



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102656266 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201080046715.0

(22)申请日 2010.10.15

(30)优先权数据

61/252,074 2009.10.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.04.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/052852 2010.10.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/047267 EN 2011.04.21

(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 园田纯一郎

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 王旭 吴小明

(51)Int.Cl.

C12N 15/09(2006.01)

(56)对比文件

US 2009192087 A1, 2009.07.30,

US 2007248604 A1, 2007.10.25,

Xinle Wu et al.C-terminal tail of

FGF19 determines its specificity toward

Klotho co-receptors.《THE JOURNAL OF

BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2008,第283卷(第48期),33304-33309.

审查员 冯晓亮

权利要求书2页 说明书91页 附图24页

(54)发明名称

具有改变的受体特异性的嵌合成纤维细胞生长因子

(57)摘要

本发明涉及新的嵌合成纤维细胞生长因子(FGF)多肽、新的编码嵌合FGF多肽的DNA,并且涉及嵌合FGF多肽的重组生产,并且涉及将嵌合FGF多肽用于治疗性治疗代谢相关疾病和其他病症以及将其用于生产包含嵌合FGF多肽的药物活性组合物的方法、组合物和测定,所述组合物具有治疗和药理学性质,其包括与治疗代谢相关疾病和其他病症相关的那些。

1. 嵌合FGF19多肽,所述多肽的序列如SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:75,SEQ ID NO:76或SEQ ID NO:77所示。

2. 嵌合FGF19多肽,所述多肽的序列如SEQ ID NO:242,SEQ ID NO:243,SEQ ID NO:244或SEQ ID NO:245所示。

3. 权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽,其中当给药于个体时所述嵌合FGF19多肽不使所述个体中的磷酸化的STAT5多肽的水平降低。

4. 权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽,其中当给药于个体时所述嵌合FGF19多肽使所述个体中的磷酸化的STAT5多肽的量减少,但是此磷酸化的STAT5多肽的量大于当将天然hFGF21给药于个体时磷酸化的STAT5多肽的量。

5. 权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽,其中当给药于个体时所述嵌合FGF19多肽将磷酸化的STAT5多肽的量减少至这样的量,所述量是在没有进行这种给药的个体中的磷酸化的STAT5多肽的量的:100%至5%、100%至10%、100%至20%、100%至30%、100%至40%、100%至50%、100%至60%、100%至70%、100%至80%、100%至90%或100%至95%中的任一个。

6. 权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽,其中当将所述嵌合FGF19多肽给药于个体时,磷酸化的STAT5多肽的量的减少小于当给药天然hFGF21时磷酸化的STAT5多肽的量的减少。

7. 权利要求6所述的嵌合FGF19多肽,其中当将所述嵌合FGF19多肽给药于所述个体时,所述磷酸化的STAT5多肽的减少是当给药天然hFGF21时磷酸化的STAT5多肽的量的减少的:0%至5%,0%至10%,0%至20%,0%至30%,0%至40%,0%至50%,0%至60%,0%至70%,0%至80%,0%至90%或0%至95%中的任一个。

8. 权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽,其中当给药于个体时,所述嵌合FGF19多肽不引起生长激素抵抗。

9. 权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽,其中所述嵌合FGF19多肽的体内生理学半衰期至少与FGF19相同。

10. 权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽,其中所述嵌合FGF19多肽的体内生理学半衰期至少与FGF21相同。

11. 融合蛋白,其中权利要求1或2所述的嵌合FGF19多肽与第二多肽融合,所述第二多肽选自由以下组成的组:免疫球蛋白的Fc部分以及免疫球蛋白的Fc部分的一个或多个片段。

12. 权利要求11所述的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白选自由以下组成的组:IgG-1、IgG-2、IgG-3、IgG-4、IgA-1、IgA-2、IgE、IgD和IgM。

13. 权利要求11所述的融合蛋白,其中所述Fc部分是人的或人源化的。

14. 权利要求11所述的融合蛋白,其中所述嵌合FGF19多肽的C末端被融合到所述第二多肽的N末端。

15. 权利要求14所述的融合蛋白,其中将所述嵌合FGF19多肽的C末端经由接头融合到所述第二多肽的N末端,所述接头选自由以下组成的组:[Gly]_n接头、[Gly₃Ser]_m接头和[Gly₄Ser]_m接头,其中n是1-30的整数而m是1-6的整数。

16. 一种药物组合物,其包含:

(a) 治疗有效量的权利要求1-10中任一项所述的嵌合FGF19多肽或权利要求11-15中任

一项所述的融合蛋白;以及

(b)可接受的药物载体。

17.治疗有效量的权利要求16所述的药物组合物在制备用于治疗显示以下病症中的一种或多种的个体的药物中的应用:1型糖尿病、2型糖尿病和高血糖。

18.治疗有效量的权利要求16所述的药物组合物在制备用于降低个体的血糖的药物中的应用,所述个体需要这种治疗。

19.权利要求17或18所述的应用,其中所述个体是人。

20.分离的核酸分子,其由以下组成:(a)、编码由SEQ ID NO:5的1至190的氨基酸残基的序列组成的多肽的DNA分子,或(b)、与(a)的DNA分子互补的序列。

21.权利要求20的分离的核酸分子,其由SEQ ID NO:7所示的核酸序列组成。

22.分离的核酸分子,其由以下组成:(a)、编码由SEQ ID NO:5的1至190的氨基酸残基的序列和对应于免疫球蛋白的Fc部分的氨基酸残基组成的多肽的DNA分子,或(b)、与(a)的DNA分子的互补序列。

23.包含权利要求20-22中任一项所述的核酸分子的表达系统。

24.包含权利要求23所述的表达系统的宿主细胞。

25.包含权利要求20-22中任一项所述的核酸分子的宿主细胞。

26.一种产生权利要求20-22的任一项中所述的多肽的方法,所述方法包括:
在适于表达所述多肽的条件下培养权利要求24或25所述的宿主细胞;以及
从所述细胞培养物中回收所述多肽。

27.一种抗体,所述抗体特异性地结合权利要求1-10中任一项所述的嵌合FGF19多肽,其中所述抗体不结合天然FGF19多肽或天然FGF21多肽。

28.权利要求27所述的抗体,其中所述抗体是单克隆的。

具有改变的受体特异性的嵌合成纤维细胞生长因子

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2009年10月15日提交的美国临时申请序号61/252,074的优先权利益,所述美国临时申请通过引用完整地结合于此。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及在本文中被称为嵌合成纤维细胞生长因子(FGF)多肽的新多肽,编码嵌合FGF多肽的新DNA,以及嵌合FGF多肽的重组生产,并且涉及将嵌合FGF多肽用于对代谢相关疾病和其他病症的治疗性处理以及用于生产包含嵌合FGF多肽的药物活性组合物的方法、组合物和测定,所述组合物具有治疗学和药理学性质,包括与治疗代谢相关疾病和其他病症相关的那些。

[0004] 发明背景

[0005] 成纤维细胞生长因子(FGF)家族包括FGF19亚家族,该亚家族由人FGF21、FGF23和FGF19以及鼠FGF15组成。与典型地以旁分泌的方式作用于其起源组织的FGF家族的其他成员不同,FGF19亚家族的成员以内分泌的方式作用于特定的末端组织。FGF家族成员的作用是由它们与FGF受体酪氨酸激酶(FGFR)家族的一个或多个成员的肝素依赖性结合导致的。此受体家族包括各自具有酪氨酸激酶结构域四个成员:FGFR1、FGFR2、FGFR3和FGFR4,以及FGFR1、FGFR2和FGFR3各自两个剪接变体。这些发生在FGFR1、FGFR2和FGFR3的外显子3中的剪接变体,被称为“b”和“c”变体(即,FGFR1b、FGFR2b、FGFR3c、FGFR1c、FGFR2c和FGFR3c,其也被分别称为FGFR1(III)b、FGFR2(III)b、FGFR3(III)c、FGFR1(III)c、FGFR2(III)c和FGFR3(III)c)。

[0006] FGF19亚家族的成员涉及在哺乳动物中调节多种组织特异性代谢过程。尤其为人所关心的是FGF19,FGF19显示靶向脂肪细胞和肝细胞两者并且对脂肪细胞和肝细胞两者具有作用。例如,用重组人FGF19(rhFGF19)处理过的小鼠尽管处于高脂肪饮食,但显示增加的代谢率,增加的脂类氧化,较低的呼吸商和重量减轻。此外,尽管处于高脂肪饮食,但是这些小鼠显示较低的瘦蛋白质、胰岛素、胆固醇和甘油三酯血清水平,和正常水平的血糖,并且食欲没有减退。缺乏瘦蛋白质但是含有FGF19转基因的肥胖小鼠显示重量减轻,胆固醇和甘油三酯降低,并且没有发展出糖尿病。当注射以rhFGF19时,缺乏瘦蛋白质的肥胖、糖尿病小鼠以重量减轻和血糖降低的方式显示其代谢特性的反转。(Fu, L.等,Endocrinology(内分泌学)145(6),2594-2603(2004);Tomlinson, E.等,Endocrinology(内分泌学)143(5),1741-1747(2002))。

[0007] FGF19亚家族的另一个成员,FGF21,主要由肝脏表达并且具有与FGF19相似的代谢作用,如经由其对脂肪组织作用的增加的代谢,重量减轻,降低的血糖水平,和对肥胖和糖尿病的抗性(Kharitonov, A.等,J Clin Invest(临床研究杂志)115(6),1627-1635(2005))。FGF21转基因小鼠同样抵抗饮食诱导的肥胖。此外,在糖尿病啮齿动物模型中,FGF21给药降低了血糖和甘油三酯水平。

[0008] FGF21也已经显示在调节生长激素(GH)通路中起作用。GH的合成代谢作用由胰岛

素样生长因子1(IGF-1)调节,IGF-1主要由肝脏产生。GH诱导IGF-1转录,由此通过经GH受体的詹纳斯激酶2(JAK2)的激活来增加其循环水平。被激活的JAK2使信号转导子和转录激活子(STAT)家族成员磷酸化,当被磷酸化时,STAT家族成员经历核易位并且与目标基因的调节元件(包括IGF-1的调节元件)结合。尤其,磷酸化形式的STAT5显示出在此响应中发挥显著作用。

[0009] GH对IGF-1水平的作用显示出被导致低水平的IGF-1转录和循环IGF-1的饥饿和禁食条件所抵消(Thissen,J.P.等,Endocr.Rev(内分泌学综述).15,80-101(1994))。这些对IGF-1的作用可以是由被磷酸化的STAT5的水平下降所导致的。特别,受GH注射的禁食大鼠与非禁食大鼠相比具有较低水平的肝磷酸化STAT5(Beauloye,V.等,Endocrinology(内分泌学)143,792-800(2002))。在饥饿或禁食条件下在肝中被诱导的FGF21可以介导此作用。FGF21转基因小鼠已经显示出具有降低水平的IGF-1和被磷酸化的STAT5(Inagaki,T.等,Cell Metabolism(细胞代谢)8,77-83(2008))。

[0010] FGF19和FGF21的代谢作用通过它们与FGFR1c、FGFR2c和FGFR3c受体的结合来实现,其中与FGFR1c和FGFR2c的结合是最显著的。此外,FGF19和FGF21与这些受体的结合需要共同受体Klotho-beta。尽管这些FGFR受体具有普遍性,但是此对具有组织特异性定位的Klotho-beta共同受体的需要使得FGF19和FGF21的代谢作用变得具有脂肪细胞特异性。

[0011] FGF19也显示出具有区别于FGF21的作用。例如,FGF19显示出经由其肝特异性作用通过肝调节胆汁产生。响应于餐后胆汁产生,FGF19通过抑制胆固醇7 α -羟化酶(胆汁酸合成中的限速酶)基因(CYP7A1)的转录并且通过刺激胆囊的充盈来负调控胆汁产生。此外,FGF19显示出具有肝促有丝分裂作用,没有发现FGF21具有该作用。例如,由于肝细胞增强的增殖和发育异常,FGF19转基因小鼠发展出肝腺癌,而用rhFGF19处理的小鼠显示出肝细胞的肝细胞增殖(Nicholes,K.等,Am JPathol(美国病理学杂志)160,2295-2307(2000))。

[0012] FGF19的这些另外的活性似乎通过其与FGFR4的结合来介导。FGF19可以以依赖Klotho-beta的方式和不依赖Klotho-beta的方式结合FGFR4。尽管FGF21同样显示出以依赖Klotho-beta的方式结合FGFR4,但是FGF21与FGFR4的结合不产生有效的信号转导。

[0013] 需要发展用于治疗代谢相关疾病如糖尿病、肥胖、高血糖和其他相关疾病的新疗法。同样需要发展用于这些代谢相关疾病的新疗法,其中这种疗法的不需要的生长或增殖潜能(例如,肿瘤发生潜能)得到消除或减小。同样需要发展用于这些代谢相关疾病的新疗法,其中这种疗法的生长激素抵抗的可能性得到消除或减小。

[0014] 发明概述

[0015] 在第一方面中,本发明提供嵌合人成纤维细胞生长因子19(hFGF19)多肽。在本发明的一些实施方案中,嵌合多肽的序列包含C端部分,该C端部分包括hFGF19多肽序列的C端部分;以及N端部分,该N端部分包括hFGF21多肽序列的N端部分。在某些实施方案中,hFGF19多肽序列的C端部分的长度是约45至约185个残基而hFGF21多肽序列的N端部分的长度是约7至约140个残基。

[0016] 在本发明的另一个实施方案中,提供有这样的嵌合hFGF19多肽,其中该多肽的序列包含C端部分,该C端部分包括hFGF21多肽序列的C端部分;以及N端部分,该N端部分包括hFGF19多肽序列的N端部分。在一些实施方案中,hFGF21多肽序列的C端部分的长度是约8至约145个残基,而hFGF19多肽序列的N端部分的长度是约45至约175个残基。

[0017] 在本发明的另一个实施方案中,提供有这样的嵌合hFGF19多肽,其中该嵌合多肽的序列包含第一多肽序列,所述第一多肽序列与hFGF19多肽的序列至少具有一定的序列同一性,并且其中第一多肽序列的一部分被第二多肽序列的一部分取代以致第一多肽序列的被取代部分的长度是约3至约185个残基,所述第二多肽序列与hFGF21多肽的序列至少具有一定的序列同一性。

[0018] 在本发明的一些实施方案中,提供有这样的嵌合hFGF19多肽,其中该嵌合多肽的序列包含第一多肽序列,所述第一多肽序列与hFGF19多肽的序列至少具有一定的序列同一性,并且其中第一多肽序列的一部分被第二多肽序列的超过一个部分取代,所述第二多肽序列与hFGF21多肽的序列至少具有一定的序列同一性。在一些实施方案中,嵌合hFGF19多肽包含用第二多肽的 $\beta 1$ - $\beta 2$ 环,第二多肽的 $\beta 10$ - $\beta 12$ 区段,和/或第二多肽的对应序列GQV对第一多肽的 $\beta 1$ - $\beta 2$ 环的取代,对第一多肽的 $\beta 10$ - $\beta 12$ 区段的取代,和/或对第一多肽的五个残基WGDPI的取代。

[0019] 在本发明的某些实施方案中,嵌合hFGF19多肽包含序列

[0020]

HP1PDSSPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFILRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR
GHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK(SEQ ID NO:5)。

[0021] 在某些实施方案中,将本发明的嵌合hFGF19多肽融合到第二多肽,所述第二多肽是免疫球蛋白的Fc部分,免疫球蛋白的Fc部分的类似物以及免疫球蛋白的Fc部分的一个或多个片段。在某些实施方案中,免疫球蛋白选自由以下组成的组: IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1, IgA-2, IgE, IgD和IgM。在一些实施方案中, Fc部分是人的或人源化的。在一些实施方案中,嵌合hFGF19多肽的C末端被融合到第二多肽的N末端。在一些实施方案中,将嵌合hFGF19多肽的C末端经由接头融合到第二多肽的N末端,所述接头选自由以下组成的组: $[Gly]_n$ 接头、 $[Gly_3Ser]_m$ 接头和 $[Gly_4Ser]_m$ 接头,其中n是1-30的整数而m是1-6的整数。

[0022] 本发明包括与天然hFGF19具有至少或几乎相同的生理学半衰期的嵌合hFGF19多肽。本发明包括与天然hFGF21具有至少或几乎相同的生理学半衰期的嵌合hFGF19多肽。

[0023] 在某些实施方案中,嵌合hFGF19多肽基本不以不依赖Klotho-beta或依赖Klotho-beta的方式使FGFR4激活。在某些实施方案中,嵌合hFGF19多肽以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c。

[0024] 在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽不减小个体的瘦体重。在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽基本不使个体的瘦体重减小。在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽不使个体的骨密度减小。在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽基本不使个体的骨密度减小。在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽不使个体的心脏功能下降。在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽基本不使个体的心脏功能下降。

[0025] 在某些实施方案中,嵌合hFGF19多肽不使或基本上不使体内磷酸化的STAT5多肽的量减小。在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽不使或基本上不使个体中磷酸化的STAT5多肽的量减小。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,在个体中磷酸化的STAT5多肽的量减少,但是此磷酸化的STAT5多肽的量大于当将天然

hFGF21给药于个体时的磷酸化的STAT5多肽的量。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药于个体时,磷酸化的STAT5多肽的量是在个体中不进行这种给药的情况下磷酸化的STAT5多肽的量的:100%至5%,100%至10%,100%至20%,100%至30%,100%至40%,100%至50%,100%至60%,100%至70%,100%至80%,100%至90%或100%至95%中的任一种。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,磷酸化的STAT5多肽的量的减少小于当给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量的减小。例如,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,磷酸化的STAT5多肽的减少是当给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量的减小的:0%至5%,0%至10%,0%至20%,0%至30%,0%至40%,0%至50%,0%至60%,0%至70%,0%至80%,0%至90%或0%至95%中的任一种。

[0026] 在某些实施方案中,嵌合hFGF19多肽不使或基本上不使体内循环的胰岛素样生长因子1(IGF-1)的量减少。在某些实施方案中,当被给药到个体时,嵌合hFGF19多肽不使个体中循环的IGF-1的量减少或显著减少。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,循环的IGF-1的量减少,但是此循环的IGF-1的量大于当将天然hFGF21给药于个体时的循环的IGF-1的量。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药于个体时,循环的IGF-1的量是在个体中不进行这种给药的情况下循环的IGF-1的量的:100%至5%,100%至10%,100%至20%,100%至30%,100%至40%,100%至50%,100%至60%,100%至70%,100%至80%,100%至90%或100%至95%中的任一种。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药于个体时,循环的IGF-1的量的减少小于当给药天然hFGF21时的循环的IGF-1的量的减小。例如,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,循环的IGF-1的减少是当给药天然hFGF21时的循环的IGF-1的量的减小的:0%至5%,0%至10%,0%至20%,0%至30%,0%至40%,0%至50%,0%至60%,0%至70%,0%至80%,0%至90%或0%至95%中的任一种。

[0027] 在另一方面中,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的本发明的嵌合hFGF19多肽;以及可接受的药物载体。

[0028] 在另一方面中,本发明提供治疗显示以下症状中的一种或多种的个体的方法:肥胖、1型糖尿病、2型糖尿病、高血糖、代谢综合征、动脉粥样硬化、高胆固醇血症、卒中、骨质疏松、骨关节炎、关节变性病、肌萎缩、老年性肌肉萎缩(sarcopenia)、瘦体重下降、秃发、皱纹、疲劳增加、耐力下降、心脏功能减弱、免疫系统功能障碍、癌症、帕金森氏病、老年痴呆、阿尔茨海默病和认知功能下降,所述方法包括向个体给药治疗有效量的本发明的药物组合物。

[0029] 在另一方面中,本发明提供降低个体的血糖的方法,所述个体需要这种治疗,所述方法包括向个体给药治疗有效量的本发明的药物组合物。

[0030] 在另一方面中,本发明提供分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含与编码具有SEQ ID NO:5的约1至约190的氨基酸残基的多肽的DNA分子或其互补序列(complement)具有至少80%、至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的DNA。

[0031] 在另一方面中,本发明提供分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含序列:

[0032]

```
CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACCTCCGGCCC  
CCACGGGCTCTCCAGCTGCTTCCTGCGCATCCGTGCCGACGGCGTCGTGGACTGCGCGCGGGGCCAGAGCGCGCACA  
GTTTGCTGGAGATCAAGGCAGTCGCTCTGCGGACCGTGGCCATCAAGGGCGTGACAGCGTGCGGTACCTCTGCATG
```

