



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115925983 A

(43) 申请公布日 2023.04.07

(21) 申请号 202211012940.3

A61P 3/04 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.23

(66) 本国优先权数据

202110977378.7 2021.08.24 CN

(71) 申请人 广东东阳光药业有限公司

地址 523808 广东省东莞市松山湖园区工业北路1号

(72) 发明人 燕江雨 操蓉波 肖琳 曾君南  
黄丽玫 危喜玲 李钊锋 龚庆伟  
闫兴国 李静 黄丹霞 陈小锋  
李文佳

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

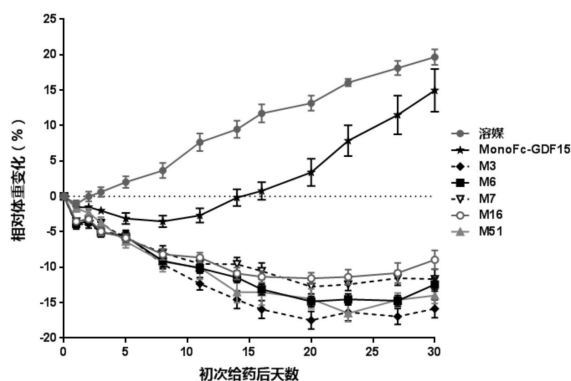
权利要求书2页 说明书32页  
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

GDF15融合蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种GDF15融合蛋白及其在治疗肥胖中的应用,该融合蛋白包括Fc变体和GDF15活性结构域,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc的第356位和/或第439位处具有氨基酸取代并且仍具有形成同源二聚体的能力。本发明通过将该Fc变体与GDF15活性结构域融合,使得Fc-GDF15融合蛋白具有显著提高的理化性质和重组表达量,具有与天然GDF15分子相当或更优的体外活性,并且具有显著延长的体内循环半衰期,可以支持两周一次甚至一个月一次的给药频率。



1. Fc-GDF15融合蛋白在制备用于治疗与肥胖相关疾病的药物中的应用。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述融合蛋白包括GDF15活性结构域和Fc变体;所述Fc变体的C末端直接或者通过肽接头连接至所述GDF15活性结构域的N末端;所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc的第356位和/或第439位处具有氨基酸取代。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述Fc变体具有形成同源二聚体的能力。

4. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述Fc变体依照EU编号将IgG Fc的第356位的氨基酸取代为:除天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)和半胱氨酸(C)以外的氨基酸;和/或所述Fc变体依照EU编号将IgG Fc的第439位的氨基酸取代为:除精氨酸(R)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)和半胱氨酸(C)以外的氨基酸;

优选地,所述Fc变体依照EU编号将IgG Fc的第356位的氨基酸取代为:甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、天冬酰胺(N)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、谷氨酰胺(Q)、酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、组氨酸(H)、脯氨酸(P)、甲硫氨酸(M)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)中的一种,和/或所述Fc变体依照EU编号将IgG Fc的第439位的氨基酸取代为:甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、天冬氨酸(D)、天冬酰胺(N)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、谷氨酸(E)、谷氨酰胺(Q)、酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、甲硫氨酸(M)中的一种;

更优选地,所述Fc变体含有以下突变:E356R、E356Q、E356A、E356N中的一种,和/或K439D、K439E、K439Q、K439A、K439N中的一种。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在于,所述Fc变体含有以下突变中的一种:K439D、K439E、K439Q、K439A、K439N;

优选地,所述Fc变体含有以下突变中的一种:K439D、K439E、K439Q。

6. 如权利要求4所述的应用,其特征在于,所述Fc变体含有以下突变中的一种:E356R、E356Q、E356A、E356N;

优选地,所述Fc变体含有E356R突变。

7. 如权利要求1-6任一项所述的应用,其特征在于,所述Fc变体还含有以下突变:依照EU编号将IgG Fc的第234位和第235位的氨基酸取代为丙氨酸(AA),和/或第447位的氨基酸删除。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述Fc变体包含下组之一的氨基酸序列,或者与下组之一具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-22, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29-45。

9. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述GDF15活性结构域为全长成熟GDF15蛋白、N端截短的GDF15蛋白、或保留GDF15生物学活性的任意变体。

10. 如权利要求2所述的应用,其特征在于,所述GDF15活性结构域包含选自下组之一的氨基酸序列或与下组之一的氨基酸序列具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列:

SEQ ID NO:46;

在SEQ ID NO:46的N末端有1-14个氨基酸截短,和/或在SEQ ID NO:46中含有1-3个氨基酸取代。

11. 如权利要求10所述的应用,其特征在于,所述GDF15活性结构域包含选自下组之一

的氨基酸序列：

SEQ ID NO:46;

在SEQ ID NO:46的N末端有1-14个氨基酸截短,和/或在SEQ ID NO:46中含有1-3个氨基酸取代。

12.如权利要求10所述的应用,其特征在于,所述SEQ ID NO:46中的氨基酸取代的位置选自下组中的一个、两个、或三个:第5位、第6位、第21位、第26位、第30位、第47位、第54位、第55位、第57位、第67位、第69位、第81位、第94位、第107位;

优选地,所述SEQ ID NO:46中的氨基酸取代选自下组中的一个、不同位置的任两个、或者不同位置的任三个:D5E、H6D、H6E、R21Q、R21H、D26E、A30S、A47D、A54S、A55E、M57T、R67Q、K69R、A81S、T94E、K107Q。

13.如权利要求10所述的应用,其特征在于,所述SEQ ID NO:46的N末端有3个、4个或14个氨基酸截短。

14.如权利要求10-13任一项所述的应用,其特征在于,所述GDF15活性结构域包含下组之一的氨基酸序列,或者与下组之一具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:46-66。

15.如权利要求14所述的应用,其特征在于,所述GDF15活性结构域包含下组之一的氨基酸序列,或者与下组之一具有至少95%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:46-66;

优选地,所述GDF15活性结构域包含下组之一的氨基酸序列:SEQ ID NO:46-66。

16.如权利要求1-15任一项所述的应用,其特征在于,所述融合蛋白包含下组之一的氨基酸序列,或者与下组之一具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:67-78,SEQ ID NO:80-102,SEQ ID NO:105-118。

17.如权利要求16所述的应用,其特征在于,所述融合蛋白包含下组之一的氨基酸序列,或者与下组之一具有至少95%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:67-78,SEQ ID NO:80-102,SEQ ID NO:105-118;

优选地,所述融合蛋白包含下组之一的氨基酸序列:SEQ ID NO:67-78,SEQ ID NO:80-102,SEQ ID NO:105-118。

18.一种同源二聚体融合蛋白在制备用于治疗与肥胖相关疾病的药物中的应用,所述同源二聚体融合蛋白由权利要求1-17任一项所述的融合蛋白所构成。

19.一种生物材料在制备用于治疗与肥胖相关疾病的药物中的应用,其特征在于,所述生物材料为以下(i)、(ii)、(iii)中的任一种:

(i) 核酸,所述核酸包括编码权利要求1-17任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列;

(ii) 载体,所述载体包含(i)中所述的核酸;

(iii) 宿主细胞,所述宿主细胞含有(i)中所述的核酸和/或(ii)中所述的载体。

20.一种药物组合物在制备用于治疗与肥胖相关的疾病的药物中的应用,其特征在于,所述药物组合物包括权利要求18所述的同源二聚体融合蛋白作为活性成分,所述同源二聚体融合蛋白以治疗有效量存在于所述药物组合物中;

优选地,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体。

## GDF15融合蛋白及其用途

[0001] 本申请要求申请日为2021.08.24的中国专利申请202110977378.7的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及一种GDF15融合蛋白及其在治疗肥胖中的应用。

### 背景技术

[0003] 肥胖是指由于体内脂肪细胞体积和数量增加、脂肪组织分布异常而形成的一种由多种因素相互作用的慢性代谢性疾病,每年至少有280万人死亡可归咎于超重或肥胖。美国医学会(AMA)的主要政策制订机构明确表示,肥胖不仅应被视为疾病危险因素,而是一种真实的疾病,美国临床内分泌医师协会(AACE)指出,超重或肥胖可增加罹患乳腺癌、冠心病、2型糖尿病、胆囊疾病、骨关节炎、结肠癌、高血压和卒中等风险。

[0004] 肥胖管理包括生活方式改变、药物治疗和减肥手术。改变生活方式通常需要专业团队制定方案并进行维护,但经常与高复发率相关;减肥手术伴随着死亡和手术并发症的风险,且成本高昂,一般用于严重肥胖症。鉴于目前改变生活方式和减肥手术的局限性,使用药物治疗肥胖至关重要。美国权威指南建议,当体重指数 $\geq 30\text{kg}/\text{m}^2$ ,或体重指数 $\geq 27\text{kg}/\text{m}^2$ 并伴有至少一种体重相关的并发症时,可应用抗肥胖药物进行治疗。

[0005] 生长分化因子15(GDF15),又名巨噬细胞抑制细胞因子-1(MIC-1)、胎盘转化生长因子- $\beta$ (PTGF- $\beta$ )、胎盘骨形态发生因子(PLAB)、前列腺衍生因子(PDF)、非甾体抗炎药活化基因(NAG-1),是转化生长因子(TGF- $\beta$ )超家族分支成员。成熟的GDF15多肽包含112个氨基酸,而体内循环的具有生物活性的GDF15则是两条多肽通过链间二硫键形成的同源二聚体蛋白(24.5kD)。

[0006] 已报道GDF15循环水平升高与晚期癌症患者食物摄入量减少和体重降低相关(Johnen H等人,Nat Med,2007)。并且,转基因高表达GDF15的小鼠以及施用重组GDF15的小鼠均表现出体重减低和食物摄入量减少,并且具有改善的糖耐受水平(Xiong Y等人,Sci Transl Med,2017),表明GDF15具有治疗肥胖症、2型糖尿病(T2D)、非酒精性脂肪肝炎(NASH)等疾病的潜力。

[0007] 天然GDF15二聚体在体内的循环半衰期( $t_{1/2}$ )较短,只有大约2-3小时,极大限制了其在临床上的治疗应用。常规延长大分子药物循环半衰期的方法包括将药物分子与抗体的Fc片段融合,但是由于GDF15二聚体和Fc片段二聚体分子三维结构的特性,直接将GDF15与Fc片段融合会极大影响分子整体的稳定性和重组表达产量。

[0008] 因此,开发稳定、半衰期更长并且工艺简单的GDF15融合蛋白分子,对于治疗肥胖,是非常必要的。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种Fc-GDF15融合蛋白在制备用于治疗与肥胖相关的疾病中的应用。本发明所述的GDF15融合蛋白具有理化性质稳定、半衰期长、作用效果长效、制备工艺简单等优点,可用于治疗代谢相关疾病,例如肥胖、2型糖尿病、NASH、血脂异常等,尤其是肥胖。

[0010] 第一方面,本发明提供一种Fc-GDF15融合蛋白在制备用于治疗与肥胖相关的疾病中的应用。为此,本发明提供一种融合蛋白,在一些实施方案中,所述融合蛋白包括GDF15活性结构域和Fc变体;所述Fc变体的C末端直接或者通过肽接头连接至所述GDF15活性结构域的N末端;

[0011] 所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc的第356位和/或第439位处具有氨基酸取代。

[0012] 在一些实施方式中,所述Fc变体具有形成同源二聚体的能力。

[0013] 在一些实施方式中,所述IgG Fc选自IgG1 Fc、IgG2 Fc、IgG3 Fc、IgG4 Fc中的一种。

[0014] 在一些实施方式中,所述IgG Fc为人IgG1 Fc。在一些实施方式中,所述IgG Fc为人IgG4 Fc。

[0015] 进一步,所述Fc变体依照EU编号将IgG Fc的第356位的氨基酸取代为:除D、E和C以外的氨基酸。例如,将IgG Fc的第356位的氨基酸取代为下组中的一种:G、S、A、T、V、N、L、I、Q、Y、F、H、P、M、K、R。进一步,所述Fc变体依照EU编号将IgG Fc的第439位的氨基酸取代为:除R、H、K和C以外的氨基酸。例如,将IgG Fc的第439位的氨基酸取代为下组中的一种:G、S、A、T、V、D、N、L、I、E、Q、Y、F、P、M。

[0016] 在一些实施方式中,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc中含有以下突变:E356G、E356S、E356A、E356T、E356V、E356N、E356L、E356I、E356Q、E356Y、E356F、E356H、E356P、E356M、E356K、E356R中的一种,和/或K439G、K439S、K439A、K439T、K439V、K439D、K439N、K439L、K439I、K439E、K439Q、K439Y、K439F、K439H、K439P、K439M中的一种。

[0017] 在优选的实施方式中,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc中含有以下突变:E356R、E356Q、E356A、E356N中的一种,和/或K439D、K439E、K439Q、K439A、K439N中的一种。

[0018] 在一些实施方式中,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc中含有以下突变:K439D、K439E、K439Q、K439A、K439N中的一种。在优选的实施方式中,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc中含有以下突变:K439D、K439E、K439Q、中的一种。

[0019] 在一些实施方式中,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc中含有以下突变:E356R、E356Q、E356A、E356N中的一种。在优选的实施方式中,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc中含有以下突变:E356R。

[0020] 在一些实施方式中,所述Fc变体还含有以下突变:依照EU编号将IgG Fc的第234位和第235位的氨基酸取代为AA,和/或将第447位的氨基酸删除。例如,对于IgG1 Fc,还含有以下突变:L234A和L235A,和/或将第447位的氨基酸删除;对于IgG4 Fc,还含有以下突变:F234A和L235A,和/或将第447位的氨基酸删除。

[0021] 在某实施方式中,所述Fc变体依照EU编号在IgG Fc中的氨基酸取代仅为下组中的一种:

[0022] 依照EU编号第356位的氨基酸取代;

- [0023] 依照EU编号第439位的氨基酸取代；
- [0024] 依照EU编号第356位和第439位的氨基酸取代；
- [0025] 依照EU编号第356位、第234位和第235位的氨基酸取代；
- [0026] 依照EU编号第439位、第234位和第235位的氨基酸取代；
- [0027] 依照EU编号第356位、第439位、第234位和第235位的氨基酸取代；
- [0028] 在各位置所述的氨基酸取代具有本发明所述的含义。
- [0029] 在某实施方式中，所述Fc变体的氨基酸序列包括下组序列之一：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45。
- [0030] 表1Fc变体

| SEQ ID NO: | 序列                                                                                                                                                                                                                            | 注释                |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1          | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSLG        | Fc (G, K439E)     |
| 2          | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSLG       | Fc (GG, K439E)    |
| 3          | EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSLG    | Fc (AA, K439E)    |
| 4          | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSLG | Fc (APEAA, K439E) |
| 5          | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQDSLSLSLG        | Fc (G, K439D)     |
| 6          | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQDSLSLSLG       | Fc (GG, K439D)    |
| 7          | EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM                      | Fc (AA, K439D)    |

[0031]

[0032]

|    |                                                                                                                                                                                                                                             |                   |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|    | HEALHNHYTQ <b>D</b> SLSLSLG                                                                                                                                                                                                                 |                   |
| 8  | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>E</b> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQ <b>D</b> SLSLSLG | Fc (APEAA, K439D) |
| 9  | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG                  | Fc (G, E356K)     |
| 10 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG                 | Fc (GG, E356K)    |
| 11 | EAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG             | Fc (AA, E356K)    |
| 12 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLG         | Fc (APEAA, E356K) |
| 13 | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG                  | Fc (G, E356R)     |
| 14 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG                 | Fc (GG, E356R)    |
| 15 | EAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG             | Fc (AA, E356R)    |
| 16 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLG         | Fc (APEAA, E356R) |
| 17 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>E</b> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQ <b>Q</b> SLSLSLG | Fc (APEAA, K439Q) |
| 18 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>E</b> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQ <b>N</b> SLSLSLG | Fc (APEAA, K439N) |
| 19 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>E</b> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQ <b>A</b> SLSLSLG | Fc (APEAA, K439A) |
| 20 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>Q</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLG         | Fc (APEAA, E356Q) |
| 21 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV                                                                                                                                                                                          | Fc                |

