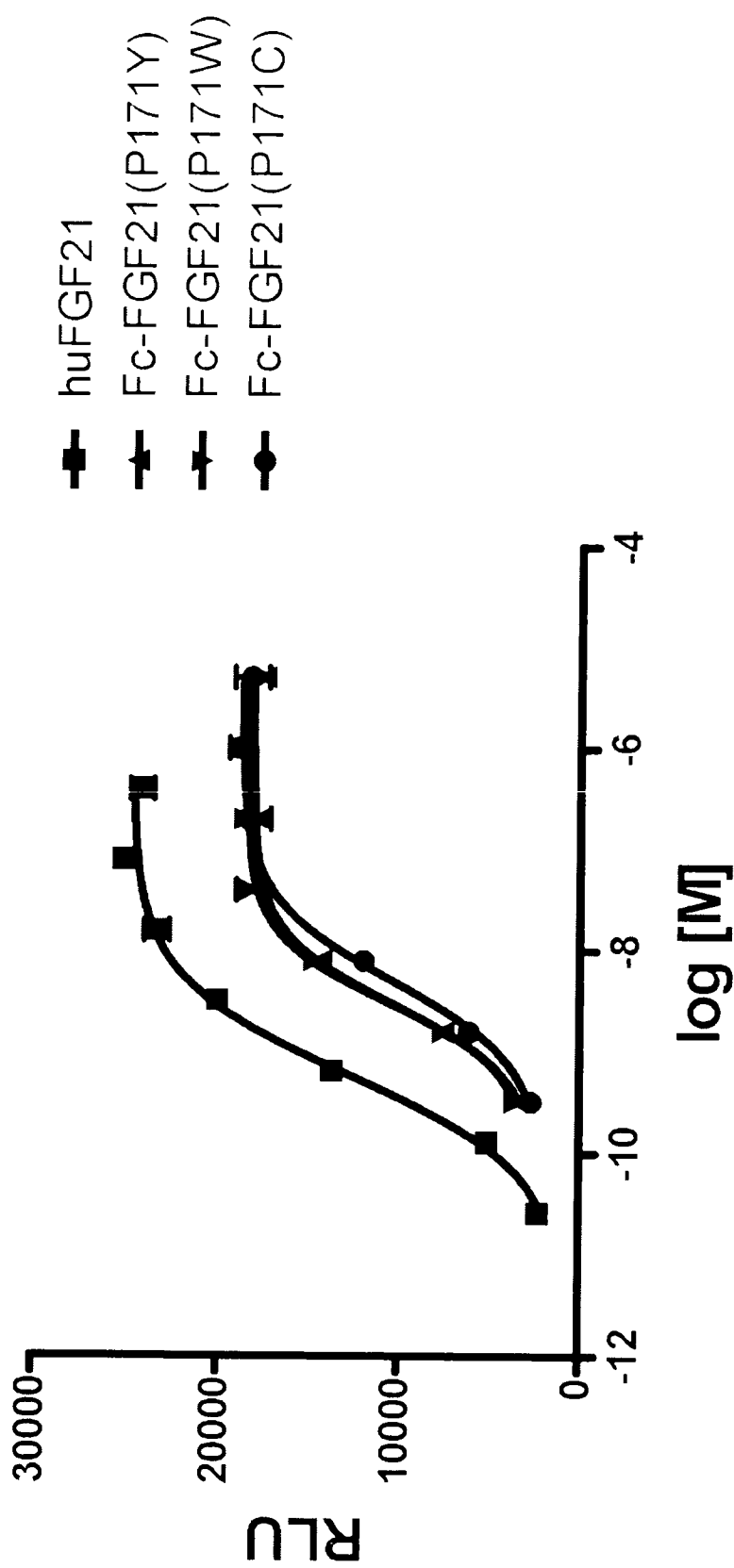


圖 25B

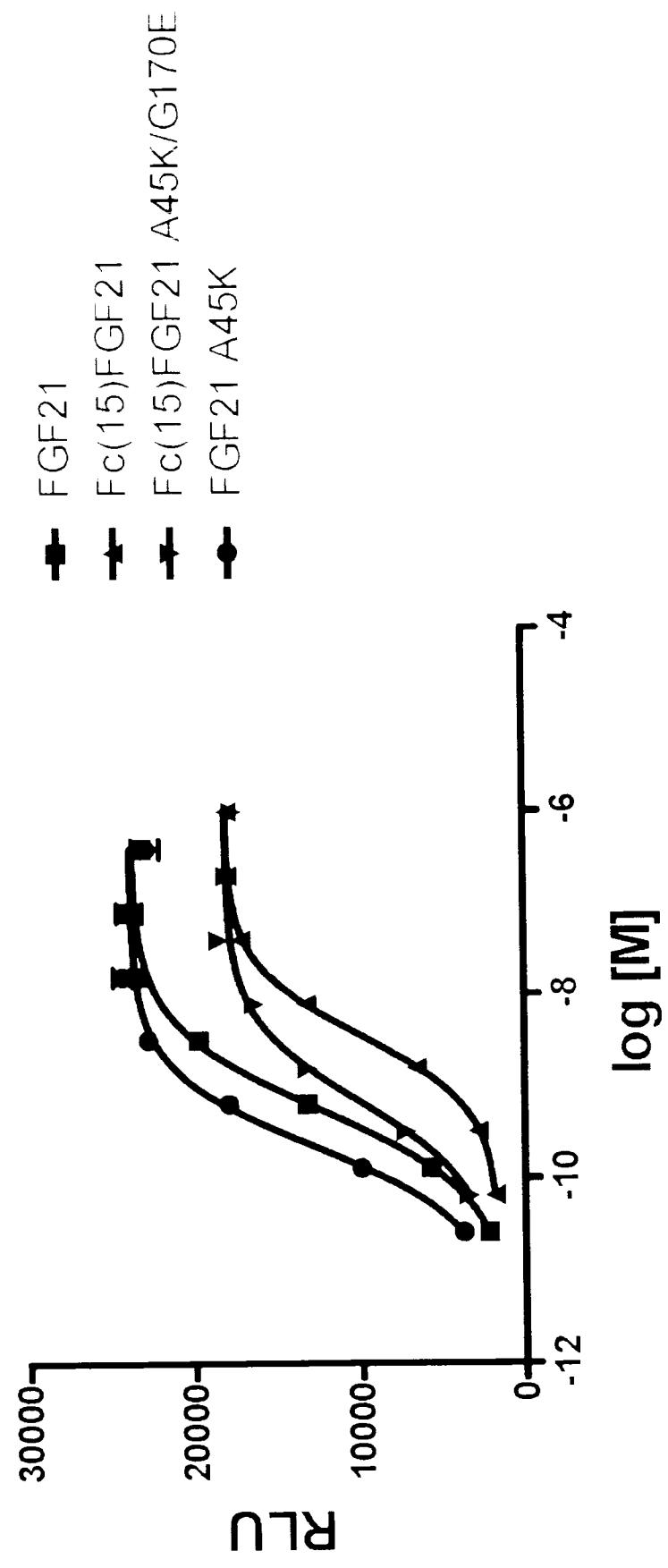


圖 25C

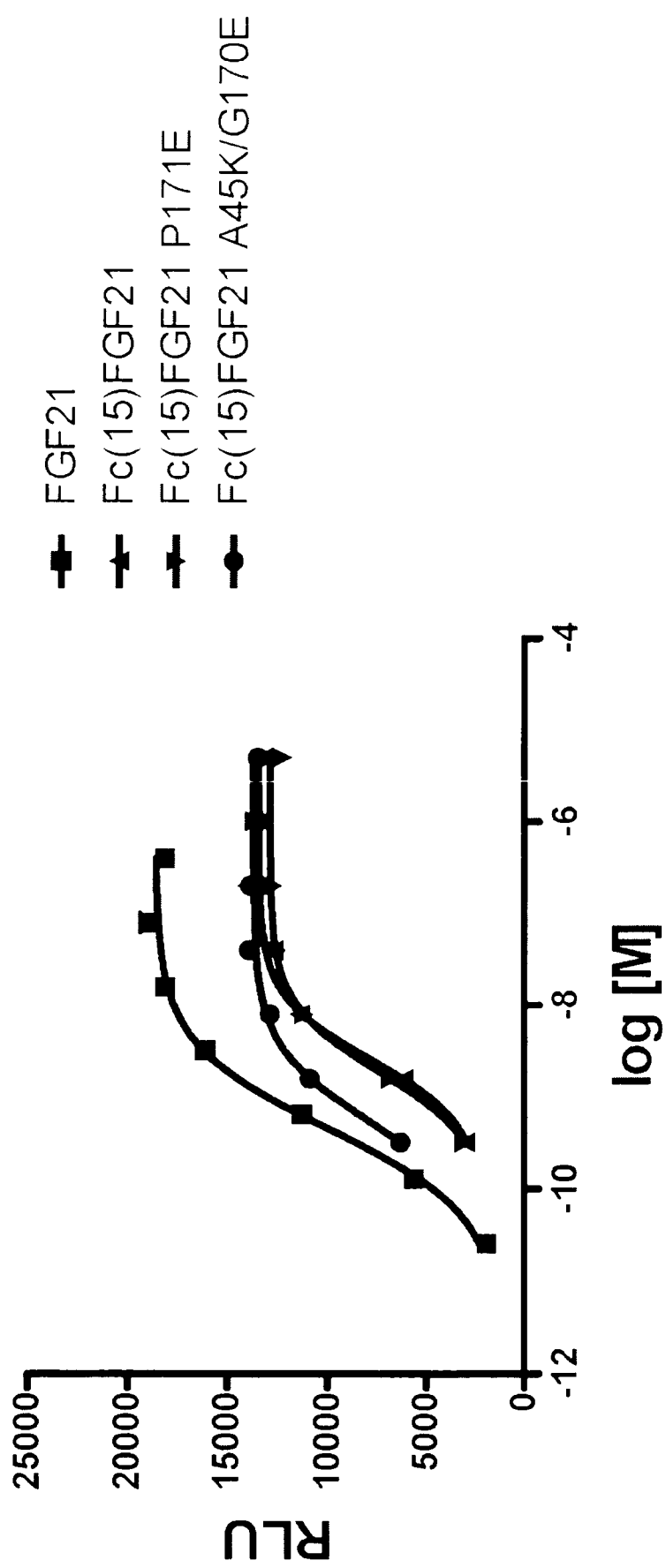


圖 25D

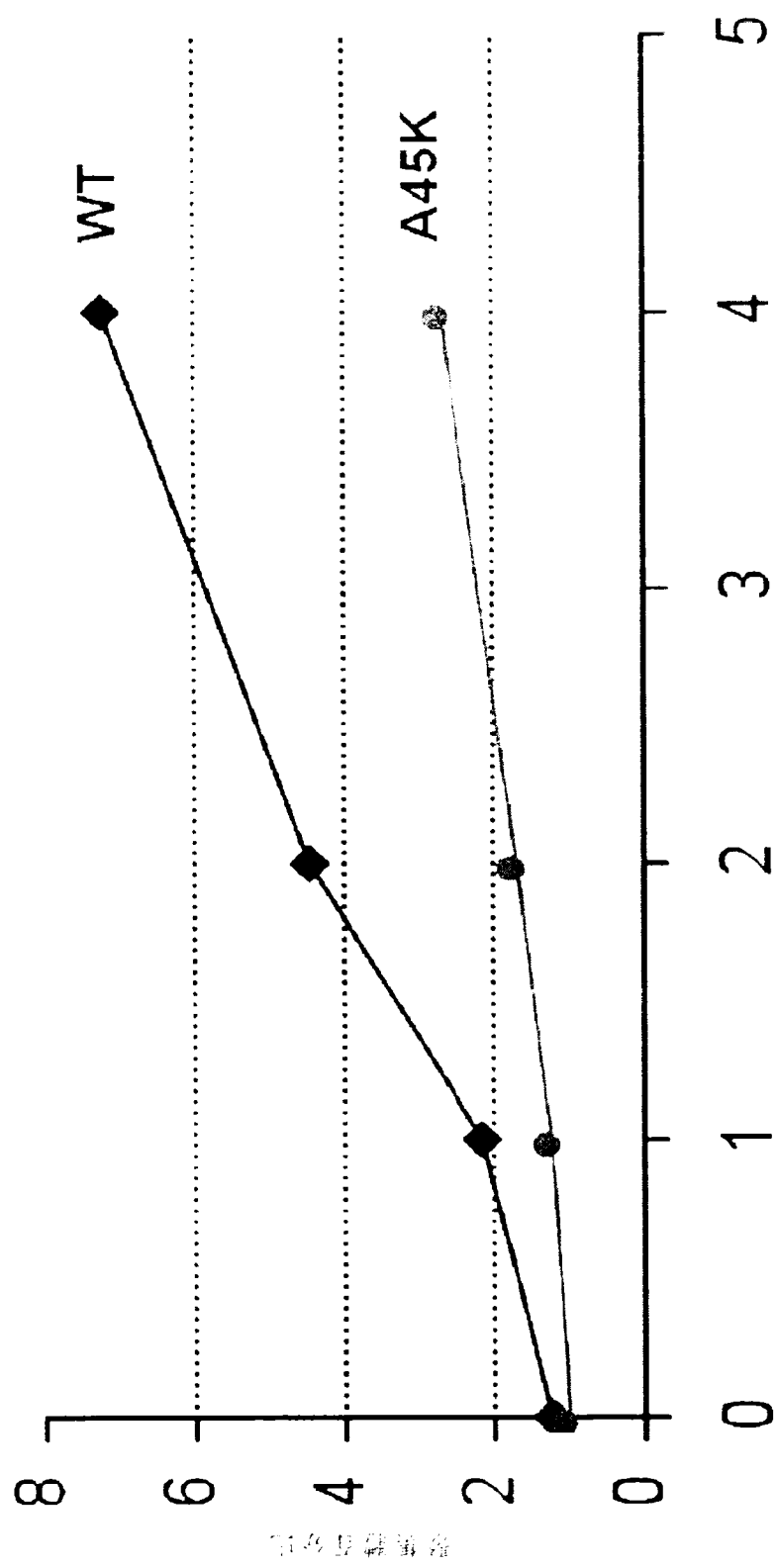


圖26A

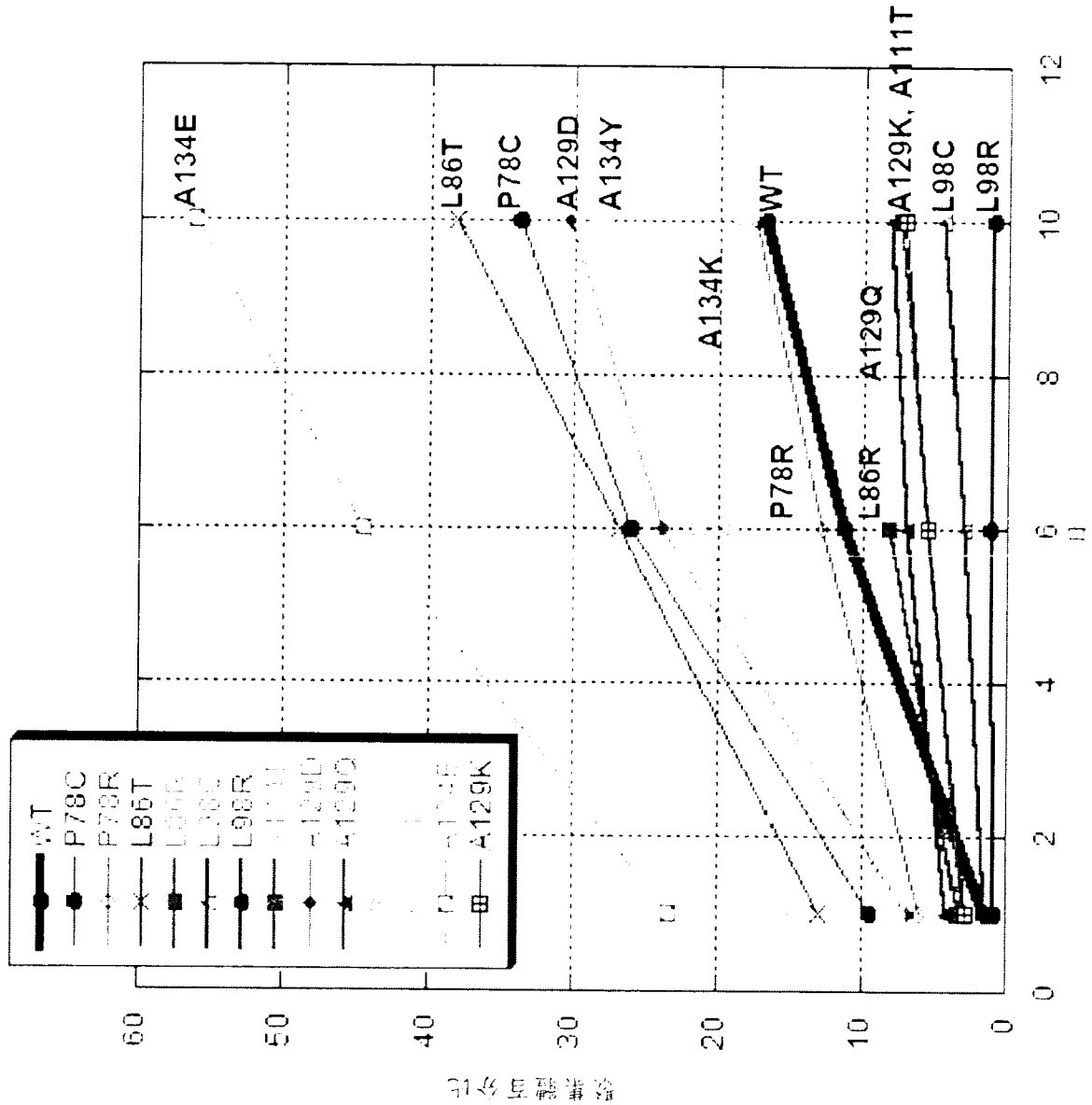


圖 26B

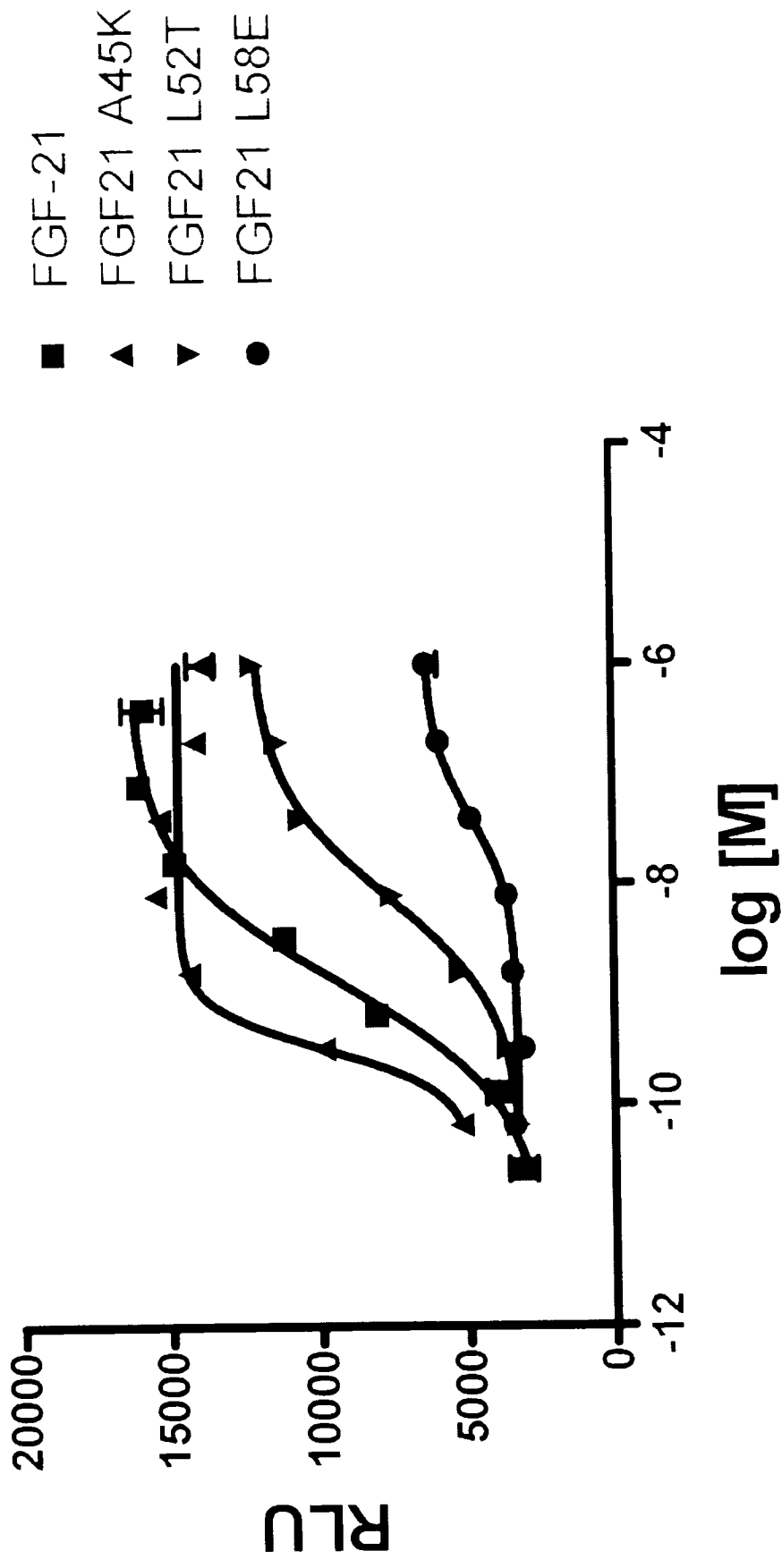


圖 27

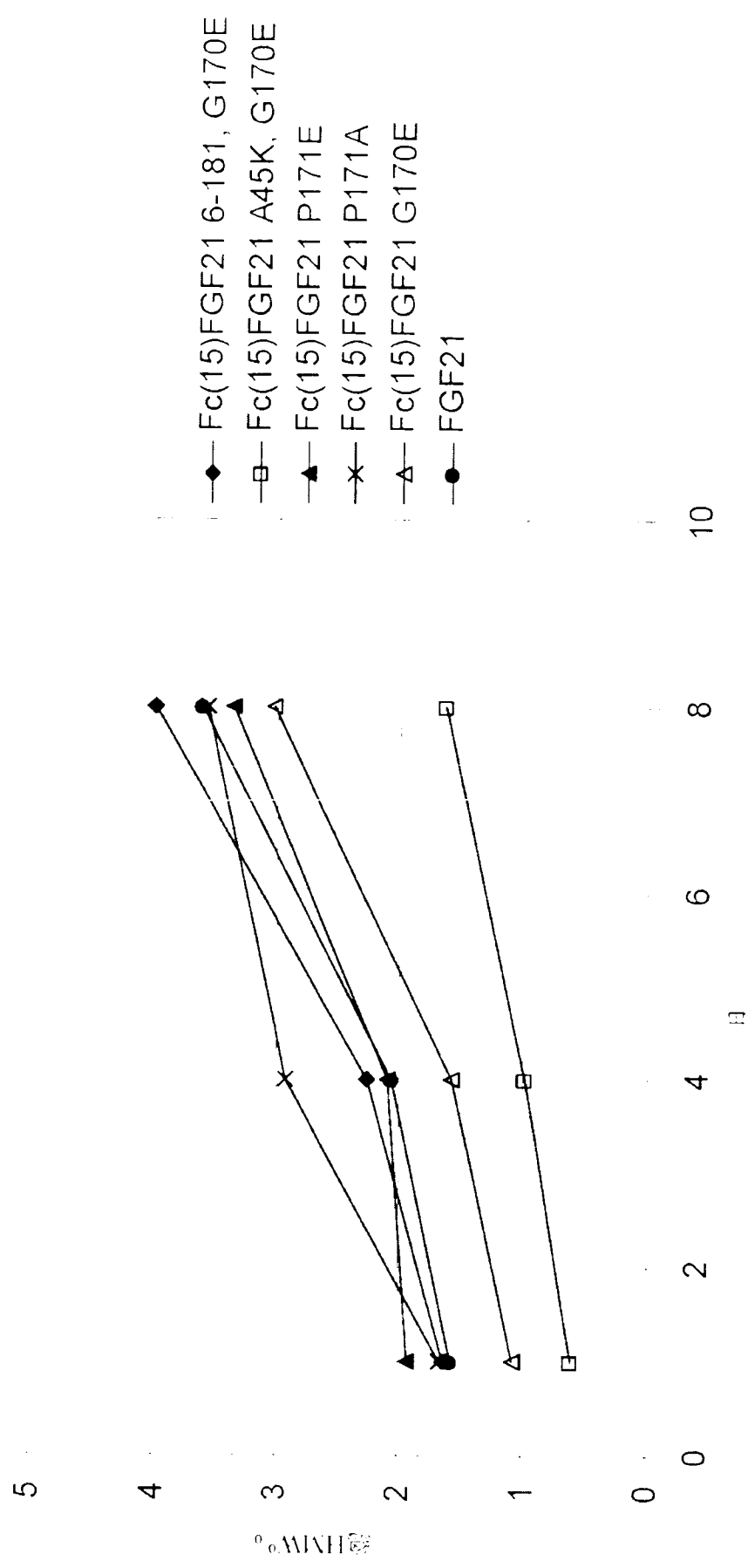


圖 28A



圖 28B

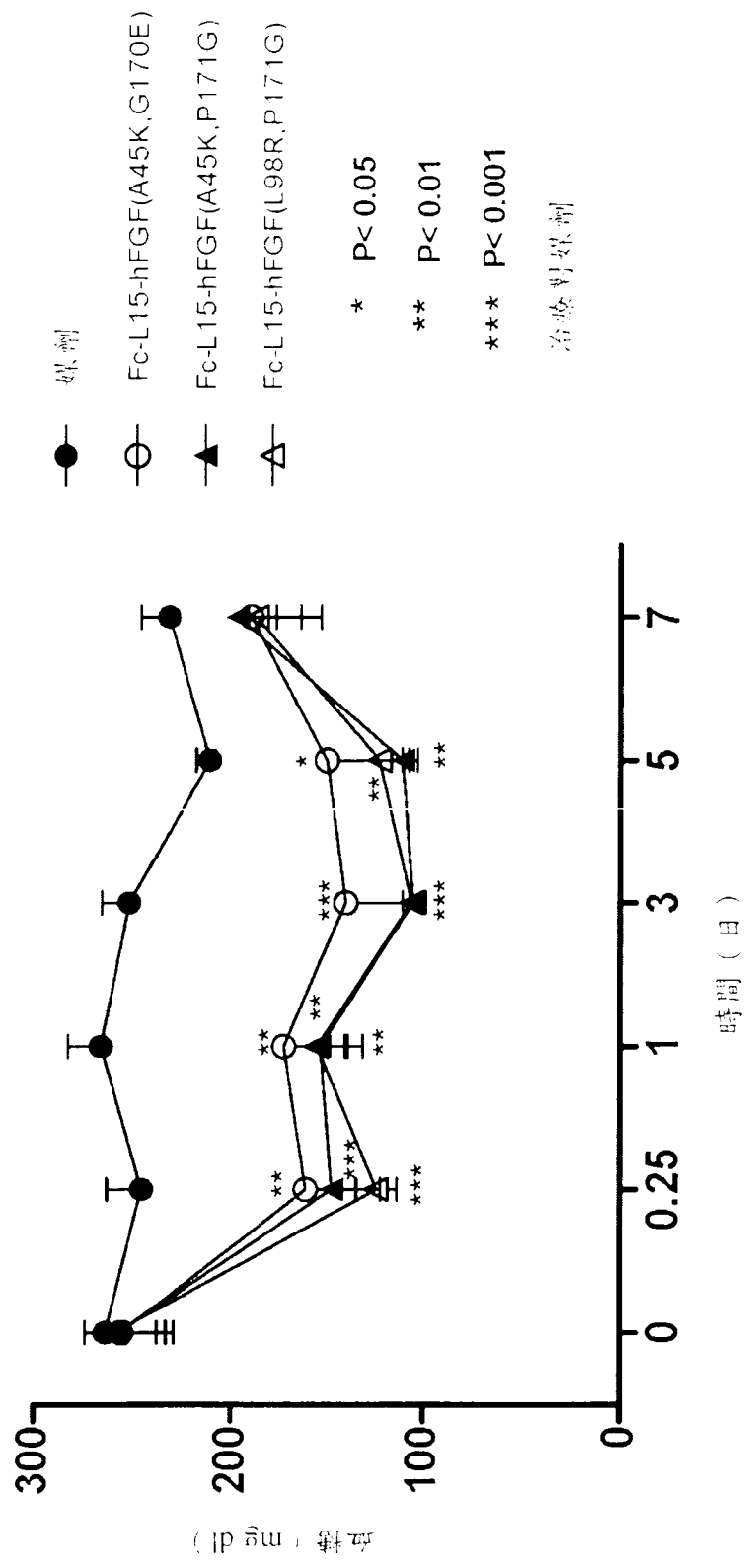


圖29

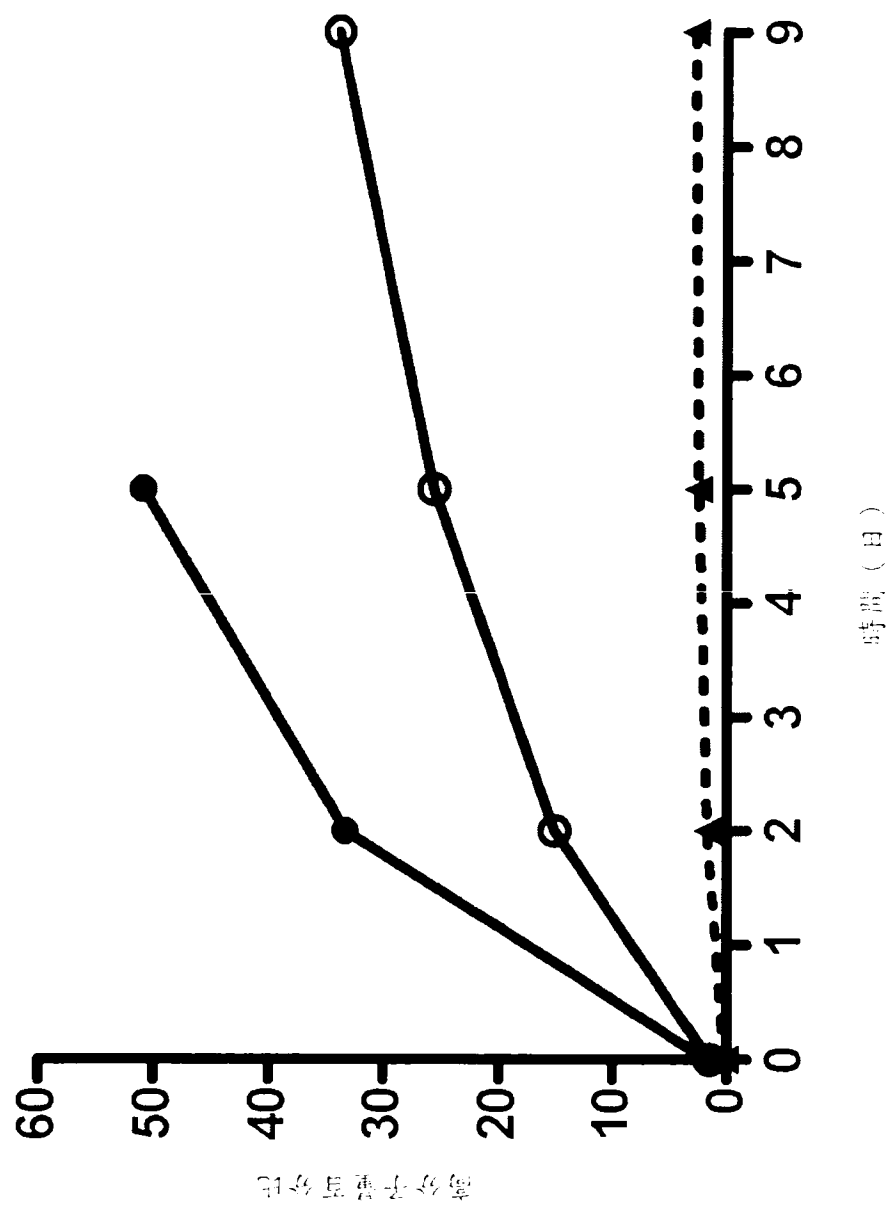


圖31A

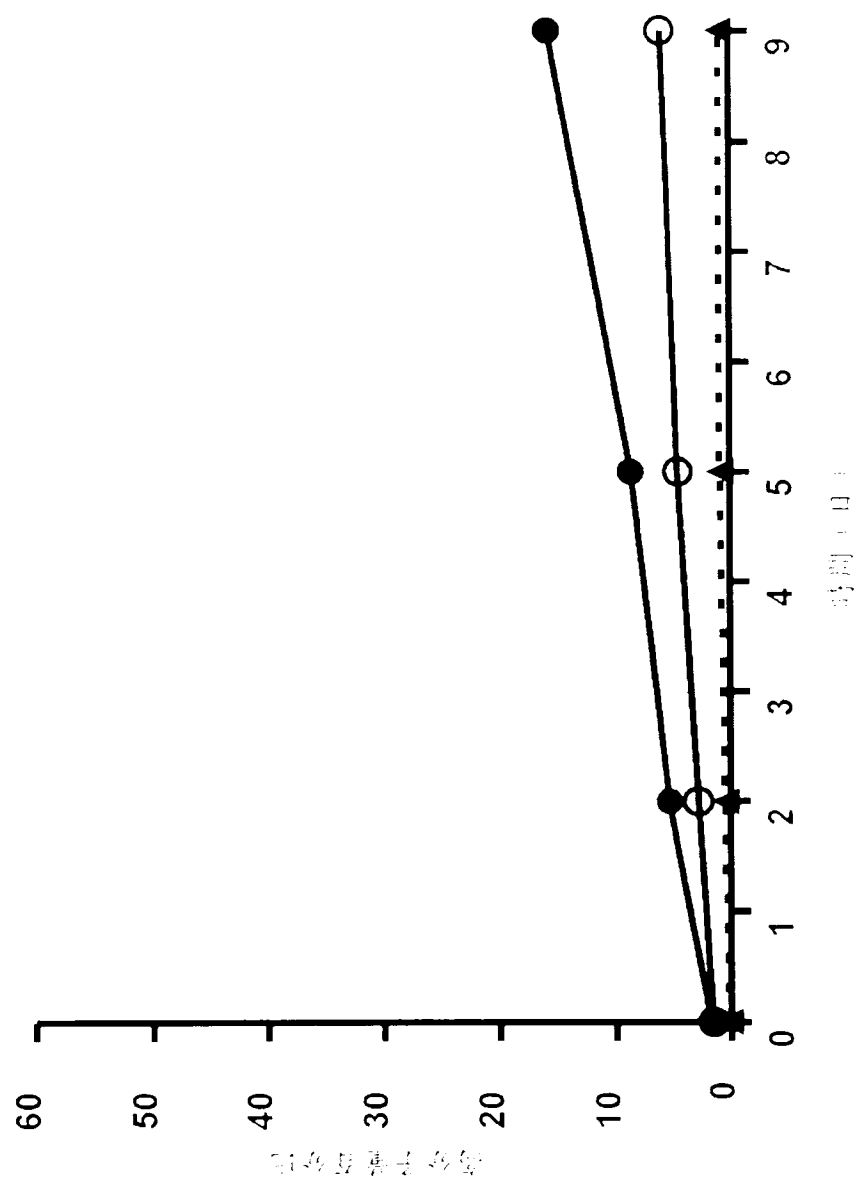