GGCGCCGACGGCAAGATGCAGGGGCTGCTTCAGTACTCGGAGGAAGACTGTGCTTTCGAGGAGGAGATCCGCCCAGATGGCTACAATGTGTACCGATCCGAGAAGCACCAGCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAGCTGTACAAGAACAGAGGCTTTCTTCCACTCTCTCATTTCTGCCCCATGCTGCCCATGGTCCCAGAGGAGCCTGAGGACCTCAGGGGCCACTTGAATCTGACATGTTCTCTTCGCCCCCTGGAGACCGACAGCATGGACCCATTTGGGCTTGTCACCGGACTGGAGGCCGTGAGGAGTCCCAGCTTTGAGAAG(SEQ ID NO:7),

[0033] 或其部分。

[0034] 在某些实施方案中,本发明的分离的核酸还包含编码对应于免疫球蛋白的Fc部分的氨基酸残基的序列。

[0035] 在另一方面中,本发明提供表达系统,所述表达系统包含本发明的核酸分子。在另一方面中,本发明提供宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明的表达系统或核酸。

[0036] 在另一方面中,本发明提供由本发明的核酸分子编码的分离的多肽。

[0037] 在另一方面中,本发明提供生产分离的多肽的方法,所述方法包括在适于表达编码的多肽的条件下培养本发明的宿主细胞和从细胞培养物中回收编码的多肽。在另一方面中,本发明提供通过本发明的方法生产的分离的多肽。

[0038] 附图简述

[0039] 图1显示人FGF19多肽(SEQ ID NO:1)和人FGF19多肽前体(SEQ IDNO:3)的氨基酸序列;

[0040] 图2显示人FGF21多肽(SEQ ID NO:2)和人FGF21多肽前体(SEQ IDNO:4)的氨基酸序列;

[0041] 图3显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的受体结合测定的典型结果;

[0042] 图4显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的受体结合测定的典型结果;

[0043] 图5显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的肝特异性基因表达测定的典型结果;

[0044] 图6显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的脂肪细胞特异性基因表达测定的典型结果;

[0045] 图7显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的血糖下降测定的典型结果;

[0046] 图8显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的葡萄糖耐受测试测定的典型结果;

[0047] 图9显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的免疫球蛋白Fc融合的活性测定的典型结果;以及

[0048] 图10-14显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的受体特异性测定的典型结果。

[0049] 图15显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的有关磷酸化Stat5蛋白质水平的典型结果。

[0050] 图16显示使用本发明的嵌合FGF19多肽的有关细胞总的代谢活性的典型结果。

[0051] 图17显示在胆汁酸(“BA”)调节中FGF19需要FGFR4,而在改善葡萄糖耐受中FGF19不需要FGFR4。图17A显示在葡萄糖耐受测试中用FGF19或PBS处理的野生型(“WT”)小鼠和FGFR4敲除(“KO”)小鼠的葡萄糖水平。 $*p<0.05$ 。 $**p<0.01$ 。曲线下面积(AUC)的p值是 $p<0.02$ (WT)和 $p<0.005$ (KO)。N=6~8。图17B显示在第7天在安乐死时用FGF19或PBS处理的WT小鼠和FGFR4KO小鼠中的多种代谢参数(体重(g)、肝/BW比(%))、血清胰岛素(ng/mL)、血清β-羟基丁酸(“BHB”)(mg/L)、血清乳酸(mg/dl)、和血清甘油三酯(mg/dl))。对小鼠实施安乐死并且在3hr的禁食后准备血清。N=6~8。图17C显示在用FGF19或PBS处理的WT和FGFR4KO

小鼠中的血清BA组成分析。只显示主要BA种类。CA:胆酸,DCA:脱氧胆酸,MCA:鼠胆酸,T-:缀合牛磺酸的。图17D显示通过实时qPCR确定的在用FGF19或PBS处理的WT和FGFR4K0小鼠中多种肝基因(Egr-1、c-Fos、AFP、Cyp7a1、Cyp8b、Cyp27a1、Cyp7b和GK)的相对表达。N=6~8。图17B-17D的p值是: <0.05 、 $**<0.005$ (PBS vs FGF19)、 $\#<0.05$ 、 $\#\#<0.005$ (WT vs FGFR4K0)。

[0052] 图18显示对具有减小的FGFR4活性的FGF19变体的鉴定。图18A显示来自GAL-E1k1荧光素酶测定,使用转染有KLB和FGFR1c或FGFR4并用含增加浓度的FGF19(○)和FGF21(▲)的培养基孵育的大鼠L6细胞,由海肾(renilla)荧光素酶活性归一化的相对的萤火虫荧光素酶活性(显示为相对荧光素酶单位(“RLU”)。图18B显示FGF19(顶部)、FGF21(底部)和具有左边氨基酸组成的多种嵌合蛋白质的图(按比例)。基于显示在图18C中的GAL-E1k1测定的结果,每种嵌合体被分类为如在右侧指示的类别(I)、(II)或(III)。此处不显示当使用条件培养基时不表现与FGF21或FGF19相当的FGFR1c活性的嵌合体。图18C显示在GAL-E1k-1测定中FGFR1c或FGFR4的激活,所述GAL-E1k-1测定使用用KLB和/或FGFR(FGFR1c或FGFR4)共转染并且与条件培养基孵育的L6细胞,所述条件培养基来自用不同FGF构建体(参见图18B:所用FGF构建体的氨基酸组成)瞬时转染的293细胞。将结果显示为相对于用模拟品(mock)转染的细胞调节的对照培养基的诱导倍数(fold induction)。图18D显示在GAL-E1k1荧光素酶测定中FGFR激活的诱导倍数,所述GAL-E1k1荧光素酶测定使用用FGFR1c、FGFR4+KLB或FGFR4转染并且与含有增加浓度的经纯化的FGF19(○)或FGF19v(▼)(图18B和18C中的构建体#4)的培养基孵育的大鼠L6细胞。图18E显示FGF19和FGF19v与融合到Fc片段的FGFR4的固相结合测定结果。该实验的示意图显示在右侧。图18F显示在图18E中使用的抗FGF19抗体以难区分的亲和性识别FGF19和FGF19v(对照ELISA实验)。该实验的示意图显示在右侧。

[0053] 图19显示GAL-E1k1荧光素酶测定中的RLU,所述GAL-E1k1荧光素酶测定在用KLB和FGFR2c或FGFR3c转染并且与含有增加浓度的FGF19(○)或FGF21(▲)的培养基孵育的大鼠L6细胞中进行。用KLB和指定的FGFR以及GAL-E1k1、SV40-海肾荧光素酶和Gal响应性荧光素酶报告子(reporter)的表达载体共转染L6细胞。在荧光素酶测定前将经转染的细胞与含有增加浓度的FGF19或FGF21的培养基孵育6小时。通过由海肾荧光素酶活性归一化并且以相对荧光素酶单位(RLU)表达的相对荧光素酶活性来评估转录激活。此图显示在存在KLB的情况下FGF21和FGF19激活FGFR2c和FGFR3c。

[0054] 图20显示在GAL-E1k-1测定中FGFR1c或FGFR4的激活,所述GAL-E1k-1测定使用用KLB和/或FGFR(FGFR1c或FGFR4)共转染并且与条件培养基孵育的L6细胞,所述条件培养基来自用显示在X轴的不同FGF构建体(参见图18B:所用FGF构建体的氨基酸组成)瞬时转染的293细胞。将结果显示为相对于用模拟品转染的细胞的对照培养基的诱导倍数。在X轴指示的编号对应于显示在图18B中的构建体的编号。

[0055] 图21显示FGF19v在饲料喂养小鼠中的作用。图21A显示在用1mg/kg的FGF21、FGF19或FGF19v或PBS对照注射(经由尾静脉)的FVB小鼠中不同基因(c-Fos、Egr-1、GK、SHP和Cyp7a1)的相对表达。p值: $*<0.05$, $**<0.01$, $***<0.001$ (vs PBS)。在注射后4小时,从每只鼠提取肝mRNA并且对其进行指定基因的实时qPCR分析。图21B显示在用1mg/kg的FGF21或FGF19或PBS对照经腹腔注射的WT小鼠或FGFR4K0(KO)小鼠(N=5-7)中不同基因(c-Fos、Egr-1、GK、SHP和Cyp7a1)的相对表达。用FGF蛋白质或PBS对照经腹腔注射过夜禁食的小鼠。

在注射后4小时,从每只鼠提取肝mRNA并且对其进行指定基因的实时qPCR分析。p值: $^* < 0.05$, $^{**} < 0.01$, $^{***} < 0.001$ 。图21C显示在不依赖贴壁的(anchorage independent)细胞生长测定中通过荧光强度($\times 10^5$)测量的用不同浓度(10ng/mL、60ng/mL和200ng/mL)的FGF21、FGF19或FGF19v处理的HepG2细胞的增殖。基于非荧光指示染料刃天青(阿尔玛蓝(Alamar Blue))到试卤灵的转化率来估计在软琼脂中HepG2细胞的增殖。图21D显示在注入FGF19或FGF19v的FVB小鼠中BrdU⁺肝细胞的变化倍数。 $N=6$, $^*p < 0.01$, $^{***}p < 5E-5$ (vs PBS), $^{##}p < 0.0002$ (vs FGF19)。给FVB小鼠植入渗透泵从而以1ng/hr(~ 0.8 mg/kg/天)连续注入指定的FGF蛋白质(第0天)。该小鼠同样接受从第1天开始的每日1mg/kg/天FGF蛋白质(q.d.)和30mg/kg/天BrdU(b.i.d.)的注射。在第7天,将肝切开并进行抗BrdU染色。结果显示为相对于模拟品处理的动物的BrdU阳性肝细胞数目/分析面积的诱导倍数。图21E显示在图21C中所示的研究的代表性图像。图21F显示不同基因(c-Fos、Egr-1、AFP、GK、Cyp7a1和Cyp8b)在用于图21D和21E的小鼠中的相对表达。 $N=6$, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.005$, $^{***}p < 0.001$ (vs PBS), $^{\#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.005$ (vs FGF19)。

[0056] 图22显示FGF19v和FGF21具有相似的代谢作用并且改善ob/ob小鼠中的高血糖。给11周龄ob/ob小鼠皮下植入渗透泵从而注入1ng/hr FGF蛋白质(0.4mg/kg/天)或PBS对照($N=7$)。图22A显示在通过渗透泵注入1ng/hr FGF21或FGF19v(0.4mg/kg/天)或PBS对照($N=7$)的ob/ob小鼠中的体重(g)和血糖(mg/dl)。在第0天植入渗透泵。图22B显示在随机喂养条件和在过夜禁食后在注入以FGF21、FGF19v或PBS对照的ob/ob小鼠中的血糖水平(mg/dl)。图22C显示在第8天在注入以FGF21、FGF19v或PBS对照的ob/ob小鼠中的血清非酯化脂肪酸(“NEFA”)水平。图22D显示在第6天在注入以FGF21、FGF19v或PBS对照的ob/ob小鼠中进行的葡萄糖耐受测试结果。使小鼠过夜禁食并在 $t=0$ 给其经腹腔注射1g/kg葡萄糖。图22E显示在第8天在注入以FGF21、FGF19v或PBS对照的ob/ob小鼠中的器官/体重比(%)。图22F显示通过qPCR确定的不同基因(AFP、IGFBP2、SCD-1、Cyp7A、Cyp8B、UCP-1、MCAD和SREBP-1c)在注入以FGF21、FGF19v或PBS对照的ob/ob小鼠的不同组织(肝、褐色脂肪组织(“BAT”)和白色脂肪组织(“WAT”))中的相对表达。p值: $^* < 0.05$, $^{**} < 0.005$, $^{***} < 0.0005$ (vs PBS对照)。

[0057] 发明详述

[0058] 本发明提供新的嵌合FGF19多肽。在本发明的一些实施方案中,嵌合FGF19多肽序列包含FGF19多肽序列的一部分和FGF21多肽序列的一部分。在某些优选实施方案中,FGF19多肽是经处理的人FGF19(hFGF19)多肽,其序列在SEQ ID NO:1中得到限定。在某些优选实施方案中,FGF21多肽是经处理的人FGF21(hFGF21)多肽,其序列在SEQ ID NO:2中得到限定。在另一方面中,本发明提供新的嵌合FGF19多肽,其进一步与免疫球蛋白结构域,如Fc结构域融合。

[0059] 在另一方面中,本发明提供新的嵌合FGF19多肽,其具有改变的受体特异性。在某些优选实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽基本上不以依赖Klotho-beta或不依赖Klotho-beta的方式使FGFR4激活。在某些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c中的至少一种。

[0060] 在一些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽可以具有以下有利特征中的一种或多种:当给药时多肽在个体中基本不诱导肝细胞增殖,当给药时多肽在个体中基本不诱导生长激素抵抗,多肽不包含种群中的多态性残基,多肽具有与天然FGF19多肽(如天然

hFGF19多肽)至少或大约相同的体内生理学半衰期,多肽具有与天然FGF21多肽(如天然hFGF21多肽)至少或大约相同的体内生理学半衰期,当给药时多肽基本不使个体的瘦体重下降,当给药时多肽基本不使个体的骨密度下降,并且当给药时多肽基本不使个体的心脏功能下降。

[0061] 本发明的嵌合FGF19多肽的有利特征还可以包括以下中的一个或多个:在需要这种治疗的个体中,多肽使个体的血糖下降;多肽以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c中的至少一个;多肽基本不以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR4;多肽基本不以不依赖Klotho-beta的方式激活FGFR4;当给药时,多肽不使或基本不使个体的磷酸化的STAT5多肽的量减少;当将多肽向个体给药时,个体的磷酸化的STAT5多肽的量减少但是此磷酸化的STAT5多肽的量大于向个体给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量;当将多肽向个体给药时,个体的磷酸化的STAT5多肽的量的减少小于在个体中给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量的减小;当给药时,多肽不使或基本不使个体的循环的IGF-1多肽的量减少;当将多肽向个体给药时,个体的循环的IGF-1的量减少但是此循环的IGF-1的量大于向个体给药天然hFGF21时的循环的IGF-1的量;当将多肽向个体给药时,个体的循环的IGF-1的量的减少小于在个体中给药天然hFGF21时的循环的IGF-1的量的减小;并且多肽不使或基本不使具有正常或超常量的GH的个体的循环的IGF-1多肽的量减少。

[0062] 在某些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽具有这样的有利特性:以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c中的至少一个,并且基本不以依赖或不依赖Klotho-beta的方式激活FGFR4。在某些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽具有这样的有利特性:以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c中的至少一个,基本不以依赖或不依赖Klotho-beta的方式激活FGFR4,并且使个体的磷酸化的STAT5多肽的量减少但是此磷酸化的STAT5多肽的量大于向个体给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量。在某些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽具有这样的有利特性:以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c中的至少一个,并且基本不以依赖或不依赖Klotho-beta的方式激活FGFR4,并且不包含在种群中具有多态性的残基。在某些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽具有这样的有利特性:以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c中的至少一个,基本不以依赖或不依赖Klotho-beta的方式激活FGFR4,使个体的磷酸化的STAT5多肽的量减少但是此磷酸化的STAT5多肽的量大于向个体给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量并且不包含在种群中具有多态性的残基。

[0063] 在另一方面中,本发明提供新的嵌合FGF19多肽,其具有改变的受体特异性。在某些优选实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽基本不以依赖Klotho-beta或不依赖Klotho-beta的方式激活FGFR4。在某些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽以依赖Klotho-beta的方式激活FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c中的至少一个。

[0064] 在另一方面中,与受天然FGF21影响的生长激素抵抗相比,嵌合FGF19多肽不影响个体中的生长激素抵抗活性。在另一方面中,与受天然FGF21影响的生长激素抵抗相比,嵌合FGF19多肽不影响个体中基本的生长激素抵抗活性。在某些实施方案中,嵌合FGF19多肽不使或基本不使个体的磷酸化的STAT5多肽的量减少。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,个体中的磷酸化的STAT5多肽的量减少但是此磷酸化的STAT5多肽的量大于向个体给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量。在某些实施方案中,当嵌合

hFGF19多肽被给药到个体时,磷酸化的STAT5多肽的量的减少小于给药天然hFGF21时的磷酸化的STAT5多肽的量的减小。在某些实施方案中,嵌合FGF19多肽不使或基本不使循环的胰岛素样生长因子1(IGF-1)的量减少。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,循环的IGF-1的量减少但是此循环的IGF-1的量大于向个体给药天然hFGF21时的循环的IGF-1的量。在某些实施方案中,当嵌合hFGF19多肽被给药到个体时,循环的IGF-1的量的减少小于给药天然hFGF21时的循环的IGF-1的量的减小。

[0065] 在另一方面中,本发明提供:新的分离的核酸分子,其具有编码本发明的嵌合FGF19多肽的序列;包含本发明的核酸分子的新的表达系统;以及含有本发明的核酸分子或本发明的表达系统的宿主细胞。

[0066] 在另一方面中,本发明包括能够特异性地结合本发明的嵌合FGF19多肽的抗体。

[0067] 在另一方面中,本发明提供药物组合物,其包含本发明的嵌合FGF19多肽和药用载体。

[0068] 在另一方面中,本发明提供通过给药本发明的嵌合FGF19多肽或其合适的药物制剂来治疗个体的代谢相关疾病的方法。在另一方面中,本发明提供在个体中实现以下作用中的至少一个或多个的方法:降低血糖、减少肥胖、增加代谢率、增加脂质氧化、减小体重、降低血清葡萄糖、瘦蛋白质、胰岛素、胆固醇和/或甘油三酯水平、治疗糖尿病以及其他代谢作用,其中这些作用是通过向个体给药治疗量的本发明的嵌合FGF19多肽或其药物制剂来实现的。

[0069] I. 具有N端FGF21多肽序列的嵌合FGF19多肽

[0070] 在本发明的一个方面中,嵌合FGF19多肽序列包含C端部分和N端部分。嵌合FGF19多肽序列的N端部分包括FGF21多肽序列的N端部分,而嵌合FGF19多肽序列的C端部分包括FGF19多肽序列的C端部分。在一些上述实施方案中,FGF19多肽序列的C端部分和嵌合FGF21多肽序列的N端部分连续地结合。在一些上述实施方案中,FGF19多肽序列的C端部分和嵌合FGF21多肽序列的N端部分通过使两个部分间共有的1个、2个、3个或多个残基重叠而连续地结合。在一些备选实施方案中,FGF19多肽序列的C端部分和嵌合FGF21多肽序列的N端部分具有1个、2个、3个、4个、5个或更多个氨基残基的插入间隔部分。

[0071] 在某些优选实施方案中,FGF19多肽是人FGF19(hFGF19)多肽,其序列在SEQ ID NO:1中得到限定(图1)。在一些实施方案中,hFGF19多肽序列的C端部分长度为约45至约185个残基,明显地包含显示在表1中的hFGF19C端部分的序列长度。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽序列的C端部分包括与hFGF19多肽序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的多肽序列的C端部分。在一些实施方案中,FGF19多肽是加工前的人FGF19(hFGF19)多肽,所述加工前的人FGF19(hFGF19)多肽包括它的信号序列并且其序列在SEQ ID NO:3中得到限定(图1)。

[0072] 在某些优选实施方案中,FGF21多肽是人FGF21(hFGF21)多肽,其序列在SEQ ID NO:2中得到限定(图2)。在一些实施方案中,hFGF21多肽序列的N端部分的长度为约7至约140个残基,明显地包含显示在表2中的hFGF19N端部分的序列长度。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽序列的N端部分包括与hFGF21多肽序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的多肽序列的N端部分。在一些实施方案中,FGF21多肽是加工前的人FGF21(hFGF21)多肽,所述加工前的人FGF21(hFGF21)多肽包括

它的信号序列并且其序列在SEQ ID NO:4中得到限定(图2)。

[0073] 如在本文中使用的,多肽序列的(如hFGF19或hFGF21多肽序列的)C端部分、N端部分、被取代部分或取代部分具有第一位置和最后位置。这些位置对应于该部分所涉及的多肽序列中的位置。因此,限定部分的序列是连续的氨基酸序列,其在对应于第一位置的多肽序列中的位置处或附近开始,并且在对应于最后位置的多肽序列中的位置处或附近结束。在一些实施方案中,多肽的C端部分的最后位置对应于或大致对应于多肽的最后一个残基。在一些实施方案中,多肽的N端部分的第一位置对应于或大致对应于多肽的第一个残基。

[0074] 本发明中涉及的hFGF19多肽序列的C端部分的实例包括但不限于具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:1的以下位置中的任一个的第一位置的那些:10、11、25、26、27、28、30、33、35、37、40、41、42、43、44、45、52、53、54、56、57、58、59、72、73、74、79、80、81、143、144、145或146。各个典型C端部分同样具有对应于或大致对应于SEQ IDNO:1的位置194的最后位置。表1显示hFGF19的典型的C端部分的多肽序列。在本文中同样考虑hFGF19的其他类似部分。