[0033]

|    |                                                                                                                                                                                                                                           |                              |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|    | DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQNEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLG                                                                  | (APEAA, E356N)               |
| 22 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQAEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLG              | Fc (APEAA, E356A)            |
| 23 | EAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLG                 | Fc (AA)                      |
| 24 | EAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLG                 | Fc (AA, F405Q/Y4 07E)        |
| 25 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLG              | Fc (APEAA)                   |
| 26 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLG                    | Fc (GG)                      |
| 27 | AESKYGPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV S LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLGLG | Fc (Hinge, K439E)            |
| 28 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSGDSFQLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQESLSLGLG                    | Fc (GG, F405 Q/Y407E, K439E) |
| 29 | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQESLSLSPG                     | Fc (G, K439E)                |
| 30 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQESLSLSPG                    | Fc (GG, K439E)               |
| 31 | EAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQESLSLSPG                | Fc (AA, K439E)               |
| 32 | APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQESLSLSPG              | Fc (APEAA, K439E)            |
| 33 | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQDSLSLSPG                     | Fc (G, K439D)                |
| 34 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE                                                                                     | Fc (GG, K439D)               |

[0034]

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                   |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|    | SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQ <b>D</b> SLSLSPG                                                                                                                                                                                       |                                   |
| 35 | E <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP<br>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQ <b>D</b> SLSLSPG            | Fc (AA,<br>K439D)                 |
| 36 | APE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQ <b>D</b> SLSLSPG          | Fc<br>(APEAA,<br>K439D)           |
| 37 | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<br>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG                | Fc (G,<br>E356K)                  |
| 38 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG               | Fc (GG,<br>E356K)                 |
| 39 | E <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP<br>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG   | Fc (AA,<br>E356K)                 |
| 40 | APE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>K</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG | Fc<br>(APEAA,<br>E356K)           |
| 41 | GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<br>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG                | Fc (G,<br>E356R)                  |
| 42 | GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG               | Fc (GG,<br>E356R)                 |
| 43 | E <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP<br>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG   | Fc (AA,<br>E356R)                 |
| 44 | APE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <b>R</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQ <b>K</b> SLSLSPG | Fc<br>(APEAA,<br>E356R)           |
| 45 | APE <b>AA</b> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ <b>Q</b> EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQ <b>Q</b> SLSLSLG | Fc<br>(APEAA,<br>E356Q,<br>K439Q) |

[0035] 注：表1中，表示氨基酸位置的数字编号方式依照EU编号系统。

[0036] 在另一实施方式中，所述Fc变体包含与下组序列之一具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列：SEQ ID NO:1-22, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29-45。

[0037] 进一步，所述GDF15活性结构域为全长成熟GDF15蛋白、成熟GDF15蛋白，N端截短的GDF15蛋白、或它们保留GDF15生物学活性的任意变体。

[0038] 在一实施方式中，所述GDF15活性结构域包含选自下组之一的氨基酸序列或与下组之一的氨基酸序列具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列：

[0039] SEQ ID NO:46;

[0040] 在SEQ ID NO:46的N末端有1-14个氨基酸截短,和/或在SEQ ID NO:46中含有1-3个氨基酸取代。

[0041] 在一实施方式中,所述GDF15活性结构域包含选自下组之一的氨基酸序列:

[0042] SEQ ID NO:46;

[0043] 在SEQ ID NO:46的N末端有1-14个氨基酸截短,和/或在SEQ ID NO:46中含有1-3个氨基酸取代。

[0044] 进一步,所述SEQ ID NO:46的N末端的氨基酸截短的数量为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个或14个。

[0045] 进一步,所述SEQ ID NO:46中的氨基酸取代的位置选自下组中的一个、两个、或三个:第5位、第6位、第21位、第26位、第30位、第47位、第54位、第55位、第57位、第67位、第69位、第81位、第94位、第107位。

[0046] 进一步,所述SEQ ID NO:46中的氨基酸取代选自下组中的一个、不同位置的任两个、或者不同位置的任三个:D5E、H6D、H6E、R21Q、R21H、D26E、A30S、A47D、A54S、A55E、M57T、R67Q、K69R、A81S、T94E、K107Q。

[0047] 在一些实施方式中,所述GDF15活性结构域包含SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列。

[0048] 在另一些实施方式中,所述GDF15活性结构域包含以下序列:在SEQ ID NO:46的N末端有1-14个氨基酸截短的氨基酸序列。

[0049] 在又一些实施方式中,所述GDF15活性结构域包含以下序列:在SEQ ID NO:46中含有1-3个氨基酸取代的氨基酸序列;所述在SEQ ID NO:46中的氨基酸取代具有本发明所述的含义。

[0050] 在再一些实施方式中,所述GDF15活性结构域包含以下序列:在SEQ ID NO:46的N末端有1-14个氨基酸截短,且在SEQ ID NO:46中含有1-3个氨基酸取代的氨基酸序列;所述在SEQ ID NO:46中的氨基酸取代具有本发明所述的含义。

[0051] 在某实施方式中,所述GDF15活性结构域包含下组序列之一:SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66。

[0052] 表2 GDF15活性结构域

[0053]

| SEQ ID NO: | 序列                                                                                                                           | 注释               |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 46         | ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI               | WT               |
| 47         | GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                  | Δ N3             |
| 48         | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                   | Δ N4             |
| 49         | CRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                            | Δ N14            |
| 50         | <b>E</b> HCPGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI            | Δ N4, D5E        |
| 51         | <b>D</b> CPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI            | Δ N5, H6D        |
| 52         | <b>D</b> ECPGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI            | Δ N4, H6E        |
| 53         | <b>E</b> CPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI            | Δ N5, H6E        |
| 54         | DHCPLGPGRCRLHTV <b>Q</b> ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI         | Δ N4, R21Q       |
| 55         | DHCPLGPGRCRLHTV <b>H</b> ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI         | Δ N4, R21H       |
| 56         | DHCPLGPGRCRLHTVRSLE <b>E</b> LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI          | Δ N4, D26E       |
| 57         | DHCPLGPGRCRLHTVRSLE <b>E</b> LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRL <b>R</b> PDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI | Δ N4, D26E, K69R |
| 58         | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGW <b>S</b> DWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI          | Δ N4, A30S       |

[0054]

|    |                                                                                                                                               |             |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 59 | TDTGVS LQTYDDLLAKDCHCI<br>DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIG <b>D</b> CPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI | Δ N4, A47D  |
| 60 | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA <b>S</b> ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                          | Δ N4, A54S  |
| 61 | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA <b>E</b> NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                           | Δ N4, A55E  |
| 62 | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN <b>T</b> HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                           | Δ N4, M57T  |
| 63 | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH <b>Q</b> LKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                           | Δ N4, R67Q  |
| 64 | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP <b>S</b> SYNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI                           | Δ N4, A81S  |
| 65 | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD <b>E</b> GVSLQTYDDLLAKDCHCI                           | Δ N4, T94E  |
| 66 | DHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD <b>Q</b> DCHCI                                        | Δ N4, K107Q |

[0055] 注:表2中,表示氨基酸位置的数字编号方式为:以SEQ ID NO:46的N末端第一个氨

基酸为第一位,依次向C末端方向进行编号。

[0056] 在另一实施方式中,所述GDF15活性结构域包含与下组序列之一具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:46-66。

[0057] 在另一实施方式中,所述GDF15活性结构域包含下组之一的氨基酸序列,或者与下组之一具有至少95%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:46-66;优选地,所述GDF15活性结构域包含下组之一的氨基酸序列:SEQ ID NO:46-66。

[0058] 在一些实施方式中,所述Fc变体的C末端通过肽接头连接至所述GDF15活性结构域的N末端;所述肽接头选自柔性肽接头、刚性肽接头中的一种或两种的组合。任何合适的接头均可用于本发明的实施方案的融合蛋白中。如本文,术语“接头”是指包含肽接头的连接部分。优选地,接头有助于确保正确的折叠,最小化空间位阻,并且不会显著地干扰融合蛋白内每个功能组分的结构。更优选地,为了获得较高的蛋白表达量,本申请可以采用刚性肽接头、刚性/柔性杂合肽接头。

[0059] 在一些实施方式中,所述肽接头包括 $(G_4X)_n$ 、 $(X'P)_m$ 、 $(EAAAK)_p$ 、 $G_q$ 中的一种或两种以上的组合,其中n、m、p、q各自独立地选自1-10的整数,X为丝氨酸(S)或丙氨酸(A),X'为丙氨酸(A)、赖氨酸(K)或谷氨酸(E)。

[0060] 在某实施方式中,所述肽接头包括 $(G_4X)_n$ 和 $(X'P)_m$ 的组合,所述n、m、X、X'具有本发明所述的含义。

[0061] 在某实施方式中,所述肽接头包括 $(G_4X)_{n1} - (X'P)_m - (G_4X)_{n2}$ ,其中n1、m、n2各自独立地选自1-10的整数,X为S或A,X'为A、K或E。

[0062] 在某实施方式中,所述肽接头包括 $(G_4X)_{n1} - (X'P)_m - (G_4X)_{n2}$ ,其中n1为2,m为10,n2为2。

[0063] 在另一实施方式中,所述肽接头包括 $G_q$ 和 $(X'P)_m$ 的组合,所述q、m、X'具有本发明所述的含义。

[0064] 在某实施方式中,所述肽接头包括 $G_{q1} - (X'P)_m - G_{q2}$ ,q1、m、q2各自独立地选自1-10的整数,X'为A、K或E。

[0065] 在某实施方式中,所述肽接头包括 $G_{q1} - (X'P)_m - G_{q2}$ ,其中q1为4,m为10,q2为4。

[0066] 在另一实施方式中,所述的肽接头包括 $(G_4X)_n$ 、 $(X'P)_m$ 和 $G_q$ 的组合,所述n、m、q、X、X'具有本发明所述的含义。

[0067] 在某些实施方式中,所述肽接头包括 $(G_4X)_{n1} - G_{q1} - (X'P)_m - (G_4X)_{n2} - G_{q2}$ ,n1、q1、m、n2、q2各自独立地选自1-10的整数,X为S或A,X'为A、K或E。

[0068] 在某些实施方式中,所述肽接头包括 $(G_4X)_{n1} - G_{q1} - (X'P)_m - (G_4X)_{n2} - G_{q2}$ ,其中n1为1,q1为4,m为10,n2为1,q2为4。

[0069] 在本发明的一些实施方式中,所述的肽接头包含 $(G_4S)_5$ (SEQ ID NO:123);在本发明的一些实施方式中,所述的肽接头包含 $(G_4S)_8$ (SEQ ID NO:124);在本发明的一些实施方式中,所述的肽接头包含 $G_4(AP)_{10}G_4$ (SEQ ID NO:125);在本发明的另一些实施方式中,所述的肽接头包含 $(G_4S)_2(AP)_{10}(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:126);在本发明的又一些实施方式中,所述的肽接头包含 $(G_4S)_2(EP)_{10}(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:127)。发明人经过大量研究发现,采用刚性肽接头,或者刚性/柔性杂合肽接头,能显著提高本发明融合蛋白的表达量。

[0070] 在一些实施方式中,所述融合蛋白包括选自下组之一的氨基酸序列:SEQ ID NO:

67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118。

[0071] 表3融合蛋白

[0072]

| SEQ ID NO: | 名称  | Fc 变体序列 SEQ ID NO: | Fc 变体的突变注释        | GDF15 活性结构域序列 SEQ ID NO: | GDF 活性结构域的注释 |
|------------|-----|--------------------|-------------------|--------------------------|--------------|
| 119        | M1  | 25                 | Fc (APEAA)        | 48                       | Δ N4         |
| 67         | M2  | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 46                       | WT           |
| 68         | M3  | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 47                       | Δ N3         |
| 69         | M4  | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 48                       | Δ N4         |
| 70         | M5  | 8                  | Fc (APEAA, K439D) | 48                       | Δ N4         |
| 71         | M6  | 17                 | Fc (APEAA, K439Q) | 48                       | Δ N4         |
| 72         | M7  | 19                 | Fc (APEAA, K439A) | 48                       | Δ N4         |
| 73         | M8  | 12                 | Fc (APEAA, E356K) | 48                       | Δ N4         |
| 74         | M9  | 16                 | Fc (APEAA, E356R) | 48                       | Δ N4         |
| 75         | M10 | 20                 | Fc (APEAA, E356Q) | 48                       | Δ N4         |
| 76         | M11 | 22                 | Fc (APEAA, E356A) | 48                       | Δ N4         |
| 77         | M12 | 32                 | Fc (APEAA, K439E) | 48                       | Δ N4         |
| 78         | M13 | 3                  | Fc (AA, K439E)    | 48                       | Δ N4         |
| 79         | M14 | 26                 | Fc (GG)           | 48                       | Δ N4         |
| 80         | M15 | 2                  | Fc (GG, K439E)    | 48                       | Δ N4         |
| 81         | M16 | 1                  | Fc (G, K439E)     | 48                       | Δ N4         |
| 82         | M17 | 2                  | Fc (GG, K439E)    | 48                       | Δ N4         |
| 83         | M18 | 2                  | Fc (GG, K439E)    | 48                       | Δ N4         |
| 84         | M19 | 2                  | Fc (GG, K439E)    | 48                       | Δ N4         |
| 85         | M20 | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 50                       | Δ N4, D5E    |
| 86         | M21 | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 51                       | Δ N5, H6D    |
| 87         | M22 | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 52                       | Δ N4, H6E    |
| 88         | M23 | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 53                       | Δ N5, H6E    |
| 89         | M24 | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 54                       | Δ N4, R21Q   |
| 90         | M25 | 4                  | Fc (APEAA, K439E) | 55                       | Δ N4, R21H   |

|        |     |              |    |                             |    |                  |
|--------|-----|--------------|----|-----------------------------|----|------------------|
| [0073] | 91  | M26          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 56 | Δ N4, D26E       |
|        | 92  | M27          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 57 | Δ N4, D26E, K69R |
|        | 93  | M28          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 58 | Δ N4, A30S       |
|        | 94  | M29          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 59 | Δ N4, A47D       |
|        | 95  | M30          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 60 | Δ N4, A54S       |
|        | 96  | M31          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 61 | Δ N4, A55E       |
|        | 97  | M32          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 62 | Δ N4, M57T       |
|        | 98  | M33          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 63 | Δ N4, R67Q       |
|        | 99  | M34          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 64 | Δ N4, A81S       |
|        | 100 | M35          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 65 | Δ N4, T94E       |
|        | 101 | M36          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 66 | Δ N4, K107Q      |
|        | 102 | M37          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 49 | Δ N14            |
|        | 103 | M38          | 28 | Fc (GG, F405Q/Y407E, K439E) | 48 | Δ N3             |
|        | 104 | monoFc-GDF15 | 24 | Fc (AA, F405Q/Y407E)        | 48 | Δ N3             |
|        | 105 | M39          | 17 | Fc (APEAA, K439Q)           | 47 | Δ N3             |
|        | 106 | M40          | 20 | Fc (APEAA, E356Q)           | 47 | Δ N3             |
|        | 107 | M41          | 18 | Fc (APEAA, K439N)           | 47 | Δ N3             |
|        | 108 | M42          | 21 | Fc (APEAA, E356N)           | 47 | Δ N3             |
|        | 109 | M43          | 19 | Fc (APEAA, K439A)           | 47 | Δ N3             |
|        | 110 | M44          | 22 | Fc (APEAA, E356A)           | 47 | Δ N3             |
|        | 111 | M45          | 17 | Fc (APEAA, K439Q)           | 47 | Δ N3             |
|        | 112 | M46          | 4  | Fc (APEAA, K439E)           | 47 | Δ N3             |
|        | 113 | M47          | 8  | Fc (APEAA, K439D)           | 47 | Δ N3             |
|        | 114 | M48          | 12 | Fc (APEAA, E356K)           | 47 | Δ N3             |
|        | 115 | M49          | 16 | Fc (APEAA, E356R)           | 47 | Δ N3             |
|        | 116 | M50          | 45 | Fc (APEAA, E356Q, K439Q)    | 47 | Δ N3             |
|        | 117 | M51          | 18 | Fc (APEAA, K439N)           | 48 | Δ N4             |
|        | 118 | M52          | 21 | Fc (APEAA, E356N)           | 48 | Δ N4             |
|        | 120 | M53          | 2  | Fc (GG, K439E)              | 48 | Δ N4             |
|        | 121 | M54          | /  | Fc (APEAA, E356D)           | 48 | Δ N4             |
|        | 122 | M55          | /  | Fc (APEAA, K439R)           | 48 | Δ N4             |