圖 31B

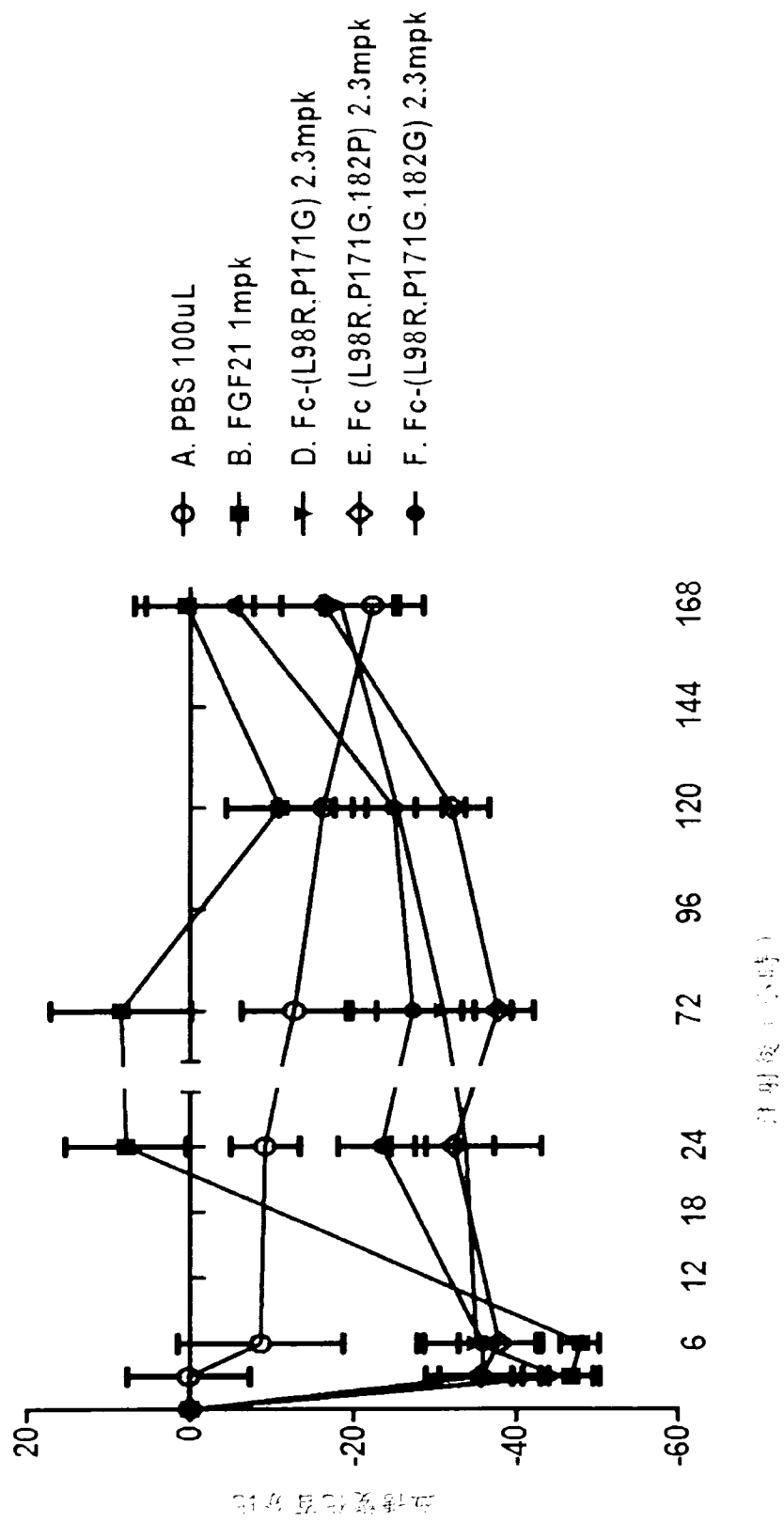


圖 33

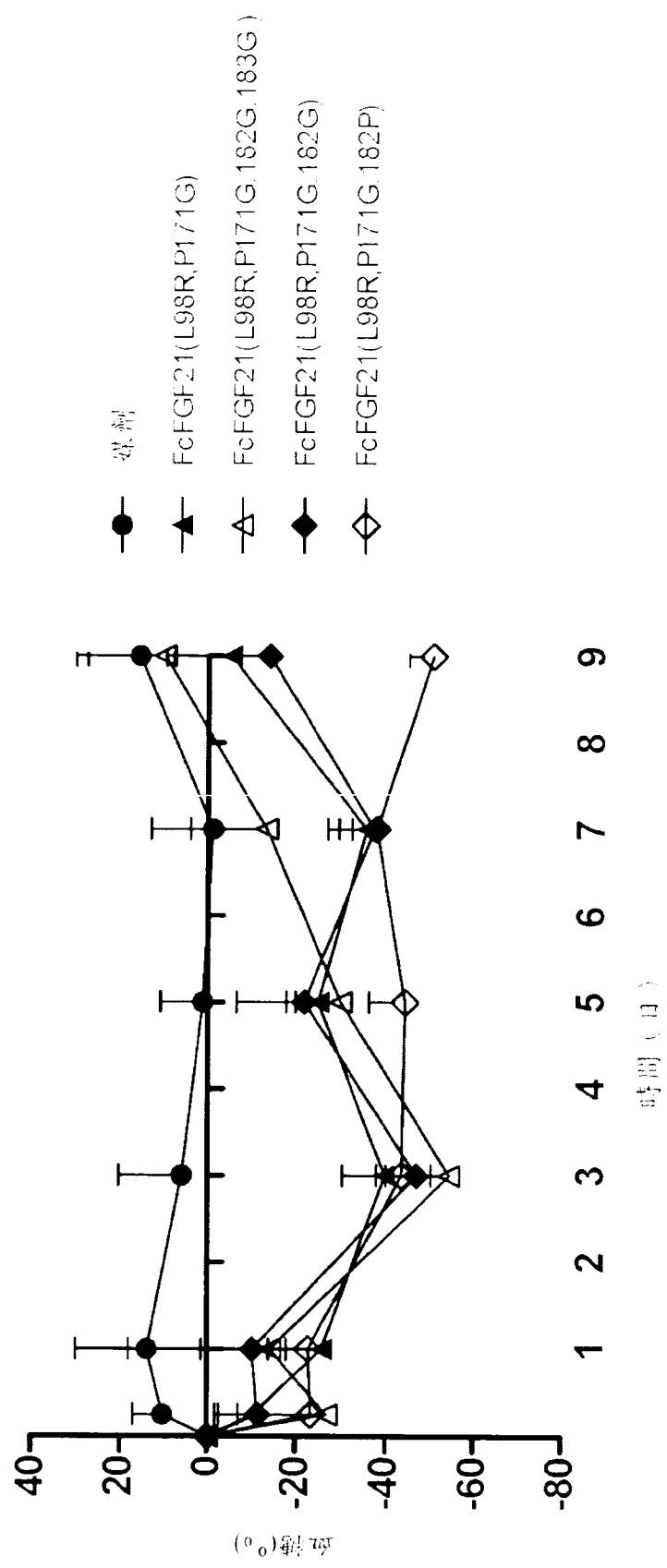


圖34

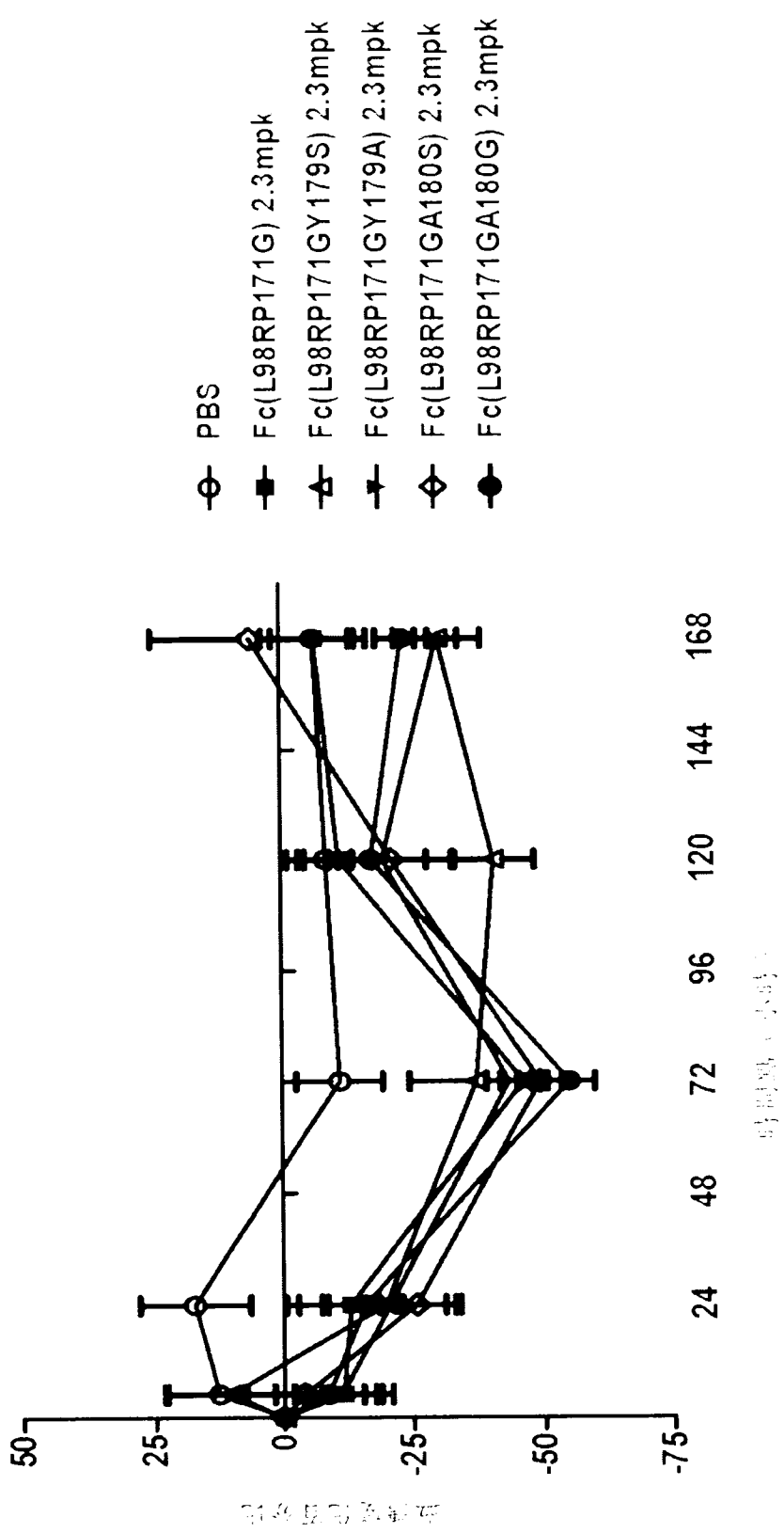


圖 35

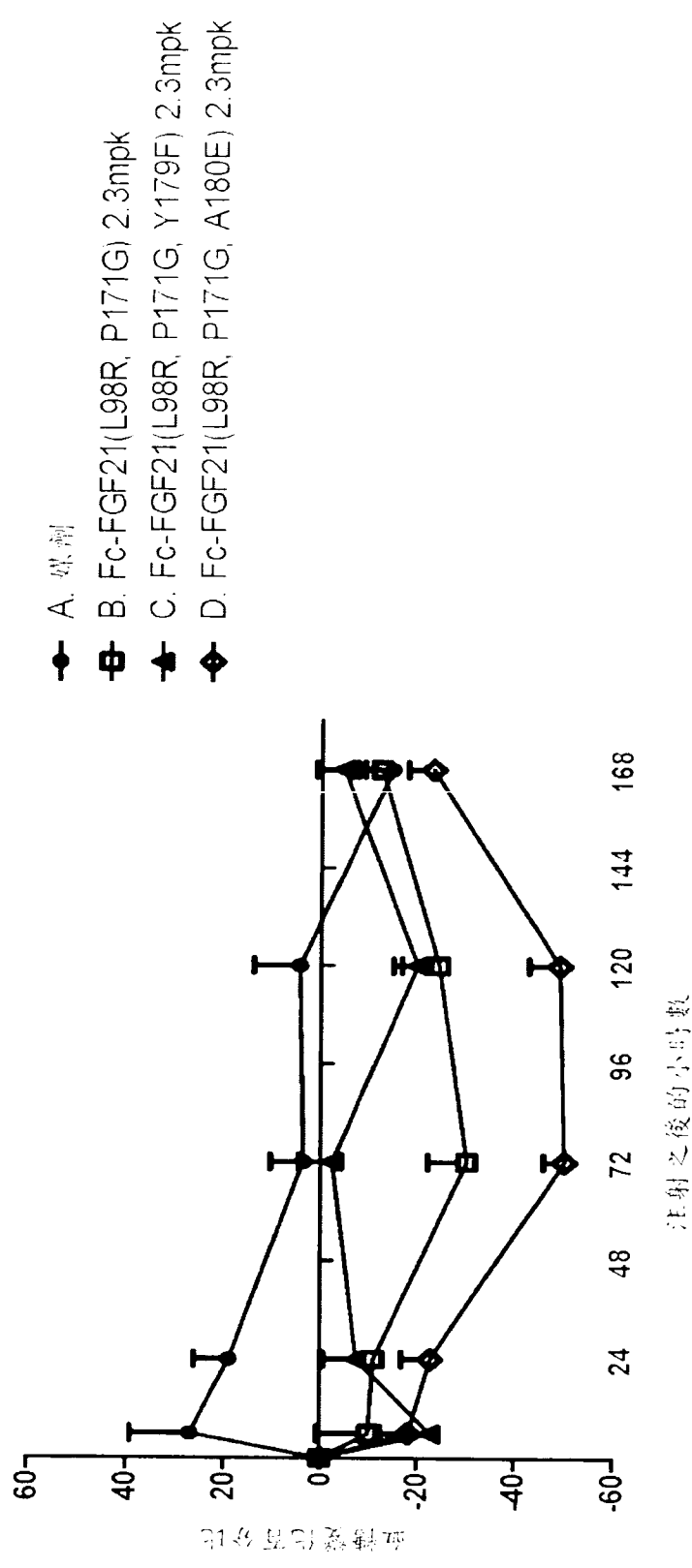


圖36

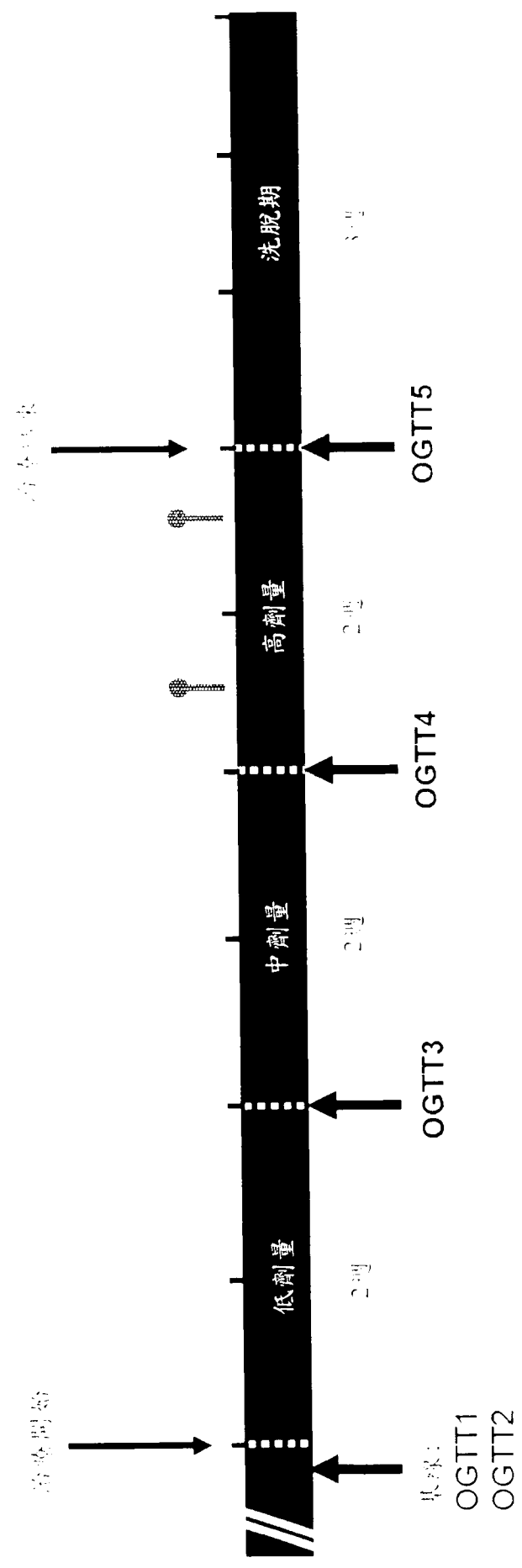


圖37

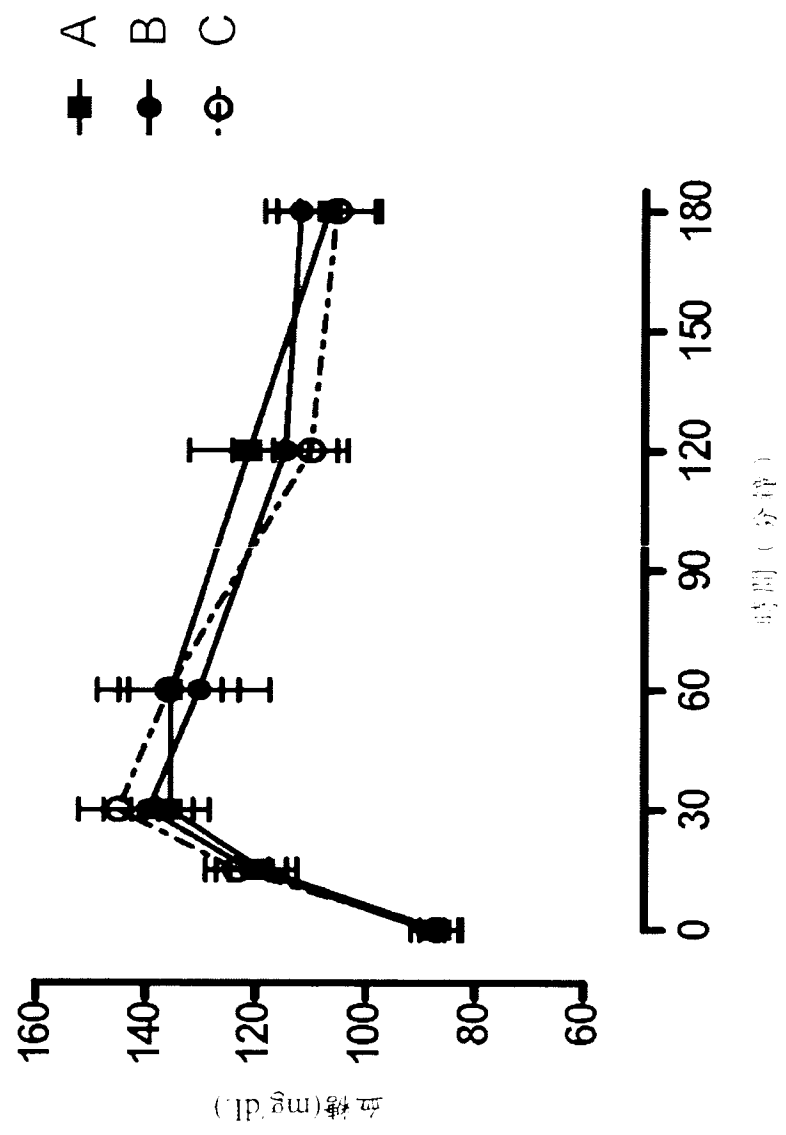


圖 38A

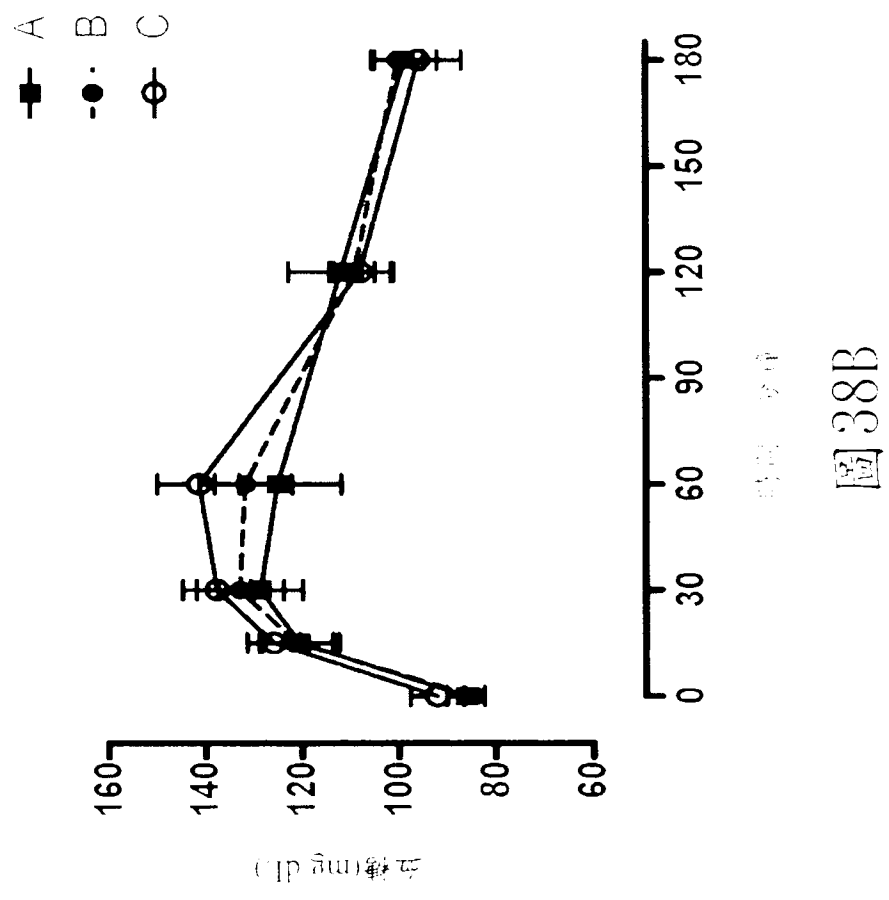


図 38B

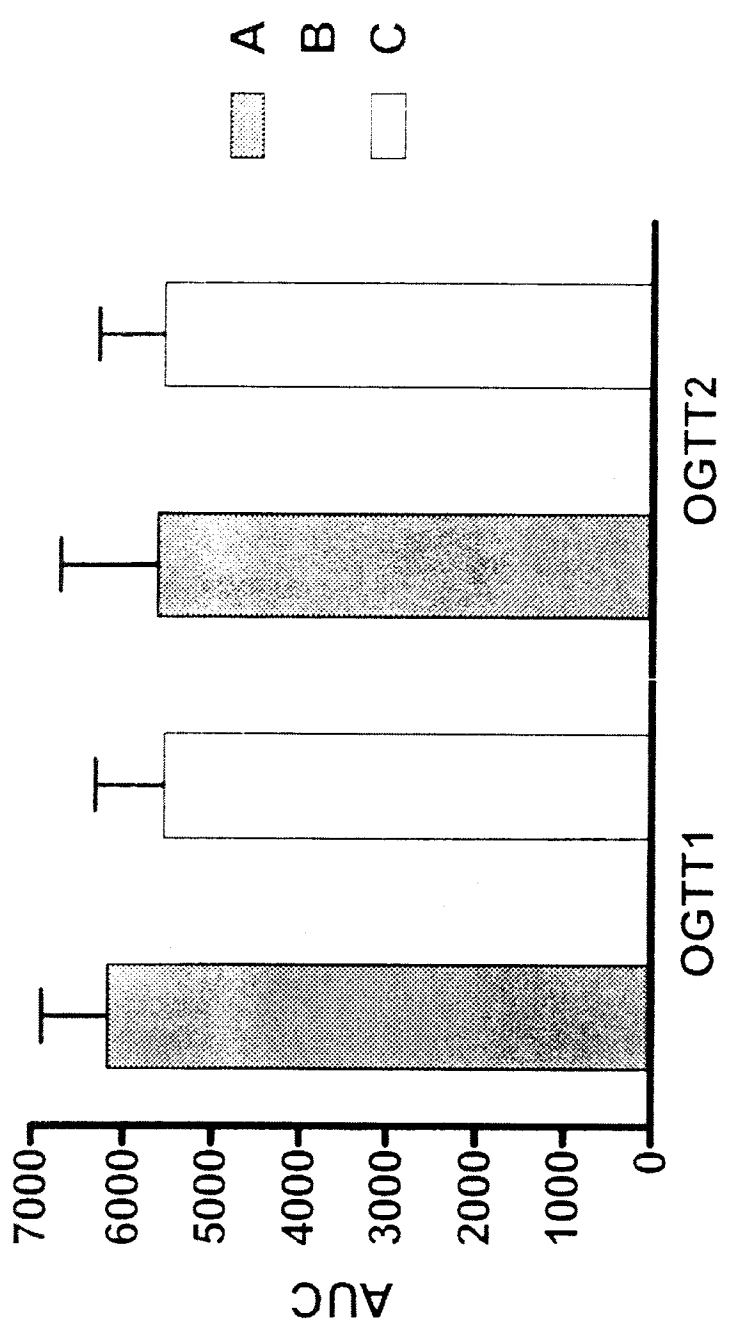


圖 38C

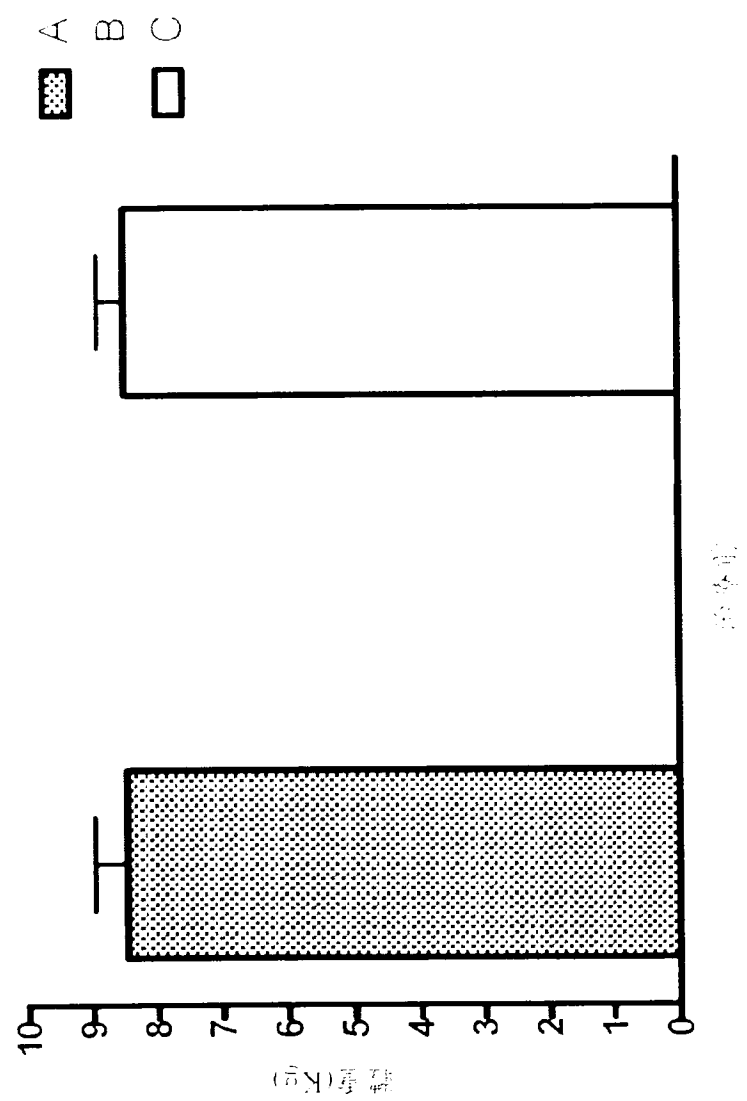


圖 38D

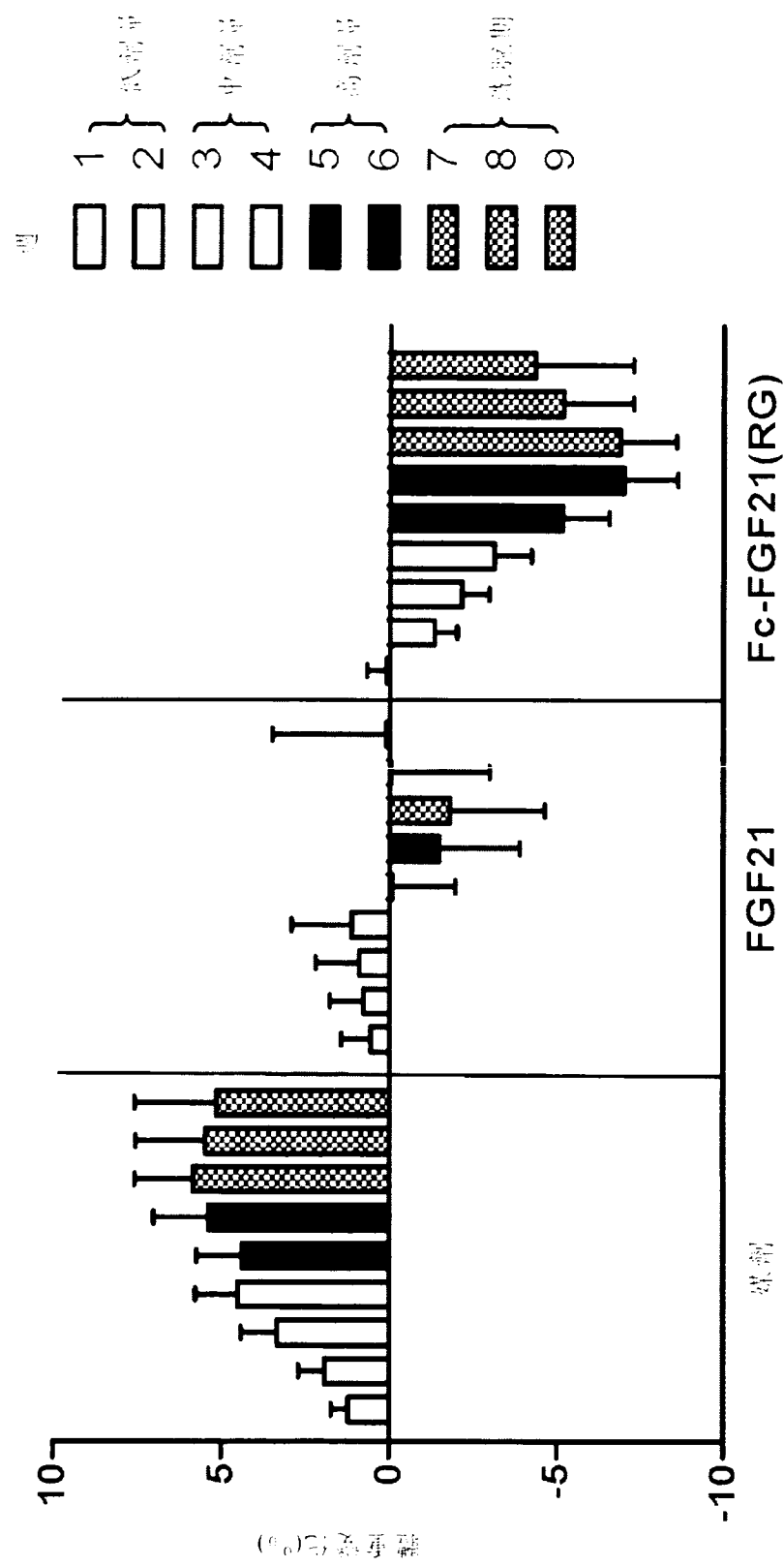


圖 39