[0075] 表1:hFGF19多肽序列的典型C端部分

[0076]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19 -C10	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKA VALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYR SEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDF SSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	8
hFGF19 -C11	IVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAV ALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSE KHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSS PLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	9
hFGF19 -C25	LYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHSV YLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQR QLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVT GLEAVRSPSEK	10
hFGF19 -C26	YTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRY LCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQ LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPL ETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	11
hFGF19 -C27	TSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYL CMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQ LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPL ETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	12
hFGF19 -C28	SGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLC MGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQ LYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPL ETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	13
hFGF19 -C30	PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCM GADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYK NRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSEK	14
hFGF19 -C33	LSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGAD GKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRG FLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSP SEK	15

[0077]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19 -C35	SCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGK MQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLP LSHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE K	16
hFGF19 -C37	FLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKM QGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPL SHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE K	17
hFGF19 -C40	IRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGL LQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHF LPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	18
hFGF19 -C41	RADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLL QYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL PMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	19
hFGF19 -C42	ADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQ YSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLP MLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	20
hFGF19 -C43	DGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQY SEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPM LPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	21
hFGF19 -C44	GVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML PMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	22
hFGF19 -C45	VVDCARGQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSE EDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	23
hFGF19 -C52	QSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII IRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPED LRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	24
hFGF19 -C53	SAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIII RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDL RGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	25

[0078]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19 -C54	AHSLEIKAVALTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	26
hFGF19 -C56	SLLEIKAVALTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	27
hFGF19 -C57	LLEIKAVALTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	28
hFGF19 -C58	LEIKAVALTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	29
hFGF19 -C59	EIKAVALTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	30
hFGF19 -C72	GVHVSRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	31
hFGF19 -C73	VHVSRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	32
hFGF19 -C74	HSVRYLCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	33
hFGF19 -C79	LCMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	34
hFGF19 -C80	CMGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	35
hFGF19 -C81	MGADGKMQGGLQYSEEDCAFEERIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	36

[0079]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	LEAVRSPSFEK	
hFGF19 -C143	FLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	37
hFGF19 -C144	LPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	38
hFGF19 -C145	PMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	39
hFGF19 -C146	MLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	40

[0080] 本发明中涉及的hFGF21多肽序列的N端部分的实例包括但不限于具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:2的以下位置中的任一个的最后位置的那些:7、8、20、21、22、23、25、27、29、31、34、35、36、37、38、39、46、47、48、50、51、52、53、66、67、68、73、74、75、135、136、137和138。各个典型N端部分同样具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:2的位置1的第一位置。表2显示hFGF21的典型的N端部分列表。在本文中同样考虑hFGF21的其他类似部分。

[0081] 表2:hFGF21多肽序列的典型N端部分

[0082]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF21-N7	HPDPSS	41
hFGF21-N8	HPDPSSP	42
hFGF21-N20	HPDPSSPLLQFGGQVRQRY	43
hFGF21-N21	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYL	44
hFGF21-N22	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLY	45
hFGF21-N23	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYT	46
hFGF21-N25	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDD	47
hFGF21-N27	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ	48
hFGF21-N29	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT	49
hFGF21-N31	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEA	50
hFGF21-N34	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLE	51

[0083]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF21-N35	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEI	52
hFGF21-N36	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIR	53
hFGF21-N37	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE	54
hFGF21-N38	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRED	55
hFGF21-N39	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDG	56
hFGF21-N46	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAAD	57
hFGF21-N47	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQ	58
hFGF21-N48	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS	59
hFGF21-N50	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PE	60
hFGF21-N51	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PES	61
hFGF21-N52	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESL	62
hFGF21-N53	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLL	63
hFGF21-N66	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQIL	64
hFGF21-N67	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILG	65
hFGF21-N68	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGV	66
hFGF21-N73	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRF	67
hFGF21-N74	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFL	68
hFGF21-N75	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLC	69
hFGF21-N135	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSIHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPR	70

[0084]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF21-N136	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAAHLEIREDDGTGVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAALYGSLLHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARF	71
hFGF21-N137	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAAHLEIREDDGTGVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAALYGSLLHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFL	72
hFGF21-N138	HPDPSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAAHLEIREDDGTGVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAALYGSLLHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLP	73

[0085] 要理解本文中限定的多肽序列的C端、N端或任何其他部分在限定的第一或最后位置可以独立并任选地包括一至五个或更多个额外的或更少的残基。例如，在残基100处或附近具有第一位置的多肽的C端部分可以独立地，(i)任选地在位置100处的残基的N端包括1、2、3、4、5或更多个额外的残基，(ii)任选地在最后残基的C端包括1、2、3、4、5或更多个额外的残基，(iii)任选地在位置100处的残基的C端的1、2、3、4、5或更多个残基的位置处开始，或(iv)任选在最后残基的N端的1、2、3、4、5或更多个残基的位置处结束。如果存在，一个或多个额外的残基可以与在多肽中对应位置处的残基相同或不同。

[0086] 在本发明的嵌合FGF19多肽的一些实施方案中，它的序列的N端部分包括选自列表于表2中的hFGF21多肽序列的N端部分，而它的序列的C端部分包括选自列表于表1中的hFGF19多肽序列的C端部分。在一些实施方案中，所选择的hFGF21N端部分和所选择的hFGF19C端部分被相互独立地选择。在一些实施方案中，这样选择hFGF21N端序列部分和hFGF19C端序列部分以致N端序列部分的C末端和C端序列部分的N末端具有共有的至少1个、至少2个或至少3个或更多个残基。在一些实施方案中，嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列，其中FGF19多肽序列的C端部分和嵌合FGF21多肽序列的N端部分是连续的而其间没有插入的氨基酸。在一些上述实施方案中，嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列，其中FGF19多肽序列的C端部分和嵌合FGF21多肽序列的N端部分通过这两部分之间共有的1、2、3或更多个残基的重叠连续地连接。在一些备选实施方案中，嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列，其中包含FGF19多肽序列的C端部分和嵌合FGF21多肽序列的N端部分，并且还包含其间的1、2、3、4、5或更多个氨基残基的插入间隔部分。

[0087] 本发明的嵌合FGF19多肽的典型序列显示在表3中，其中它的N端部分包括hFGF21多肽序列的N端部分，而它的C端部分包括hFGF19多肽序列的C端部分。

[0088] 表3: 典型嵌合FGF19多肽序列

[0089]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
cFGF21/19-1	HPIPDSS PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSA HSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCA FEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPM LPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE K	74
cFGF21/19-2	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRY LYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIK GVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEK HRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLE SDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	5
cFGF21/19-3	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDD PHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHS VRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLP VSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDF SSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	75
cFGF21/19-4	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ LSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRY LCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSL	76

[0090]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	SSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	
cFGF21/19-5	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT SCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	77
cFGF21/19-6	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEA FLRIRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	78
cFGF21/19-7	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLE IRADGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	79
cFGF21/19-8	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE DGVVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	80
cFGF21/19-9	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAAD QSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSEK	81
cFGF21/19-10	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPE SLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPM	82

[0091]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	LPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	
cFGF21/19-11	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQIL GVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEK HRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	83
cFGF21/19-12	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRF LCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	84
cFGF21/19-13	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPR GPAR FLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK	85

[0092] II. 具有C端FGF21多肽序列的嵌合FGF19多肽

[0093] 在本发明的第二方面中,嵌合FGF19多肽序列包括C端部分和N端部分。嵌合FGF19多肽序列的N端部分包括FGF19多肽序列的N端部分而嵌合FGF19多肽序列的C端部分包括FGF21多肽序列的C端部分。在一些上述实施方案中,FGF21多肽序列的C端部分和嵌合FGF19多肽序列的N端部分连续地连接。在一些上述实施方案中,FGF21多肽序列的C端部分和嵌合FGF19多肽序列的N端部分通过两部分之间共有的1、2、3或更多个残基的重叠连续地连接。在一些备选实施方案中,FGF21多肽序列的C端部分和嵌合FGF19多肽序列的N端部分具有1、2、3、4、5或更多个氨基残基的插入间隔部分。

[0094] 在某些优选实施方案中,FGF19多肽是人FGF19(hFGF19)多肽,其序列在SEQ ID NO:1中得到限定。在一些实施方案中,hFGF19多肽序列的N端部分长度为约45至约175个残基,明显地包含显示在表4中的hFGF19N端部分的序列长度。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽序列的N端部分与hFGF19多肽序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的多肽序列的N端部分。

[0095] 在某些优选实施方案中,FGF21多肽是人FGF21(hFGF21)多肽,其序列在SEQ ID NO:2中得到限定。在一些实施方案中,hFGF21多肽序列的C端部分的长度为约8至约145个残基,明显地包含显示在表5中的hFGF19C端部分的序列长度。在一些实施方案中,嵌合FGF21多肽序列的C端部分包括与hFGF21多肽序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的多肽序列的C端部分。

[0096] 本发明中涉及的hFGF19多肽序列的N端部分的实例包括但不限于具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:1的以下位置中的任一个的最后位置的那些:9、10、24、25、26、27、39、40、41、42、43、44、51、52、53、55、56、57、58、71、72、73、78、79、80、142、143、144和145。各个典型N端部分同样具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:1的位置1的最后位置。表4显示hFGF19的典型的N端部分的多肽序列。在本文中同样考虑hFGF19的其他类似部分。

[0097] 表4:hFGF19多肽序列的典型N端部分

[0098]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19 -N9	RPLAFSDAG	86
hFGF19 -N10	RPLAFSDAGP	87
hFGF19 -N24	RPLAFSDAGPHIVHYGWGDPIRLRH	88
hFGF19 -N25	RPLAFSDAGPHIVHYGWGDPIRLRHL	89

[0099]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19 -N26	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLY	90
hFGF19 -N27	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYT	91
hFGF19 -N39	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFR	92
hFGF19 -N40	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRI	93
hFGF19 -N41	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIK	94
hFGF19 -N42	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRA	95
hFGF19 -N43	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRAD	96
hFGF19 -N44	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADG	97
hFGF19 -N51	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARG	98
hFGF19 -N52	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARGQ	99
hFGF19 -N53	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARGQ S	100
hFGF19 -N55	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARGQ SAH	101
hFGF19 -N56	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARGQ SAHS	102
hFGF19 -N57	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARGQ SAHSL	103
hFGF19 -N58	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARGQ SAHSLI	104
hFGF19 -N71	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVLRITVAIK	105

[0100]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19 -N72	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKG	106
hFGF19 -N73	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGV	107
hFGF19 -N78	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRY	108
hFGF19 -N79	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYL	109
hFGF19 -N80	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLC	110
hFGF19 -N142	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEET RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSH	111
hFGF19 -N143	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEET RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHF	112
hFGF19 -N144	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEET RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL	113
hFGF19 -N145	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEET RPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLP	114

[0101] 本发明中参考的hFGF21多肽序列的C端部分的实例包括但不限于具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:2的以下位置中的任一个的最后位置的那些:8、9、21、22、23、24、35、36、37、38、39、40、47、48、49、51、52、53、54、67、68、69、146、147、148和149。各个典型C端部分同样具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:2的位置181的最后位置。表5显示hFGF21的典型C端部分的列表。在本文中同样考虑hFGF21的其他类似部分。

[0102] 表5:hFGF21多肽序列的典型C端部分

[0103]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF21-C8	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL LEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPA LPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGPSQGRSPSYAS	115
hFGF21-C9	LLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLL QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLL EDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAL PEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGPSQGRSPSYAS	116
hFGF21-C21	LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL GVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH GLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	117
hFGF21-C22	YTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG VKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHG LPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV SSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	118
hFGF21-C23	TDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGV KTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGL PLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGPSQGRSPSYAS	119
hFGF21-C24	DDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVK TSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLP LHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS DPLSMVGPSQGRSPSYAS	120
hFGF21-C35	IREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRD PAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGPSQGR SPSYAS	121
hFGF21-C36	REDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRD PAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGS SDPLSMVGPSQGR SPSYAS	122

[0104]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF21-C37	EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY YGS LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP APRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRS PSYAS	123
hFGF21-C38	DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA PRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSP SYAS	124
hFGF21-C39	GTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAP RGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPS YAS	125
hFGF21-C40	TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSY AS	126
hFGF21-C47	QSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEAC SFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	127
hFGF21-C48	SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACS FRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	128
hFGF21-C49	PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSF RELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPG LPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	129
hFGF21-C51	SLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP PALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	130
hFGF21-C52	LLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSFREL LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPP ALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	131
hFGF21-C53	LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSFRELL	132

[0105]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	LEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	
hFGF21-C54	QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	133
hFGF21-C67	GVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	134
hFGF21-C68	VKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	135
hFGF21-C69	KTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	136
hFGF21-C74	LCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	137
hFGF21-C75	CQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	138
hFGF21-C76	QRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	139
hFGF21-C146	FLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	140
hFGF21-C147	LPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	141
hFGF21-C148	PLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	142
hFGF21-C149	LPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	143

[0106] 在本发明的嵌合FGF19多肽的一些实施方案中,它的序列的N端部分包括选自列表于表4中的hFGF19多肽序列部分的序列,而它的序列的C端部分包括选自列表于表5中的hFGF21多肽序列部分中的序列。在一些实施方案中,所选择的hFGF19N端部分和所选择的hFGF21C端部分被相互独立地选择。在一些实施方案中,这样选择hFGF19N端序列部分和hFGF21C端序列部分以致N端序列部分的C末端和C端序列部分的N末端具有共有的至少1个、至少2个或至少3个或更多个残基。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列,其中FGF19多肽序列的N端部分和嵌合FGF21多肽序列的C端部分是连续的而其间没有插入的氨基酸。在一些上述实施方案中,嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列,其中FGF19多肽序列的N端部分和嵌合FGF21多肽序列的C端部分通过这两部分之间共有的1、2、3或更多

个残基的重叠连续地连接。在一些备选实施方案中,嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列,其中包含FGF19多肽序列的N端部分和嵌合FGF21多肽序列的C端部分,并且还包含其间的1、2、3、4、5或更多个氨基残基的插入间隔部分。

[0107] 本发明的嵌合FGF19多肽的典型序列显示在表6中,其中它的N端部分包括hFGF19多肽序列的N端部分,而它的C端部分包括hFGF21多肽序列的C端部分。

[0108] 表6:典型嵌合FGF19多肽序列

[0109]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
cFGF19/21-1	RPLAFSDAG PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESL LQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPA LPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	144
cFGF19/21-2	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRH LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQIL GVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	145
cFGF19/21-3	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFR IREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGA LYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRD	146

[0110]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	PAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGR SPSYAS	
cFGF19/21-4	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRA DGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALY GSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPA PRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSP SYAS	147
cFGF19/21-5	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARG QSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEAC SFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	148
cFGF19/21-6	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQSAH SLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP PALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	149
cFGF19/21-7	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIK GVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAH GLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDV GSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	150
cFGF19/21-8	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRY LCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS MVGPSQGRSPSYAS	151
cFGF19/21-9	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGK MQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQR QLYKNRGFLPLSH FLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	152

[0111]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
cFGF19/21-10 (显示在图 18B 中的构建体 8)	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGK MQGLLOYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQR QLYKNRGFLPLSHFLP LPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	271
cFGF19/21-11 (显示在图 18B 中的构建体 9)	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQSAHSLLEIKAVALRTVAIKGV KTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPP DVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	272
cFGF19/21-12 (显示在图 18B 中的构建体 10)	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQSAHSL QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL EDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAL PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	273
cFGF19/21-13 (显示在图 18B 中的构建体 11)	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG VVDCARGQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSF RELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPG LPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	274
cFGF19/21-14 (显示在图 18B 中的构建体 12)	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG TVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPR GPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPL SMVGPSQGRSPSYAS	275
cFGF19/21-15 (显示在图 18B 中的构建体 13)	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIR EDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAL YGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDP APRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRS PSYAS	276
cFGF19/21-16 (显示在图 18B 中的构建体 14)	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYT DDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVK TSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVY QSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAP QPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	277
cFGF19/21-17 (显示在图 18B 中的构建体 15)	RPLAFSDAGP LLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLL QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELL EDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAL PEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	278

[0112] III. 具有取代FGF21多肽序列的嵌合FGF19多肽

[0113] 在本发明的第三方面中,嵌合FGF19多肽序列包括第一多肽序列,其中第一多肽序列的一部分被第二多肽序列的一部分取代。在优选实施方案中,第一多肽是人FGF19(hFGF19)多肽,其序列在SEQ ID NO:1中得到限定。在一些实施方案中,第一多肽序列是与

hFGF19多肽序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的多肽序列。

[0114] 在某些优选实施方案中,第二多肽是人FGF21(hFGF21)多肽,其序列在SEQ ID NO: 2中得到限定。在一些实施方案中,FGF21多肽序列是与hFGF21多肽序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%氨基酸序列同一性的多肽序列。

[0115] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽的序列包括hFGF19多肽序列,其中要被取代的部分来自这样的组,所述组包括但不限于下述部分,所述部分(i)具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:1中的以下位置中任一个的第一位置:1、10、11、17、18、21、22、25、26、27、28、40、41、42、43、44、45、52、53、54、56、57、58、59、63、72、73、74、79、80、81、143、144、145和146,以及(ii)具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:1中的以下位置中任一个的最后位置:9、10、24、25、26、27、29、31、32、34、36、39、40、41、42、43、44、51、52、53、55、56、57、58、66、71、72、73、78、79、80、142、143、144、145和194,以致最后位置在所述第一位置的C端并且该位置被独立地选择。表7显示要被hFGF21多肽序列的一部分取代的hFGF19多肽序列的典型部分的列表。

[0116] 表7:hFGF19多肽序列的典型被取代部分

[0117]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19-S10-27	PHVHYGWGDPIRLRHLYT	153
hFGF19-S10-29	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSG	154
hFGF19-S10-31	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPH	155
hFGF19-S10-32	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHG	156

[0118]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF19-S10-34	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLS	157
hFGF19-S10-36	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSC	158
hFGF19-S10-41	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIR	159
hFGF19-S10-44	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG	160
hFGF19-S10-52	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQS	161
hFGF19-S10-58	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSL	162
hFGF19-S10-73	PHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSL LEIKAVLRITVAIKGV	163
hFGF19-S17-27	GDPIRLRHLYT	164
hFGF19-S17-29	GDPIRLRHLYTSG	165
hFGF19-S17-31	GDPIRLRHLYTSGPH	166
hFGF19-S17-32	GDPIRLRHLYTSGPHG	167
hFGF19-S17-34	GDPIRLRHLYTSGPHGLS	168
hFGF19-S17-36	GDPIRLRHLYTSGPHGLSSC	169
hFGF19-S21-27	RLRHLYT	170
hFGF19-S21-29	RLRHLYTSG	171
hFGF19-S21-	RLRHLYTSGPH	172

[0119]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
31		
hFGF19-S21-32	RLRHLYTSGPHG	173
hFGF19-S21-34	RLRHLYTSGPHGLS	174
hFGF19-S21-36	RLRHLYTSGPHGLSSC	175
hFGF19-S25-41	LYTSGPHGLSSCFLRIR	176
hFGF19-S25-44	LYTSGPHGLSSCFLRIRADG	177
hFGF19-S25-52	LYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQS	178
hFGF19-S25-58	LYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLL	179
hFGF19-S25-73	LYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGV	180
hFGF19-S63-66	VALR	181

[0120] hFGF19多肽序列的被取代部分被hFGF21多肽序列的一部分取代。hFGF21多肽序列的典型取代部分包括但不限于下述部分，所述部分(i)具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:2中的以下位置中任一个的第一位置:1、8、9、13、14、17、18、21、22、23、24、35、36、37、38、39、40、47、48、49、51、52、53、54、58、67、68、69、74、75、76、136、137、138和139,以及(ii)具有对应于或大致对应于SEQ ID NO:2中的以下位置中任一个的最后位置:7、8、20、21、22、23、24、25、27、29、31、34、35、36、37、38、39、46、47、48、50、51、52、53、61、66、67、68、73、74、75、135、136、137、138和181,以致最后位置在第一位置的C端并且该位置被独立地选择。表8显示要被hFGF19多肽序列的一部分的一部分取代的hFGF21多肽序列的典型部分的列表。