[0074] 注：表3中，Fc变体的突变注释中表示氨基酸位置的数字编号依照EU编号；GDF15活性结构域中表示氨基酸位置的数字编号方式为：以SEQ ID NO:46的N末端第一个氨基酸为第一位，依次向C末端方向进行编号。

[0075] 在另一实施方式中，所述融合蛋白包含与下组序列之一具有至少85%、90%、95%或99%序列同一性的氨基酸序列：SEQ ID NO:67-78, SEQ ID NO:80-102, SEQ ID NO:105-118。在另一实施方式中，所述融合蛋白包含下组之一的氨基酸序列，或者与下组之一具有至少95%序列同一性的氨基酸序列：SEQ ID NO:67-78, SEQ ID NO:80-102, SEQ ID NO:

105-118;优选地,所述融合蛋白包含下组之一的氨基酸序列:SEQ ID NO:67-78,SEQ ID NO:80-102,SEQ ID NO:105-118。

[0076] 本发明的第二方面,提供一种同源二聚体融合蛋白在治疗肥胖中的应用,其中所述的同源二聚体融合蛋白由本发明第一方面所述的融合蛋白所构成。

[0077] 本发明的第三方面,提供一种生物材料在治疗肥胖中的应用,所述生物材料为(i)、(ii)、(iii)中的任一种:

[0078] (i) 核酸,所述核酸包括编码本发明所述的融合蛋白的核苷酸序列;

[0079] (ii) 载体,所述载体包含(i)中的核酸;

[0080] (iii) 宿主细胞,所述宿主细胞含有(i)中的核酸和/或(ii)中的载体。

[0081] 本发明的第四方面,提供一种药物组合物在治疗肥胖中的应用,所述药物组合物包括本发明所述的同源二聚体融合蛋白作为活性成分,所述同源二聚体融合蛋白以治疗有效量存在于所述药物组合物中。

[0082] 进一步,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体。

[0083] 与现有技术相比,本发明具有以下进步:相对于未突变IgG Fc与GDF15活性结构域的融合蛋白,通过将本发明提供的Fc变体与任意保留生物学活性的GDF15结构域(成熟GDF15、截短的GDF15、或其变体)融合,使得Fc-GDF15融合蛋白具有显著提高的理化性质和重组表达量,具有与天然GDF15分子相当或更高的体外活性,并且具有显著更长的体内循环半衰期,在治疗肥胖时,可以支持两周一次甚至一个月一次的给药频率。此外,本发明Fc-GDF15融合蛋白相比现有技术中的异源二聚体形成的融合蛋白,制备工艺更简单,成本更低,患者的依从性更好。

## 附图说明

[0084] 通过阅读下文优选实施方式的详细描述,各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的,而并不认为是对本发明的限制。在附图中:

[0085] 图1:Fc-GDF15融合蛋白所形成的同源二聚体的示意图;

[0086] 图2:Fc-GDF15融合蛋白单次给药治疗对正常小鼠体重的影响(监测14天);

[0087] 图3:Fc-GDF15融合蛋白单次给药治疗对正常小鼠食物摄入量的影响(监测14天);

[0088] 图4:Fc-GDF15融合蛋白单次给药治疗对正常小鼠体重的影响(监测30天);

[0089] 图5:Fc-GDF15融合蛋白单次给药治疗对正常小鼠食物摄入量的影响(监测30天);

[0090] 图6:Fc-GDF15融合蛋白单次给药治疗对正常小鼠体重的影响(监测56天);

[0091] 图7:Fc-GDF15融合蛋白单次给药治疗对正常小鼠食物摄入量的影响(监测56天);

[0092] 图8:Fc-GDF15融合蛋白重复给药对饮食诱导肥胖小鼠体重的影响(监测42天);

[0093] 图9:接受Fc-GDF15融合蛋白重复给药的饮食诱导肥胖小鼠的耐糖量测试结果;

[0094] 图10:不同剂量下M39构建体重重复给药对饮食诱导肥胖小鼠体重的影响(监测49天);

[0095] 图11:接受不同剂量M39构建体重重复给药后饮食诱导肥胖小鼠空腹血糖水平(第46天)(\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒;统计分析方法:one-way ANOVA, followed by Dunnett's);

[0096] 图12:a.接受不同剂量M39构建体重重复给药后饮食诱导肥胖小鼠糖耐量测试结果

(第46天);b.糖耐量测试曲线下面积统计(\*\*- $p < 0.01$ ,\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's);

[0097] 图13:接受不同剂量M39构建体重复给药后饮食诱导肥胖小鼠脂肪指数水平(\*\*- $p < 0.01$ ,\*\*\*- $p < 0.001$ ,#- $p < 0.05$ ,##- $p < 0.01$ ,###- $p < 0.001$ 相对于溶媒;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's);

[0098] 图14:接受不同剂量M39构建体重复给药后饮食诱导肥胖小鼠谷丙转氨酶水平(\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's);

[0099] 图15:接受不同剂量M39构建体重复给药后饮食诱导肥胖小鼠谷草转氨酶水平(\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's);

[0100] 图16:不同剂量下M6和M39构建体重复给药对ob/ob肥胖小鼠体重的影响(监测52天):a.体重变化相对于基线;b.体重变化相对于溶媒对照;

[0101] 图17不同剂量下M6和M39构建体重复给药对ob/ob肥胖小鼠摄食量的影响(监测52天);

[0102] 图18:接受不同剂量M6和M39构建体重复给药后ob/ob肥胖小鼠肝脏指数水平(\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒,###- $p < 0.001$ 相对于司美格鲁肽;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's);

[0103] 图19:接受不同剂量M6和M39构建体重复给药后ob/ob肥胖小鼠谷丙转氨酶水平(\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒,##- $p < 0.01$ 相对于司美格鲁肽;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's);

[0104] 图20:接受不同剂量M6和M39构建体重复给药后ob/ob肥胖小鼠谷草转氨酶水平(\*- $p < 0.05$ ,\*\*- $p < 0.01$ ,\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒,#- $p < 0.05$ 相对于司美格鲁肽;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's);

[0105] 图21:接受不同剂量M6和M39构建体重复给药后ob/ob肥胖小鼠肝病理改善效果(\*\*\*- $p < 0.001$ 相对于溶媒,###- $p < 0.001$ 相对于司美格鲁肽;统计分析方法:one-way ANOVA,followed by Dunnett's)。

## 具体实施方式

[0106] 下面将参照附图更详细地描述本公开的示例性实施方式。虽然附图中显示了本公开的示例性实施方式,然而应当理解,可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施方式所限制。相反,提供这些实施方式是为了能够更透彻地理解本公开,并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

[0107] 除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0108] 本文中,术语“天然”、“野生型”或“WT”指不包含任何遗传工程突变的、天然存在或可从环境分离的蛋白质或多肽。

[0109] 本文中,氨基酸“取代”或“置换”指将多肽中一个氨基酸用另一种氨基酸替换。

[0110] 本文中,氨基酸的取代由第一个字母后跟数字后跟第二个字母来表示。第一个字

母表示野生型蛋白质中的氨基酸；数字是指其中被置换的氨基酸位置；第二个字母表示用于替代野生型氨基酸的氨基酸。

[0111] 本文中，蛋白质或多肽的氨基末端的缺失由  $\Delta N$  后跟数字来表示，其中数字表示氨基末端缺失的氨基酸的数目。

[0112] 本文中，“IgG”或“IgG抗体”指具有天然存在免疫球蛋白G分子的结构抗体。IgG抗体包括例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgG1 Fc、IgG2 Fc、IgG3Fc、IgG4 Fc分别表示IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc或Fc区。本文中融合蛋白中的IgG Fc可以为IgG1 Fc、IgG2 Fc、IgG3 Fc、IgG4 Fc，优选是IgG1 Fc、IgG4 Fc。

[0113] 本文中，“肽接头”指将两个蛋白质连接在一起的单个氨基酸或者多肽序列。肽接头的长度可以为例如约1-40个氨基酸，包含例如重复的丙氨酸，甘氨酸和丝氨酸。常见的肽接头包括柔性肽接头，例如甘氨酸和丝氨酸的组合，如(GGGGS)<sub>n</sub>，通过肽接头中重复单元的数量可以调节其连接的蛋白之间的距离；仅由甘氨酸组成的肽接头，例如G<sub>n</sub>，常见的包括G<sub>6</sub>、G<sub>8</sub>等；刚性肽接头，例如具有(EAAAK)<sub>n</sub>序列的 $\alpha$ -螺旋形肽接头；具有富含脯氨酸的肽接头(XP)<sub>n</sub>，其中X可以指定任何氨基酸，常见的包括丙氨酸、赖氨酸或谷氨酸，(XP)<sub>n</sub>序列没有螺旋结构，肽接头中存在的脯氨酸可以增加骨架硬度，并且有效分离结构域。富含脯氨酸序列的结构在机体中广泛的存在，例如骨骼肌蛋白的N端就存在(AP)<sub>7</sub>的结构。肽接头的选择本领域技术人员可根据通常的实验进行确定，例如仅使用柔性肽接头、仅使用刚性肽接头、使用柔性肽接头与刚性肽接头的组合等。

[0114] 本文中，“Fc”或“Fc区”用于定义抗体重链中至少含有恒定区的一部分的C端区域。Fc区可以是天然序列Fc区或变体Fc区。本领域技术人员知晓，Fc区一般包含两个恒定结构域：CH2和CH3，而Fc区的边界可以变化。在本文中，Fc区的C末端即为抗体重链的C末端；而Fc区的N末端可以变化，在一些实施方式中，Fc区的N末端可以从例如第231位(EU编号)开始，或第233位(EU编号)开始，或第236位(EU编号)开始，或从第237位(EU编号)开始；在另一些实施方式中，本发明的Fc区的N末端不包含铰链区；在又一些实施方式中，本发明的Fc区的N末端包含铰链区。本文中，Fc区中氨基酸残基的编号方式依照EU编号系统，也称为EU索引，如记载于Edelman et al., The covalent structure of an entire  $\gamma$ G immunoglobulin molecule. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1969。

[0115] GDF15需要形成二聚体以行使活性，在本发明研究过程中发现，尽管IgG Fc能够自然形成二聚体，然而IgG Fc二聚体中两个单体Fc的羧基端的空间距离与GDF15单体氨基端的空间距离存在明显差异；即使使用柔性或刚性的肽接头，经过IgG Fc的C末端与GDF15的N末端形成的融合蛋白在组装时仍然存在不稳定性，表达产量低等问题。本发明提供的Fc变体，通过在Fc的特定位点如439位或356位引入突变，显著改善了Fc-GDF15分子的稳定性，实现Fc-GDF15融合蛋白的高效组装，提高了融合蛋白的表达产量，制备工艺简单，且不破坏同源二聚体的形成。此外，本发明的Fc变体可适用于所有保留生物学活性的GDF15蛋白或其变体，无论是成熟GDF15蛋白，或其截短的GDF15，或其变体，均可以与本发明的Fc变体形成融合蛋白而发挥作用。

[0116] 本文中，“二聚体”指蛋白二聚体，其由两个蛋白质分子组合而成，是一种蛋白质的四级结构。组成二聚体的两个蛋白质分子可称为该二聚体的单体分子或单体蛋白质。二聚体可包括“同源二聚体”和“异源二聚体”两种情况，其中，同源二聚体由两个相同的单体分

子组合而成；异源二聚体由两种不同的单体分子组合而成。通常认为，同源二聚体相对于异源二聚体，具有更简单的制备方法，因为只需合成一种肽。在本发明中，本发明提供的Fc变体具有形成同源二聚体的能力；本发明提供的Fc变体与GDF15活性结构域的融合蛋白也具有形成同源二聚体的能力，参照图1，在由该融合蛋白形成的同源二聚体中，两个单体Fc变体之间、两个单体GDF15活性结构域之间分别都存在着同源二聚作用。

[0117] 本文中，“生长分化因子15”，“GDF15”或“GDF15活性结构域”在有些实施例中是天然的成熟人GDF15或其结构域，在某些实施例中指的是GDF15或其结构域的突变体。成熟GDF15由总共308个氨基酸(UniProt Q99988)中除信号肽和前肽外的第197位(A)至第308位(I)氨基酸组成(GDF15(197-308)(SEQ ID NO:46))，或与所述氨基酸序列在维持GDF15的独特活性和结构的范围内具有至少85%、90%、95%、99%的序列同一性的多肽。所述的突变体包含截短的，和/或者一个、多个氨基酸突变。在有些实施例中，截短的GDF15可以是N端缺失变体，比如N末端处截短1-14个氨基酸的序列，或与截短氨基酸序列至少85%、90%、95%、99%的序列同一性的多肽；在有些实施例中，所述的GDF15变体，是指相比于成熟GDF15或截短的GDF15存在至少1个氨基酸位点的置换、插入或缺失，只要其保持GDF15蛋白的生物活性中的至少一者，如其对食物摄取量、血糖水平、胰岛素抗性和体重等的影响，都在本发明保护范围内。

[0118] 所述的GDF15变体，也可通过在GDF15多肽的特定位置上引入一个或多个保守或非保守氨基酸取代和使用天然存在或非天然存在的氨基酸或者通过缺失特定残基或残基的区段而产生。

[0119] “保守氨基酸取代”可涉及天然氨基酸残基(即，在野生型GDF15多肽序列的给定位置上发现的残基)被非天然残基(即，不是在野生型GDF15多肽序列的给定位置上发现的残基)取代，以使对所述位置处的氨基酸残基的极性或电荷影响很小或没有影响。保守氨基酸取代还涵盖通常通过化学肽合成而不是通过在生物系统中的合成并入的非天然存在的氨基酸残基(如本文所定义)。这些包括肽模拟物以及氨基酸部分的其它反向或倒转形式。

[0120] 天然存在的残基可基于共同侧链特性分成以下种类：

[0121] (1) 疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0122] (2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0123] (3) 酸性:Asp、Glu；

[0124] (4) 碱性:His、Lys、Arg；

[0125] (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro；以及

[0126] (6) 芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0127] 某些保守氨基酸取代的示例见下表：