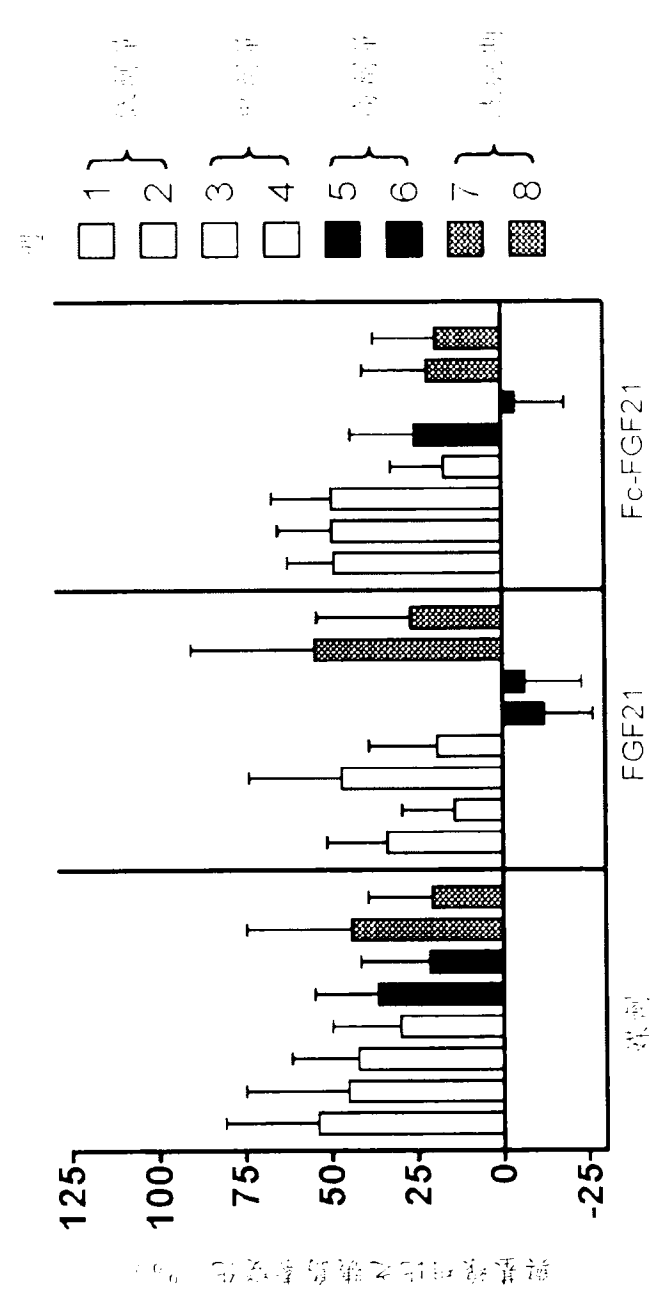


圖 40

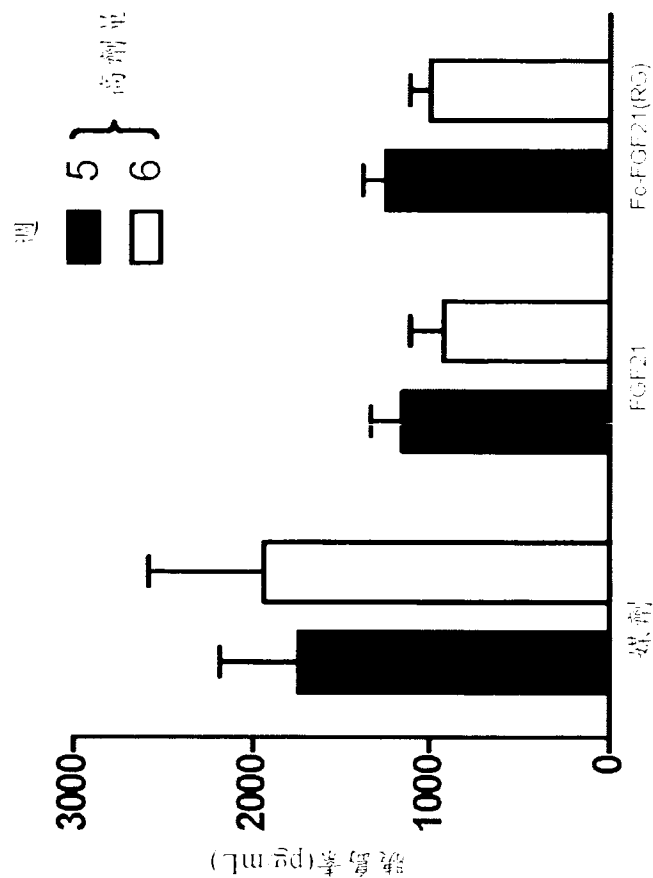


圖 41

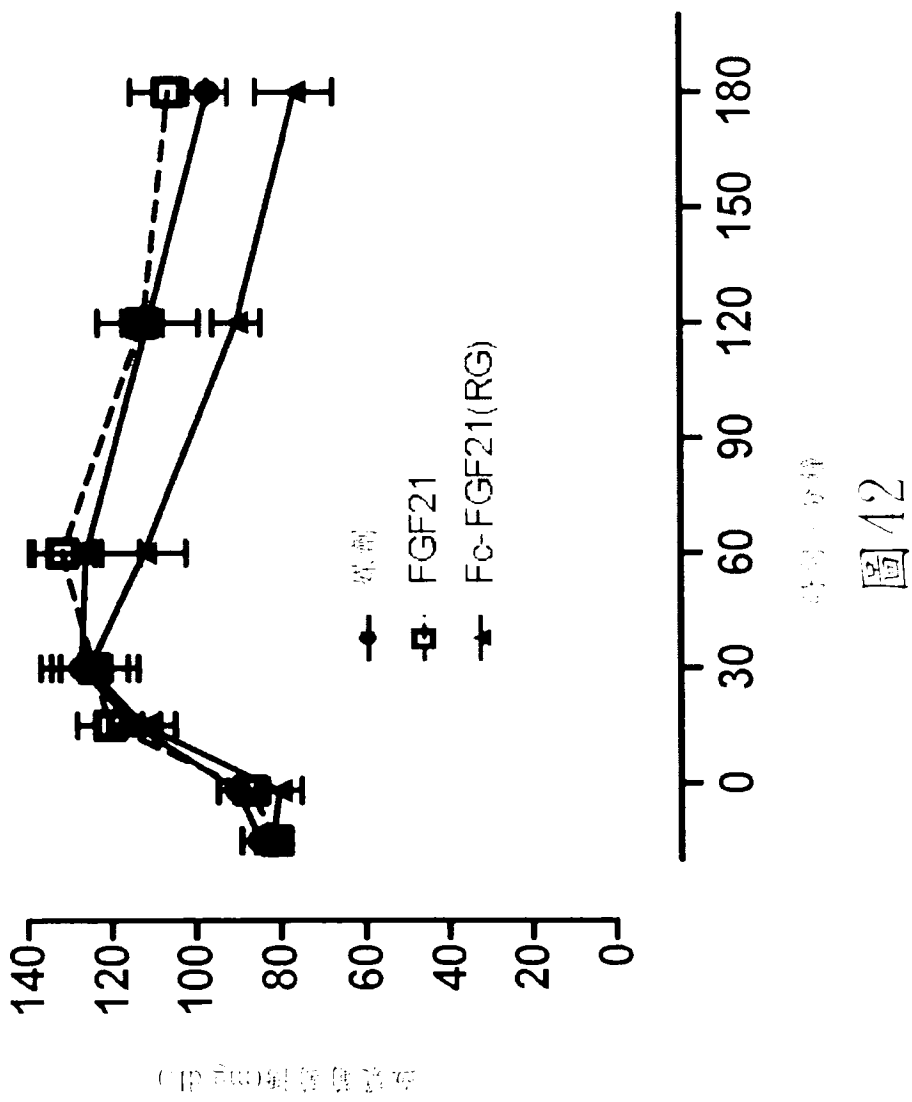


圖 42

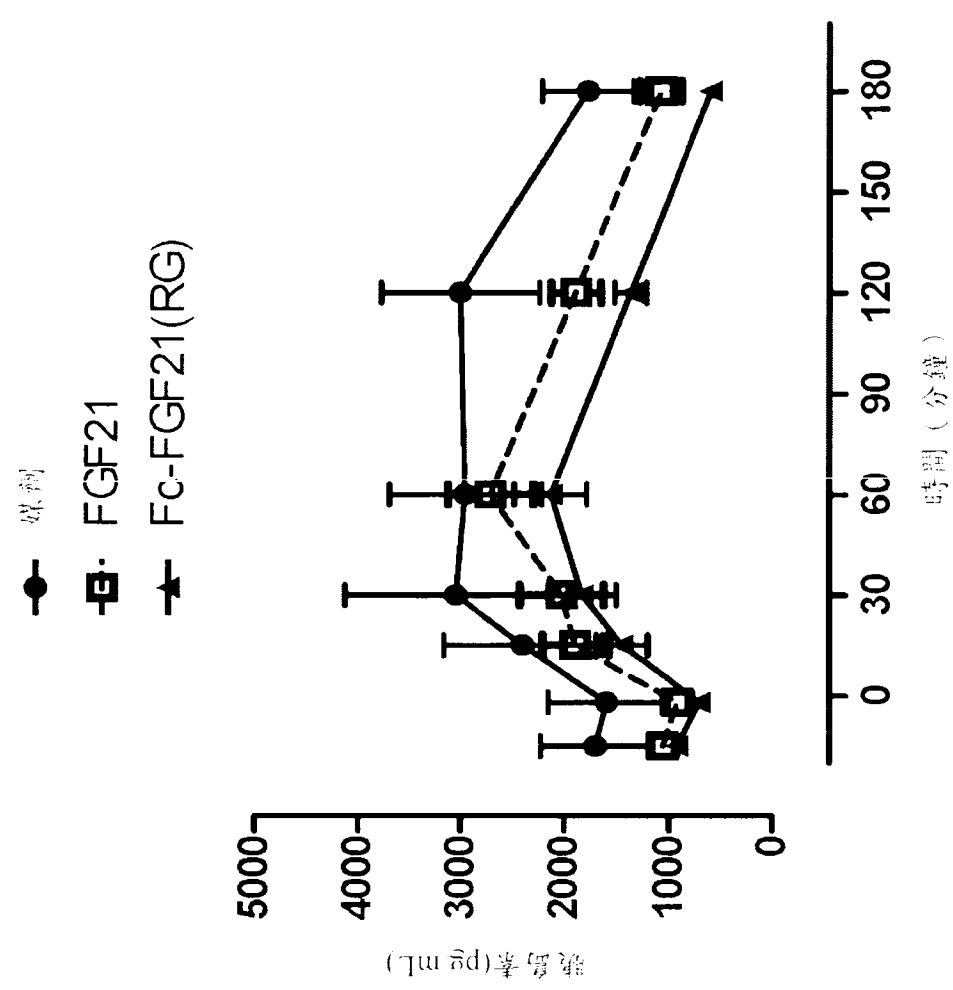


圖43

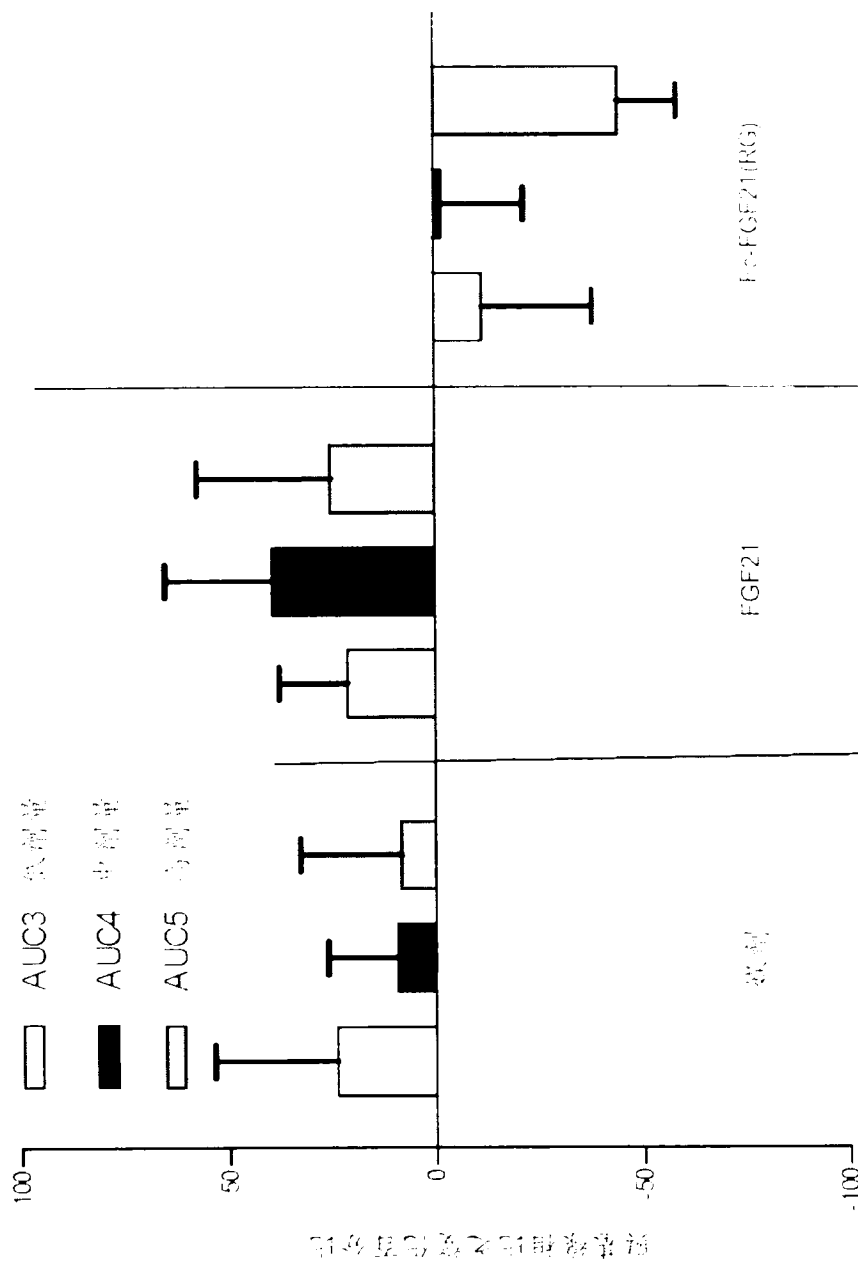


圖 44

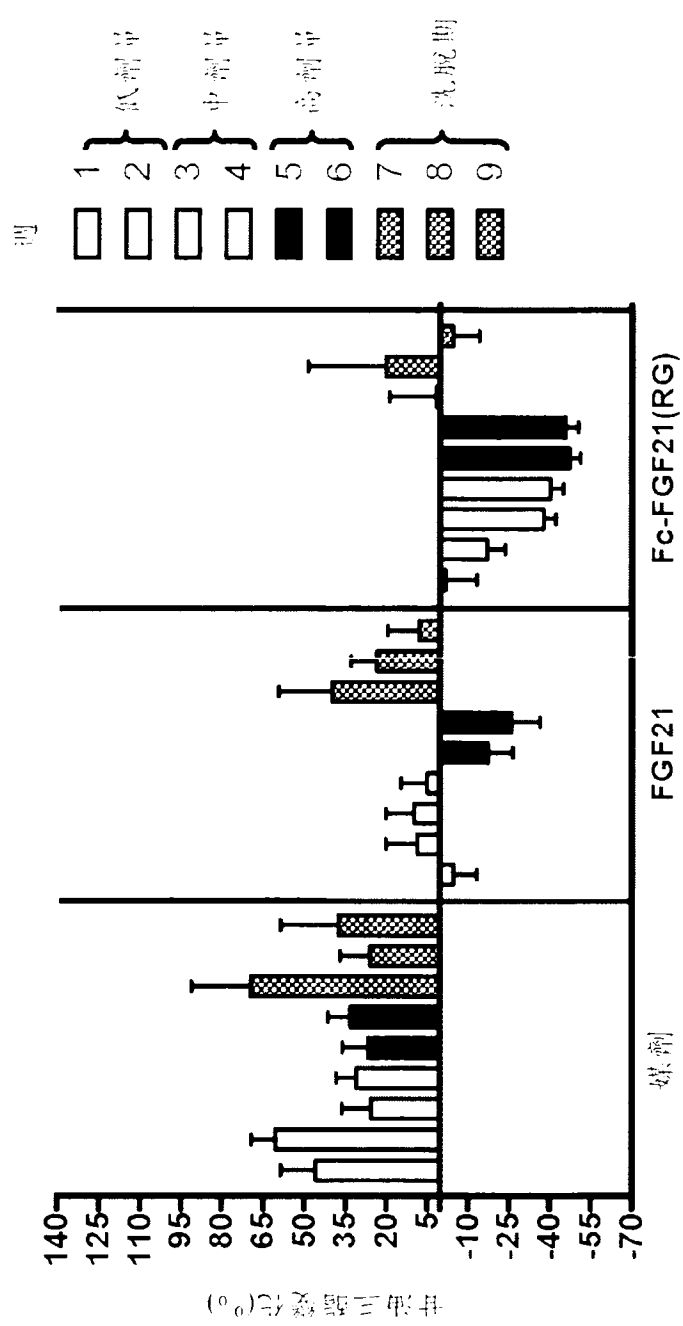


圖 45

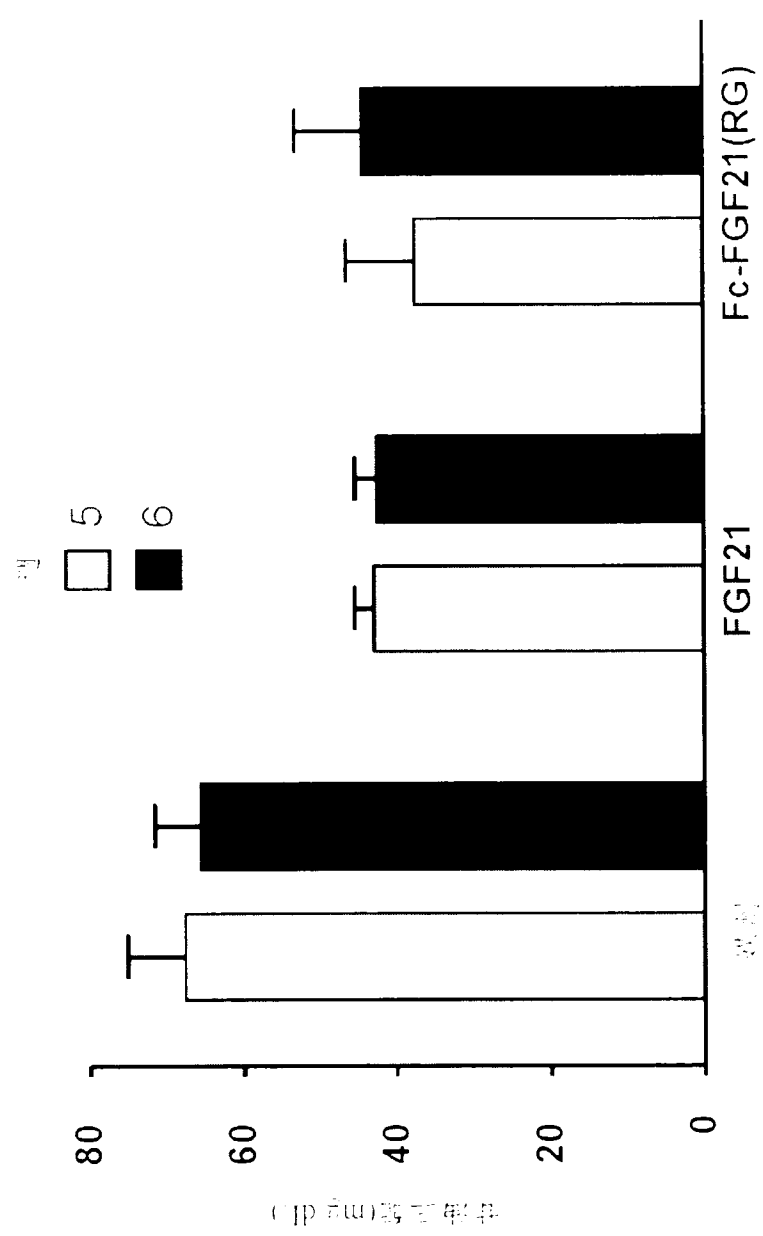


圖 46

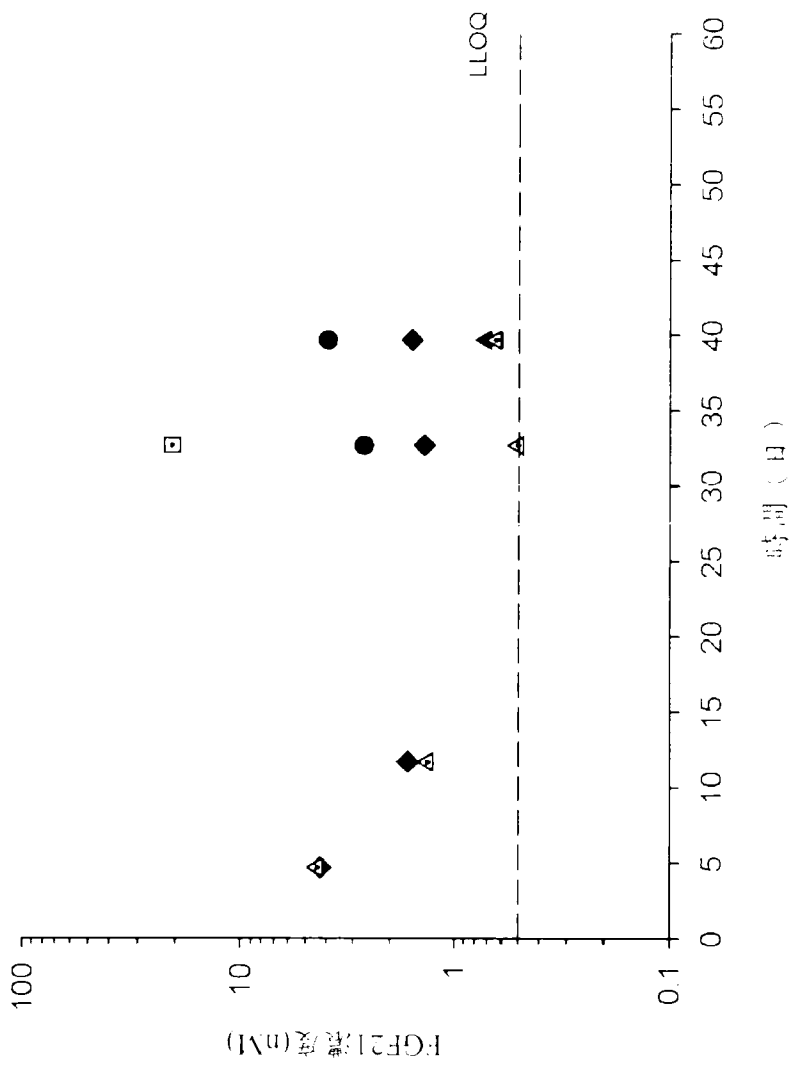


圖47

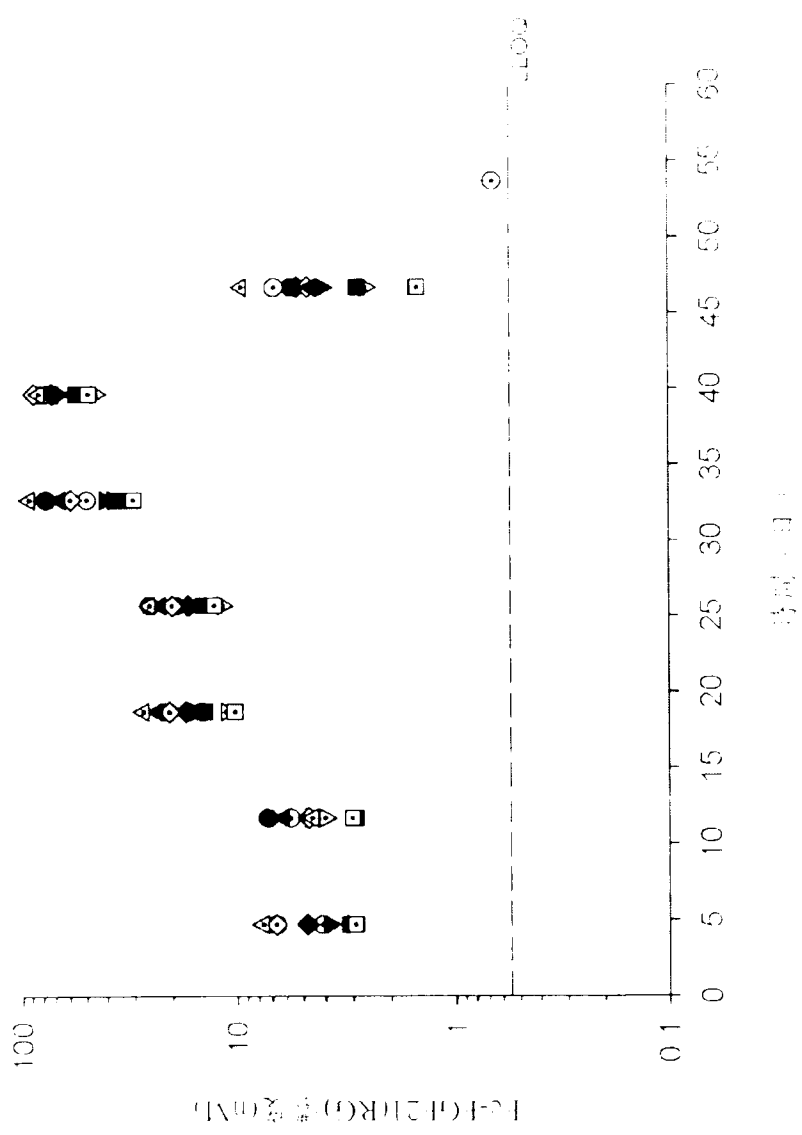


圖 48

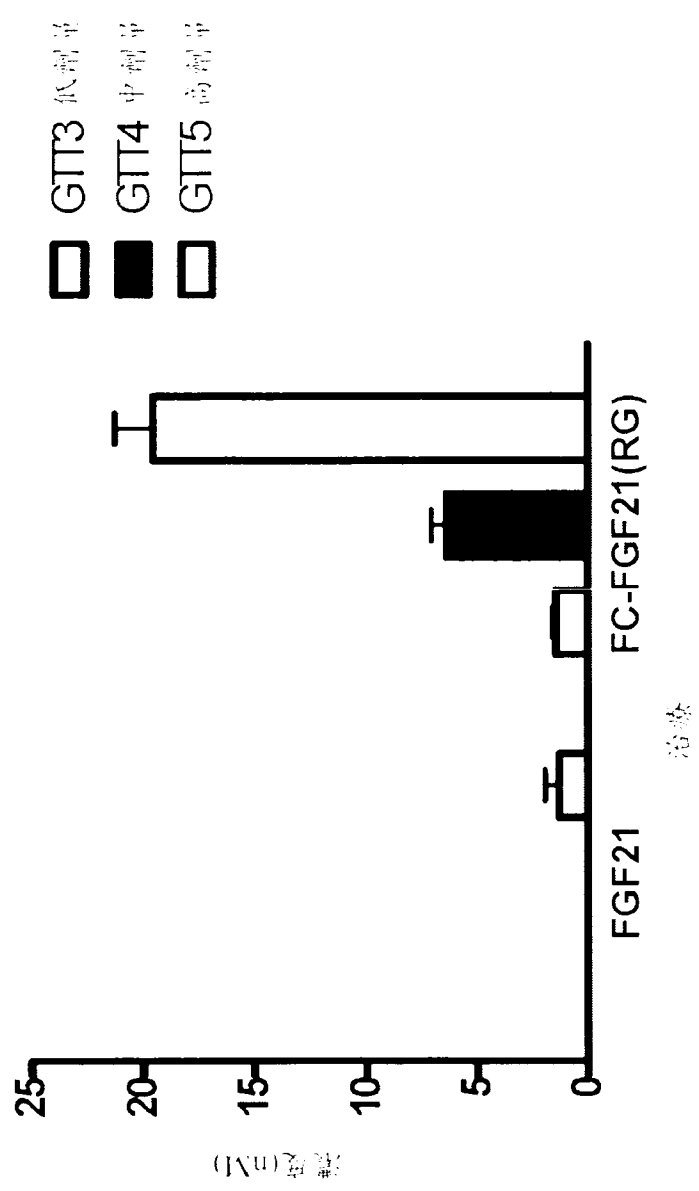


圖 49

四、本案指定代表圖：