[0121] 表8:来自hFGF21多肽序列的典型取代部分

[0122]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
hFGF21-S8-23	PLLQFGGQVRQRYLYT	182
hFGF21-S8-25	PLLQFGGQVRQRYLYTDD	183
hFGF21-S8-27	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ	184
hFGF21-S8-29	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQT	185
hFGF21-S8-31	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTTEA	186
hFGF21-S8-36	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTTEAHLEIR	187
hFGF21-S8-39	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTTEAHLEIREDDG	188
hFGF21-S8-48	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTTEAHLEIREDDGTVGGAADQS	189
hFGF21-S8-53	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLL	190
hFGF21-S8-68	PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQL KALKPGV	191
hFGF21-S13- 23	GGQVRQRYLYT	192
hFGF21-S13- 25	GGQVRQRYLYTDD	193
hFGF21-S13- 27	GGQVRQRYLYTDDAQ	194
hFGF21-S13- 29	GGQVRQRYLYTDDAQQT	195
hFGF21-S13- 31	GGQVRQRYLYTDDAQQTTEA	196
hFGF21-S17- 23	RQRYLYT	197
hFGF21-S17- 25	RQRYLYTDD	198
hFGF21-S17- 27	RQRYLYTDDAQ	199
hFGF21-S17- 29	RQRYLYTDDAQQT	200
hFGF21-S17-	RQRYLYTDDAQQTTEA	201

[0123]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
31		
hFGF21-S21-36	LYTDDAQQTEAHLEIR	202
hFGF21-S21-39	LYTDDAQQTEAHLEIREDG	203
hFGF21-S21-48	LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS	204
hFGF21-S21-53	LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLL	205
hFGF21-S21-68	LYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGV	206
hFGF21-S58-62	LKPG	207

[0124] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽包含hFGF19的多肽序列,其中所述hFGF19的一部分序列(如选自列于表7中的hFGF19多肽序列部分的序列)被hFGF21多肽序列的一部分(如列于表8中的序列部分)取代。在一些实施方案中,所选择的hFGF19N端部分和所选择的hFGF21C端部分被相互独立地选择。在一些实施方案中,要被取代的hFGF19部分包括hFGF19多肽的N端残基。在一些实施方案中,要被取代的hFGF19部分包括hFGF19多肽的C端残基。在一些实施方案中,取代的hFGF21部分包括hFGF21多肽的N端残基。在一些实施方案中,取代的hFGF21部分包括hFGF21多肽的C端残基。在一些实施方案中,要被取代的hFGF19部分包括hFGF19多肽的N端残基,而取代的hFGF21部分也包括hFGF21多肽的N端残基。在一些实施方案中,要被取代的hFGF19部分包括hFGF19多肽的C端残基,而取代的hFGF21部分也包括hFGF21多肽的C端残基。

[0125] 在一些实施方案中,这样选择hFGF19序列部分和hFGF21序列部分以致它们各自的对应端部(例如,hFGF19部分的N末端和hFGF21部分的N末端,hFGF19部分的C末端和hFGF21部分的C末端,或两者)中的至少一个在所述对应的末端具有共有的至少1个、至少2个或至少3个或更多个残基。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列,其中hFGF21多肽序列的取代部分通过两个部分间共有的1、2、3或更多个残基与剩余的hFGF19多肽序列相连。

[0126] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列,其中在hFGF19多肽序列中取代有hFGF21多肽序列的一部分以致hFGF19和hFGF21多肽序列是连续的并且其间没有额外的插入氨基酸。在一些备选实施方案中,嵌合FGF19多肽的序列包括这样的序列,其中在hFGF19多肽序列中取代有hFGF21多肽序列的一部分以致嵌合FGF19多肽序列在hFGF19和hFGF21序列之间还包括其间的1、2、3、4、5或更多个氨基残基的插入间隔部分。

[0127] 本发明的嵌合FGF19多肽的典型序列显示在表9中,其中部分的hFGF19被部分的

hFGF21取代。

[0128] 表9:典型的嵌合FGF19多肽序列

[0129]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
cFGF19/21/19- 1	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCA RGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPL HFLLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR SPSFEK	208
cFGF19/21/19- 2	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDPHGLSSCFLRIRADGVVDC ARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQY SEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPL SHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAV RSPSFEK	209
cFGF19/21/19- 3	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQGLSSCFLRIRADGVVDC ARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQY SEEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPL SHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAV	210

[0130]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	RSPSFEK	
cFGF19/21/19- 4	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQLSSCFLRIRADGVVDCA RGQSAHSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLS HFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR SPSFEK	211
cFGF19/21/19- 5	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTSCFLRIRADGVVDCA RGQSAHSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLS HFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR SPSFEK	212
cFGF19/21/19- 6	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAFLRIRADGVVDCA RGQSAHSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLS HFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR SPSFEK	213
cFGF19/21/19- 7	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRADGVVDCA RGQSAHSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLS HFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR SPSFEK	214
cFGF19/21/19- 8	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGVVDCA RGQSAHSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLS HFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR SPSFEK	215
cFGF19/21/19- 9	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA ADQSAHSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYS EEDCAFEIIIIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLS HFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVR SPSFEK	216

[0131]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
cFGF19/21/19- 10	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA ADQSPESLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSH FLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRS PSFEK	217
cFGF19/21/19- 11	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGA ADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVHVSRYLCMGADGKMQLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSH FLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRS PSFEK	218
cFGF19/21/19- 12	RPLAFSDAGPHVHYGWGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVV DCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE AVRSPSFEK	219
cFGF19/21/19- 13	RPLAFSDAGPHVHYGWGGQVRQRYLYTDDPHGLSSCFLRIRADGVV DCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE AVRSPSFEK	220
cFGF19/21/19- 14	RPLAFSDAGPHVHYGWGGQVRQRYLYTDDAQGLSSCFLRIRADGV VDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE EAVRSPSFEK	221
cFGF19/21/19- 15	RPLAFSDAGPHVHYGWGGQVRQRYLYTDDAQLSSCFLRIRADGVV DCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE AVRSPSFEK	222
cFGF19/21/19-	RPLAFSDAGPHVHYGWGGQVRQRYLYTDDAQQTSCFLRIRADGVV	223

[0132]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
16	DCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLL QYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE AVRSPSEK	
cFGF19/21/19- 17	RPLAFSDAGPHVHYGWGGQVRQRYLYTDDAQQTAEFLRIRADGVV DCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLL QYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE AVRSPSEK	224
cFGF19/21/19- 18	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPQRQRYLYTSGPHGLSSCFLLRIRADGVVD CARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLP LSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSEK	225
cFGF19/21/19- 19	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPQRQRYLYTDDPHGLSSCFLLRIRADGVV DCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLL QYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE AVRSPSEK	226
cFGF19/21/19- 20	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPQRQRYLYTDDAQLSSCFLLRIRADGVV DCARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLL QYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFL PLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLE AVRSPSEK	227
cFGF19/21/19- 21	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPQRQRYLYTDDAQLSSCFLLRIRADGVVD CARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLP LSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSEK	228
cFGF19/21/19- 22	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPQRQRYLYTDDAQTSCFLRIRADGVVD CARGQSAHSLLEIKAVALLRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQLLQ	229

[0133]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLP LSHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSFEK	
cFGF19/21/19- 23	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRQRYLYTDDAQQTEAFLRIRADGVVD CARGQSAHSLSLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLP LSHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSFEK	230
cFGF19/21/19- 24	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTDDAQQTEAHLEIRADGVVD CARGQSAHSLSLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLP LSHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSFEK	231
cFGF19/21/19- 25	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTDDAQQTEAHLEIREDGVD CARGQSAHSLSLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLP LSHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSFEK	232
cFGF19/21/19- 26	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTDDAQQTEAHLEIREDGTVG GAADQSAHSLSLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLP LSHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSFEK	233
cFGF19/21/19- 27	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTDDAQQTEAHLEIREDGTVG GAADQSPESLLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLP LSHFPLMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSFEK	234
cFGF19/21/19- 28	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLTYTDDAQQTEAHLEIREDGTVG GAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQY SEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPL	235

[0134]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	SHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAV RSPSFEEK	
cFGF19/21/19-29	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVD CARGQSAHSLLEIKALKPGTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQ YSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLP LSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEA VRSPSFEEK	236

[0135] 在任何嵌合hFGF19的一些实施方案中,嵌合hFGF19多肽包括第一多肽序列,所述第一多肽序列与hFGF19多肽的序列具有至少一定的序列同一性,并且其中所述第一多肽序列的一部分被第二多肽序列的多于一个部分取代,所述第二多肽序列与hFGF21多肽的序列具有至少一定的序列同一性。在一些实施方案中,嵌合hFGF19多肽还包含用第二多肽的β1-β2环,第二多肽的β10-β12区段,和/或第二多肽的对应序列GQV对第一多肽的β1-β2环的取代,对第一多肽的β10-β12区段的取代,和/或对第一多肽的五个残基WGDPI(SEQ ID NO:287)的取代。在一些实施方案中,嵌合hFGF19多肽还包含用FGF21的β1-β2环(FGF21的氨基酸残基51-57(DDAQQTE(SEQ ID NO:289))对FGF19的β1-β2环(FGF19的氨基酸残基50-57(SGPHGLSS(SEQ ID NO:288))的取代。在一些实施方案中,嵌合hFGF19多肽还包含用FGF21的β10-β12区段(FGF21的氨基酸残基147-161(PGNKSPHRDPAPRGP(SEQ ID NO:291))对FGF19的β10-β12区段(FGF19的氨基酸残基146-162(SSAKQRQLYKNRGFLPL(SEQ ID NO:290))的取代。在一些实施方案中,嵌合hFGF19多肽还包含FGF21的氨基酸残基41-43(GQV)对FGF19的氨基酸残基38-42(WGDPI(SEQ ID NO:287))的取代。

[0136] 本发明的嵌合FGF19多肽,并且尤其是其药物活性组合物以及将所述嵌合FGF19多肽用于本文中列出或所述的或在本领域中已知的一种或多种疾病、病症等的治疗性治疗的方法,相对使用天然FGF19(例如,hFGF19)或天然FGF21(例如,hFGF21)具有一定的优势。

[0137] 在一些实施方案中,相比其天然亲本FGF中的一个或两个,嵌合FGF19多肽可以具有较低的免疫原性。天然FGF19和/或FGF21(如hFGF19或hFGF21)可以以多于一种的等位变化存在于种群中,其中在等位形式间至少存在一个不同的氨基酸残基。例如,已知成熟形式的hFGF21在位置146处具有多态性,其中在不同等位基因中此残基可以是亮氨酸(如在图2和SEQ ID NO:2中的)或脯氨酸。这种多态性可能限制天然hFGF21作为治疗组合物的有效性。例如,向个体给药FGF19多肽(其中个体的内源FGF19与被给药的FGF19具有不同的序列)可能导致个体对所给hFGF21的免疫响应。因此,在一些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽可以包括部分的hFGF21多肽序列和hFGF19多肽序列的一部分,其中两个部分只包括各自多肽序列的不具有多态性的部分。这可以通过例如以下方式实现:用一个FGF多肽的类似的、不具有多态性的部分取代另一个FGF的具有多态性的序列部分。例如,本发明的嵌合FGF19多肽,如包含部分的hFGF21但不包含位置146的cFGF21/19-2(参见表3)在此位置缺乏多态性。以此方式,本发明的嵌合FGF19多肽可以有利地具有较低的免疫原性,并且因此可

以有利地适用于在大范围的个体中给药。

[0138] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以比其对应的天然FGF中的一个或两个具有更低的致癌性。特别,嵌合FGF19多肽比天然hFGF19具有更低的致癌性。如上所述,天然hFGF19经由其与FGFR4的结合显示潜在的致癌活性。此致癌活性显示出可与hFGF19的代谢作用分离,如同hFGF21,此代谢作用通过依赖Klotho-beta的与FGFR1c、FGFR2c和/或FGFR3c的结合而实现。在一些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽包括hFGF19多肽序列的一部分,所述hFGF19多肽序列的一部分不包括FGFR4效应子基序,而是被来自hFGF21的相应序列所取代。在一些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽基本不再结合和/或基本激活FGFR4。在一些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽基本不再以不依赖Klotho-beta的方式结合和/或激活受体,如FGFR4。以此方式,本发明的嵌合FGF19多肽可以有利地具有较低的致癌性,并且因此可以有利地更适用于在大范围的个体中给药。

[0139] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以基本不影响生长激素(GH)抵抗,或者显示比其对应的天然FGF中的一个或两个基本上更低的GH抵抗活性。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以比天然FGF21(如天然hFGF21)具有更低的GH抵抗活性。GH通常具有受到胰岛素样生长因子1(IGF-1)介导的生长和代谢作用。GH与其受体的结合导致詹纳斯激酶2(JAK2)的激活,然后所述詹纳斯激酶2使STAT5蛋白质磷酸化。磷酸化的STAT5被转运到核并且与促进IGF-1表达的基因调节响应元件结合。

[0140] 可以在个体中通过增加FGF21的水平来减弱GH的作用,或者可以通过延长饥饿或禁食(也使FGF21水平增加)来减弱GH的作用。在个体中GH抵抗的作用包括节约能量、增加麻痹、降低体温、减少物理活动、抑制生长、瘦体重减轻和诱导酮体合成。天然hFGF21通过例如降低通常受GH诱导的IGF-1的水平来影响GH抵抗。不受限于理论,此hFGF21的GH抵抗活性可以通过其具有的以下能力来介导:使磷酸化的STAT5多肽的量减少,并且从而减少磷酸化的STAT5到核的转运并且因此减少IGF-1的表达,由此抵抗GH的作用。

[0141] 在一些实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽不使或基本不使磷酸化的STAT5多肽的量减少。以此方式,本发明的嵌合FGF19多肽可以显示较少的GH抵抗活性或基本上不显示GH抵抗活性,并且因此可以有利地更适用于在大范围的个体中给药。

[0142] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽基本不促进细胞不依赖贴壁的生长。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以基本不促进细胞在需要不依赖贴壁的生长的环境中的增加的代谢活性和/或增殖。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以在低于相应的天然FGF19对不依赖贴壁的生长的促进的程度促进细胞不依赖贴壁的生长。在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以在低于天然FGF19的相应作用的程度促进细胞在需要不依赖贴壁的生长的环境中的增加的代谢活性和/或增殖。因为不依赖贴壁的生长是转化细胞的限定特征之一,所以不促进细胞不依赖贴壁的生长或基本不促进细胞在需要不依赖贴壁的生长的环境中的增加的代谢活性和/或增殖的本发明的这种嵌合FGF19多肽较不可能差别地促进或增加转化细胞的生长和/或代谢活性,并且因此可以有利地更适用于在大范围的个体中给药。

[0143] IV. 定义

[0144] 当在本文中使用时,术语“FGF19多肽”、“FGF19蛋白质”和“FGF19”包括具有与成纤维细胞生长因子19家族成员的天然序列相同的氨基酸序列的多肽。此家族成员包括如由SEQ ID NO:1和在图1中提供的人FGF19(hFGF19)的194个氨基酸的序列。FGF19多肽可以从

自然中分离或者可以通过重组和/或合成方法制备。FGF19多肽特别地包括FGF19的天然存在的截短或分泌形式、天然存在的变体形式(例如,可变剪接形式)和天然存在的等位变体。FGF19多肽还特别地包括FGF19的未加工的和加工的两种形式如,例如,如由SEQ ID NO:3和在图1中提供的人FGF19多肽前体的216个氨基酸的序列。

[0145] 当在本文中使用时,术语“FGF21多肽”、“FGF21蛋白质”和“FGF21”包括具有与成纤维细胞生长因子21家族成员的天然序列相同的氨基酸序列的多肽。此家族成员包括如由SEQ ID NO:2和在图2中提供的人FGF21(hFGF21)的181个氨基酸的序列。FGF21多肽可以从自然中分离或者可以通过重组和/或合成方法制备。FGF21多肽特别地包括FGF21的天然存在的截短或分泌形式、天然存在的变体形式(例如,可变剪接形式)和天然存在的等位变体。FGF21多肽还特别地包括FGF21的未加工的和加工的两种形式如,例如,如由SEQ ID NO:4和在图2中提供的人FGF21多肽前体的209个氨基酸的序列。

[0146] 当在本文中使用时,术语“FGF多肽”和“FGF蛋白质”包括具有FGF家族成员的天然序列的多肽,如人FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23和它们的哺乳动物同系物。指定FGF多肽的天然序列可以从自然中分离或者可以通过重组和/或合成方法制备。指定FGF多肽的天然序列特别地包括FGF的天然存在的天然存在的截短或分泌形式、天然存在的变体形式(例如,可变剪接形式)、天然存在的其等位变体以及未加工的和加工的两种形式。

[0147] 当在本文中使用时,术语“嵌合多肽”和“嵌合蛋白质”包括具有这样序列的多肽,所述序列包含第一多肽序列的全长序列的至少一部分和第二多肽序列的全长序列的至少一部分,其中所述第一和第二多肽是不同的多肽。嵌合多肽还包括这样的多肽,所述多肽包含来源于相同多肽的两个或更多个非连续部分。嵌合多肽还包括具有至少一个取代的多肽,其中所述嵌合多肽包括第一多肽序列,在所述第一多肽序列中所述第一多肽序列的一部分已经被第二多肽序列的一部分取代。

[0148] 当在本文中使用时,相对于指定的多肽序列,术语“一部分”是指短于指定的多肽的全长序列的一段连续长度的指定多肽的序列。指定多肽的一部分可以通过它的第一位置和它的最后位置得到限定,其中所述第一和最后位置各自对应于指定多肽的序列中的位置,其中对应于第一位置的序列位置位于对应于最后位置的序列位置的N端,并且由此该部分的序列是指定多肽中的连续的氨基酸序列,其在对应于第一位置的序列位置开始并且在对应该于最后位置的序列位置结束。也可以通过参照指定多肽序列中的位置和相对于参照位置的残基长度来限定一部分,由此该部分的序列是指定多肽中的连续的氨基酸序列,其具有限定的长度并且根据限定的位置定位在指定多肽中。

[0149] 术语指定多肽序列的“N端部分”是在指定多肽序列的N端残基处或附近开始的一段连续长度的指定多肽序列。指定多肽的N端部分可以通过长度来得到限定。类似地,术语指定多肽序列的“C端部分”是在指定多肽序列的C端残基处或附近结束的一段连续长度的指定多肽序列。指定多肽的C端部分可以通过长度来得到限定。

[0150] 当在本文中使用时,术语“嵌合FGF多肽”和“嵌合FGF蛋白质”包括具有这样序列的多肽,所述序列至少包含第一FGF多肽序列的一部分和第二FGF多肽序列的一部分,其中所述第一和第二FGF多肽是彼此不同的。嵌合FGF多肽还包括这样的多肽,所述多肽包含来源

于相同FGF多肽的两个或更多个非连续部分。嵌合FGF多肽还包括具有至少一个取代的多肽,其中所述嵌合FGF多肽包括第一FGF多肽序列,在所述第一FGF多肽序列中所述第一FGF多肽序列的一部分已经被第二FGF多肽序列的一部分取代。

[0151] 当在本文中使用时,术语“嵌合FGF19多肽”和“嵌合FGF19蛋白质”包括具有这样序列的嵌合FGF多肽,所述序列至少包含FGF19多肽序列的一部分和第二多肽序列的一部分。例如,嵌合FGF19多肽包括其中第二多肽序列是FGF21多肽序列的多肽。

[0152] 嵌合FGF19多肽还包括这样的多肽,所述多肽包含来源于一个FGF19多肽序列的两个或更多个不连续部分。嵌合FGF19多肽还包括具有至少一个取代的多肽,其中嵌合FGF19多肽序列包括FGF19多肽序列,在所述FGF19多肽序列中FGF19多肽序列的一部分已经被第二多肽序列的一部分取代。在这种情况下,嵌合FGF19多肽明显包括其中取代部分是FGF21多肽序列的一部分的多肽。

[0153] 嵌合FGF19多肽还包括这样的多肽,所述多肽的序列仅由来源于FGF19多肽序列或第二多肽序列(如FGF21多肽序列)的部分组成。除非另外说明,嵌合FGF19多肽不限于也不暗示FGF19多肽序列相对于嵌合FGF19多肽序列内的任何其他序列部分的相应次序或位置。

[0154] 关于在本文中鉴别的指定多肽序列,“百分比(%)氨基酸序列同一性”被定义为:在进行序列比对并在必要时导入空隙以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参比序列中的氨基酸残基相同的百分数。可使用本领域技术内的各种方法来完成为确定百分比氨基酸序列同一性而进行的比对,例如,使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。

[0155] 在本文中,指定氨基酸序列A相对于(to)、与(with)、或针对(against)指定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者说:指定氨基酸序列A具有或含有相对于、与或针对指定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性)如下计算:分数 X/Y 乘以100,其中X是通过指定序列比对程序在该程序的A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,而Y是B中的氨基酸残基总数。可以理解,当氨基酸序列A与氨基酸序列B的长度不相等时,A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。

[0156] 关于在本文中鉴别的编码多肽的核酸序列,“百分比(%)核酸序列同一性”被定义为:在进行序列比对并在必要时导入空隙以获取最大百分比序列同一性之后,候选序列中的核苷酸与编码多肽的核酸序列中的核苷酸相同的百分数。可使用本领域技术内的各种方法来完成为确定百分比核酸序列同一性而进行的比对,例如,使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。