[0128]

| 氨基酸 | 保守氨基酸取代                                               |
|-----|-------------------------------------------------------|
| Ala | D-Ala, Gly, Aib, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys           |
| Arg | D-Arg, Lys, Orn, D-Orn                                |
| Asn | D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln             |
| Asp | D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln             |
| Cys | D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser |
| Gln | D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp             |

|     |                                                     |
|-----|-----------------------------------------------------|
| Glu | D-Glu, Asp, D-Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln           |
| Gly | Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, $\beta$ -Ala           |
| Ile | D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met           |
| Leu | D-Leu, Val, D-Val, Met, D-Met, Ile, D-Ile           |
| Lys | D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn                       |
| Met | D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val |
| Phe | D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp           |
| Pro | D-Pro                                               |
| Ser | D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys           |
| Thr | D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val |
| Tyr | D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp           |
| Val | D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met           |

[0129] 保守取代可涉及这些种类之一的成员与相同种类的另一成员的交换。非保守取代可涉及这些种类之一的成员与另一种类的成员的交换。

[0130] 本文中，“同一性”或“同源性”，通常是指两个肽或蛋白质之间或两个核酸分子之间的序列相似性。“同一性”或“同源性”百分比，指所比较的分子中的氨基酸或核苷酸之间相同残基的百分比，并且基于正在比较的分子中最小分子的大小来计算。

[0131] 本发明中的Fc变体与天然的成熟人GDF15或其变体所形成的融合蛋白，均可以达到本发明的目的。本文中，“载体”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子，包括作为自身复制型核酸结构的载体及整合入接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达，此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0132] 本文中，“宿主细胞”指已引入外源核酸的细胞，包括这类细胞的后代。宿主细胞包括初始转化的细胞和自其衍生的后代(不考虑传代数)。后代在核酸内含物上可能与亲本细胞不完全相同，但可以含有突变。本文中包括具有如原始转化细胞中筛选或选择的相同的功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞是能用于生成本发明的融合蛋白的任意类型的细胞系统。宿主细胞包括哺乳动物培养细胞如CHO细胞、BHK细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、Y0骨髓瘤细胞、P3X63小鼠骨髓瘤细胞、PER细胞、PER.C6细胞或杂交瘤细胞、酵母细胞、细菌细胞如大肠杆菌，昆虫细胞和植物细胞等，而且还包括在转基因动物、转基因植物或培养的植物或动物组织中包含的细胞。

[0133] 本文中，“药物组合物”指其形式使得容许其中含有的活性成分的生物活性有效，且不含对会接受药物组合物施用的受试者有不可接受的毒性的别的成分的制剂。

[0134] 本文中，“治疗有效量”指有效实现期望的治疗或预防结果的量，期望的治疗或预防结果包括例如消除、降低、延迟、最小化或预防疾病的不良作用。

[0135] 本文中，“药学上可接受的载体”指药物组合物中活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0136] 本文中，“治疗”指试图改变治疗个体中疾病的自然进程，并且可以是为了预防或在临床病理学的过程期间实施的临床干预。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、降低疾病的任何直接或间接病理学后果、减缓疾病进展速率、改善或消除疾病状态、及消退或改善的预后。

[0137] 本文中,“个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于灵长类(例如人和非人灵长类如猴)或其他哺乳动物(例如牛、羊、猫、犬、马、兔和啮齿动物如小鼠和大鼠)。特别地,所述个体或受试者是人。

[0138] 在本文中,使用天然氨基酸的常规单字母或三字母代码:

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| [0139] 丙氨酸 (Ala, A) | 精氨酸 (Arg, R)  |
| 天冬酰胺 (Asn, N)       | 天冬氨酸 (Asp, D) |
| 半胱氨酸 (Cys, C)       | 谷氨酸 (Glu, E)  |
| 谷氨酰胺 (Gln, Q)       | 甘氨酸 (Gly, G)  |
| 组氨酸 (His, H)        | 异亮氨酸 (Ile, I) |
| [0140] 亮氨酸 (Leu, L) | 赖氨酸 (Lys, K)  |
| 甲硫氨酸 (Met, M)       | 苯丙氨酸 (Phe, F) |
| 脯氨酸 (Pro, P)        | 丝氨酸 (Ser, S)  |
| 苏氨酸 (Thr, T)        | 色氨酸 (Trp, W)  |
| 酪氨酸 (Tyr, Y)        | 缬氨酸 (Val, V)  |

[0141] 实施例1Fc变体设计

[0142] 本实施例测试了引入不同突变对Fc结构性质的影响,部分突变体的测试结果如表4所示。试验步骤包括:

[0143] 采用分子克隆方法将Fc核酸分子序列插入到哺乳动物细胞表达载体中,采用 ExpiCHO Fectamine™ CHO Transfection Kit (ThermoFisher Scientific),在CHO-S细胞中进行瞬时转染表达;经过Protein A层析柱纯化后,获得目标蛋白,采用尺寸排阻高效液相色谱 (SEC) 对目标蛋白进行分析。

[0144] SEC分析的主要原理是基于待分析物(如蛋白质)的分子量大小和三维结构,一般分子量大的分析物会更加快速地通过色谱柱,因此具有较短的色谱柱保留时间,反之,分子量更小的分析物则具有更长的保留时间,因此SEC可用来分析蛋白分子的聚体情况。

[0145] 天然免疫球蛋白Fc片段会自然形成同源二聚体结构,而为了提高融合蛋白稳定性,需要对Fc进行突变,但突变后可能会破坏Fc同源二聚体的结构。而发明人惊奇地发现,在第439位引入突变后的Fc分子(K439D或K439E)与未引入突变的Fc分子在SEC分析中保留时间一致,表明该引入的突变不会破坏Fc二聚体形成。作为对照,本实施例还测试了氨基酸序列为SEQ ID NO:24的Fc分子(包含F405Q/Y407E突变),根据此前专利文献W02019195091报道,F405Q/Y407E突变可破坏Fc二聚体而形成单体Fc分子,本实验中发现该突变具有明显延长的保留时间,表明该Fc分子确实以单体形式存在。

[0146] 表4 Fc变体二聚体形成特性

|        |              |                    |           |      |
|--------|--------------|--------------------|-----------|------|
| [0147] | 序列           | Fc变体               | 保留时间      | 聚体状态 |
|        | SEQ ID NO:23 | IgG4 Fc (AA)       | 13.341min | 二聚体  |
|        | SEQ ID NO:3  | IgG4 Fc (AA,K439E) | 13.156min | 二聚体  |
|        | SEQ ID NO:7  | IgG4 Fc (AA,K439D) | 13.093min | 二聚体  |

|              |                          |           |    |
|--------------|--------------------------|-----------|----|
| SEQ ID NO:24 | IgG4 Fc (AA,F405Q/Y407E) | 15.076min | 单体 |
|--------------|--------------------------|-----------|----|

[0148] 实施例2 Fc-GDF15构建体的制备

[0149] 构建表达载体:将表3所示的Fc-GDF15分子分别插入至哺乳动物细胞载体pXC17.4的多克隆酶切位点,构建得到分别表达表3所示的Fc-GDF15的表达载体;采用去内毒素的质粒提取试剂盒(OMEGA)提取Fc-GDF15的表达载体,用于细胞转染。

[0150] 细胞转染与培养:将CHO-S细胞复苏后传代培养,至密度约为 $6 \times 10^6$ 细胞/mL时收集细胞,进行细胞转染。细胞转染采用ExpiCHO Fectamine™ CHO Transfection Kit (ThermoFisher Scientific),其中Fc-GDF15的表达载体的终浓度为1 $\mu$ g/ml。转染约20h后加入ExpiCHO Fectamine CHO Enhancer以及ExpiCHO Feed维持转染细胞的生长。待细胞活率降至约80%时收获细胞培养液。

[0151] 蛋白纯化:将细胞培养液离心后收集上层清液,并用0.22 $\mu$ m滤膜过滤以获得细胞培养液上清。采用两步层析法对所述细胞培养液上清进行纯化:第一层析:将细胞培养液上清应用至经磷酸缓冲盐溶液(PBS)平衡的AT Protein A Diamond层析柱(博格隆公司),待目标蛋白结合后,用平衡液冲洗3CV(柱体积,column volume)以上,以除去未结合杂质,用100mM乙酸-乙酸钠(pH3.0)缓冲液洗脱并收集目标蛋白,然后迅速用1.0M Tris-HCl pH 8.0溶液调节洗脱收集样品pH至7.2-7.6,对已调节pH样品用纯化水进行稀释至其电导值低于5ms/cm,得到第一样品;第二步层析:使用Bestarose Q HP层析柱对经第一层层析获得的第一样品进一步精纯,用20mM Tris-HCl缓冲液平衡层析柱,将第一样品上样,20mM Tris-HCl缓冲液冲洗3CV,20mM PB缓冲液冲洗3CV以上以置换缓冲体系,最终用PBS洗脱并收集洗脱组分,获得目标蛋白样品。目标蛋白样品的性质和纯度通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和质谱分析进行评价。目标蛋白样品通过微量核酸蛋白测定仪(NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer)进行定量。

[0152] 实施例3 Fc变体对Fc-GDF15融合蛋白表达量影响

[0153] 采用实施例2中描述的方法表达得到了表3所记载的Fc-GDF15融合蛋白,比较应用不同Fc变体对Fc-GDF15融合蛋白表达产量的影响。测试的结果在表5中示出。

[0154] 根据测试结果,发现未对Fc的K439(EU编号)或E356(EU编号)进行突变的Fc-GDF15融合蛋白,如M1(单体具有SEQ ID NO:119序列的同源二聚体)、M14(单体具有SEQ ID NO:79序列的同源二聚体)表达量较低,而对Fc K439和/或E356进行突变的Fc-GDF15融合蛋白,如M2(单体具有SEQ ID NO:67序列的同源二聚体)、M3(单体具有SEQ ID NO:68序列的同源二聚体)、M4(单体具有SEQ ID NO:69序列的同源二聚体)、M5(单体具有SEQ ID NO:70序列的同源二聚体)、M6(单体具有SEQ ID NO:71序列的同源二聚体)、M7(单体具有SEQ ID NO:72序列的同源二聚体)、M8(单体具有SEQ ID NO:73序列的同源二聚体)、M9(单体具有SEQ ID NO:74序列的同源二聚体)、M10(单体具有SEQ ID NO:75序列的同源二聚体)、M11(单体具有SEQ ID NO:76序列的同源二聚体)、M15(单体具有SEQ ID NO:80序列的同源二聚体)、M39(单体具有SEQ ID NO:105序列的同源二聚体)、M50(单体具有SEQ ID NO:116序列的同源二聚体),具有提高的融合蛋白表达产量,表明在Fc第356位(EU编号)或第439位(EU编号)氨基酸进行的突变更有利于Fc-GDF15融合蛋白的组装表达。

[0155] 表5包含不同Fc变体的Fc-GDF15融合蛋白表达产量

| [0156] | Fc-GDF15<br>构建体 | Fc 356 或 439 位<br>突变 | 表达体积 (ml) | 表达产量 (Protein<br>A 纯化, $\mu\text{g/ml}$ 培<br>养液) |
|--------|-----------------|----------------------|-----------|--------------------------------------------------|
|        | M14             | 未突变                  | 50        | 34                                               |
|        | M15             | K439E                | 50        | 252                                              |
|        | M1              | 未突变                  | 100       | 67                                               |
|        | M2              | K439E                | 100       | 145                                              |
|        | M3              | K439E                | 100       | 170                                              |
|        | M4              | K439E                | 100       | 169                                              |
| [0157] | M5              | K439D                | 100       | 137                                              |
|        | M6              | K439Q                | 100       | 294                                              |
|        | M7              | K439A                | 100       | 260                                              |
|        | M8              | E356K                | 100       | 345                                              |
|        | M9              | E356R                | 100       | 272                                              |
|        | M10             | E356Q                | 100       | 150                                              |
|        | M11             | E356A                | 100       | 132                                              |
|        | M39             | K439Q                | 100       | 358                                              |
|        | M50             | E356Q, K439Q         | 100       | 215                                              |

[0158] 实施例4 Fc-GDF15融合蛋白的理化性质

[0159] 蛋白分子的理化性质比如聚集和降解倾向会影响分子的成药性,因此理想的药物分子需要具有稳定单一的组分,即有更少的聚集和降解发生。

[0160] 为了测试Fc-GDF15融合蛋白的理化性质,采用实施例2中描述的方法表达纯化出Fc-GDF15融合蛋白,然后利用尺寸排阻色谱高效液相色谱 (SEC) 对融合蛋白进行分析。具体地,SEC分析采用Waters Xbridge BEH 200A,  $3.5\mu\text{m}$  ( $7.8 \times 300\text{mm}$ ) 色谱柱,流动相为(150mM 磷酸盐缓冲液:乙腈=9:1, pH 6.5),流速为0.5ml/min。检测结果中,高分子量 (HMW) 组分占比代表聚集的比例,低分子量 (LMW) 代表降解的比例。检测结果如表6所示。

[0161] 表6不同Fc-GDF15融合蛋白理化性质比较

[0162]

| 构建体 | Fc 356 或 439 位突变 | GDF15 突变    | HMW (%) | LMW(%) |
|-----|------------------|-------------|---------|--------|
| M1  | 未突变              | $\Delta$ N4 | 50.2    | 0.5    |
| M14 | 未突变              | $\Delta$ N4 | 67.6    | 0.7    |
| M2  | K439E            | WT          | 3.6     | 2.1    |
| M3  | K439E            | $\Delta$ N3 | 2.4     | 0.1    |
| M4  | K439E            | $\Delta$ N4 | 2.2     | 0.7    |
| M5  | K439D            | $\Delta$ N4 | 2.8     | 0.2    |
| M6  | K439Q            | $\Delta$ N4 | 2.7     | 1.0    |
| M7  | K439A            | $\Delta$ N4 | 4.4     | 0.9    |
| M8  | E356K            | $\Delta$ N4 | 7.4     | 0.6    |

[0163]

|     |              |                             |      |     |
|-----|--------------|-----------------------------|------|-----|
| M9  | E356R        | $\Delta N4$                 | 3.9  | 0.3 |
| M10 | E356Q        | $\Delta N4$                 | 7.1  | 0.7 |
| M11 | E356A        | $\Delta N4$                 | 11.2 | 1.7 |
| M13 | K439E        | $\Delta N4$                 | 2.2  | 0.2 |
| M15 | K439E        | $\Delta N4$                 | 2.1  | 0.2 |
| M16 | K439E        | $\Delta N4$                 | 12   | 1.5 |
| M17 | K439E        | $\Delta N4$                 | 11.0 | 0.3 |
| M18 | K439E        | $\Delta N4$                 | 0.2  | 0.1 |
| M19 | K439E        | $\Delta N4$                 | 4.6  | 0.7 |
| M20 | K439E        | $\Delta N4$ , D5E           | 2.2  | 0.1 |
| M21 | K439E        | $\Delta N5$ , H6D           | 2.0  | 1.1 |
| M22 | K439E        | $\Delta N4$ , H6E           | 2.1  | 0.2 |
| M23 | K439E        | $\Delta N5$ , H6E           | 1.8  | 0.2 |
| M24 | K439E        | $\Delta N4$ , R21Q          | 3.1  | 0.1 |
| M25 | K439E        | $\Delta N4$ , R21H          | 1.5  | 0.1 |
| M26 | K439E        | $\Delta N4$ , D26E          | 2.3  | 0.1 |
| M27 | K439E        | $\Delta N4$ , D26E,<br>K69R | 2.8  | 0.2 |
| M28 | K439E        | $\Delta N4$ , A30S          | 2.3  | 0.1 |
| M29 | K439E        | $\Delta N4$ , A47D          | 1.6  | 0.1 |
| M30 | K439E        | $\Delta N4$ , A54S          | 2.0  | 0.2 |
| M31 | K439E        | $\Delta N4$ , A55E          | 0.7  | 0.1 |
| M32 | K439E        | $\Delta N4$ , M57T          | 2.0  | 0.1 |
| M33 | K439E        | $\Delta N4$ , R67Q          | 1.6  | 0.2 |
| M34 | K439E        | $\Delta N4$ , A81S          | 2.3  | 0.1 |
| M35 | K439E        | $\Delta N4$ , T94E          | 0.7  | 0.1 |
| M36 | K439E        | $\Delta N4$ , K107Q         | 1.2  | 0.1 |
| M37 | K439E        | $\Delta N14$                | 1.4  | 1.1 |
| M39 | K439Q        | $\Delta N3$                 | 3.2  | 0.9 |
| M50 | E356Q, K439Q | $\Delta N3$                 | 24.1 | 0.3 |
| M53 | K439E        | $\Delta N4$                 | 8.3  | 2.7 |
| M54 | E356D        | $\Delta N4$                 | 33.7 | 0.7 |