—(一)本案指定代表圖為：第 (1A) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

或 Fc(15)FGF21 P171E 突變體相比 Fc(15)FGF21 A45K/G170E突變體展示較少聚集，但與Fc(15)FGF21對照相比所有三種突變體均展示較少聚集。表17展示Fc-FGF21對照及Fc-FGF21 A45K/G170E突變體在4°C或室溫下培育0日、2日、3日、4日或7日之後所獲得之聚集百分比。

表 17

Fc-FGF21及Fc-FGF21突變體之聚集百分比

樣品		第0日	第2日	第3日	第4日	第7日
Fc(15)FGF21 WT 32 mg/mL	4°C	1.12	1.71	1.89	2.14	2.32
	RT	1.12	6.09	7.94	9.57	12.59
Fc(15)FGF21 A45K/G170E 33 mg/mL	4°C	0.45	0.77	0.88	1.03	1.24
	RT	0.45	3.86	5.22	6.62	8.60

實例 20

Fc-FGF21融合組合突變體之製備及表現

如上所述，可經由引入特定截短及胺基酸取代來調節FGF21之穩定性及溶解性。此外，可進一步藉由使該等經修飾FGF21蛋白與人類免疫球蛋白IgG1基因之Fc部分融合來增強FGF21穩定性。此外，藉由引入以上修飾之組合，可產生具有增強之穩定性與溶解性之FGF21分子。使用上述技術製備編碼表18中所列之FGF21組合突變體之核酸序列。

表 18

FGF21組合突變體

胺基酸殘基	蛋白水解突變	聚集突變	Fc	連接子
1-181	G170E	A45K	-NH ₂	15
1-181	G170E	L98R	-NH ₂	15
1-181	G170E	A45K、L98R	-NH ₂	15
1-181	P171G	A45K	-NH ₂	15

1-181	P171S	A45K	-NH ₂	15
1-181	P171G	L98R	-NH ₂	15
1-181	P171S	L98R	-NH ₂	15
1-181	P171G	A45K、L98R	-NH ₂	15
1-178	G170E		-NH ₂	15
6-181	G170E		-NH ₂	15
6-181	G170E	A45K	-NH ₂	15
6-181	G170E	L98R	-NH ₂	15
6-181	P171G		-NH ₂	15
6-181	P171G	L98R	-NH ₂	15
7-181	G170E		-NH ₂	15

圖 29 展示在注射有 Fc(15)FGF21 組合突變體、Fc(15)FGF21 A45K/G170E、Fc(15)FGF21 A45K/P171G 或 Fc(15)FGF21 L98R/P171G 之小鼠中所量測之血糖含量。

在另一實驗中，將 FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 L98R/P171G 與野生型成熟 FGF21 及 Fc(15)FGF21 並行研究。在一實驗中，將重組 293T 細胞株在不同濃度之 FGF21、Fc(15)FGF21 或 Fc(15)FGF21 L98R/P171G 存在下培養 6 小時。接著檢定細胞溶菌液之螢光素酶活性。如圖 30 中所示，Fc(15)FGF21 L98R/P171G 具有與 Fc(15)FGF21 類似之活性，從而指示兩點突變之引入不改變分子之活體外活性。