[0157] 在本文中,指定核酸序列C相对于(to)、与(with)、或针对(against)指定核酸序列D的%核酸序列同一性(或者说:指定核酸序列C具有或含有相对于、与或针对指定核酸序列D的某一%核酸序列同一性)如下计算:分数 W/Z 乘以100,其中W是通过指定序列比对程序在该程序的C和D的比对中评分为相同匹配的核苷酸数,而Z是D中的核苷酸总数。可以理解,当核酸序列C的长度与核酸序列D的长度不相等时,C相对于D的%核酸序列同一性将不等于D相对于C的%核酸序列同一性。

[0158] 当用于描述在本文中公开的多种多肽时,“分离的”是指已经鉴定且从其自然环境的成分中分开和/或回收的多肽。优选地,使分离的多肽免于与它自然缔合的所有成分相缔合。其天然环境的污染性成分指典型地会干扰该多肽的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将该多肽纯化至(1)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N端或内部氨基酸序列的程度,或(2)根据使用考马斯蓝(或优选银染)的非还原性或还原性条件下的SDS-PAGE达到同质。由于多肽天然环境的至少一种成分不会存在,因此分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽。然而,分离的多肽通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0159] 编码多肽的“分离的”核酸分子是这样的核酸分子,其从至少一种在编码多肽的核酸的天然源中通常与其缔合的污染物核酸分子中鉴定和分离。优选地,使分离的核酸免于与它自然缔合的所有成分相缔合。分离的编码多肽的核酸分子不是以其在自然中被发现的形式或设置。因此,分离的核酸分子不同于当其存在于天然细胞中时的编码多肽的核酸分子。然而,分离的编码多肽的核酸分子包括在通常表达多肽的细胞中含有的编码多肽的核酸分子,例如其中核酸分子位于不同于天然细胞的染色体位置。

[0160] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列和核糖体结合位点。已知真核细胞能利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

[0161] 当核酸与另一核酸序列处于功能性关系中时,该核酸是“可操作连接”的。例如,若前序列或分泌前导序列的DNA表达成参与多肽分泌的前蛋白,则它与该多肽的DNA可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。通常,“可操作连接”指相连的DNA序列是相邻的,而且在分泌前导序列的情况中指相邻且处于阅读框中。然而,增强子不必相邻。连接可通过在方便的限制性位点处的连接来实现。如果没有此类位点,那么可依照常规实践使用合成的寡核苷酸接头或接头。

[0162] 术语“抗体”以最广义使用并且具体地覆盖,例如,单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂和中和抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、单链抗体和抗体片段(参见以下)。如在本文中使用的,术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体,即除了可以少量存在的可能的天然存在的突变外,构成群体的各个抗体是相同的。

[0163] 关于多肽、抗体、寡肽或其他有机分子与目标分子或同源受体的结合,术语“特异性结合”或“特异性结合至”或“特异于”特定多肽或特定多肽靶标上的表位或同源受体指可测量出不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可通过例如确定与对照分子的结合相比的分子的结合来测量,所述对照分子通常是具有没有结合活性的相似结构的分子。例如,特异性结合可通过和与靶标相似的对照分子的竞争来测定,例如与过量的未标记靶标竞争。在这种情况下,若经标记靶标与探针的结合受到过量未标记靶标的竞争性抑制,则指示特异性结合。当在本文中使用时,术语“特异性结合”或“特异性结合至”或“特异于”特定多肽或特定多肽靶标上的表位或同源受体可以例如通过对靶标具有以下Kd值的分子来显示:至少约 10^{-4} M、备选地至少约 10^{-5} M、备选地至少约 10^{-6} M、备选地至少约 10^{-7} M、备选地至少约 10^{-8} M、备选地至少约 10^{-9} M、备选地至少约 10^{-10} M、备选地至少约 10^{-11} M、备选地至少约 10^{-12} M或更大。在一个实施方案中,术语“特异性结合”指这样的结合,其中分子与特定多肽或特定

多肽或同源受体上的表位结合而基本上不与任何其他多肽或多肽表位或受体结合。

[0164] 杂交反应的“严格性”可以容易地由本领域普通技术人员确定,而且通常凭经验根据探针长度、洗涤温度、和盐浓度来计算。通常,较长的探针要求较高的温度以正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性DNA重新退火的能力。探针和可杂交序列之间所期望的同源性程度越高,可使用的相对温度也越高。因此可以认为,较高相对温度将趋向于使反应条件更为严格,而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的其它细节和解释,参见Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学实验方案),Wiley Interscience Publishers,(1995)。

[0165] 本文中所定义的“严格条件”或“高严格性条件”可如下确定:(1)采用低离子强度 and 高温进行洗涤,例如0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠,50℃;(2)在杂交过程中采用变性剂,诸如甲酰胺,例如50%(v/v)甲酰胺及0.1%牛血清白蛋白质/0.1%Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液pH 6.5,其含750mM氯化钠、75mM柠檬酸钠,42℃;或(3)在采用50%甲酰胺、5XSSC(0.75M NaCl,0.075M柠檬酸钠)、50mM磷酸钠(pH 6.8)、0.1%焦磷酸钠、5X Denhardt氏溶液、超声波处理的鲑鱼精DNA(50μg/ml)、0.1% SDS和10%硫酸右旋糖苷,42℃,并在42℃于0.2XSSC(氯化钠/柠檬酸钠)中以及在55℃于50%甲酰胺洗涤,继之以高严格性的洗涤,包括在55℃的含EDTA的0.1XSSC。

[0166] “中等严格条件”可以如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室指南),纽约:冷泉港出版社,1989所述来鉴定,并且包括使用比上文所述那些较不严格的洗涤溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和%SDS)。中等严格条件的一个例子是于37℃在含20%甲酰胺、5XSSC(150mM NaCl,15mM柠檬酸三钠)、50mM磷酸钠(pH 7.6)、5X Denhardt氏溶液、10%硫酸右旋糖苷、和20mg/ml变性剪切的鲑鱼精DNA的溶液中孵育过夜,接着在1XSSC中于约37-50℃洗涤滤膜。技术人员将认识到如何根据需要来调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0167] 术语“带表位标签的”在用于本文时指与“标签多肽”融合的多肽。标签多肽具有足够的残基以提供针对其可制备抗体的表位,但又足够短使得其不干扰与其融合的多肽的活性。标签多肽优选还是相当独特的,使得该抗体基本上不与其它表位发生交叉反应性。合适的标签多肽通常具有至少6个氨基酸残基且通常在约8个到50个氨基酸残基之间(优选在约10个到20个氨基酸残基之间)。

[0168] 本文所用的术语“免疫粘附素”指将异源蛋白质(“粘附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能联合起来的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包括具有期望结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定结构域序列的融合物,所述期望结合特异性不同于抗体的抗原识别和结合位点(即是“异源”)。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是至少包含受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可从任何免疫球蛋白获得,诸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亚型、IgA(包括IgA-1和IgA-2)、IgE、IgD或IgM。

[0169] 对本文来说“有活性的”或“活性”涉及保留自然或天然存在的FGF19多肽和/或FGF21多肽(尤其是自然或天然存在的hFGF19多肽和/或hFGF21多肽)的至少一种生物和/或免疫活性的嵌合FGF19多肽。“生物”活性是指除了自然或天然存在的FGF19多肽和/或FGF21

多肽所具有的诱导产生针对抗原表位的抗体的能力外由自然或天然存在的FGF19多肽和/或FGF21多肽导致的生物功能(抑制、刺激或协同)。“生物”活性还可以指自然或天然存在的FGF19多肽和/或FGF21多肽的细胞或生化功能,如与其相应的同源受体中的一个或多个结合的能力。“免疫”活性是指自然或天然存在的FGF19多肽和/或FGF21多肽所具有的诱导产生针对抗原表位的抗体的能力。优选的生物活性包括以下典型活性中的任意一个或多个:增加个体中的代谢(或代谢率),降低个体的体重,减少个体中的肥胖,减少进入脂肪细胞的葡萄糖摄取,增加瘦蛋白质自脂肪细胞的释放,减少个体中的甘油三酯,减少个体中的游离脂肪酸,与同源FGF受体的Klotho-beta依赖性结合,以及与同源FGF受体的Klotho-beta不依赖性结合。要理解,一些FGF19和/或FGF21多肽的活性直接由多肽诱导而一些被间接诱导,然而,每种活性是由FGF19和/或FGF21多肽的存在导致的并且在不存在所述多肽的情况下不会具有所述结果。

[0170] 术语“拮抗剂”以最广义使用,并且包括部分或完全阻断、抑制或中和本文中公开的天然或嵌合多肽的生物活性的任何分子。以类似的方式,术语“激动剂”以最广义使用,并且包括模仿本文中公开的天然或嵌合多肽的生物活性的任何分子。合适的激动剂或拮抗剂分子具体包括激动剂或拮抗剂抗体或抗体片段、天然多肽的片段或氨基酸序列变体、肽、小的有机分子等。用于鉴别多肽的激动剂或拮抗剂的方法可以包括使多肽与候选激动剂或拮抗剂分子接触并测量通常与该多肽相关的一种或多种生物活性的可检测的改变。

[0171] 用于本文时,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是用于获得有益的或所需的结果(包括临床结果)的方法。对本发明来说,有益的或所需的临床结果包括但不限于以下的一种或多种:减少疾病所致的一种或多种症状,使疾病的程度下降,使疾病稳定(例如,防止或延迟疾病的恶化),延迟或减缓疾病的进展,改善疾病状态,减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量,和/或提高生活质量。

[0172] 当在本文中使用时,“延迟”进展指推迟、阻止、减缓、推延、稳定和/或延缓疾病的发展。取决于病史和/或被治疗的个体,此延迟可以具有不同的时间长度。

[0173] 在一些实施方案中,本文中所述的治疗方法改善(例如,减少发生、减少持续时间、减少或减轻严重度)疾病的一种或多种症状。

[0174] “症状”是个体经历的在结构、功能或感觉方面的任何病态现象或与正常的偏离。

[0175] 如在本文中公开的多肽、抗体、其激动剂或拮抗剂的“有效量”是足以实现具体指定目的的量。“有效量”可以凭经验并且以关于指定目的的常规方式确定。

[0176] 术语“治疗有效量”指对于“治疗”个体或哺乳动物的疾病或病症有效的抗体、多肽或其他药物的量。参见本文中对“治疗”的定义。

[0177] “延续”给药指以与急性模式相对的连续模式给药药剂,从而在延长的时间周期内维持最初的治疗效果(活性)。“间歇”给药不是连续进行而没有间断的治疗,而实际上是周期性的。

[0178] 对治疗来说“哺乳动物”是指被分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养和农场动物,以及动物园动物、竞技动物或宠物,如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔子等。优选地,哺乳动物是人。

[0179] “个体”是任何哺乳动物,优选人类。

[0180] “肥胖”是指这样的状态,其中哺乳动物具有至少25.9的体重指数(BMI)(计算为重

量(kg)/高度²(米))。通常,那些正常体重的人具有19.9至小于25.9的BMI。本文中,肥胖可以由任何原因所致,不管是遗传原因或环境原因。可以导致肥胖或是肥胖的原因的病症的实例包括过食和贪食症、多囊卵巢病、颅咽管瘤、Prader-Willi综合征、Frohlich氏综合征、II型糖尿病、GH缺乏个体、正常变异矮小身材、Turner氏综合征和显示降低的代谢活性或静息能量消耗以及总的非脂肪质量的百分比下降的其他病理状态,例如,患有急性淋巴细胞性白血病的儿童。

[0181] “肥胖相关的病症”是指作为肥胖结果或由肥胖加重的病症,诸如但不限于皮肤疾病如感染、静脉曲张、黑棘皮病和湿疹、运动不耐受(exercise intolerance)、糖尿病、胰岛素抗性、高血压、高胆固醇血症、胆石病、骨关节炎、整形损伤、血栓栓塞病、癌症和冠状动脉(或心血管)心脏病,尤其是与个体中的高甘油三酯和游离脂肪酸相关的那些心血管病症。

[0182] “结合”或“连同”一种或多种进一步的治疗药剂的给药包括以任何次序同时、并行、连续和相继给药。

[0183] 当在本文中使用时,“载体”包括药用载体、赋形剂或稳定剂,所述药用载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度对接受它们的细胞或哺乳动物没有毒性。通常,生理用载体是pH缓冲的水溶液。生理用载体的实例包括缓冲剂如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量的(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖醇如甘露醇或山梨醇;成盐反离子如钠;和/或非离子表面活性剂如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。

[0184] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,和残余的“Fc”片段,其名称反映其容易结晶的能力。Fab片段由整个L链连同H链的可变区结构域(V_H)以及一条重链的第一恒定结构域(C_{H1})组成。相对于抗原结合,每个Fab片段是单价的,即,它具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生一个较大的F(ab')₂片段,它粗略相当于两个通过二硫键相连的Fab片段,其具有二价抗原结合活性且仍能够交联抗原。Fab'片段因在C_{H1}结构域的羧基末端具有额外的几个残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而与Fab片段有所不同。Fab'-SH是本文中对其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带一个游离硫醇基的Fab'的称谓。F(ab')₂抗体片段最初是作为成对Fab'片段生成的,在Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0185] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此区由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域以紧密的、非共价缔合的二聚体组成。在这种构型中,每个可变结构域的三个CDRs相互作用从而限定在V_H-V_L二聚体的表面上的抗原结合位点。总而言之,六个CDRs将抗原结合特异性赋予抗体。然而,即使是单个可变结构域(或只包含对抗原特异的三个CDRs的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,然而亲和性低于完整结合位点。

[0186] “Fc”片段包含通过二硫键保持在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应子功能是由Fc区中的序列决定的,该区还是由在某些类型细胞上发现的Fc受体(FcR)所识别的部分。

[0187] Fab片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab片段与Fab'片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基端加入几个残基,包括来自抗体铰链区

的一个或多个半胱氨酸。

[0188] 基于抗体(免疫球蛋白)的恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”分为两种清楚区分的类型之一,称为kappa(κ)和lambda(λ)。

[0189] 取决于免疫球蛋白的重链的恒定结构域的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白分为不同的种类。存在五种主要的免疫球蛋白类别:IgA,IgD,IgE,IgG,和IgM,并且这些中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA1,和IgA2。

[0190] “单链Fv”或“sFv”片段包含抗体VH和VL结构域,其中这些结构域在一条多肽链中出现。优选的是,sFv多肽在VH和VL结构域之间还包含多肽接头,使得sFv形成期望的抗原结合结构。关于sFv的综述参见Pluckthun于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(单克隆抗体药理学),vol.113,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,纽约,pp.269-315(1994)。

[0191] 术语“双抗体(diabodies)”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段在相同的多肽链(VH-VL)中包含与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短所以不能在相同链上的两个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对从而产生两个抗原结合位点。双抗体更充分地描述于例如EP专利公布0404097;PCT国际专利公布W0 93/11161;和Hollinger等,美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)90:6444-6448(1993)中。

[0192] “分离的抗体”指已经鉴定且与其天然环境的成分分离和/或从其回收的抗体。抗体的天然环境的污染性成分指将会干扰其诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)通过Lowry法的测定,超过95重量%的抗体,并且最优选超过99重量%的抗体,(2)至足以通过使用转杯式测序仪(spinning cup sequenator)获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)通过使用例如考马斯蓝或优选地银染色在还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE,达到同质。既然抗体的天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0193] 当在本文中使用时,词语“标记物”是指可检测化合物或组合物,其直接或间接地与抗体缀合从而产生“标记的”抗体。所述标记物可以本身是可检测的(例如,放射同位素标记物或荧光标记物),或者,在酶标记物的情形中,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0194] “固相”是指本发明的抗体可附着其上的非水性基质。本文中所涵盖的固相的实例包括那些部分或完全由玻璃(例如可控孔径玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅酮制成的固相。在某些实施方案中,根据语境,固相可包括测定板的孔;在其它实施方案中,它指纯化柱(例如亲和色谱柱)。此术语还包括离散颗粒的不连续固相,诸如美国专利No.4,275,149中所述那些。

[0195] “脂质体”是由多种脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡,其被用于将药物(如嵌合FGF19多肽或针对其的抗体)递送到哺乳动物。脂质体的结构通常被布置成双层形式,与生物膜的脂质布置类似。

[0196] 本文中对“约”值或参数的参考包括(并且描述)指向所述值或参数本身的变化。例

如,提到“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0197] 在用于本文及所附权利要求时,除非上下文另有明确规定,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数所指物。要理解在本文中描述的本发明的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本由方面和变化组成”。

[0198] V. 嵌合FGF19变体

[0199] 除了本文中描述的嵌合FGF19多肽以外,预期可以制备嵌合FGF19变体多肽(或“嵌合FGF19变体”)。可以通过向编码嵌合或天然FGF19或FGF21多肽的DNA中引入合适的核苷酸变化和/或通过合成所需的嵌合FGF19变体来制备嵌合FGF19变体。本领域技术人员将理解氨基酸变化将改变嵌合FGF19变体的翻译后加工,如改变糖基化位点的数量或位置或者改变膜锚定性质。

[0200] 可以例如使用在例如美国专利号5,364,934中所述的用于保守或非保守突变的任何技术和指导来改变本发明的嵌合FGF19多肽或其不同的结构域。改变可以是使嵌合FGF19多肽的氨基酸序列发生变化的编码嵌合FGF19多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入。所述改变可以是关于编码源自天然FGF19或FGF21多肽的嵌合FGF19多肽的一个或多个密码子的。任选地,所述改变是通过在嵌合FGF19多肽的一个或多个结构域中使至少一个氨基酸被任何其他的氨基酸取代。可以通过将嵌合FGF19多肽的序列与同源的已知蛋白分子的序列进行比较并且使在高度同源性区域中作出的氨基酸序列变化的数目最小化来发现在确定在对所需的活性没有不利的影响的情况下可以插入、取代或缺失哪个氨基酸残基方面的指导。氨基酸取代可以是使一个氨基酸被具有相似结构和/或化学性质的另一个氨基酸取代(如用丝氨酸取代亮氨酸,即保守氨基酸取代)的结果。插入或缺失可以任选地在约1至5个氨基酸的范围内。可以通过在序列中系统地进行氨基酸的插入、缺失或取代并且测试所得变体的由全长或成熟的天然序列显示的活性来确定所允许的变化。

[0201] 本文中提供嵌合FGF19多肽片段(“或嵌合FGF19片段”)。这种片段可以在N末端或C末端被截短,或者例如当与全长天然蛋白质比较时,可以缺少内部残基。一些片段缺少对于所需的嵌合FGF19多肽的生物活性不是必需的氨基酸残基。

[0202] 可以通过众多常规技术中的任一个来制备嵌合FGF19片段。可以化学合成所需的肽片段。一种备选的方法涉及通过酶消化来产生嵌合FGF19片段,例如,通过用已知在由特定氨基酸残基限定的位点处切割蛋白质的酶处理蛋白质,或者通过用合适的限制性酶消化DNA并且分离所需的片段。而另一种合适的技术涉及通过聚合酶链反应(PCR)来分离并扩增编码所需多肽片段的DNA片段。限定所需的DNA片段末端的寡核苷酸被用于PCR中的5'和3'引物处。优选地,嵌合FGF19多肽片段与天然FGF19多肽(如显示在图1中的hFGF19多肽(SEQ ID NO:1))或天然FGF21多肽(如显示在图2中的hFGF21(SEQ ID NO:2))共享至少一种生物和/或免疫活性。

[0203] 在具体的实施方案中,所感兴趣的保守取代显示在表10中在优选取代的标题下。如果这种取代导致生物活性的改变,则引入在表10中被称为典型取代或如以下根据氨基酸分类进一步描述的更多的基本变化,并筛查产物。

[0204] 表10: 优选的氨基酸残基取代

	原始残基	典型取代	优选取代
[0205]	Ala(A)	val; leu; ile	val
	Arg(R)	lys; gln; asn	lys
[0206]	Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln
	Asp(D)	glu	glu
	Cys(C)	ser	ser
	Gln(Q)	asn	asn
	Glu(E)	asp	asp
	Gly(G)	pro; ala	ala
	His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
	Leu(L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys(K)	arg; gln; asn	arg
	Met(M)	leu; phe; ile	leu
	Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
	Pro(P)	ala	ala
	Ser(S)	thr	thr
	Thr(T)	ser	ser
	Trp(W)	tyr; phe	tyr
	Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
	Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

[0207] 通过选择取代来实现对嵌合FGF19多肽的功能或免疫特性的实质改变,所述取代在它们对以下各项的作用方面显著不同(a)在取代区域中保持多肽骨架的结构,例如,片(sheet)或螺旋的构象,(b)保持分子在目标位点处的电荷和疏水性,或(c)保持侧链的体积(bulk)。基于共有的侧链性质,天然存在的残基被划分到以下的组中:

[0208] (1)疏水:正亮氨酸,met,ala,val,leu,ile;

[0209] (2)中性亲水:cys,ser,thr;

[0210] (3)酸性:asp,glu;

[0211] (4)碱性:asn,gln,his,lys,arg;

[0212] (5)影响链取向的残基:gly,pro;和

[0213] (6)芳香族的:trp,tyr,phe。

[0214] 非保守性取代必须使这些分类中的一个的成员与另一个分类交换。这种被取代的残基也可以被引入到保守取代位点或者,更优选地,引入到剩余的(非保守)位点。

[0215] 可以使用本领域中已知的方法来进行改变,所述方法如寡核苷酸介导的(定点)突变、丙氨酸扫描和PCR突变。可以将定点突变[Carter等,Nucl.Acids Res.(核酸研究),13:4331(1986);Zoller等,Nucl.Acids Res.(核酸研究),10:6487(1987)]、盒突变[Wells等,Gene(基因),34:315(1985)]、限制选择突变[Wells等,Philos.Trans.R.Soc(皇家学会自然科学会报).LondonSerA,317:415(1986)]或其他已知技术用于克隆的DNA以产生编码嵌合FGF19变体多肽的DNA。

[0216] 也可以采用扫描氨基酸分析来沿连续的序列鉴别一个或多个氨基酸。在优选的扫描中,氨基酸是相对小的、中性氨基酸。这种氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。在此组中,丙氨酸是典型优选的扫描氨基酸,原因是它排除了在 β 碳以外的侧链并且较不可能改变变体的主链构象[Cunningham和Wells,Science(科学),244:1081-1085(1989)]。丙氨酸是典型优选的,原因是它是最普通的氨基酸。此外,它在包埋和暴露位置都经常被发现[Creighton,The Proteins(蛋白质),(W.H.Freeman&Co.,N.Y.);Chothia,J.Mol.Biol.(分子生物学杂志),150:1(1976)]。如果丙氨酸取代没有产生足够量的变体,则可以使用等构(isoteric)氨基酸。

[0217] VI.对嵌合FGF19的修饰

[0218] 对嵌合FGF19多肽的共价修饰包含在本发明的范围内。一个类型的共价修饰包括使嵌合FGF19多肽的目标氨基酸残基与有机衍生化试剂反应,所述有机衍生化试剂能够与嵌合FGF19多肽的选定的侧链或N端或C端残基反应。用双功能试剂衍生化是有用的,例如,对于使嵌合FGF19多肽与在抗体纯化方法中使用的不溶于水的支持基质或表面交联,并且反之亦然。通常使用的交联剂包括例如1,1-双(重氮乙酰)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯(例如与4-叠氮水杨酸的酯)、同型双功能酰亚胺酯(包括二琥珀酰亚胺酯如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯)、双功能马来酰亚胺如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷和试剂如甲基-3-[(p-叠氮苯基)二硫代]丙亚胺酸酯。

[0219] 其他修饰包括将谷氨酰胺和天冬氨酰胺残基分别脱酰胺化为相应的谷氨酰胺和天冬氨酰胺残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化[T.E.Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties(蛋白质:结构和分子性质),W.H.Freeman&Co.,San Francisco,pp.79-86(1983)],N端氨基的乙酰化,以及任何C端羧基的酰胺化。

[0220] 包含在本发明范围内的另一个类型的对嵌合FGF19多肽的共价修饰包括改变多肽的糖基化模式。本文中的“改变天然糖基化模式”意在指使在相应的天然FGF19多肽和/或FGF21多肽序列中发现的一个或多个碳水化合物部分缺失(通过除去潜在的糖基化位点或者通过借助化学和/或酶方法来使糖基化缺失),和/或添加在天然FGF19多肽和/或FGF21多肽序列中不存在的一个或多个糖基化位点。此外,该短语包括天然蛋白质糖基化的定性改变,包括存在的不同碳水化合物部分的性质和比例的变化。

[0221] 可以通过改变氨基酸序列来实现向嵌合FGF19多肽添加糖基化位点。例如可以通过向嵌合FGF19多肽添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来取代嵌合FGF19多肽来进行改变(对于O连接糖基化位点)。嵌合FGF19多肽氨基酸序列可以任选地通过在DNA水平上的变化来改变,尤其是通过在预先选定的碱基突变编码嵌合FGF19多肽的DNA以致产生将被翻译为所需氨基酸的密码子。

[0222] 增加嵌合FGF19多肽上碳水化合物部分的数目的另一种方式是通过使糖苷与多肽化学或酶偶联。在本领域中描述了这些方法,例如在公布于1987年9月11日的WO 87/05330和Aplin和Wriston,CRC Crit.Rev.Biochem.(CRC生物化学评论综述),pp.259-306(1981)中。

[0223] 可以用化学方法或酶学方法或通过突变取代编码充当糖基化靶标的氨基酸残基的密码子来实现对存在于嵌合FGF19多肽上的碳水化合物部分的去除。化学去糖基化技术在本领域中是已知的,并且例如得到Hakimuddin等,Arch.Biochem.Biophys.(生物化学和生物物理学文献),259:52(1987)和Edge等,Anal.Biochem.(分析生物化学),118:131(1981)的描述。可以通过使用如由Thotakura等,Meth.Enzymol.(酶学方法),138:350(1987)描述的多种内切和外切糖苷酶来实现对多肽上的碳水化合物部分的酶切。

[0224] 另一种对嵌合FGF19多肽的共价修饰包括以在美国专利号4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337中所述的方式将嵌合FGF19多肽与多种非蛋白质聚合物中的一种相连,所述非蛋白质聚合物例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。

[0225] 也可以通过使本发明的嵌合FGF19多肽与另一种异源多肽或氨基酸序列融合来修饰嵌合FGF19多肽。

[0226] 在一个实施方案中,这种嵌合分子包括嵌合FGF19多肽与标签多肽的融合,所述标签多肽提供抗标签抗体能够选择性结合的表位。表位标签通常位于嵌合FGF19多肽的氨基或羧基末端。可以使用针对标签多肽的抗体来检测这种表位标签形式的嵌合FGF19多肽的存在。同样,提供表位标签使得可以通过亲和纯化使用抗标签抗体或与表位标签结合的另一亲和基质来容易地纯化嵌合FGF19多肽。多种标签多肽和它们各自的抗体在本领域中是已知的。实例包括多组氨酸(poly-his)或多组氨酸-甘氨酸(poly-his-gly)标签;流感HA标签多肽及其抗体12CA5[Field等,Mol.Cell.Biol.(分子细胞生物学),8:2159-2165(1988)];c-myc标签以及针对其的8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体[Evan等,Molecular and Cellular Biology(分子细胞生物学),5:3610-3616(1985)];以及单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签及其抗体[Paborsky等,Protein Engineering(蛋白质工程),3(6):547-553(1990)]。其他标签多肽包括Flag肽[Hopp等,BioTechnology(生物技术),6:1204-1210(1988)];KT3表位肽[Martin等,Science(科学),255:192-194(1992)]; α 微管蛋白表位肽[Skinner等,J.Biol.Chem.(生物化学杂志),266:15163-15166(1991)];以及T7基因10蛋白质肽标签[Lutz-Freyermuth等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),87:6393-6397(1990)]。

[0227] 在备选实施方案中,本发明的多肽可以包括嵌合FGF19多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区域的融合。对于二价形式的嵌合分子(也被称为“免疫粘附素”),这种融合可以是与免疫球蛋白的Fc部分,免疫球蛋白的Fc部分的类似物以及免疫球蛋白的Fc部分的一个或多个片段的融合。在一些实施方案中,免疫球蛋白选自由以下组成的组:IgG-1、IgG-2、

IgG-3、IgG-4、IgA-1、IgA-2、IgE、IgD和IgM。在一些实施方案中，Fc部分是人或人源化的。

[0228] 在一些实施方案中，使嵌合FGF19多肽的C末端和Fc部分的N末端融合。在一些实施方案中，使嵌合FGF19多肽的N末端与Fc部分的C末端融合。在一些实施方案中，免疫球蛋白融合包括IgG1分子的铰链、CH2和CH3区域，或IgG1分子的铰链、CH1、CH2和CH3区域。对于免疫球蛋白融合的产生，也参见颁布于1995年6月27日的美国专利号5,428,130。在一些实施方案中，嵌合FGF19多肽的C末端与Fc部分的N末端经由接头融合，所述接头选自由以下组成的组： $[\text{Gly}]_n$ 接头、 $[\text{Gly}_3\text{Ser}]_m$ 接头和 $[\text{Gly}_4\text{Ser}]_m$ 接头，其中n是1-30的整数而m是1-6的整数。

[0229] VII. 使用嵌合FGF19多肽的用途和方法

[0230] 也可以将本文中所述的嵌合FGF19多肽及其调制剂用作治疗药剂。可以根据已知方法来配制本发明的嵌合FGF19多肽及其调制剂以制备在制药上有用的组合物，由此将于此的嵌合FGF19多肽结合到与药用载体的掺和物中。通过将具有所需纯度的活性成分与任选的生理用载体、赋形剂或稳定剂混合来制备用于存储的冻干剂型或水溶液形式的治疗制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition(Remington药物科学,第16版), Osol, A. Ed. (1980))。可用的载体、赋形剂或稳定剂在使用剂量和浓度对接受者是无毒性的，并且包括缓冲剂如磷酸、柠檬酸和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如EDTA；糖醇如甘露醇或山梨醇；成盐反离子如钠；和/或非离子表面活性剂如TWEENTM、PLURONICSTM或PEG。

[0231] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这通过在以下的冻干和重构(reconstitution)之前经由无菌滤膜过滤来容易地实现。

[0232] 通常将本文中的治疗组合物放入具有无菌接入端的容器中，例如，静脉溶液包或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的瓶。

[0233] 给药途径与已知方法一致，所述方法例如通过静脉内途径、腹膜内途径、大脑内途径、肌肉内途径、眼内途径、动脉途径内或病变内途径注射或输注，局部给药，或通过缓释系统。

[0234] 本发明的药物组合物的剂量和所需药物浓度可以取决于所想到的具体用途而不同。对合适剂量或给药途径的确定为普通内科医生所熟练掌握。动物实验为确定人类治疗的有效剂量提供可靠的指导。可以遵从由Mordenti, J. 和Chappell, W. Toxicokinetics and New Drug Development(毒物代谢动力学和新药开发)中的“The use of interspecies scaling into toxicokinetics(种间类推在毒物代谢动力学中的应用)”，Yacobi等, Eds., Pergamon Press, 纽约1989, pp. 42-96提出的原则来进行有效剂量的种间类推。

[0235] 当进行嵌合FGF19多肽或其激动剂或拮抗剂的体内给药时，取决于给药途径，正常剂量可以在每天约10ng/kg哺乳动物体重至100mg/kg哺乳动物体重以上的范围内变化，优选地在约1μg/kg/天至10mg/kg/天的范围内变化。在文献中提供了关于具体剂量和递送方法的指导；参见例如，美国专利号4,657,760；5,206,344；或5,225,212。预期不同的剂型将对不同的治疗化合物和不同的疾病有效，并且预期例如以一种器官或组织为目标的给药可能需要以与向另一种器官或组织的给药不同的方式递送。

[0236] 当在具有适用于治疗需要给药嵌合FGF19多肽或调制剂的任何疾病或病症的释放

特性的剂型中需要嵌合FGF19多肽或调制剂的缓释给药时,想到了微囊化。已经对人生长激素(rhGH)、干扰素-(rhIFN-)、白介素-2和MN rgp120成功地进行了用于缓慢释放的重组蛋白质的微囊化。Johnson等,Nat.Med.(自然-医学),2:795-799(1996);Yasuda,Biomed.Ther.(生物医学疗法),27:1221-1223(1993);Hora等,Bio/Technology(生物技术)8:755-758(1990);Cleland,“Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems(使用聚交酯聚乙醇酸交酯微球设计和制备单免疫疫苗)”Vaccine Design(疫苗设计):The Subunit and Adjuvant Approach(亚基和佐剂方法),Powell和Newman,eds,(Plenum Press:纽约,1995),pp.439-462;WO 97/03692,WO 96/40072,WO 96/07399;和美国专利号5,654,010。

[0237] 使用聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)聚合物(由于其生物相容性和宽范围的生物降解性质)来开发这些蛋白的缓释剂型。PLGA的降解产物,乳酸和羟基乙酸,可以在人体中被快速清除。此外,取决于分子量和组成,可以将此聚合物的降解性调节为数月至数年。Lewis“Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer(生物活性药剂从交酯/乙醇酸交酯聚合物的控制释放)”:M.Chasin和R.Langer(Eds.),Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems(作为药物递送系统的生物降解聚合物)(Marcel Dekker:纽约,1990),pp.1-41。

[0238] 可以将包含本文中提供的嵌合FGF19多肽的治疗药剂和组合物用于多种应用。所述应用包括治疗患有肥胖或肥胖相关病症的个体。在一个方面中,将嵌合FGF19多肽以可以有效治疗所述病症的量给药于需要其的个体。优选地,所述病症是这样的病症,其需要以下各项中的至少一种得到治疗:血糖降低,代谢增加,体重下降,体脂下降,甘油三酯下降,游离脂肪酸下降,葡萄糖从脂肪细胞的释放增加和/或瘦蛋白质从脂肪细胞的释放增加。可以通过标准方法来测量这些参数中的每个,例如,通过测量氧消耗来确定代谢率,使用秤来确定重量,以及测量身材来确定脂肪。此外,可以通过标准方法来确定甘油三酯、游离脂肪酸、葡萄糖和瘦蛋白的存在和量。应用包括治疗患有以下病症中的一种或多种的个体:1型糖尿病、2型糖尿病、高血糖、代谢综合征、动脉粥样硬化、高胆固醇血症、卒中、骨质疏松、骨关节炎、关节变性病、肌萎缩、老年性肌肉萎缩、瘦体重下降、脱发、皱纹、疲劳增加、耐力下降、心脏功能减弱、免疫系统功能障碍、癌症、帕金森氏病、老年痴呆、阿尔茨海默病和认知功能下降。

[0239] 优选地将嵌合FGF19多肽和包含嵌合FGF19多肽的组合物用于体内。然而,如下所述,给药可以是体外的如在以下所述的用于筛选嵌合FGF19多肽的调制剂的方法中。然而,要理解,嵌合FGF19多肽的调制剂也可以通过使用动物模型和来自个体的样品来鉴别。

[0240] 本发明还包括这些方面,在所述方面中将本发明的嵌合FGF19多肽或其药物组合物与第二试剂结合在一起给药,其中所述第二试剂优选药理学试剂。在一些实施方案中,将治疗有效量的本发明的嵌合FGF19多肽或其药物组合物与治疗有效量的第二试剂结合在一起给药。在一些实施方案中,将嵌合FGF19多肽或其药物组合物与第二试剂共同给药,即,各自的给药周期是单一给药方式的部分。在一些实施方案中,将嵌合FGF19多肽或其药物组合物与第二试剂同时给药,即,各自的给药周期相互重叠。在一些实施方案中,使嵌合FGF19多肽或其药物组合物与第二试剂不在同时给药,即,各自的给药周期不相互重叠。在一些实施方案中,将嵌合FGF19多肽或其药物组合物与第二试剂顺序给药,即,在第二试剂的给药前

和/或后给药嵌合FGF19多肽或其药物组合物。在一些实施方案中,将嵌合FGF19多肽或其药物组合物与第二试剂作为单独的组合物同时给药。在一些实施方案中,将嵌合FGF19多肽或其药物组合物与第二试剂作为相同组合物的部分同时给药。

[0241] 在一些实施方案中,第二试剂是不同的本发明的嵌合FGF19多肽。在一些实施方案中,第二试剂是消炎剂、抗糖尿病剂和/或“他汀”类降胆固醇药。在一些实施方案中,第二活性剂是胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是速效、短效、长效、间歇作用或长效胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是和/或包含优泌乐(Humalog)、赖脯胰岛素(Lispro)、Novolog、Apidra、优泌林(Humulin)、门冬胰岛素(Aspart)、常规胰岛素、NPH、Lente(人胰岛素锌混悬液)、Ultralente、来得时(Lantus)、甘精胰岛素(Glargine)、Levemir、或Detemir。在一些实施方案中,第二活性剂是他汀。在一些实施方案中,他汀是和/或包含阿托伐他汀(Atorvastatin)(例如,立普妥(Lipitor)或Torvast)、西立伐他汀(Cerivastatin)(例如,Lipobay或拜可(Baycol))、氟伐他汀(Fluvastatin)(例如,来适可(Lescol)或来适可(Lescol))、洛伐他汀(Lovastatin)(例如,美降脂(Mevacor)、Altacor或Altoprev)、美伐他汀(Mevastatin)、匹伐他汀(Pitavastatin)(例如,Livalo或Pitava)、普伐他汀(Pravastatin)(例如,普拉固(Pravachol)、Selektine或Lipostat)、罗苏伐他汀(Rosuvastatin)(例如,克来斯妥(Crestor))、辛伐他汀(Simvastatin)(例如,舒降之(Zocor)或Lipex)、Vytorin、Advicor、Besylate(苯磺酸盐)Caduet或辛可(Simcor)。

[0242] 在本发明的另一方面中,结合在个体上进行的第二疗法来将本发明的嵌合FGF19多肽或其药物组合物给药于个体,其中所述第二疗法包括外科手术。在一些实施方案中,与第二疗法结合地给药治疗有效量的本发明的嵌合FGF19多肽或其药物组合物。在一些实施方案中,与第二疗法共同地给药嵌合FGF19多肽或其药物组合物,即,给药和疗法是单一给药治疗方案的部分。在一些实施方案中,与第二疗法同时地给药嵌合FGF19多肽或其药物组合物,即,给药与疗法的各自周期相互重叠。在一些实施方案中,与第二疗法不同时地给药嵌合FGF19多肽或其药物组合物以及第二试剂,即,给药与疗法的各自周期不相互重叠。在一些实施方案中,与第二疗法顺序地给药嵌合FGF19多肽或其药物组合物以及第二试剂,即,在第二疗法前和/或后给药嵌合FGF19多肽或其药物组合物。在一些实施方案中,与第二疗法同时地给药嵌合FGF19多肽或其药物组合物以及第二试剂。

[0243] 也可以将本文中所述的嵌合FGF19多肽用作蛋白质电泳的分子量标记物。

[0244] 本发明的嵌合FGF19多肽和核酸分子也可以被用于组织分型,其中当彼此相比较时,本发明的嵌合FGF19多肽可以在一个组织中被有差异地表达。将发现嵌合FGF19多肽核酸分子在产生用于PCR、Northern分析、Southern分析和Western分析的探针中的用途。

[0245] 可以将与另一个蛋白(例如FGFR中的一个)、嵌合FGF19多肽结合的本发明的嵌合FGF19多肽用于鉴别涉及结合相互作用的其他蛋白质或分子的测定。通过这些方法,可以鉴别受体/配体结合相互作用的抑制剂。也可以将涉及这种结合相互作用的蛋白质用于筛选结合相互作用的肽或小分子抑制剂或激动剂。同样,可以将嵌合FGF19多肽用于分离相关的一个或多个配体。可以将筛选测定设计成用于发现模仿天然FGF19、天然FGF21、嵌合FGF19多肽或FGF19和/或FGF21的受体的生物活性的先导化合物(lead compound)。这种筛选测定将包括易于对化学库的高通量筛选的测定,使它们尤其适用于鉴别小分子候选药物。预期的小分子包括合成的有机或无机化合物。可以以在本领域中得到充分表征的多种形式进行

测定,包括蛋白质-蛋白质结合测定、生化筛选测定、免疫测定和基于细胞的测定。

[0246] 作为受体鉴定的备选方法,可以将标记的嵌合FGF19多肽与细胞膜或表达受体分子的提取物制剂光亲和连接。通过PAGE分解交联物质并使其曝光于X射线胶片。包含受体的标记的复合物可以被切割、分解为肽段,并且对其进行蛋白质微测序。自微测序获得的氨基酸序列将被用于设计一组简并寡核苷酸探针以筛选cDNA文库从而鉴别编码推定受体的基因。

[0247] 在本文中进行竞争性结合测定的一个实施方案中,将FGFR1c、FGFR2c、FGFR3c和/或FGFR4或针对嵌合FGF19多肽的抗体用作竞争剂。

[0248] VIII. 针对嵌合FGF19多肽的抗体

[0249] 1. 多克隆抗体

[0250] 抗嵌合FGF19多肽抗体可以包括多克隆抗体。用于制备多克隆抗体的方法为技术人员所熟知。可以例如通过一次或多次免疫剂和(如果需要)佐剂的注射,在哺乳动物中培育多克隆抗体。典型地,通过多次皮下或腹膜内注射将免疫剂和/或佐剂注射到哺乳动物中。免疫剂可以包括嵌合FGF19多肽或其融合蛋白质。可能有用的是将免疫剂与已知在被免疫的哺乳动物中具有免疫原性的蛋白缀合。这种具有免疫原性的蛋白质的实例包括但不限于匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂。可用的佐剂的实例包括Freund氏完全佐剂和MPL-TDM佐剂(单磷脂A、合成海藻糖dicorynomycolate)。本领域技术人员不需要过多实验就可以选择免疫方案。