[0164]

|     |       |             |      |     |
|-----|-------|-------------|------|-----|
| M55 | K439R | $\Delta N4$ | 36.7 | 0.6 |
|-----|-------|-------------|------|-----|

[0165] 表6结果表明,未对Fc的K439 (EU编号) 或E356 (EU编号) 进行突变的Fc-GDF15融合蛋白,如M1和M14分别具有50.2%和67.6%的高分子(HMW) 聚集;而对Fc K439 (EU编号) 和/或E356 (EU编号) 进行突变的Fc-GDF15融合蛋白,均具有显著降低的高分子聚集比例,并且绝大部分融合蛋白具有低于5%的高分子聚集,说明Fc K439 (EU编号) 或E356 (EU编号) 的突变能带来更好的Fc-GDF15融合蛋白成药性。

[0166] 实施例5 Fc-GDF15融合蛋白的体外活性

[0167] 已有研究表明,GDF15在体内发挥功能需要通过其特异性受体GFRAL和辅助受体RET进行信号转导。GDF15与细胞表面受体结合后可激活下游信号通路,其中一条通路为ERK1/2磷酸化。因此可通过检测细胞内ERK1/2磷酸化水平来评价GDF15的体外活性。

[0168] 将人GFRAL (UniProtKB-Q6UXV0) 和人RET (UniProtKB-P07949) 的表达基因通过IRES元件连接并置于CMV启动子下游后转染HEK293T细胞(ATCC),加入嘌呤霉素(Gibco) 筛选得到稳定表达两个受体的阳性细胞,简称为受体表达细胞,将其用于磷酸化水平检测试验。细胞内ERK1/2磷酸化水平采用Advanced phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 试剂盒(cisbio) 基于HTRF (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence,均相时间分辨荧光) 技术进行检测,按照试剂盒手册进行操作。

[0169] 具体地,将受体表达细胞按16000细胞/孔的密度铺384孔板,饥饿培养后用待测Fc-GDF15融合蛋白或天然GDF15 (ACROBiosystems, GD5-H5149) 刺激细胞,细胞裂解后加入试剂盒中经标记的抗体,室温孵育过夜后用多功能酶标仪 (SpectraMax i3X, Molecular devices) 以337nm为激发波长,检测665nm、620nm荧光值。响应值通过在665nm及620nm处的荧光值的比值Ratio计算得到,公式如下:

[0170] 
$$\text{Ratio} = \frac{A_{665}}{A_{620}} \times 10^4$$

[0171] 其中:A665为检测在665nm波长下的荧光值;A620为检测在620nm波长下的荧光值。响应值强度即对应细胞内ERK1/2磷酸化强度。

[0172] 采用GraphPad Prism通过四参数拟合剂量-响应曲线,测定Fc-GDF15融合蛋白体外活性的EC<sub>50</sub>值,然后和天然成熟GDF15的活性EC<sub>50</sub>值比较,计算得到相对活性比值(天然GDF15 EC<sub>50</sub>:Fc-GDF15构建体EC<sub>50</sub>),结果如表7所示。

[0173] 表7 Fc-GDF15融合蛋白的体外活性

[0174]

| 构建体      | Fc 356 或 439 位突变 | GDF15 突变          | 相对活性比值 |
|----------|------------------|-------------------|--------|
| 天然 GDF15 | N/A              | WT                | 1      |
| M1       | 未突变              | $\Delta$ N4       | 2.66   |
| M2       | K439E            | WT                | 3.27   |
| M3       | K439E            | $\Delta$ N3       | 4.53   |
| M4       | K439E            | $\Delta$ N4       | 2.62   |
| M5       | K439D            | $\Delta$ N4       | 2.47   |
| M6       | K439Q            | $\Delta$ N4       | 2.71   |
| M7       | K439A            | $\Delta$ N4       | 3.16   |
| M8       | E356K            | $\Delta$ N4       | 1.69   |
| M9       | E356R            | $\Delta$ N4       | 1.33   |
| M10      | E356Q            | $\Delta$ N4       | 1.62   |
| M11      | E356A            | $\Delta$ N4       | 2.02   |
| M12      | K439E            | $\Delta$ N4       | 0.97   |
| M13      | K439E            | $\Delta$ N4       | 1.89   |
| M14      | 未突变              | $\Delta$ N4       | 1.18   |
| M15      | K439E            | $\Delta$ N4       | 2.79   |
| M16      | K439E            | $\Delta$ N4       | 2.03   |
| M17      | K439E            | $\Delta$ N4       | 1.31   |
| M18      | K439E            | $\Delta$ N4       | 1.69   |
| M19      | K439E            | $\Delta$ N4       | 1.19   |
| M20      | K439E            | $\Delta$ N4, D5E  | 3.08   |
| M21      | K439E            | $\Delta$ N5, H6D  | 3.87   |
| M22      | K439E            | $\Delta$ N4, H6E  | 1.42   |
| M23      | K439E            | $\Delta$ N5, H6E  | 3.38   |
| M24      | K439E            | $\Delta$ N4, R21Q | 2.65   |

|        |     |              |                            |      |
|--------|-----|--------------|----------------------------|------|
| [0175] | M25 | K439E        | $\Delta$ N4, R21H          | 4.76 |
|        | M26 | K439E        | $\Delta$ N4, D26E          | 2.91 |
|        | M27 | K439E        | $\Delta$ N4, D26E,<br>K69R | 2.66 |
|        | M28 | K439E        | $\Delta$ N4, A30S          | 1.38 |
|        | M29 | K439E        | $\Delta$ N4, A47D          | 1.26 |
|        | M30 | K439E        | $\Delta$ N4, A54S          | 1.51 |
|        | M31 | K439E        | $\Delta$ N4, A55E          | 0.87 |
|        | M32 | K439E        | $\Delta$ N4, M57T          | 1.26 |
|        | M33 | K439E        | $\Delta$ N4, R67Q          | 0.84 |
|        | M34 | K439E        | $\Delta$ N4, A81S          | 0.90 |
|        | M35 | K439E        | $\Delta$ N4, T94E          | 0.19 |
|        | M36 | K439E        | $\Delta$ N4, K107Q         | 0.82 |
|        | M37 | K439E        | $\Delta$ N14               | 3.17 |
|        | M39 | K439Q        | $\Delta$ N3                | 2.62 |
|        | M50 | E356Q, K439Q | $\Delta$ N3                | 1.50 |
|        | M51 | K439N        | $\Delta$ N4                | 3.16 |

[0176] 结果表明,除M35具有显著降低的体外活性之外,其余Fc-GDF15融合蛋白均具有与天然GDF15相当或优于天然GDF15的体外活性。

[0177] 实施例6 Fc-GDF15融合蛋白的热稳定性(DSC)

[0178] 本实施例采用差示扫描热分析法(DSC)测试了不同Fc-GDF15融合蛋白的热稳定性。DSC图谱上的吸热转变曲线代表了蛋白分子变性解折叠过程,可以通过热转变中点( $T_m$ )值来表征蛋白热稳定性。具体地,样品以120℃/小时的加热速率从30℃加热到110℃,测定不同Fc-GDF15融合蛋白的 $T_m$ 值,结果如表8所示。实验结果表明,Fc-GDF15融合蛋白具有比较好的热稳定性,适合进行药物开发。

[0179] 表8 Fc-GDF15融合蛋白的 $T_m$ 值

|        |     |            |
|--------|-----|------------|
| [0180] | 构建体 | $T_m$ (°C) |
|        | M3  | 63.94      |
|        | M4  | 63.93      |
|        | M5  | 62.74      |
| [0181] | M6  | 65.69      |
|        | M15 | 65.23      |
|        | M39 | 65.71      |

[0182] 实施例7单次施与Fc-GDF15融合蛋白在正常小鼠体内的药效

[0183] GDF15能够抑制食物摄入,降低体重,具有治疗肥胖等相关代谢疾病的潜力。但天然GDF15分子在人体内只有约3小时的半衰期,不适合直接应用于药物治疗,本发明提供的Fc-GDF15融合蛋白可延长药物分子半衰期。本实施例测试了单次施与不同Fc-GDF15融合蛋白对正常小鼠食物摄入量和体重的影响,以评估不同Fc-GDF15融合蛋白的体内活性与药效维持时间。

[0184] 具体地,在第0天对8-9周龄C57BL/6(湖南斯莱克景达公司)小鼠称重并单次皮下给予待测试Fc-GDF15融合蛋白或溶媒(PBS),并在给药后连续监测动物摄食量和体重的变化。其中体重变化百分比计算方式为:体重变化(%)=(实测体重-初始体重)/初始体重×100%

[0185] 正常小鼠单次给药治疗14天的摄食量和体重结果显示于表9和图2、图3中。

[0186] 表9单次给药治疗对正常小鼠体重和食物摄入量影响(监测14天)

| 组别                         | 第 8 天         |            | 第 14 天         |            |
|----------------------------|---------------|------------|----------------|------------|
|                            | 体重变化 (%)      | 累计食物摄入 (g) | 体重变化 (%)       | 累计食物摄入 (g) |
| 溶媒                         | 5.5±1.1       | 35.1       | 6.3±1.3        | 61.9       |
| MonoFc-GDF15<br>(3nmol/kg) | -5.7±1.4***   | 28.1       | -7.1±2.5***    | 50.4       |
| M3 (3nmol/kg)              | -8.4±1.8***   | 28.7       | -15.4±2.2***#  | 48.9       |
| M15 (3nmol/kg)             | -8.4±1.8***   | 27.9       | -14.5±2.0***#  | 48.0       |
| M20 (3nmol/kg)             | -10.8±1.0***# | 23.7       | -16.2±0.8***## | 42.2       |
| M23 (3nmol/kg)             | -11.9±2.0***# | 24.2       | -16.1±2.4***#  | 43.6       |
| M24 (3nmol/kg)             | -10.1±0.9***# | 25.0       | -13.8±1.6***#  | 44.1       |
| M35 (3nmol/kg)             | -6.6±1.2***   | 27.4       | -13.7±1.5***#  | 48.5       |

[0188] 注:数值代表每组7只动物数据的平均值±SEM;\*\*\*-p<0.001,相对于溶媒;#-p<0.05,相对于MonoFc-GDF15;##-p<0.01,相对于MonoFc-GDF15,统计分析方法:T检验。

[0189] 结果表明,正常小鼠以3nmol/kg剂量单次施用Fc-GDF15融合蛋白,在第8天和第14天相对于溶媒能抑制食物摄入并显著降低体重。其中,包含单体Fc的GDF15融合蛋白monoFc-GDF15(专利W02019195091中公开的“Compound2”,单体具有SEQ ID NO:104序列;Fc具有SEQ ID NO:18序列,其中F405Q,Y407E)在第8天左右药效达到最大值;对Fc K439进行突变的Fc-GDF15融合蛋白,如M3(单体具有SEQ ID NO:68序列的同源二聚体)和M15(单体具有SEQ ID NO:80序列的同源二聚体);以及进一步包含GDF15不同氨基酸位点突变的Fc-GDF15融合蛋白,如M20(单体具有SEQ ID NO:85序列的同源二聚体)、M23(单体具有SEQ ID NO:88序列的同源二聚体)、M24(单体具有SEQ ID NO:89序列的同源二聚体)和M35(单体具有SEQ ID NO:100序列的同源二聚体)在给药第14天时小鼠体重仍有下降趋势,并且体重降

低显著大于monoFc-GDF15融合蛋白的效果。

[0190] 正常小鼠单次给药治疗30天的摄食量和体重结果显示于表10和图4、图5中。

[0191] 表10单次给药治疗对正常小鼠体重和食物摄入量影响(监测30天)

| 组别                                | 第 8 天          |             | 第 14 天          |             |
|-----------------------------------|----------------|-------------|-----------------|-------------|
|                                   | 体重变化 (%)       | 累计食物摄入量 (g) | 体重变化 (%)        | 累计食物摄入量 (g) |
| 溶媒                                | 3.2±2.8        | 27.7        | 7.9±5.2         | 48.4        |
| [0192] MonoFc-GDF15<br>(1nmol/kg) | -3.6±2.2***    | 21.5        | -0.2±3.2**      | 41.3        |
| M3 (1nmol/kg)                     | -9.6±1.8***### | 23.7        | -14.6±3.5***### | 44.3        |
| M6 (1nmol/kg)                     | -9.1±2.5***### | 26.0        | -11.4±2.1***### | 46.2        |
| M7 (1nmol/kg)                     | -8.0±2.8***### | 22.8        | -9.6±2.8***###  | 43.7        |
| M16 (1nmol/kg)                    | -8.2±2.2***### | 22.8        | -10.9±2.4***### | 40.5        |
| M51 (1nmol/kg)                    | -9.2±3.9***### | 22.5        | -13.6±4.2***### | 41.3        |

[0193] 注:数值代表每组7-8只动物数据的平均值±SEM;\*\*-p<0.01,\*\*\*-p<0.001,相对于溶媒;##-p<0.01,###-p<0.001,相对于MonoFc-GDF15,统计分析方法:T检验。

[0194] 结果表明,对正常小鼠以1nmol/kg剂量单次施用Fc-GDF15融合蛋白,能够显著降低小鼠体重。其中,包含单体Fc的GDF15融合蛋白MonoFc-GDF15降体重效果较弱,并且在14天时小鼠已经恢复到初始体重。而包含Fc K439位不同氨基酸突变的Fc-GDF15构建体,如M3(单体具有SEQ ID NO:68序列的同源二聚体)、M6(单体具有SEQ ID NO:71序列的同源二聚体)、M7(单体具有SEQ ID NO:72序列的同源二聚体)、M16(单体具有SEQ ID NO:81序列的同源二聚体)和M51(单体具有SEQ ID NO:117序列的同源二聚体),具有更加显著的降体重效果,并且能够在第21-28天内持续降低小鼠体重,具有显著延长的药效维持时间。