在又一實驗中，在兩種不同溫度(亦即室溫及 4°C)下歷時 9 日並行評估 65 mg/mL 之 Fc(15)FGF21 L98R/P171G 與 FGF21 及 Fc(15)FGF21 之穩定性。在培育期之後，接著用 SEC-HPLC 分析細胞溶菌液以測定在各種溫度下之聚集-時間曲線。圖 31A 及圖 31B 中所示之資料指示在室溫下(圖 31A 中之實心三角形，點線)及在 4°C 下(圖 31B 中之實心三角形，點線)Fc(15)FGF21 L98R/P171G 之聚集形成速率顯著減低。

實例 21

包含C末端突變之抗蛋白水解性FGF21突變體

亦研究組合突變體之活體內穩定性。特定言之，在鼠類及食蟹獼猴模型中比較Fc(15)FGF21 L98R/P171G之活體內穩定性與Fc(15)FGF21之穩定性。發現在兩種物種中結果類似。在食蟹獼猴研究中，將Fc(15)FGF21 L98R/P171G及Fc(15)FGF21以23.5 mg/kg之量進行靜脈內注射且在給藥後至840小時之各時間點採集血清及血漿之等分試樣。分析至168小時之時間點。使用抗Fc試劑將時間點樣品親和純化，接著使用MALDI質譜進行分析。兩種分析之間結果良好相關。

分析使用免疫親和MALDI所產生之資料，可見在Fc(15)FGF21 L98R/P171G分子中由於P171突變為P171G而消除P171位點之截斷。然而，對於Fc(15)FGF21 L98R P171G而言觀測到較少及緩慢之降解，導致至多3個C末端殘基之損失(圖32)。如圖20及圖21中所示，在胺基酸殘基171與172之間的更敏感裂解位點經阻斷之後，亦觀測到其他FGF21突變體在3個C末端殘基之較少裂解。3個C末端殘基裂解可表示終止藉由羧肽酶以依序、逐殘基方式或特異性蛋白酶攻擊在胺基酸殘基178及179處與非特異性截斷在胺基酸殘基179-180及180-181處進行之分子之C末端裂解。C末端之2-3個胺基酸之損失可導致 β -klotho結合減少且分子之效能及活體內活性最終降低。例如參見Yie等人，2009, *FEBS Lett.* 583:19-24。為處理C末端之明顯羧肽酶降解，研究將胺基酸殘基「蓋(cap)」添加至各種FGF21突變體多肽上的影響。製備包括表19中所呈現之構築體的多種構築體且使

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、S181P、P182)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、A180G)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、S181G)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、L182)

hFGF21(L98R、P171G、G182)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、Y179P)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、Y179G)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、Y179S)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、Y179A)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、S181T)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、S181A)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、S181L)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、S181P)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、A180P)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、A180S)

hFGF21(L98R、P171G、GGGGG182-6)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、P182)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、G182)

hFc.L15.hFGF21(1-178、L98R、P171G)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、GG182-3)

hFc.L15.hFGF21(L98R、P171G、GGGGG182-6)

272	69.9%
3.25	76.9%
3.43	77.3%

428	44.4%
61	82.6%
25.3	74.8%
43.2	79.6%
3.07	77.6%
2.66	73.5%
3.46	72.6%
33.8	79.5%
617	77.1%
2.18	84.7%

6.1	85.9%
6.5	71.1%
167	63.9%

1941 84.2%

4307 99.7%

圖 33 展示在注射有 PBS 對照、野生型天然 FGF21、Fc(15)FGF21(L98R、P171G)及在 C 末端添加脯胺酸或甘胺酸殘基之兩種加蓋分子(亦即 Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182P)及 Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182G))之糖尿病性 db/db 小鼠(C57B6 本底)中所觀測到之血糖含量變化百分比。在本實例中，當將殘基添加至野生型或突變體 FGF21 多肽之 C 末端時，殘基係由其在所得蛋白質中之位置來提及。因此，「182G」指示將甘胺酸殘基添加至成熟 181 殘基野生型或突變體蛋白質之 C 末端。圖 33 展示天然 FGF21 降低血糖含量達 6 小時，而所研究之所有三種 Fc(15)FGF21 突變體均展示持續的降血糖活性達至少 120 小時。與 Fc(15)FGF21(L98R、P171G) 及 Fc(15)FGF21(L98R、

P171G、182G)相比，包含在融合分子之FGF21組份之C末端處添加脯胺酸殘基的Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182P)分子似乎最有效且導致最低血糖含量。

在後續實驗中，研究Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182G)及Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182P)之活體內活性且將其與包含C末端處添加兩個甘胺酸之加蓋分子(亦即Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182G 183G)的活體內活性進行比較。圖34展示彼實驗之結果。圖34展示在注射有PBS對照、Fc(15)FGF21(L98R、P171G)、Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182G 183G)、Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182G)及Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182P)之ob/ob小鼠中所觀測到之血糖含量變化百分比。

如圖34中所示，與PBS對照相比，所有所研究分子均展示持續的降葡萄糖活性。此實驗證實先前結果(圖33)：與不具有脯胺酸蓋之分子(例如Fc(15)FGF21(L98R、P171G))相比，在C末端處具有脯胺酸添加之Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182P)展示略增強之降葡萄糖功效。然而，C末端之兩個甘胺酸殘基之添加(例如Fc(15)FGF21(L98R、P171G、182G 183G))似乎減低分子之活體內效能且縮短活體內降葡萄糖作用之持續時間。

圖35展示在注射有PBS對照或FGF21突變體多肽Fc(15)FGF21(L98R、P171G)、Fc(15)FGF21(L98R、P171G、Y179S)、Fc(15)FGF21(L98R、P171G、Y179A)、Fc(15)FGF21(L98R、P171G、A180S)及Fc(15)FGF21

(L98R、P171G、A180G)之糖尿病性 db/db 小鼠 (C57B6 本底) 中所觀測到之血糖含量變化百分比。所有突變體均展示類似的降葡萄糖活性與類似的作用持續時間。

圖 36 展示在注射有媒劑對照、Fc(15)FGF21(L98R、P171G)、Fc(15)FGF21(L98R、P171G、Y179F) 及 Fc(15)FGF21 (L98R、P171G、A180E) 之糖尿病性 db/db 小鼠 (C57B6 本底) 中所觀測到之血糖含量變化百分比。與 Fc(15)FGF21 (L98R、P171G) 相比，Fc(15)FGF21(L98R、P171G、Y179F) 在降低血糖中之有效性較差。然而，與 Fc(15)FGF21(L98R、P171G) 相比使胺基酸位置 180 之丙胺酸突變為麩胺酸之 Fc(15)FGF21(L98R、P171G、A180E) 更有效且與 Fc(15)FGF21(L98R、P171G) 相比其導致血糖含量之額外 20% 降低。此等資料表明 A180E 突變可能已降低活體內 C 末端降解且藉此改良分子之活體內效能及功效。

實例 22

恆河猴 (Rhesus monkey) 研究

Fc-連接子-FGF21 構築體係使用本文所述方法產生。該構築體包含在 C 末端處與 (Gly)₅-Ser-(Gly)₃-Ser-(Gly)₄-Ser 連接子序列 (SEQ ID NO:23) 融合之 IgG1 Fc 序列 (SEQ ID NO:13)，接著使該連接子序列在 C 末端處與成熟 FGF21 序列 (SEQ ID NO:4) 之 N 末端融合，將兩個突變 (L98R 及 P171G) 引入該構築體中。接著如本文所述將此構築體表現及純化，且以蛋白質之二聚體形式分離，其中各單體係經由各單體之 Fc 區之間的分子間雙硫鍵連接。在本實例中將

此分子稱為「Fc-FGF21(RG)」且其具有由SEQ ID NO:37編碼之蛋白質之胺基酸序列。在此實例中，FGF21係指FGF21之成熟形式，亦即SEQ ID NO:4。

22.1 研究設計

將Fc-FGF21(RG)構築體長期地且經皮下(「SC」)投與至BMI>35之非糖尿病性雄性恆河猴。用成熟FGF21(亦即SEQ ID NO:4)或媒劑對照治療另外兩組猴子(每組n=10)。

在投與任何測試化合物之前使動物適應42天且接著將其分為具有10隻動物之組且如圖37中所圖解描述以盲法方式多次經皮下投與測試化合物或對照物件之注射劑。簡言之，一天一次向每一動物注射化合物或媒劑。FGF21係每日一次投與，而Fc-FGF21(RG)係每週一次投與。如圖37中所示，每2週將Fc-FGF21(RG)及FGF21劑量遞增。在整個研究中監測體重及食物攝入。CRO對治療不知情。

在起始治療之前進行兩次口服葡萄糖耐受性測試(OGTT)。使用OGTT1基於曲線下面積(AUC)及體重以將動物分成具有類似動物分布之三個相等組。使用第二OGTT(OGTT2)之結果以確定第一OGTT(OGTT1)之分組。排除一測試(OGTT1)與下一測試(OGTT2)之OGTT概況不一致的猴子。OGTT1及OGTT2之結果展示於圖38A及圖38B中，AUC量測結果展示於圖38C中。基線體重展示於圖38D及表20中。

在低劑量、中劑量及高劑量之每一劑量治療結束時每2週進行OGTT3、OGTT4及OGTT5。每週自空腹動物採集血

(樣品 D24；圖 6C)及在注射之後 48 小時自小鼠抽取之 Fc(5)FGF21 之樣品(樣品 D48；圖 6D)的液相層析-質譜法(LC-MS)分析之結果；

圖 7A-圖 7D 展示源自哺乳動物之人類 FGF21(3)Fc 對照樣品(圖 7A)及在注射之後 6 小時自小鼠抽取之 FGF21(3)Fc 之樣品(樣品 E6；圖 7B)、在注射之後 24 小時自小鼠抽取之 FGF21(3)Fc 之樣品(樣品 E24；圖 7C)及在注射之後 48 小時自小鼠抽取之 FGF21(3)Fc 之樣品(樣品 E48；圖 7D)的 LC-MS 分析之結果；

圖 8A-圖 8D 展示 Fc(15)FGF21 對照樣品(圖 8A)及在注射之後 6 小時(圖 8B)、24 小時(圖 8C)及 48 小時(圖 8D)自小鼠抽取之 Fc(15)FGF21 之樣品的 LC-MS 分析之結果；

圖 9A-圖 9D 展示 FGF21(15)Fc 對照樣品(圖 9A)及在注射之後 6 小時(圖 9B)、24 小時(圖 9C)及 48 小時(圖 9D)自小鼠抽取之 FGF21(15)Fc 之樣品的 LC-MS 分析之結果；

圖 10A-圖 10B 展示藉由對注射至小鼠中之 Fc(15)FGF21(圖 10A，SEQ ID NO:38)及 FGF21(15)Fc(圖 10B，SEQ ID NO:25)融合蛋白之 LC-MS 分析而鑑別之裂解位點；

圖 11 展示注射有 PBS(實心條)、Fc(15)FGF21(空心條)或 Fc(15)FGF21 突變體 Fc(15)FGF21 G170E(灰色條)、Fc(15)FGF21 P171A(點畫條)、Fc(15)FGF21 S172L(空心對角交叉影線條)、Fc(15)FGF21 G170E/P171A/S172L(實心水平交叉影線條)或 Fc(15)FGF21 G151A(空心對角交叉影線條)之小鼠中所量測之血糖含量；

圖 21A-圖 21D 展示 Fc(15)FGF21 P171A 對照樣品(圖 21A)及在注射之後 6 小時(圖 21B)、24 小時(圖 21C)及 48 小時(圖 21D)自小鼠所抽取之 Fc(15)FGF21 P171A 之樣品的 LC-MS 分析之結果；

圖 22A-圖 22D 展示 Fc(15)FGF21 S172L 對照樣品(圖 22A)及在注射之後 6 小時(圖 22B)、24 小時(圖 22C)及 48 小時(圖 22D)自小鼠所抽取之 Fc(15)FGF21 S172L 之樣品的 LC-MS 分析之結果；

圖 23A-圖 23D 展示藉由對注射於小鼠中之 Fc(15)FGF21(圖 23A, SEQ ID NO:38)、Fc(15)FGF21 G170E(圖 23B, SEQ ID NO:39)、Fc(15)FGF21 P171A(圖 23C, SEQ ID NO:40)及 Fc(15)FGF21 S172L(圖 23D, SEQ ID NO:41)融合蛋白之 LC-MS 分析而鑑別的裂解位點；

圖 24A-圖 24C 展示對 FGF21 突變體 FGF21 L99R、FGF21 L99D 及 FGF21 A111T(圖 24A)；FGF21 突變體 FGF21 A129D、FGF21 A129Q 及 FGF21 A134K(圖 24B)；及 FGF21 突變體 FGF21 A134Y、FGF21 A134E 及 FGF21 A129K(圖 24C)所進行之 ELK-螢光素酶活性檢定之結果；各圖展示針對人類 FGF21 對照所獲得之結果；

圖 25A-圖 25D 展示對 Fc-FGF21 突變體 Fc-FGF21 P171G、Fc-FGF21 P171S 及 Fc-FGF21 P171T(圖 25A)；Fc-FGF21 突變體 Fc-FGF21 P171Y、Fc-FGF21 P171W 及 Fc-FGF21 P171C(圖 25B)；Fc(15)FGF21、Fc(15)FGF21 A45K/G170E 及 FGF21 A45K(圖 25C)；及 Fc(15)FGF21、Fc(15)FGF21

心三角形)之小鼠中所量測之血糖含量；

圖 30 為展示對人類 FGF21(實心圓，實線)、Fc(15)FGF21(空心圓，實線)及 Fc(15)FGF21 L98R/P171G(實心三角形，點線)所進行之 ELK-螢光素酶活性檢定之結果的圖；

圖 31 為展示針對 FGF21(實心圓，實線)、Fc(15)FGF21(空心圓，實線)及 Fc(15)FGF21 L98R/P171G(實心三角形，點線)在室溫下(圖 31A)及在 4°C 下(圖 31B)在 9 日之後所觀測到之高分子量聚集體之百分比的圖；

圖 32 為展示在 168 小時時期內在多個點時所觀測到之 Fc(15)FGF21 L98R/P171G 變化的一系列 MALDI 質譜分析跡線；

圖 33 為展示關於 PBS 媒劑對照(空心圓)、野生型成熟 FGF21(實心正方形)，及 FGF21 突變體 L98R、P171G(實心倒三角形)；L98R、P171G、182P(空心菱形)及 L98R、P171G、182G(實心圓)中之每一者而言 db/db 小鼠中血糖含量變化百分比之圖；

圖 34 為展示關於 PBS 媒劑對照(實心圓)，及 FGF21 突變體 L98R、P171G(實心三角形)；L98R、P171G、182G、183G(空心三角形)；L98R、P171G、182G(實心菱形)及 L98R、P171G、182P(空心菱形)中之每一者而言 ob/ob 小鼠中血糖含量變化百分比之圖；

圖 35 為展示關於 PBS 媒劑對照(空心圓)，及 FGF21 突變體 L98R、P171G(實心正方形)；L98R、P171G、Y179S(空心三角形)；L98R、P171G、Y179A(實心倒三角形)；L98R、P171G、180S(空心菱形)及 L98R、P171G、

A180G(實心圓)中之每一者而言db/db小鼠中血糖含量變化百分比之圖；

圖36為展示關於PBS媒劑對照(實心圓)，及FGF21突變體L98R、P171G(空心正方形)；L98R、P171G、Y179F(實心三角形)及L98R、P171G、A180E(空心菱形)中之每一者而言db/db小鼠中血糖含量變化百分比之圖；

圖37為圖解描述用恆河猴進行之6週劑量遞增研究之研究設計的圖；在該圖中，陰影符號指示空腹狀態下之血液抽取，且點畫符號指示飽食狀態下之血液抽取；

圖38A-圖38D為一系列描述如何關於OGTT概況、OGTT AUC及體重對恆河猴進行隨機分組之圖；圖38A描述在將化合物或媒劑指定至每一組之前OGTT1中之基線葡萄糖含量，實心正方形對應於A組，實心圓、實線對應於B組且空心圓、點線對應於C組；圖38B描述在將化合物或媒劑指定至每一組之前OGTT2中之基線葡萄糖含量，實心正方形對應於A組，實心圓、實線對應於B組且空心圓、實線對應於C組；圖38C展示根據AUC所示之OGTT1及OGTT2之基線葡萄糖含量，點畫條對應於A組，陰影條對應於B組且空心條對應於C組；且圖38D展示基線體重，點畫條對應於A組，陰影條對應於B組且空心條對應於C組；