[0251] 2. 单克隆抗体

[0252] 备选地,抗嵌合FGF19多肽抗体可以是单克隆抗体。可以使用杂交瘤方法如由Kohler和Milstein, Nature(自然), 256:495(1975)描述的那些来制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中,典型地用免疫剂来免疫小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物以诱导产生或能够产生将与免疫剂特异性结合的抗体的淋巴细胞。备选地,可以在体外免疫淋巴细胞。在优选实施方案中,抗嵌合FGF19多肽抗体特异性地结合本发明的多肽。在更优选的实施方案中,特异性结合的抗体不结合天然FGF19多肽或天然FGF21多肽。

[0253] 免疫剂将典型地包括嵌合FGF19多肽或其融合蛋白质。通常,如果需要的是人类来源的细胞则使用外周血淋巴细胞(“PBL”),或者如果需要的是非人哺乳动物来源则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与永生细胞系融合,从而形成杂交瘤细胞[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice(单克隆抗体:原理与实践), Academic Press, (1986) pp. 59-103]。永生细胞系通常是被转化的哺乳动物细胞,尤其是啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。可以将杂交瘤细胞在合适的培养基中培养,所述培养基优选地包含一种或多种抑制未融合的永生细胞的生长或存活物质。例如,如果亲本细胞缺少酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基将典型地包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶(“HAT培养基”),所述物质阻止缺乏HGPRT的细胞的生长。

[0254] 优选的永生细胞系是这样的细胞系,其有效地融合,支持所选抗体产生细胞稳定地高水平地表达抗体,并且对培养基如HAT培养基敏感。更优选的永生细胞系是鼠科骨髓瘤细胞系,其可以从例如Salk Institute Cell Distribution Center(Salk研究所细胞分发中心), San Diego, Calif. 和American Type Culture Collection(美国典型培养物保藏中

心),Manassas,Va获得。对于将人骨髓瘤和鼠-人杂交骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体也已经有描述[Kozbor,J.Immunol.(免疫学杂志),133:3001(1984);Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications(单克隆抗体制备技术和应用),Marcel Dekker,Inc.,纽约,(1987)pp.51-63]。

[0255] 然后可以测定在其中培养有杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对嵌合FGF19多肽的单克隆抗体。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定来确定由杂交瘤细胞制备的单克隆抗体的结合特异性,所述测定如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)。这些技术和测定在本领域中是已知的。可以例如通过Munson和Pollard,Anal.Biochem.(分析生物化学),107:220(1980)的Scatchard分析来确定单克隆抗体的结合亲和性。

[0256] 在所需的杂交瘤细胞得到鉴别后,可以通过有限稀释方式来亚克隆克隆以及通过标准方法使克隆生长[Goding,如上]。用于此的合适培养基包括例如,Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM培养基)和RPMI-1640培养基。备选地,杂交瘤细胞可以作为腹水在哺乳动物中培育。

[0257] 可以通过常规免疫球蛋白纯化方法如例如蛋白质A-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析来从培养基或腹水分离或纯化由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0258] 也可以通过重组DNA方法如在美国专利号4,816,567中所述的那些来制备单克隆抗体。可以使用常规方法容易地分离编码本发明的单克隆抗体的DNA并对其进行测序(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。本发明的杂交瘤细胞充当这种DNA的优选的来源。一旦被分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将所述表达载体转染到宿主细胞如猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。也可以例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源的鼠的序列[美国专利号4,816,567;Morrison等,如上]或通过与免疫球蛋白编码序列非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列相连来改变DNA。这种非免疫球蛋白多肽可以取代本发明的抗体的恒定结构域,或者可以取代本发明的抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以产生嵌合二价抗体。

[0259] 抗体可以是单价抗体。制备单价抗体的方法在本领域中是为人所熟知的。例如,一种方法包括免疫球蛋白轻链和经修饰的重链的重组表达。所述重链通常在Fc区中的任何点处被截断从而防止重链交联。备选地,用另一种氨基酸残基取代相关的半胱氨酸残基或使相关的半胱氨酸残基缺失从而防止交联。

[0260] 体外方法也适于制备单价抗体。可以使用本领域中已知的常规技术来完成对抗体的消化以产生其片段,尤其是Fab片段。

[0261] 3. 人和人源化抗体

[0262] 本发明的抗嵌合FGF19多肽抗体还可以包括人源化抗体或人抗体。人源化形式的非人(例如,鼠)抗体是包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合亚序列)。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲和性和能力的来自非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基取代。在某些情况中,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人残基代替。人源化抗体还可以包括既没有在受体抗体中发现也没有在输入的CDR或框架序列中发现的残基。通常,人源化抗体将包括至

少一个并且典型地两个可变结构域的基本全部,其中全部或基本全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而全部或基本全部的FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最好也包括至少部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),典型地是人免疫球蛋白的恒定区(Fc)[Jones等,Nature(自然),321:522-525(1986);Riechmann等,Nature(自然),332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.(结构生物学新见),2:593-596(1992)]。

[0263] 用于使非人抗体人源化的方法在本领域中是已知的。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其典型地取自“输入”可变结构域。基本可以遵从Winter及同事[Jones等,Nature(自然),321:522-525(1986);Riechmann等,Nature(自然),332:323-327(1988);Verhoeyen等,Science(科学),239:1534-1536(1988)]的方法,通过用啮齿动物的一个或多个CDR序列取代人抗体的相应序列来进行人源化。因此,这种“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中基本上不及完整人可变结构域的序列被来自非人物种的相应序列所取代。实际上,人源化抗体典型地是其中某些CDR残基以及可能的某些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基所取代的人抗体。

[0264] 还可以使用本领域中已知的多种技术来制备人抗体,所述技术包括噬菌体展示文库[Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.(分子生物学杂志),227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol.(分子生物学杂志)222:581(1991)]。Cole等和Boerner等的技术对于制备人单克隆抗体也是可用的(Cole等,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(单克隆抗体和癌症治疗),Alan R. Liss, p.77(1985)以及Boerner等,J.Immunol.(免疫学杂志),147(1):86-95(1991)]。相似地,可以通过将人免疫球蛋白基因座(loci)引入到转基因动物中来制备人抗体,所述转基因动物例如内源免疫球蛋白基因已经部分或全部失活的小鼠。在激发后,观察人抗体的产生,其在各个方面(包括基因重排、装配和抗体所有组成部分)都与在人中观察到的非常相似。此方法描述于例如美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016以及以下科学出版物中: Marks等,Bio/Technology(生物技术)10,779-783(1992);Lonberg等,Nature(自然)368:856-859(1994);Morrison,Nature(自然)368,812-13(1994);Fishwild等,Nature Biotechnology(自然-生物技术)14,845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology(自然-生物技术)14,826(1996);Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.(国际免疫学综述)13:65-93(1995)。

[0265] 4. 双特异性抗体

[0266] 双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆(优选地)人或人源化抗体。在本例中,结合特异性之一针对FGF19,另一个针对任何其他抗原,并且优选针对细胞表面蛋白或受体或受体亚基。

[0267] 用于制备双特异性抗体的方法在本领域中是已知的。常规上,双特异性抗体的重组制备基于两对免疫球蛋白重链/轻链的共表达,其中两种重链具有不同的特异性[Milstein和Cuello,Nature(自然),305:537-539(1983)]。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadromas))产生十种不同抗体分子的可能混合物,在所述十种不同抗体分子中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤来完成对正确分子的纯化。类似方法公开在公布于1993年5月13日的W093/08829以及Traunecker等,EMBO J.(欧洲分子生物学学会杂志),10:3655-3659(1991)中。

[0268] 可以将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域融合到免疫球蛋白恒定结构域序列。所述融合优选地具有免疫球蛋白重链恒定结构域,其包括至少部分的铰链区、CH2区和CH3区。优选的是使第一重链恒定区(CH1)包含存在于至少一个融合中的轻链结合所需的位点。将编码免疫球蛋白重链融合以及(如果需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入到各自的表达载体中,并且共转染到合适的宿主生物体中。关于产生双特异性抗体的进一步的细节,参见例如Suresh等,Methods in Enzymology(酶学方法),121:210(1986)。

[0269] 根据在WO 96/27011中所述的另一种方法,可以改变抗体分子对之间的界面以使从重组细胞培养物回收的异源二聚体的百分比最大化。优选的界面包括抗体恒定结构域的CH3区的至少一部分。在此方法中,使来自第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链被较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)取代大的氨基酸侧链,具有与一个或多个大的侧链相同或相似尺寸的补偿性“空腔”在第二抗体分子的界面上产生。这为提高异源二聚体相对其他不需要的终产物如同源二聚体的产率提供了机制。

[0270] 可以将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)。用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术已经在文献中得到描述。例如,可以使用化学键来制备双特异性抗体。Brennan等,Science(科学)229:81(1985)描述了这样的方法,其中完整抗体被蛋白水解切割以产生F(ab')₂片段。这些片段在二硫酚络合剂亚砷酸钠存在下被还原从而使邻近的二硫酚稳定并且防止分子间二硫键形成。然后将所产生的Fab'片段转变为硫代硝基苯甲酸(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原来将Fab'-TNB衍生物中的一种转变回Fab'-硫醇并且将其与等摩尔量的其他Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。可以将所产生的双特异性抗体用作酶的用于酶的选择性固定化的试剂。

[0271] 可以直接从大肠杆菌(E.coli)回收Fab'片段并且进行化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等,J.Exp.Med.(实验医学杂志)175:217-225(1992)描述了完全人源化双特异性抗体F(ab')₂分子的制备。各个Fab'片段从大肠杆菌分别地分泌并且在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。因此形成的双特异性抗体能够结合过量表达ErbB2受体的细胞以及正常人T细胞,并引发人细胞毒淋巴细胞对人乳腺癌靶标的裂解活性。

[0272] 用于制备双特异性抗体片段以及从重组细胞培养物直接分离双特异性抗体片段的多种技术也已经得到描述。例如,已经使用亮氨酸拉链来制备双特异性抗体。Kostelny等,J.Immunol.(免疫学杂志)148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽连接到两个不同抗体的Fab'部分。抗体同源二聚体的铰链区得到还原从而形成单体,然后使其再氧化以形成抗体异源二聚体。此方法也可以被用于制备抗体同源二聚体。由Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报)90:6444-6448(1993)所述的“双抗体”技术已经提供了制备双特异性抗体片段的备选机制。所述片段包含通过接头连接到轻链可变结构域(V_L)的重链可变结构域(V_H),所述接头非常短以致不允许相同链上的两个结构域的配对。因此,一个片段的V_H和V_L结构域被迫与另一个片段的互补V_L和V_H结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。通过利用单链Fv(sFv)二聚体来制备双特异性抗体片段的另一个策略也已经得到报道。参见,Gruber等,J.Immunol.(免疫学杂志)152:5368(1994)。预期有超过二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt等,J.Immunol.(免疫学杂志)147:60(1991)。

[0273] 本文中,典型的双特异性抗体可以结合指定的FGF19多肽上的两个不同表位。备选地,抗嵌合FGF19多肽多肽臂(arm)可以结合这样的臂,所述臂与白细胞上的触发分子如T细胞受体分子(例如CD2、CD3、CD28或B7)或IgG的Fc受体(Fc γ R)如Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)结合从而将细胞的防御机制集中于表达特定FGF19多肽的细胞。双特异性抗体也可以被用于使细胞毒试剂定位于表达特定FGF19多肽的细胞。这些抗体具有FGF19-结合臂以及与细胞毒试剂或放射性核素螯合剂如EOTUBE、DPTA、DOTA或TETA结合的臂。感兴趣的另一种双特异性抗体结合FGF19多肽并且还结合组织因子(TF)。

[0274] 5. 异源缀合物(heteroconjugate)抗体

[0275] 异源缀合物抗体也在本发明的范围内。异源缀合物抗体由两个共价结合的抗体组成。已经提出例如这种抗体使不想要的细胞成为免疫系统的靶标[美国专利号4,676,980],并且用于治疗HIV感染[W0 91/00360;W092/200373;EP 03089]。预期可以使用合成蛋白质化学中的已知方法(包括涉及交联剂的那些)来在体外制备该抗体。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫酸盐和甲基-4-巯基丁亚氨酸酯以及例如在美国专利号4,676,980中公开的那些。

[0276] 6. 效应子功能改造

[0277] 可能需要的是关于效应子功能来改变本发明的抗体,从而加强,例如,抗体的有效性。例如,可以将一个或多个半胱氨酸残基引入到Fc区中,由此允许在此区域中形成链间二硫键。因此产生的同源二聚抗体可以具有改善的内化能力和/或增强的补体介导的细胞致死以及依赖抗体的细胞的细胞毒性(ADCC)。参见Caron等,J. Exp. Med. (实验医学杂志),176:1191-1195(1992)和Shopes,J. Immunol. (免疫学杂志),148:2918-2922(1992)。在一个实例中,可以使用如在Wolff等,Cancer Research (癌症研究),53:2560-2565(1993)中所述异双功能交联剂来制备具有增强的抗肿瘤活性的同源二聚抗体。备选地,可以改造抗体以使其具有双Fc区并且可以由此具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等,Anti-Cancer Drug Design (抗癌药物设计),3:219-230(1989)。

[0278] 7. 免疫缀合物

[0279] 本发明还涉及免疫缀合物,所述免疫缀合物包括与细胞毒试剂缀合的抗体,所述细胞毒试剂如化疗剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物(radioconjugate))。

[0280] 以上已经描述了可以用于产生这种免疫缀合物的化疗剂。可用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A链、 α 帚曲霉素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、香石竹毒蛋白、垂序商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII、和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、多花白树毒蛋白、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和顶孢霉毒素(tricothecenes)。多种放射性核素可用于制备放射性缀合物抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0281] 使用以下试剂来制备抗体和细胞毒试剂的缀合物:双功能蛋白偶联剂如N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫酸(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二亚氨酸二甲酯HCL盐)、活性酯(如二琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮化合物

(如双(p-叠氮苯甲酰)己二胺)、双重氮杂衍生物(如双-(p-重氮杂苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯),以及双活性含氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如在Vitetta等,Science(科学),238:1098(1987)中所述那样制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳14标记的1-异硫氰酸根合苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于使放射性核苷酸与抗体缀合的典型螯合剂。参见W094/11026。

[0282] 在另一个实施方案中,抗体可以与用于肿瘤预定位的“受体”(如链霉亲和素)缀合,其中所述抗体-受体缀合物被给药于个体,之后使用清洗剂将未结合的缀合物从循环中除去,然后给药与细胞毒试剂(例如,放射性核苷酸)缀合的“配体”(例如,抗生物素蛋白)。

[0283] 8. 免疫脂质体

[0284] 本文中公开的抗体也可以被制成免疫脂质体。通过本领域中已知的方法如在Epstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),82:3688(1985);Hwang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),77:4030(1980);以及美国专利号4,485,045和4,544,545中描述的来制备包含抗体的脂质体。具有增加的循环时间的脂质体在美国专利号5,013,556中得到公开。

[0285] 可以通过反相蒸发法使用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物来制备尤其有用的脂质体。将脂质体经由具有限定孔径的滤膜挤出以产生具有所需直径的脂质体。本发明的抗体的Fab'片段可以经由二硫键互换反应与在Martin等,J.Biol.Chem.(生物化学杂志),257:286-288(1982)中所述的脂质体缀合。

[0286] 9. 抗体的药物组合物

[0287] 本文中鉴别的特异性结合FGF19多肽的抗体,以及通过上文中公开的筛选测定鉴别的其他分子,可以以药物组合物的形式被给药以用于治疗多种疾病。

[0288] 如果FGF19多肽是细胞内的并且整个抗体被用作抑制剂,则优选内在化抗体。然而,也可以将脂转染或脂质体用于将抗体或抗体片段递送到细胞中。当使用抗体片段时,优选特异性结合目标蛋白的结合结构域的最小抑制性片段。例如,基于抗体的可变区序列,可以将肽分子设计成保留结合目标蛋白序列的能力。可以化学合成和/或通过重组DNA技术制备这种肽。参见,例如,Marasco等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),90:7889-7893(1993)。当对被处理的具体适应证必要时,本文中的制剂也可以包含多于一种活性化合物,优选相互不产生不利影响的具有互补活性的那些。备选地或此外,所述组合物可以包含增强其功能的试剂,如例如,细胞毒试剂、细胞因子、化疗剂或生长抑制剂。这种分子适于以对目标用途有效的量组合地出现。

[0289] 在胶态药物递送系统(例如,脂质体、清蛋白微球、微乳状液、纳米粒和纳米胶囊)或粗乳状液中,也可以分别将活性成分包裹在例如通过凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊中,所述微胶囊例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这些技术公开于在上的Remington'sPharmaceutical Sciences中。

[0290] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这可以通过经由无菌滤膜过滤容易地实现。

[0291] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透基质,所述基质是以成形物品例如膜或微胶囊的形式存在。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和γ-乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸

共聚物如LUPRONDEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和亮丙瑞林乙酸酯组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使得分子的释放在100天以上,而某些水凝胶在较短的时间周期内释放蛋白质。当被包起来的抗体长时间留在身体中时,它们可能由于在37℃暴露于水分而变性或聚集,导致生物活性的丧失以及可能的免疫原性的变化。取决于所涉及的机制可以为稳定化提出合理的策略。例如,如果发现聚集机制是通过硫-二硫键互换的分子间S-S键形成,则可以通过修饰硫氢基残基、从酸性溶液冷冻干燥、控制水分含量、使用合适的添加剂以及开发特异性聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0292] G. 抗体的用途

[0293] 本发明的抗嵌合FGF19多肽抗体具有多种用途。例如,抗FGF19抗体可以用于对嵌合FGF19多肽的诊断测定,例如,检测其在具体细胞、组织或血清中的表达。可以使用本领域中已知的多种诊断测定技术,如在非均相或均相中进行的竞争性结合测定、直接或间接夹心测定以及免疫沉淀测定[Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques(单克隆抗体:技术手册), CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]。可以用可检测部分标记用于诊断测定的抗体。可检测部分应当能够直接或间接产生可检测信号。例如,可检测部分可以是放射性同位素如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I, 荧光或化学发光化合物如荧光素异硫氰酸酯、罗丹明或萤光素,或是酶如碱性磷酸酶、β半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。可以采用本领域中已知的用于使抗体与可检测部分缀合的任何方法,包括由Hunter等, Nature(自然), 144:945(1962); David等, Biochemistry(生物化学), 13:1014(1974); Pain等, J. Immunol. Meth. (免疫学方法杂志), 40:219(1981); 以及Nygren, J. Histochem. and Cytochem. (组织化学和细胞化学杂志), 30:407(1982)所述的那些方法。

[0294] 抗嵌合FGF19多肽抗体也被用于从重组细胞培养物或天然来源亲和纯化嵌合FGF19多肽。在此方法中,使用本领域中已知的方法将针对嵌合FGF19多肽的抗体固定在合适的支持物上,所述支持物如Sephadex树脂或滤纸。然后使被固定的抗体与含有要被纯化的嵌合FGF19多肽的样品接触,之后用合适溶剂洗涤支持物,所述溶剂将基本除去样品中除与固定的抗体结合的嵌合FGF19多肽以外的所有物质。最后,用另一种合适溶剂洗涤支持物,所述溶剂将从抗体释放嵌合FGF19多肽。

[0295] IX. 嵌合FGF19多肽的制备

[0296] 以下描述主要涉及通过培养用含有编码嵌合FGF19多肽的核酸的载体转化或转染的细胞来制备嵌合FGF19多肽。当然,预期可以使用本领域中已知的备选方法来制备嵌合FGF19多肽。例如,可以使用固相技术通过直接肽合成来制备嵌合FGF19多肽或其部分[参见,例如,Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis(固相肽合成), W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (美国化学学会杂志), 85:2149-2154(1963)]。可以例如使用手动技术或通过自动化来进行体外蛋白质合成;可以使用Applied Biosystems Peptide Synthesizer(Applied Biosystems肽合成仪)(Foster City, Calif.)使用厂商的说明来实现自动合成。可以通过化学方法分别地合成嵌合FGF19多肽的不同部分并且使用化学或酶方法使其结合以制备全长嵌合FGF19多肽。