[0195] 正常小鼠单次给药治疗56天的摄食量和体重结果显示于表11和图6、图7中。

[0196] 表11单次给药治疗对正常小鼠体重和食物摄入量影响(监测56天)

| 组别                   | 第 13 天       |            | 第 25 天       |            | 第 41 天       |            |
|----------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|
|                      | 体重变化 (%)     | 累计食物摄入 (g) | 体重变化 (%)     | 累计食物摄入 (g) | 体重变化 (%)     | 累计食物摄入 (g) |
| 溶媒                   | 7.9±1.1      | 49.4       | 16.3±1.2     | 95.2       | 17.9±1.0     | 156.6      |
| [0197] M9 (1nmol/kg) | -15.1±1.5*** | 35.2       | -19.6±1.5*** | 60.6       | -11.0±1.3*** | 100.9      |
| M18 (1nmol/kg)       | -13.3±1.1*** | 38.4       | -15.7±1.3*** | 70.7       | -12.4±1.9*** | 114.4      |
| M22 (1nmol/kg)       | -12.7±1.2*** | 37.5       | -14.9±1.0*** | 67.8       | -12.1±0.8*** | 108.3      |
| M35 (1nmol/kg)       | -15.7±1.4*** | 35.7       | -20.0±1.4*** | 66.6       | -13.1±1.2*** | 105.5      |

[0198] 注：数值代表每组8只动物数据的平均值±SEM；\*\*\*-p<0.001，相对于溶媒；统计方法：T检验。

[0199] 结果表明，正常小鼠以1nmol/kg剂量单次施用M9(单体具有SEQ ID NO:74序列的同源二聚体)、M18(单体具有SEQ ID NO:83序列的同源二聚体)、M22(单体具有SEQ ID NO:87序列的同源二聚体)或M35(单体具有SEQ ID NO:100序列的同源二聚体)，能抑制小鼠食物摄入并显著降低体重。并且，小鼠体重持续降低直到第21天之后才趋于平稳和回升，在第56天基本恢复至初始体重，表明对Fc K439或E356进行突变的Fc-GDF15融合蛋白，如M9和M18以及进一步包含GDF15不同氨基酸位点突变的融合蛋白如M22和M35均具有超长的药效维持时间，单次给药治疗后药效维持可达1个月左右。同时发明人惊奇地发现，虽然构建体M35具有显著降低的体外活性，其仍然保持了与其他构建体类似的体内药效。

[0200] 实施例8重复施与Fc-GDF15融合蛋白在饮食诱导肥胖(DIO)小鼠体内药效

[0201] 本实施例测试了Fc-GDF15融合蛋白重复给药在DIO小鼠中对食欲抑制、降低体重，以及改善各项代谢指标的效果。C57BL/6小鼠经过高脂饮食诱导四个月，根据体重进行随机分组，随后分别皮下给予溶媒(PBS，两周一次)、不同Fc-GDF15融合蛋白(1nmol/kg，每两周一次)或司美格鲁肽(3nmol/kg，每天一次)，试验持续49天。试验期间持续监测小鼠体重和食物摄入量变化，在初次给药后第45天对小鼠进行糖耐量测试，并且在第49天对小鼠进行解剖，分析了脂肪含量以及各项血清生化指标。

[0202] 小鼠体重和食物摄入量结果显示于表12中，体重变化曲线显示于图8中；糖耐量曲线显示于图9中，糖耐曲线下面积、脂肪指数、血清总胆固醇、甘油三脂、谷丙转氨酶、谷草转氨酶和低密度脂蛋白参数显示于表13中。

[0203] 表12 Fc-GDF15构建体重重复给药对DIO小鼠体重和食物摄入量的影响(第42天)

|        |                     |           |                      |
|--------|---------------------|-----------|----------------------|
| [0204] | 组别                  | 体重变化 (%)  | 累计食物摄入量<br>(g/mouse) |
|        | 溶媒                  | 3.7±2.2   | 111.4                |
|        | 司美格鲁肽<br>(3nmol/kg) | -21.4±1.7 | 92.7                 |
| [0205] | M4 (1nmol/kg)       | -25.3±3.1 | 93.8                 |
|        | M5 (1nmol/kg)       | -28.0±2.9 | 93.8                 |
|        | M9 (1nmol/kg)       | -25.9±4.3 | 92.1                 |

[0206] 注:数值代表每组9只动物数据的平均值±SEM。

[0207] 表13 Fc-GDF15构建体重复给药对DIO小鼠糖耐量、脂肪指数、血清总胆固醇 (TC)、甘油三脂 (TG)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和低密度脂蛋白 (LDL) 的影响

[0208]

| 组别                  | IPGTT 血糖<br>AUC <sub>0-90min</sub> | 脂肪指数 (%)                 | TC<br>( mmol/L)          | TG<br>( mmol/L)          | ALT<br>(U/L)              | AST (U/L)                  | LDL<br>( mmol/L)         |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 正常小鼠对照              | 1198.6±23.6 <sup>***</sup>         | 2.57±0.41 <sup>***</sup> | 2.31±0.23 <sup>***</sup> | 0.77±0.04 <sup>***</sup> | 29.42±1.67 <sup>***</sup> | 112.67±6.39 <sup>***</sup> | 0.36±0.02 <sup>***</sup> |
| 溶媒                  | 2257.6±136.1                       | 14.24±1.06               | 4.35±0.18                | 1.73±0.13                | 82.41±11.97               | 250.00±20.02               | 0.77±0.07                |
| 司美格鲁肽<br>(3nmol/kg) | 1450.5±144.9 <sup>**</sup>         | 7.62±1.30 <sup>**</sup>  | 3.24±0.21 <sup>*</sup>   | 0.80±0.08 <sup>***</sup> | 23.79±1.47 <sup>***</sup> | 115.44±4.63 <sup>***</sup> | 0.42±0.04 <sup>**</sup>  |
| M4<br>(1nmol/kg)    | 1679.3±90.4 <sup>*</sup>           | 6.35±0.85 <sup>***</sup> | 3.17±0.28 <sup>*</sup>   | 0.97±0.07 <sup>***</sup> | 31.32±5.95 <sup>***</sup> | 116.22±6.34 <sup>***</sup> | 0.41±0.06 <sup>**</sup>  |
| M5<br>(1nmol/kg)    | 1654.4±116.6 <sup>*</sup>          | 5.75±1.23 <sup>***</sup> | 3.21±0.12 <sup>*</sup>   | 1.00±0.10 <sup>***</sup> | 27.94±2.69 <sup>***</sup> | 106.00±3.34 <sup>***</sup> | 0.39±0.03 <sup>***</sup> |
| M9<br>(1nmol/kg)    | 1750.4±113.1 <sup>ns</sup>         | 6.37±1.12 <sup>***</sup> | 3.34±0.20 <sup>*</sup>   | 0.93±0.05 <sup>***</sup> | 30.17±4.23 <sup>***</sup> | 119.11±7.71 <sup>***</sup> | 0.43±0.05 <sup>**</sup>  |

[0209] 注：数值代表每组7-9只动物数据的平均值±SEM；\*-p<0.05，\*\*-p<0.01，\*\*\*-p<0.001，ns-无显著性差异，相对于溶媒；统计分析方法：one-way ANOVA, followed by Dunnett's。

[0210] 结果表明，以1nmol/kg剂量每两周一次给予Fc-GDF15融合蛋白M4(单体具有SEQ ID NO:69序列的同源二聚体)、M5(单体具有SEQ ID NO:70序列的同源二聚体)或M9(单体具有SEQ ID NO:74序列的同源二聚体)、治疗DIO小鼠能够抑制食物摄入并且显著降低小鼠体重，体重减轻效果与每天给予3nmol/kg司美格鲁肽效果相当，均能使小鼠体重达到正常水平；M4和M5还能显著改善DIO小鼠糖耐量水平；M4、M5和M9能显著降低DIO小鼠的脂肪含量，同时还能改善血脂如显著降低总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白；M4、M5和M9也能改善肝功能如显著降低ALT和AST水平。表明本发明的Fc-GDF15构建体可以应用于肥胖、糖尿病、高血脂或脂肪肝/脂肪肝炎的疾病的治疗。

[0211] 在另一次实验中测试了不同剂量的构建体M39(单体具有SEQ ID NO:105序列的同源二聚体)重复给药在DIO小鼠中对食欲抑制、降低体重，以及改善各项代谢指标的效果。DIO小鼠随机分组(每组10-12只小鼠)，分别皮下给予溶媒(PBS,每周一次)、不同剂量的M39

(0.03nmol/kg, 0.1nmol/kg和1nmol/kg, 每周一次; 3nmol/kg, 每两周一次) 或司美格鲁肽 (3nmol/kg, 每天一次)。试验期间持续监测小鼠体重和食物摄入量变化, 在初次给药后第46天对小鼠进行空腹血糖及糖耐量测定, 并且在第49天对小鼠进行解剖, 分析了脂肪含量、各项血清生化指标。

[0212] 小鼠在治疗末期体重变化显示于表14中, 体重变化曲线、治疗46天后空腹血糖水平和IPGTT及曲线下面积、脂肪指数、转氨酶水平分别显示于图10到15中。

[0213] 表14不同剂量M39重复给药对DIO小鼠降体重效果 (第48天)

|        |                      |               |
|--------|----------------------|---------------|
| [0214] | 组别                   | 体重变化 (相对于基线%) |
|        | 溶媒                   | 1.2±1.1       |
|        | 司美格鲁肽 QD (3nmol/kg)  | -24.7±2.0***  |
|        | M39 QW (0.03nmol/kg) | -5.4±1.6      |
|        | M39 QW (0.1nmol/kg)  | -19.4±2.2***  |
|        | M39 QW (1nmol/kg)    | -33.6±1.8***# |
| [0215] | M39 Q2W (3nmol/kg)   | -30.1±3.2***  |

[0216] 注: 数值代表每组10-12只动物数据的平均值±SEM; \*\*\*-p<0.001相对于溶媒, #-p<0.05相对于司美格鲁肽; 统计分析方法: one-way ANOVA, followed by Dunnett's。

[0217] 以上结果表明, 每周一次或每两周一次皮下注射M39能够剂量依赖性降低DIO小鼠体重, 并且在每周一次1nmol/kg剂量下减重效果显著强于每天一次注射3nmol/kg司美格鲁肽。同时M39还能显著降低小鼠脂肪含量, 改善小鼠空腹血糖水平、糖耐量, 以及肝功能指标。

[0218] 实施例9 Fc-GDF15融合蛋白在ob/ob肥胖小鼠模型体内药效

[0219] 本实施例测试了构建体M6和M39在ob/ob肥胖小鼠模型中对食欲抑制、降低体重, 以及改善各项代谢指标的效果。6-7周龄ob/ob小鼠 (江苏集萃药康生物科技有限公司) 经过适应性饲养后根据体重进行随机分组, 分别皮下给予溶媒 (PBS)、不同剂量的M6或M39 (0.1nmol/kg, 第0天和第24天各给药一次; 1nmol/kg、10nmol/kg, 第0天和第36天各给药一次) 或司美格鲁肽 (3nmol/kg, 每天一次)。试验期间持续监测小鼠体重和食物摄入量变化, 在第52天对小鼠进行解剖, 分析了各项血清生化指标和肝病理情况。

[0220] 小鼠在治疗末期体重变化显示于表15中, 体重变化曲线、累计摄食量、肝体比、转氨酶水平以及肝病理结果分别显示于图16到21中。

[0221] 表15不同剂量M6和M39改善ob/ob小鼠体重效果 (第52天)

|        |                  |               |
|--------|------------------|---------------|
| [0222] | 组别               | 体重变化 (相对于基线%) |
|        | 溶媒               | 47.9±4.5      |
|        | 司美格鲁肽 (3nmol/kg) | 30.6±4.5***   |
|        | M6 (0.1nmol/kg)  | 25.9±1.7***   |
|        | M6 (1nmol/kg)    | 0.1±2.0***### |

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| M6 (10nmol/kg)   | -1.9±2.2 <sup>#####</sup> |
| M39 (0.1nmol/kg) | 27.2±2.8 <sup>***</sup>   |
| M39 (1nmol/kg)   | 2.7±2.1 <sup>#####</sup>  |
| M39 (10nmol/kg)  | -0.7±1.7 <sup>#####</sup> |

[0223] 注:数值代表每组8只动物数据的平均值±SEM;\*\*\*-p<0.001相对于溶媒,###-p<0.001相对于司美格鲁肽;统计分析方法:one-way ANOVA, followed by Dunnett's。

[0224] 以上结果表明,本发明设计的Fc-GDF15构建体具有超长的药效维持时间,M6和M39低剂量下在第0天和第24天、以及中高剂量下在第0天和第36天分别给药一次,能够显著降低ob/ob小鼠摄食量,对体重的改善显著强于每天给药的司美格鲁肽,同时还能显著改善ob/ob小鼠的肝功能以及肝脂肪变性,效果也显著好于司美格鲁肽。

[0225] 实施例10 Fc-GDF15融合蛋白在小鼠体内药代动力学

[0226] 本实施例测试了构建体M38(单体具有SEQ ID NO:103序列的同源二聚体)、M3(单体具有SEQ ID NO:68序列的同源二聚体)、M15(单体具有SEQ ID NO:80序列的同源二聚体)在小鼠体内的药代动力学表现。将上述融合蛋白用10mM的PBS稀释至0.05mg/mL,然后以0.25mg/kg的剂量分别皮下注射C57BL/6小鼠,每种融合蛋白注射3只小鼠。每只动物给药前、给药后2h、7h、24h、48h、96h、168h、356h、504h、672h分别采血,采用夹心ELISA方法测定血浆Fc-GDF15浓度。具体地,采用鼠抗人GDF15单克隆抗体(义翘神州公司)包板,然后用鼠抗人IgG4 Fc-HRP检测目标蛋白,并进行药代数据计算,结果如表16所示。

[0227] 表16 Fc-GDF15融合蛋白在小鼠体内药代参数

| [0228] | 构建体 | PK 参数                               |             |                             |             |                         |             |                         |
|--------|-----|-------------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
|        |     | AUC <sub>INF_obs</sub><br>(h*ng/ml) |             | C <sub>max</sub><br>(ng/ml) |             | T <sub>1/2</sub><br>(h) |             | T <sub>max</sub><br>(h) |
|        |     | 平均值                                 | SD<br>(标准差) | 平均值                         | SD<br>(标准差) | 平均值                     | SD<br>(标准差) | 平均值<br>SD<br>(标准差)      |
|        | M38 | 42100                               | 3900        | 541                         | 46          | 58                      | 2.9         | 7<br>0                  |
|        | M15 | 314000                              | 17000       | 904                         | 55          | 244                     | 13          | 30<br>12                |
|        | M3  | 397000                              | 55000       | 907                         | 95          | 306                     | 24          | 48<br>34                |

[0229] 注:AUC<sub>INF\_obs</sub>表示从给药时间开始到理论外推无穷远的时间的曲线下面积;C<sub>max</sub>表示检测到的最高血浆浓度;T<sub>1/2</sub>表示半衰期;T<sub>max</sub>表示达到最高血浆浓度的时间。

[0230] 结果表明,包含单体Fc和GDF15的融合蛋白M38在小鼠体内的半衰期为58h;惊奇地发现,具有Fc变体的Fc-GDF15融合蛋白M15和M3在小鼠体内的半衰期则达到了244h和306h,远长于常规Fc融合蛋白在小鼠体内的半衰期。

[0231] 实施例11 Fc-GDF15融合蛋白在食蟹猴体内药代动力学

[0232] 本实施例测试了构建体M39在食蟹猴体内的药代动力学表现。对食蟹猴分别以1mg/kg和2mg/kg剂量皮下注射给予M39,每个剂量雌雄各三只动物。每只动物给药前、给药后0.5h、2h、6h、48h、168h、356h、504h、672h分别采血,采用夹心ELISA方法测定血浆Fc-GDF15浓度。具体地,采用鼠抗人GDF15单克隆抗体(义翘神州公司)包板,然后用鼠抗人IgG4