圖39為展示恆河猴中媒劑、FGF21及Fc-FGF21(RG)對體重之影響的圖；陰影條1及陰影條2對應於低劑量之第1週及第2週，空心條3及空心條4對應於中劑量之第3週及第4週，實心條5及實心條6對應於高劑量之第5週及第6週且點

序列表

<110> 美商安美基公司

<120> FGF21突變體及其用途

<130> A-1429-WO-PCT

<140> 098118662

<141> 2009-06-04

<150> 1. 61/058,861 2. 61/058,919 3. 61/164,364 4. 61/175,736

<151> 1. 2008-06-04 2. 2008-06-04 3. 2009-03-27 4. 2009-05-05

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 630

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

atggactcgg acgagaccgg gticgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt    60
cttctgctgg gaggctgcc ggcacacccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc    120
ggggggccaa tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagcccac    180
ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc    240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaatct tgggagtc aa gacatccagg    300
ttcctgtgcc agcggccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga ccctgaggcc    360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg ttaccagtc cgaagcccac    420
ggcctccgcg tgcacctgcc agggacaacg tccccacacc gggaccctgc accccgagga    480
ccagctcgtc tctgtccact accaggcctg cccccgcac ccccgagacc acccggaatc    540
ctggcccccc agccccccga tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc    600
caggggccgaa gccccagcta cgcttcctga                                630
    
```

<210> 2

<211> 209

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu
65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val

85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu
165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 200 205

Ser

<210> 3
<211> 546
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3
caccccaatcc ctgactccag tcctctcctg caattcgggg gccaaagtccg gcagcggtag 60
ctctacacag atgatgccc gacagacagaa gccacactgg agatcaggga ggatgggacg 120
gtggggggcg ctgctgacca gagccccgaa agtctcctgc agctgaaagc cttgaagccg 180
ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccagggttc tgtgccagcg gccagatggg 240
gccctgtatg gatcgctcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga gctgcttctt 300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gccacggcc tcccgctgca cctgccaggg 360
aacaagtcac cacaccggga ccttgacccc cgaggaccag ctgccttctt gccactacca 420
ggcctgcccc ccgcaccccc ggagccaccc ggaatcctgg cccccagcc ccccgatgtg 480
ggctcctcgg accctctgag catggtggga ccttcccagg gccgaagccc cagctacgct 540
tcctga 546

<210> 4
<211> 181
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

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

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

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 5
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 5
aggaggaata acatatgcat ccaattccag attcttctcc 40

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 6
tagtgagctc gaattcttag gaagcgtagc tgg 33

<210> 7
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 7
ggagatat ac atagccaat tccagattct tctccattat t 41

<210> 8
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> PCR引子

 <400> 8
 catatgtata tctccttctt aaagttaaac aaaa 34

 <210> 9
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> PCR引子

 <400> 9
 aaaacaaatt gaaattcttc ctctatatgt atac 34

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

 <220>
 <223> 成熟人類FGF21多肽之部分

 <400> 10
 Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 來自FGF21表現構築體之一部分的正義鏈

 <400> 11
 ttitgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgcatcca attccagatt ctctccatt 60
 att 63

 <210> 12
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 來自FGF21表現構築體之一部分的反義鏈

 <400> 12
 aaaacaaatt gaaattcttc ctctatatgt atacgtaggt taaggcttaa gaagaggtaa 60
 taa 63

 <210> 13
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 13
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 14
aggaggaata acatatggac aaaactcaca catg

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> PCR引子	
<400> 15 ggatccacca ccaccgctac cac	23
<210> 16 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引子	
<400> 16 ggtaggtggtag gatcccatcc aattccagat tcttctcca	39
<210> 17 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引子	
<400> 17 tagtgagctc gaattcttag gaagcgtagc tgg	33
<210> 18 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引子	
<400> 18 atggtggaac ctctccaggg ccgaagc	27
<210> 19 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR引子	
<400> 19 ggaagggtcc accatgctca gaggggtccga	30
<210> 20 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 來自FGF21表現構築體之一部分的正義鏈	
<400> 20 ctcctcggac cctctgagca tggtagggacc tccccagggc cgaagcccca	50
<210> 21 <211> 30 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> PCR引子	
<400> 21 agcctgggag actcgtacca ccttggaagg	30

<210> 22
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 來自FGF21表現構築體之一部分的反義鏈

<400> 22
gaggagcctg ggagactcgt accaccctgg aagggtcccg gcttcggggt

50

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Fc-(G4S)3-FGF21

<400> 24

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220
 Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
 245 250 255
 Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
 260 265 270
 Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
 275 280 285
 Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
 290 295 300
 Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
 305 310 315 320
 Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
 325 330 335
 Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
 340 345 350
 Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
 355 360 365
 Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
 370 375 380
 Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
 385 390 395 400
 Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
 405 410 415
 Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 420

<210> 25
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>

<223> FGF21(15)-Fc

<400> 25

Met His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15

Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45

Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60

Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95

Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110

His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp
145 150 155 160

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
195 200 205

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
210 215 220

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
225 230 235 240

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
245 250 255

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
260 265 270

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
275 280 285

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
290 295 300

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
305 310 315 320

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
325 330 335

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
340 345 350

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
355 360 365

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
370 375 380

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
385 390 395 400

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
405 410 415

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
420

<210> 26
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Fc-(G4S)3-FGF21 G170E

<400> 26

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 27
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> Fc-(G4S)3-FGF21 P171A

<400> 27

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
 245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ala Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 28
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Fc-(G4S)3-FGF21 S172L

<400> 28

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

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

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Leu Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 連接子

<400> 29

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 連接子

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 連接子

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 連接子

<400> 32

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 連接子

<400> 33

Gly Gly Gly Asn Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 连接子

<400> 34

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 连接子

<400> 35

Gly Pro Asn Gly Gly
1 5

<210> 36
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Fc-(G4S)3-FGF21 L98R, P171G

<400> 36

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Arg Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Gly Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 37

<211> 1274

<212> DNA

<213> 人工

<223> Fc(15)FGF21 L98R, P171G

<211> 1274

<212> DNA

<213> 人工

<400> 37

```

atggacaaaa ctacacatg tccacctgt ccagctccgg aactcctggg gggaccgtca    60
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgtag ccctgaggic    120
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttaa ctggtacgtg    180
gacggcgtag aggtgcataa tgccaagaca aagccgcgtg aggagcagta caacagcacg    240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag    300
aagtgcagg tctccaaca agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctcaaagcc    360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgtag tgagctgacc    420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg    480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac    540
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagccg ttggcagcag    600
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacgcagaag    660
agcctctccc tgtctccggg taaagggtga ggtgggtgtt ctggtggtgg tagcgggtgt    720
ggtggatccc atccaattcc agattcttct ccattattac aaticggggg ccaagtccgg    780
cagcggatcc tctacacaga tgatgccag cagacagaag cccacctgga gatcaggagg    840
gatgggacgg tggggggcgc tgcagaccag agccccgaaa gtctcctgca gctgaaagcc    900
ttgaagccgg gagtattca aatcttggga gtcaagacat ccaggttcct gtgccagcgg    960
ccagatgggg ccctgtatgg atcgtccac ttgaccctg aggcctgcag ctccgggag    1020
cgtcttcttg aggacggata caatgtttac cagtccgaag cccacggcct cccgctgcac    1080
ctgccaggga acaagtcccc acaccgggac cctgcacccc gaggaccagc tcgcttcttg    1140
ccactaccag gcctgcccc cgcaccccc gagccacccg gaatcctggc ccccagccc    1200
cccgatgtgg gctcctcgga cctctgagc atggtgggag gtcccaggg ccgaagcccc    1260
agctacgctt ccta                                     1274

```

<210> 38

<211> 424

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> Fc(15)FGF21

<400> 38

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His
355 360 365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370 375 380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385 390 395 400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 39
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Fc(15)FGF21 G170E

<400> 39

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

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

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Ser Gln
405 410 415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

<210> 40
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> Fc(15)FGF21 P171A

<400> 40

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

225	230	235	240
Gly Gly Ser His Pro	Ile Pro Asp Ser Ser	Pro Leu Leu Gln Phe Gly	
	245	250	255
Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr			
	260	265	270
Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala			
	275	280	285
Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly			
	290	295	300
Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg			
	305	310	315
Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys			
	325	330	335
Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser			
	340	345	350
Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His			
	355	360	365
Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly			
	370	375	380
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro			
	385	390	395
Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Ala Ser Gln			
	405	410	415
Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser			
	420		

<210> 41
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> Fc(15)FGF21 S172L

<400> 41

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly
245 250 255

Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr
260 265 270

Glu Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly
290 295 300

Val Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg
305 310 315 320

Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
325 330 335

Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser
340 345 350

Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His

355360365

Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly
370375380

Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro
385390395400

Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Leu Gln
405410415

Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
420

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離之多肽，其包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列，其中該多肽包含(a)位於SEQ ID NO：4之位置98之精胺酸殘基，及(b)位於SEQ ID NO：4之位置171之甘胺酸殘基。
2. 一種融合多肽，其包含如請求項1之多肽連結至異源性多肽。
3. 如請求項2之融合多肽，其中該異源性多肽為Fc多肽。
4. 如請求項3之融合多肽，其中該Fc多肽包含SEQ ID NO：13之胺基酸序列。
5. 如請求項4之融合多肽，其中該多肽係經由連接子與該Fc多肽融合。
6. 如請求項5之融合多肽，其中該連接子為GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:23)。
7. 如請求項6之融合多肽，其中該融合多肽包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列。
8. 一種多聚體，其包含兩個或兩個以上之如請求項7之融合多肽。
9. 一種醫藥組合物，其包含如請求項7之融合多肽及醫藥學上可接受之調配劑。
10. 如請求項5之融合多肽，其中該連接子為GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:31)。
11. 如請求項10之融合多肽，其中該融合多肽包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列。

12. 一種多聚體，其包含兩個或兩個以上之如請求項11之融合多肽。
13. 一種醫藥組合物，其包含如請求項11之融合多肽及醫藥學上可接受之調配劑。
14. 如請求項1之經分離之多肽，其進一步包含位置180之突變。
15. 一種融合多肽，其係由SEQ ID NO:37之核苷酸1-1272編碼。

Figure 30: Binding of FGF21 to Fc(15)FGF21(L98R,P171G) and Fc(15)FGF21.

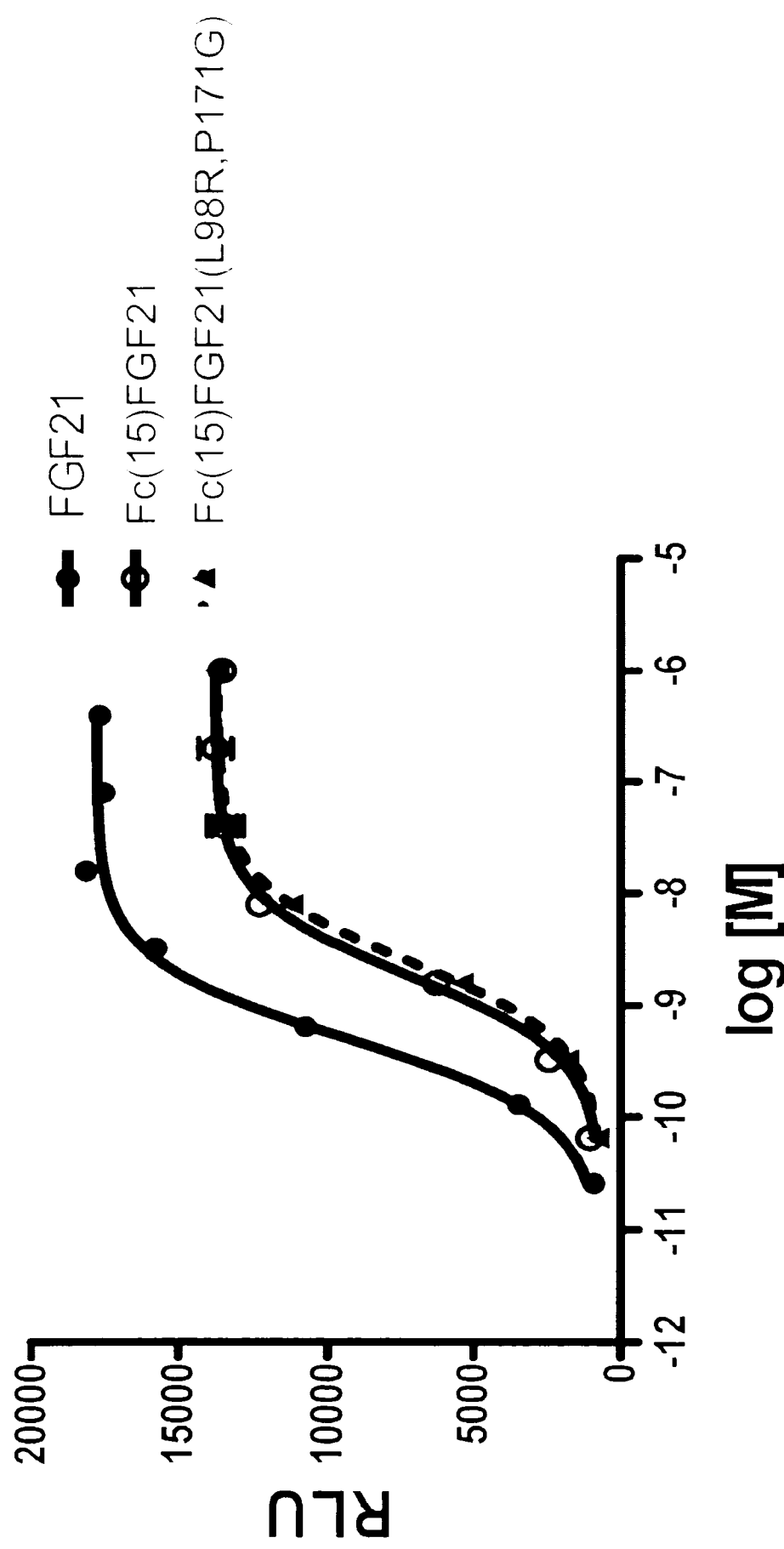


圖 30

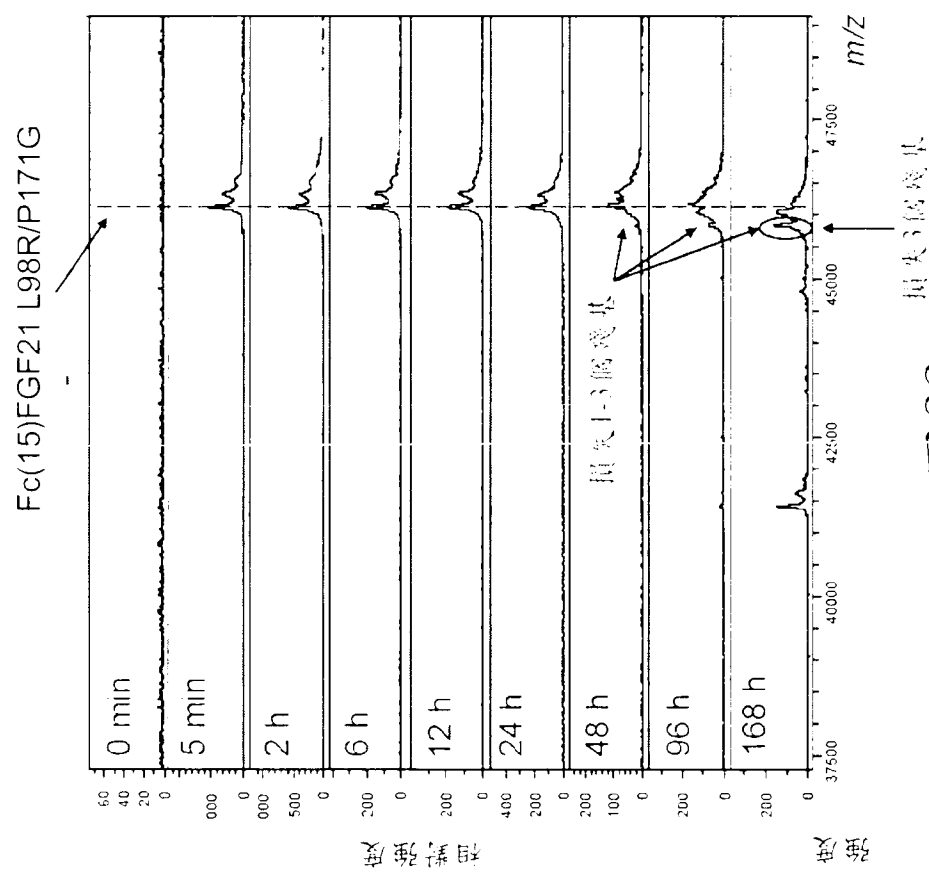


圖32