Fc-HRP检测目标蛋白,并进行药代数据计算,结果如表17所示。

[0233] 表17构建体M39在食蟹猴体内药代参数

|        |    | PK 参数                               |             |                             |             |                         |             |                         |             |
|--------|----|-------------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
|        |    | AUC <sub>INF_obs</sub><br>(h*ug/ml) |             | C <sub>max</sub><br>(ug/ml) |             | T <sub>1/2</sub><br>(h) |             | T <sub>max</sub><br>(h) |             |
| 剂量     | 性别 | 平均值                                 | SD<br>(标准差) | 平均值                         | SD<br>(标准差) | 平均值                     | SD<br>(标准差) | 平均值                     | SD<br>(标准差) |
| 1mg/kg | 雌性 | 7480                                | 1740        | 16                          | 0.307       | 290                     | 12          | 48                      | 0           |
| 1mg/kg | 雄性 | 4950                                | 282         | 10.7                        | 1.49        | 260                     | 7           | 34                      | 24          |
| 2mg/kg | 雌性 | 13400                               | 3640        | 31.2                        | 4.53        | 240                     | 42          | 48                      | 0           |
| 2mg/kg | 雄性 | 9320                                | 2040        | 26.9                        | 4.96        | 210                     | 55          | 34                      | 24          |

[0235] 结果表明,发明人惊奇地发现,构建体M39在食蟹猴中也体现出了超长半衰期,达到200-300小时,远长于常规非抗体类Fc融合蛋白在食蟹猴中约100h左右的半衰期。

[0236] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

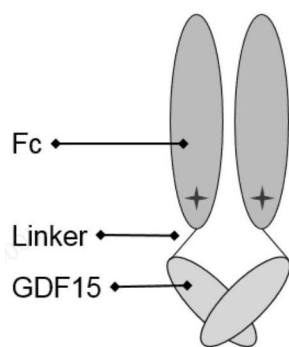


图1

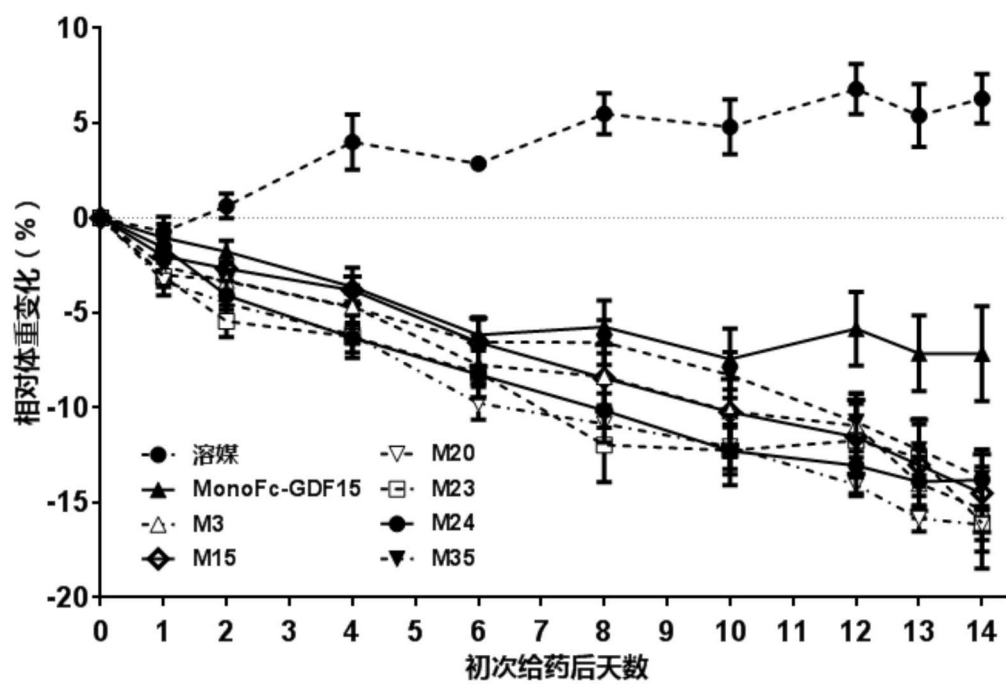


图2

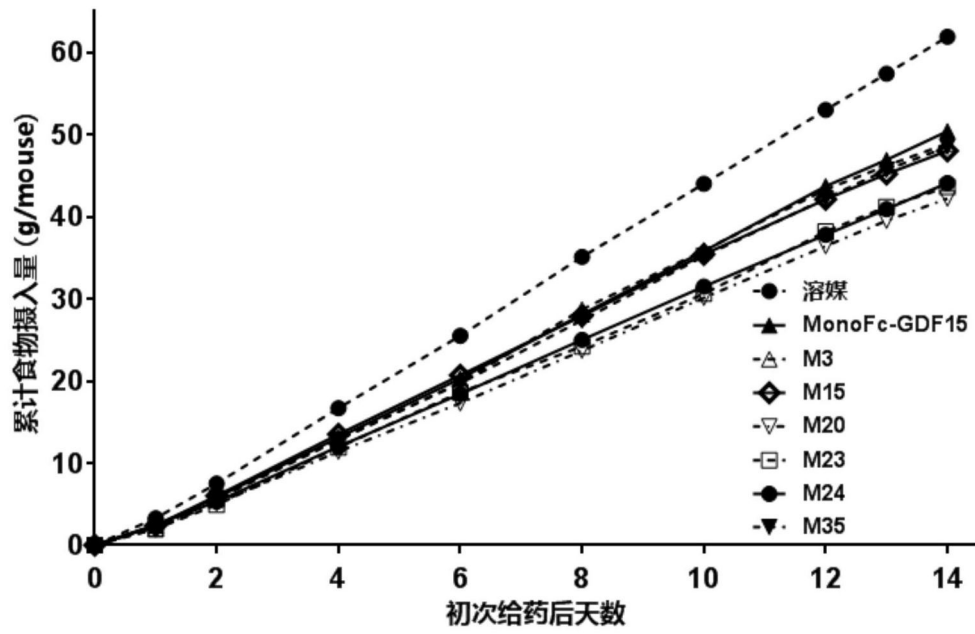


图3

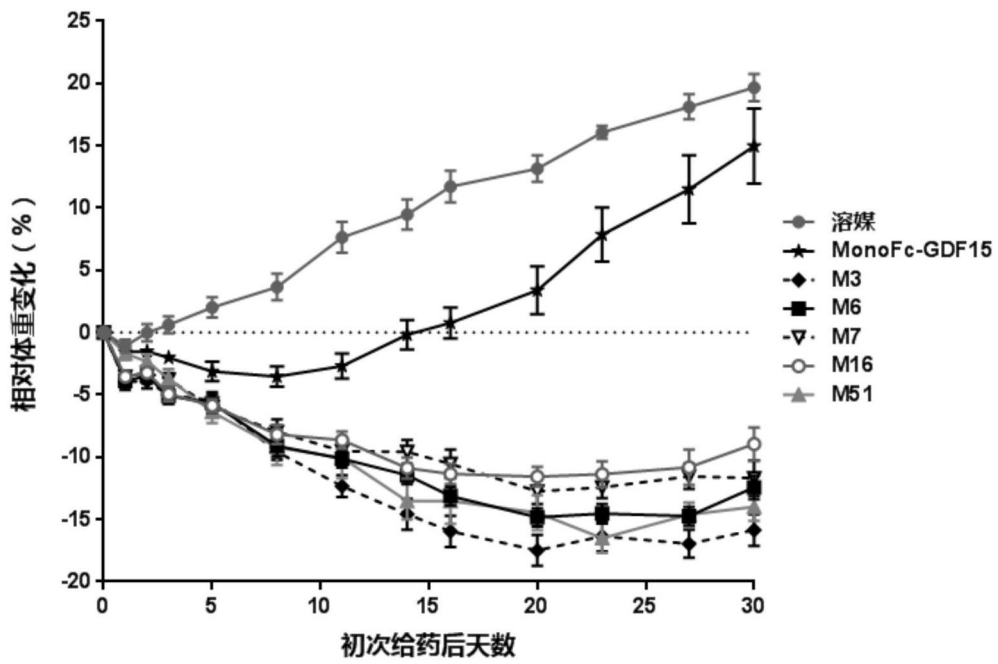


图4

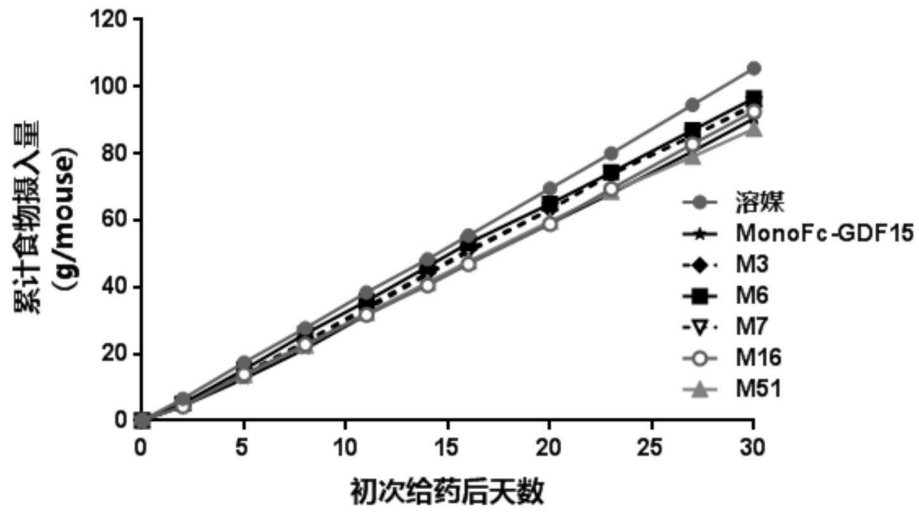


图5

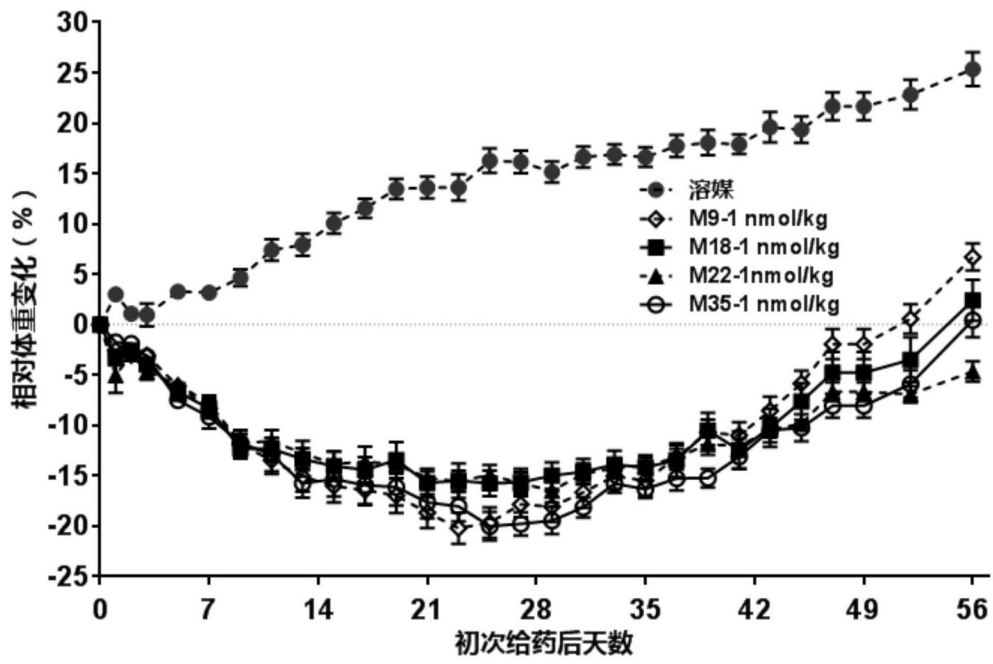


图6

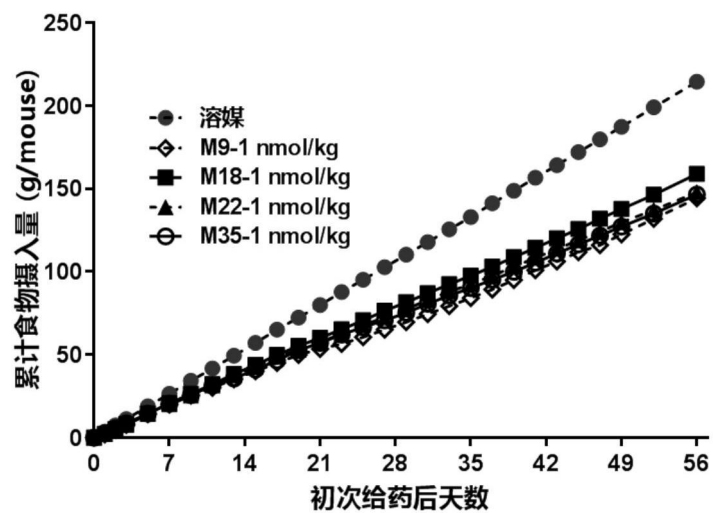


图7

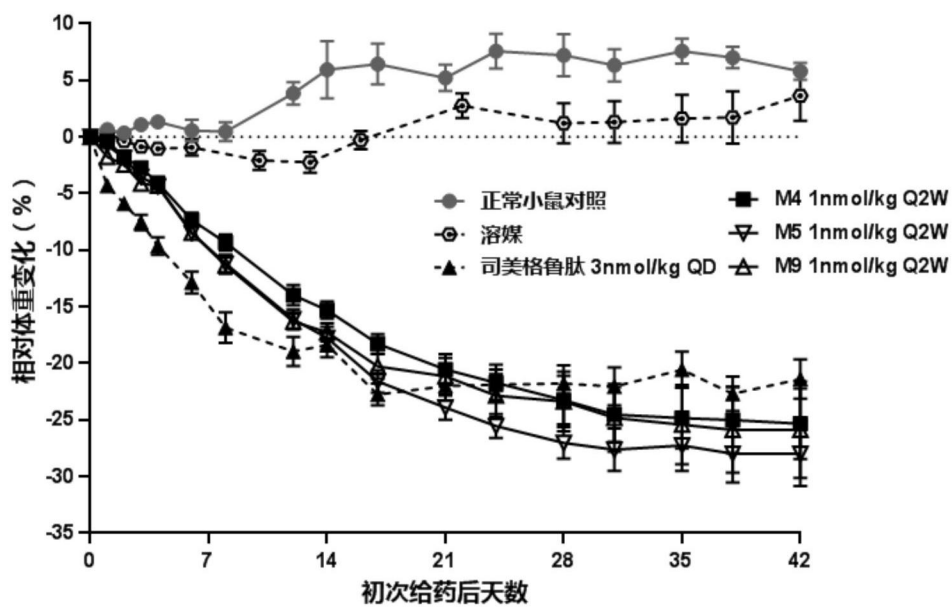


图8

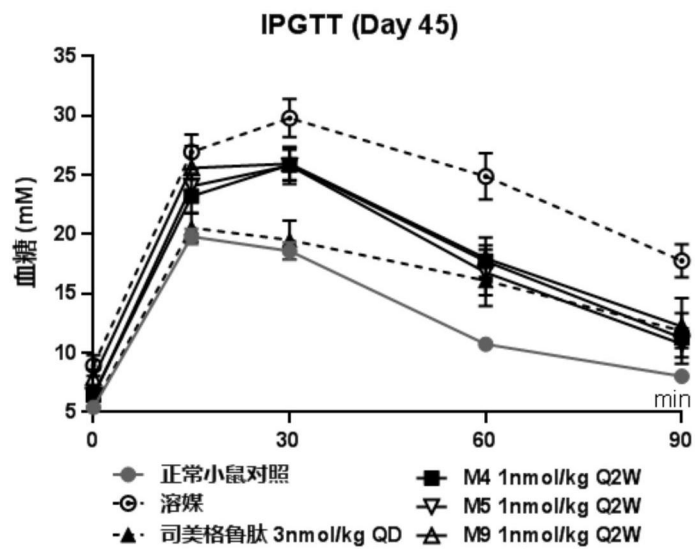


图9

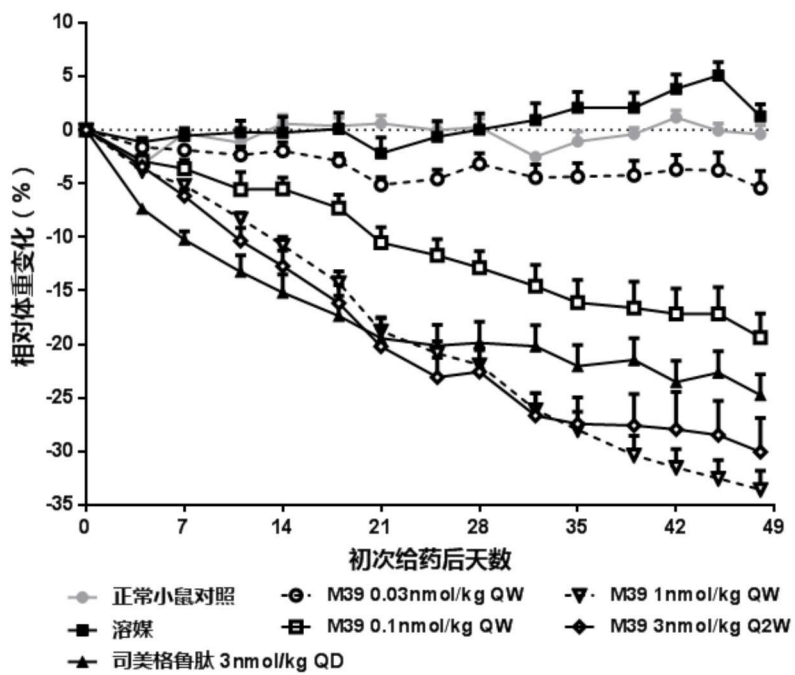


图10

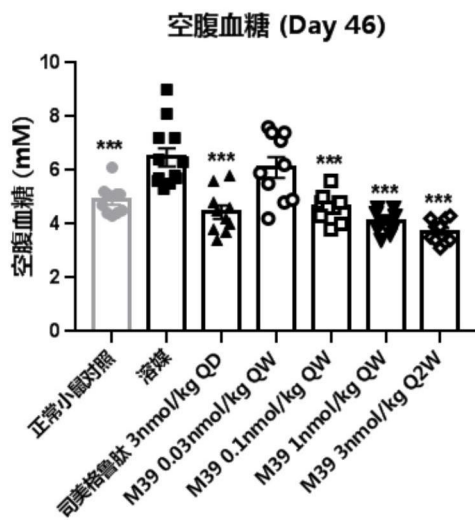


图11

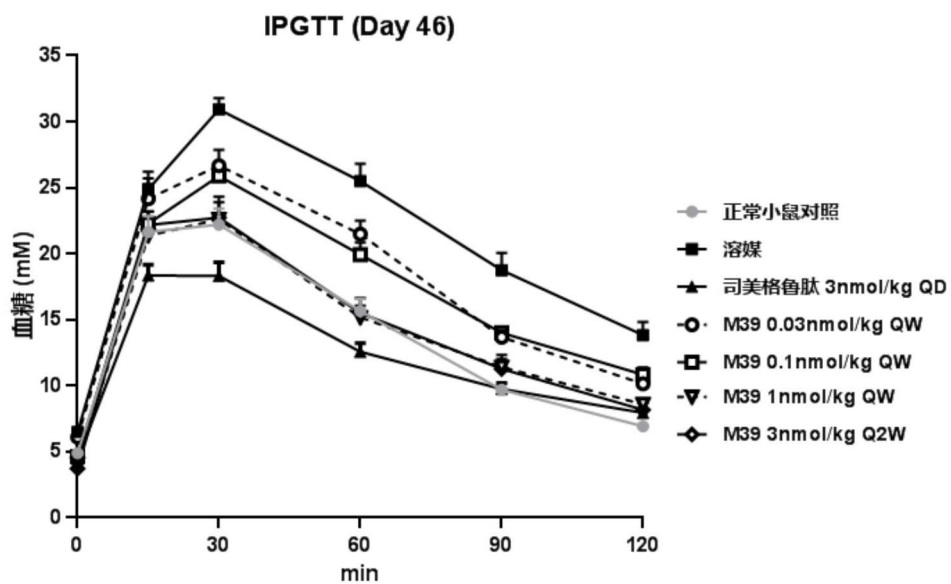


图12a

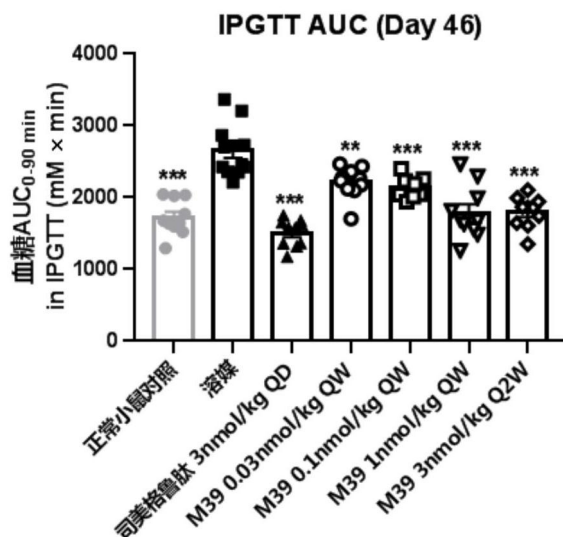


图12b

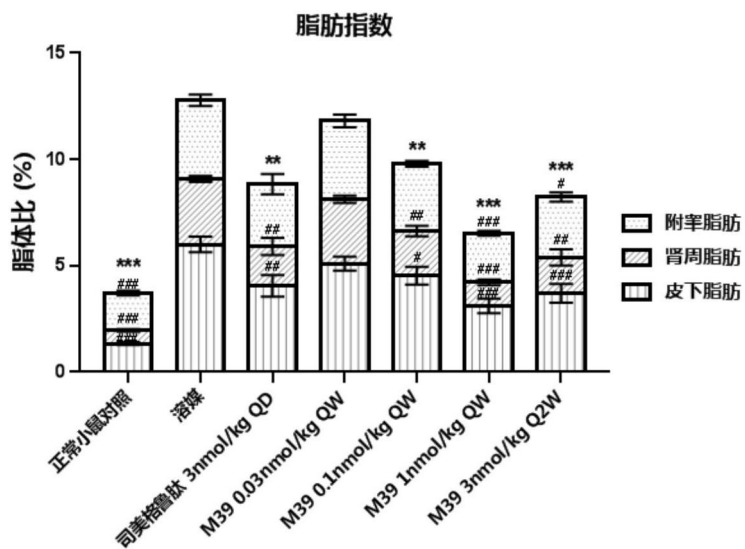


图13

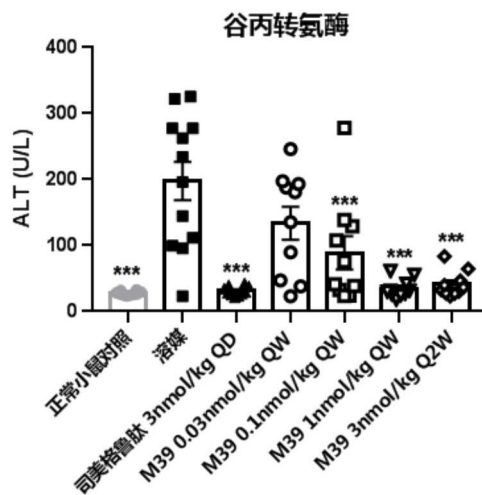


图14

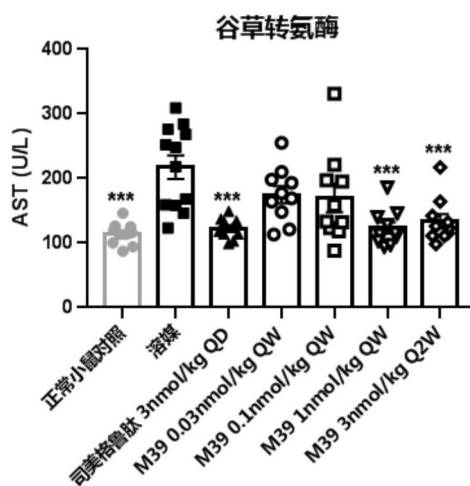


图15

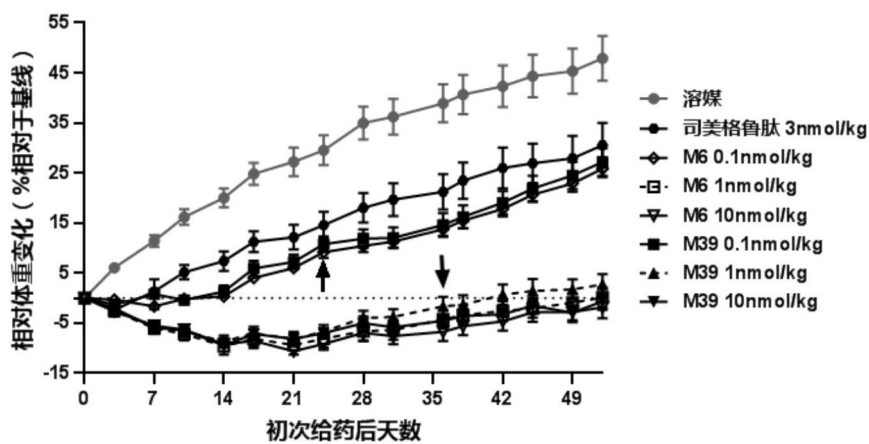


图16a

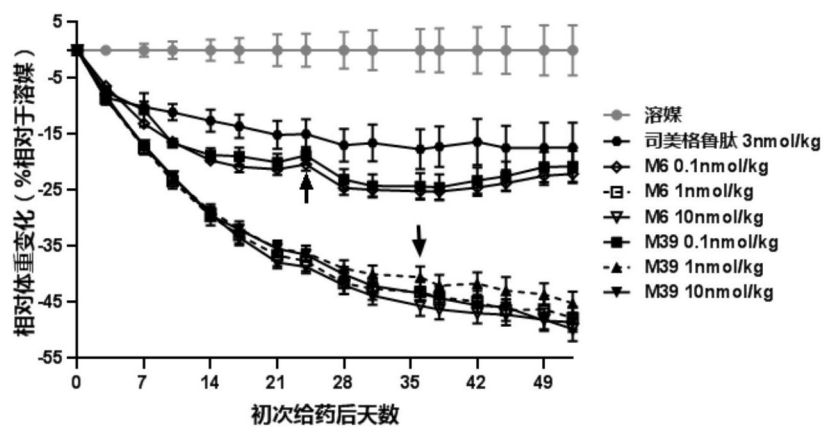


图16b

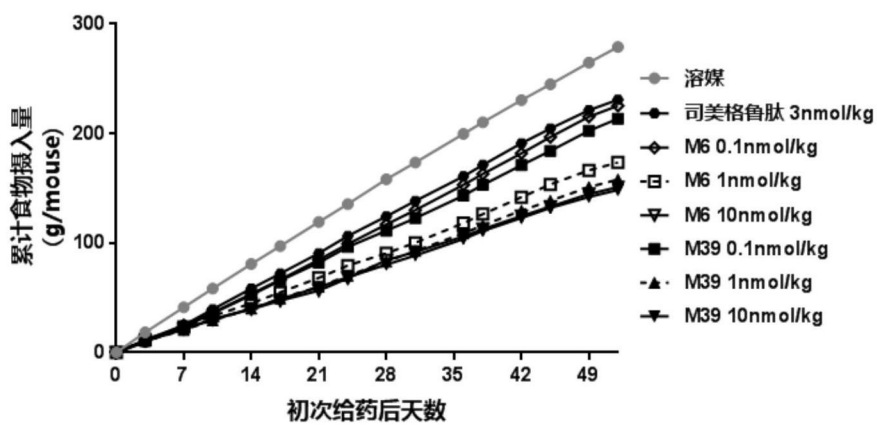


图17

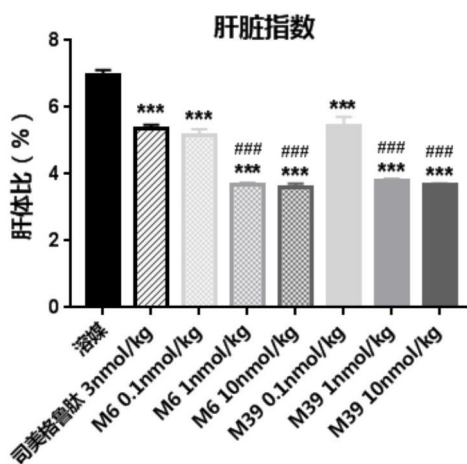


图18

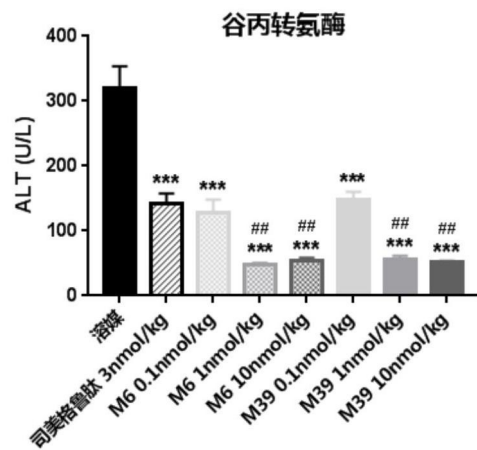


图19

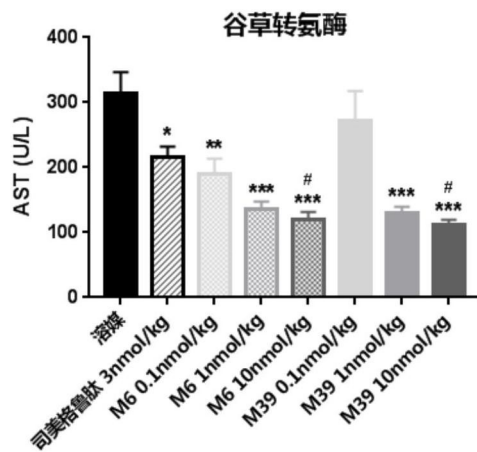


图20

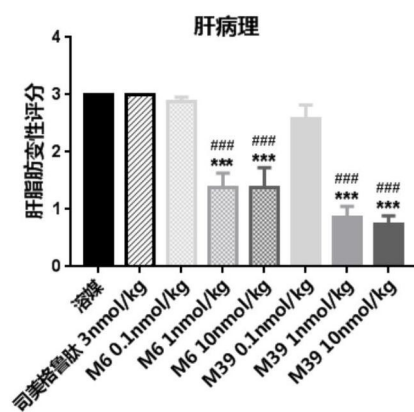


图21