[0297] 1. 分离编码嵌合FGF19多肽的DNA

[0298] 可以通过使用PCR方法使用编码至少部分的天然FGF19多肽和至少部分的天然

FGF21多肽的cDNA作为模板来产生编码本发明的嵌合FGF多肽的cDNA片段。例如,在一种情况中,通过标准方法分别扩增并纯化编码FGF21多肽的N端部分的cDNA片段和编码FGF19多肽的C端部分的cDNA片段,如通过使用PCR并继之以琼脂糖凝胶电泳。这样设计引物序列以致在FGF21cDNA片段的3'端和FGF19cDNA片段的5'端存在18个核苷酸的重叠。使用两种cDNA片段的混合物作为模板来进行使用PCR的第二扩增,产生编码FGF21片段和FGF19片段的嵌合多肽的cDNA。用合适的限制性酶消化所得的cDNA片段,通过琼脂糖凝胶电泳纯化,并使用标准方法将其克隆到质粒载体pRK5.sm(基于pUC的质粒载体,其含有用于哺乳动物表达的CMV启动子)。通过Sanger DNA测序法来确认所得质粒的序列。

[0299] 可以从cDNA文库获得编码嵌合FGF19多肽的DNA并且以可检测的水平表达它,所述cDNA文库从被认为具有FGF19和/或FGF21mRNA的组织制得。因此,如在实施例中所描述的,可以方便地从自人组织制得的cDNA文库获得人FGF19和/或FGF21DNA。也可以从基因组文库或通过已知的合成方法(例如,自动核酸合成)获得FGF19-和/或FGF21-编码基因。

[0300] 可以用探针(如针对FGF19和/或FGF21的抗体或具有至少约20-80个碱基的寡核苷酸)来筛选文库,所述探针被设计成识别目的基因或它编码的蛋白质。可以使用如在Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册)(纽约: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的标准方法来进行用选定的探针筛选cDNA或基因组文库。用于分离编码FGF19的基因的一个备选方法是使用PCR方法[Sambrook等,如上;Dieffenbach等,PCR Primer:A Laboratory Manual(PCR引物:实验室手册)(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1995)]。

[0301] 以下的实施例描述用于筛选cDNA文库的技术。被选作探针的寡核苷酸序列应当具有足够的长度并且十分明确以使假阳性最小化。优选地,这样标记寡核苷酸以致当杂交到被筛选的文库中的DNA时可以检测到它。标记方法在本领域中是已知的,并且包括使用放射性标记如³²P标记的ATP、生物素化或酶标记。包括中等严格和高度严格的杂交条件提供在如上的Sambrook等中。

[0302] 可以将在这种文库筛选方法中鉴别的序列与在公共数据库如GenBank或其他私有序列数据库中存放并且可用的其他已知序列进行比较和比对。可以使用本领域中已知的并如在本文中所述的方法来确定在分子限定区域内或沿全长序列的序列同一性(以氨基酸或核苷酸水平)。

[0303] 可以通过以下方式来获得具有蛋白质编码序列的核酸:使用本文中首次公开的推理出的氨基酸序列筛选选定的cDNA或基因组文库,并且必要时使用如在上面的Sambrook等中所述的常规引物延伸方法以检测不能被反转录为cDNA的mRNA的前体和处理中间体。

[0304] 2. 宿主细胞的选择和转化

[0305] 用本文中所述的用于嵌合FGF19多肽制备的表达或克隆载体转染或转化宿主细胞并且在适当地改变为诱导启动子,选择转化体,或者扩增编码所需序列的基因的常规培养基中培养。培养条件如培养基、温度、pH等可以由技术人员不需过多实验地选择。通常,可以在Mammalian Cell Biotechnology:a Practical Approach(哺乳动物细胞生物技术:实用方法),M.Butler,ed.(IRL Press,1991)以及以上的Sambrook等中发现使细胞培养产率最大化的原理、方案和实用技术。

[0306] 真核细胞转染和原核细胞转化的方法对于普通技术人员是已知的,例如,CaCl₂、

CaPO₄、脂质体介导的和电穿孔。取决于所用的宿主细胞,使用对这种细胞适当的标准技术来进行转化。如在以上的Sambrook等中所述的使用氯化钙的钙处理或电穿孔通常被用于原核生物。使用根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感染被用于转化某些植物细胞,如由Shaw等,Gene(基因),23:315(1983)和于1989年6月29日公布的W0 89/05859所述。对于不具有这样的细胞壁的哺乳动物细胞,可以使用Graham和vander Eb,Virology(病毒学),52:456-457(1978)的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转染的一般方面已经在美国专利号4,399,216中得到描述。典型地,根据Van Solingen等,J.Bact.(细菌学杂志),130:946(1977)以及Hsiao等,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)(美国科学院院报),76:3829(1979)的方法来进行向酵母中的转化。然而,也可以使用用于将DNA引入到细胞中的其他方法如通过核微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞融合或聚阳离子例如聚凝胺(polybrene)、多鸟氨酸。对于用于转化哺乳动物细胞的多种技术,参见Keown等,Methods in Enzymology(酶学方法),185:527-537(1990)以及Mansour等,Nature(自然),336:348-352(1988)。

[0307] 用于克隆或表达本文中的载体中的DNA的合适的宿主细胞包括原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。合适的原核生物包括但不限于真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如,肠细菌如大肠杆菌。多种大肠杆菌菌株是公众可获得的,如大肠杆菌K12菌株MM294(ATCC 31,446);大肠杆菌X11776(ATCC 31,537);大肠杆菌菌株W3110(ATCC 27,325)和K5772(ATCC 53,635)。其他合适的原核宿主细胞包括肠细菌如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如,大肠杆菌、肠杆菌(*Enterobacter*)、欧文氏菌(*Erwinia*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、变形菌(*Proteus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌(*Serratia*)例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和志贺氏菌(*Shigella*),以及芽孢杆菌(*Bacilli*)如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)(例如,在于1989年4月12日公布的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P)、假单胞菌(*Pseudomonas*)如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)以及链霉菌(*Streptomyces*)。这些实例是示例性的而不是限制性的。菌株W3110是一种尤其优选的宿主或亲本宿主,原因在于它是用于重组DNA产物发酵的通常宿主菌株。优选地,宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如,可以改造菌株W3110以在编码宿主的内源蛋白的基因中引起遗传突变,这种宿主的实例包括大肠杆菌W3110菌株1A2,该菌株具有完整的基因型tonA;大肠杆菌W3110菌株9E4,该菌株具有完整的基因型tonA ptr3;大肠杆菌W3110菌株27C7(ATCC 55,244),该菌株具有完整的基因型tonA ptr3 phoAE15(argF-lac)169degP ompT kan^r;大肠杆菌W3110菌株37D6,该菌株具有完整的基因型tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169degP ompT rbs7 ilvGkan^r;大肠杆菌W3110菌株40B4,该菌株是菌株37D6的不具有卡那霉素抗性的degP缺失突变;以及在于1990年8月7日颁布的美国专利号4,946,783中公开的具有突变的周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。备选地,体外克隆方法例如PCR或其他核酸聚合酶反应是合适的。

[0308] 除了原核微生物,真核微生物如丝状真菌(filamentous fungi)或酵母是FGF19编码载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种常用的低等真核宿主微生物。其他包括栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)(Beach和Nurse,Nature(自然),290:140[1981];EP 139,3831985年5月2日出版);克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces*)宿主(美国专利号4,943,529;Fleer等,Bio/Technology(生物技术),9:

968-975(1991))如,例如,乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)(MW98-8C、CBS683、CBS4574; Louvencourt等, *J.Bacteriol.*(细菌杂志),154(2):737-742[1983])、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*)(ATCC 16,045)、wickeramii克鲁维酵母(*K.wickeramii*)(ATCC 24,178)、waltii克鲁维酵母(*K.waltii*)(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*)(ATCC 36,906; Van den Berg等, *Bio/Technology*(生物技术),8:135(1990))、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*); 耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP 402,226); 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070; Sreekrishna等, *J.Basic Microbiol.*(基础微生物学杂志),28:265-278[1988]); 假丝酵母(*Candida*); reesia木霉菌(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)(Case等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*(美国科学院院报),76:5259-5263[1979]); 许旺酵母(*Schwanniomyces*)如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)(公布于1990年10月31日的EP 394,538); 以及丝状真菌如,例如,脉孢菌(*Neurospora*)、青霉菌(*Penicillium*)、雪状白僵菌(*Tolypocladium*)(1991年1月10日公布的WO 91/00357)和曲霉菌(*Aspergillus*)宿主如构巢曲霉菌(*A.nidulans*)(Ballance等, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*(生物化学与生物物理学研究通讯),112:284-289[1983]; Tilburn等, *Gene*(基因),26:205-221[1983]; Yelton等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*(美国科学院院报),81:1470-1474[1984])以及黑曲霉菌(*A.niger*)(Kelly和Hynes, *EMBO J.*(欧洲分子生物学学会杂志),4:475-479[1985])。甲醇酵母(*Methylotropic yeast*)在本文中是合适的并且包括但不限于选自以下各项组成的属的能够依靠甲醇生长的酵母: 汉逊酵母(*Hansenula*)、假丝酵母、克勒克酵母(*Kloeckera*)、毕赤酵母、酵母菌(*Saccharomyces*)、球拟酵母(*Torulopsis*)和深红酵母(*Rhodotorula*)。作为典型的此类酵母的具体物种的列表可以在C.Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*(甲基营养菌的生物化学),269(1982)中找到。

[0309] 用于表达被糖基化的嵌合FGF19多肽的合适的宿主细胞来源于多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括昆虫细胞如果蝇S2和贪夜蛾(*Spodoptera*)Sf9,以及植物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)和COS细胞。更具体的实例包括转染有SV40的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾细胞系(293细胞或被亚克隆以用于在悬浮培养中生长的293细胞, Graham等, *J.Gen Virol.*(遗传病毒学杂志),36:59(1977)); 中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub和Chasin, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*(美国科学院院报),77:4216(1980)); 小鼠塞托立(*Sertoli*)细胞(TM4, Mather, *Biol.Reprod.*(繁殖生物学),23:243-251(1980)); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(HepG2, HB 8065); 以及小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)。对适当宿主细胞的选择被认为是在本领域的技术范围内。

[0310] 3. 选择和使用可复制载体

[0311] 可以将编码嵌合FGF19多肽的核酸(例如, cDNA或基因组DNA)插入到可复制载体以用于克隆(DNA的扩增)或用于表达。多种载体是公众可获得的。载体可以是以例如质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式存在。可以通过多种方法将适当的核酸序列插入到载体中。通常, 使用本领域中已知的技术将DNA插入到一个或多个合适的限制性内切酶位点。载体的部件通常包括但不限于一个或多个信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、

启动子和转录终止序列。采用本领域技术人员已知的标准连接技术来构建包含这些部件中的一个或多个的合适载体。

[0312] 嵌合FGF19多肽不但可以直接地通过重组方法制备,而且还可以作为与异源多肽的融合多肽得到制备,所述异源多肽可以是信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N末端具有特异性切割位点的其他多肽。通常,信号序列可以是载体的部件,或者它可以是被插入到载体中的嵌合FGF19多肽编码DNA的部分。信号序列可以是FGF19或FGF21如hFGF19或hFGF21的原始信号序列。因此,在这样的实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽可以包括至少pre-hFGF19的N端部分,如至少SEQ ID NO:3的残基1-22。在这样的实施方案中,本发明的嵌合FGF19多肽可以包括至少pre-hFGF1的N端部分,如至少SEQ ID NO:4的残基1-28。

[0313] 信号序列可以是选自例如以下组的原核信号序列:碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定肠毒素II前导区。对于酵母分泌,信号序列可以是例如酵母转化酶前导区、 α 因子前导区(包括酵母和克鲁维酵母 α 因子前导区,后者在美国专利号5,010,182中得到描述)或酸性磷酸酶前导区、白色念珠菌(*C.albicans*)葡糖淀粉酶前导区(1990年4月4日公布的EP 362,179),或在1990年11月15日公布的WO 90/13646中描述的信号。在哺乳动物细胞表达中,可以将哺乳动物信号序列用于指引蛋白质的分泌,如来自相同或相关物种的分泌多肽的信号序列,以及病毒的分泌前导区。

[0314] 表达和克隆载体两者都含有使载体能够在一种或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。这种序列对于多种细菌、酵母和病毒是公知的。来自质粒pBR322的复制起点适用于大多数革兰氏阴性菌,2 μ 质粒起点适用于酵母,而多种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)可以用作哺乳动物细胞中的克隆载体。

[0315] 表达和克隆载体典型地将包含选择基因,其也被称为选择性标记。典型的选择基因编码这样的蛋白质,所述蛋白质(a)给予对抗生素或其他毒素例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素的耐受,(b)互补营养缺陷型缺陷,或者(c)提供不能从复合培养基中获得的重要营养素,例如,编码芽孢杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0316] 用于哺乳动物细胞的合适的选择性标记是使得能够鉴别有能力吸收FGF19编码核酸的细胞的那些,如DHFR或胸苷激酶。当使用野生型DHFR时,适当的宿主细胞是如Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),77:4216(1980)所述那样制备和繁殖的缺乏DHFR活性的CHO细胞系。用于酵母的合适的选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因[Stinchcomb等,Nature(自然),282:39(1979);Kingsman等,Gene(基因),7:141(1979);Tschemper等,Gene(基因),10:157(1980)]。trp1基因为不能在色氨酸中生长的酵母的突变菌株(例如ATCC号44076或PEP4-1)提供选择标记[Jones,Genetics(遗传学),85:12(1977)]。

[0317] 表达和克隆载体通常含有与FGF19编码核酸序列可操作相连的启动子从而指导mRNA合成。被多种潜在宿主细胞识别的启动子是为人所熟知的。适于与原核宿主一起使用的启动子包括 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统[Chang等,Nature(自然),275:615(1978);Goeddel等,Nature(自然),281:544(1979)]、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统[Goeddel,NucleicAcids Res.(核酸研究),8:4057(1980);EP 36,776]和杂合启动子如tac启动子[deBoer等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),80:21-25(1983)]。用于细菌系统中的启动子也包含与编码FGF19的DNA可操作相连的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0318] 用于与酵母宿主一起使用的合适的启动序列的实例包括以下酶的启动子:3-磷酸甘油酸激酶[Hitzeman等,J.Biol.Chem.(生物化学杂志),255:2073(1980)]或其他糖解酶[Hess等,J.Adv.Enzyme Reg.(酶调节进展),7:149(1968);Holland,Biochemistry(生物化学),17:4900(1978)],如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0319] 作为具有通过生长条件来控制转录的额外优势的可诱导启动子,其他酵母启动子有以下各蛋白的启动子区域:醇脱氢酶2、异细胞色素(isocytochrome)C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。用于酵母表达中的合适的载体和启动子在EP 73,657中得到进一步描述。

[0320] 通过例如从病毒如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公布的UK2,211,504)、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和猴病毒40(SV40)的基因组获得的启动子,从异源哺乳动物启动子获得的启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,以及从热休克启动子获得的启动子(假设这些启动子与宿主细胞系统相容)来控制哺乳动物宿主细胞中从载体的转录。

[0321] 可以通过将增强子序列插入到载体中来增强高等真核生物对编码嵌合FGF19多肽的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常为约10至300bp,其作用于启动子以增强它的转录。目前已知很多来自哺乳动物基因的增强子序列(球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 α -胎蛋白质和胰岛素)。然而,典型地,将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括复制起点晚期侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。增强子可以被接合到载体中的嵌合FGF19多肽编码序列的5'位置或3'位置处,但是优选地位于启动子的5'位点。

[0322] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物的成核细胞)中的表达载体还将包含终止转录和稳定mRNA所需的序列。这种序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'和(偶尔的)3'未翻译区获得。这些区域包含作为编码嵌合FGF19多肽的mRNA的未翻译部分中的多腺苷酸化片段转录的核苷酸区段。

[0323] 适用于嵌合FGF19多肽在重组脊椎动物细胞培养中的合成的其他方法、载体和宿主细胞在Gething等,Nature(自然),293:620-625(1981);Mantei等,Nature(自然),281:40-46(1979);EP 117,060;和EP 117,058中得到描述。

[0324] 4. 检测基因扩增/表达

[0325] 可以基于本文中提供的序列,使用适当标记的探针,直接通过例如常规Southern印迹法、Northern印迹法[Thomas,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报),77:5201-5205(1980)]、斑点印迹法(DNA分析)或原位杂交以量化mRNA的转录来测量样品中的基因扩增和/或表达。备选地,可以采用这样的抗体,所述抗体可以识别特异性双链体,包括DNA双链体、RNA双链体和DNA-RNA杂合双链体或DNA-蛋白质双链体。又可以使抗体被标记,并且可以在双链体结合到表面时进行测定,以致当双链体在表面形成时,可以检测到结合到双链体的抗体的存在。

[0326] 备选地,可以通过以下方法来测量基因表达:免疫方法如对细胞或组织切片的免疫组化染色以及测定细胞培养物或体液以直接量化基因产物的表达。可用于免疫组化染色

和/或测定样品液的抗体可以是单克隆或多克隆,并且可以在任何哺乳动物中制备。可以方便地制备针对嵌合FGF19多肽或合成肽的抗体,所述合成肽是基于本文中提供的DNA序列或是针对融合到编码嵌合FGF19多肽以及编码特异性抗体表位的DNA的外源序列。

[0327] 5.多肽的纯化

[0328] 可以从培养基或宿主细胞裂解液回收多种形式的嵌合FGF19多肽。如果是膜结合的,则可以使用合适的去垢剂溶液(例如Triton-X 100)或通过酶切来使其从膜释放。可以通过多种物理或化学方法如冻融循环、超声、机械破碎或细胞裂解试剂来破裂用于表达嵌合FGF19多肽的细胞。

[0329] 可能需要的是从重组细胞蛋白或多肽纯化嵌合FGF19多肽。以下方法是合适纯化方法的示例:通过在离子交换柱上的分部分离;乙醇沉淀;反相HPLC;在二氧化硅或在阳离子交换树脂如DEAE上的层析;色谱聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤;除去污染物如IgG的蛋白质A Sepharose柱;以及结合表位标记形式的嵌合FGF19多肽的金属螯合柱。可以使用多种蛋白纯化方法并且这些方法在本领域中是已知的并在例如Deutscher, Methods in Enzymology(酶学方法),182(1990);Scopes, Protein Purification: Principles and Practice(蛋白纯化:原理和实践),Springer-Verlag,纽约(1982)中得到描述。所选择的一个或多个纯化步骤将取决于例如所用的生产方法和所产生的特定嵌合FGF19多肽的性质。

[0330] X.编码嵌合FGF19多肽的核酸以及它们的用途

[0331] 在另一方面中,本发明包括本发明的编码嵌合FGF19多肽的核苷酸序列(或“嵌合FGF19核酸”)(或它们的互补序列)。本发明的嵌合FGF19核酸在分子生物学领域中具有多种应用,包括用作杂交探针,在染色体和基因定位(mapping)中以及在反义RNA和DNA的产生中。嵌合FGF19核酸也将可以用于通过本文中所述的重组技术来制备嵌合FGF19多肽。

[0332] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以包括一个或多个表位标签。在一些实施方案中,表位标签位于嵌合FGF19多肽的N末端。在一些实施方案中,表位标签位于嵌合FGF19多肽的C末端。在一些实施方案中,表位标签位于嵌合FGF19多肽的N末端。

[0333] 在一些实施方案中,嵌合FGF19多肽可以包括一个或多个表位标签。在一些实施方案中,表位标签位于嵌合FGF19多肽的N末端。在一些实施方案中,表位标签位于嵌合FGF19多肽的C末端。在一些实施方案中,表位标签位于嵌合FGF19多肽的N末端。在一些实施方案中,表位标签包含氨基酸序列DYKDDDDK(SEQ ID NO:279)。

[0334] 在示例的实施方案中,本发明的嵌合FGF19核酸包括以下序列:
CACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACCTCCGGCCC
CCACGGGCTCTCCAGCTGCTTCCTGCGCATCCGTGCCACGGCGTCGTGGACTGCGCGCGGGGCCAGAGCGCGCACA
GTTTGCTGGAGATCAAGGCAGTCGCTCTGCGGACCGTGGCCATCAAGGGCGTGACAGCGTGCGGTACCTCTGCATG
GGCGCCGACGGCAAGATGCAGGGGCTGCTTCAGTACTCGGAGGAAGACTGTGCTTTCGAGGAGGAGATCCGCCCAGA
TGGCTACAATGTGTACCGATCCGAGAAGCACCGCCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAGCTGTACA
AGAACAGAGGCTTTCTTCCACTCTCTCATTTCTGCCATGCTGCCCATGGTCCCAGAGGAGCCTGAGGACCTCAGG
GGCCACTTGGAATCTGACATGTTCTCTTCGCCCTGGAGACCGACAGCATGGACCCATTTGGGCTTGTACCGGACT
GGAGGCCGTGAGGAGTCCCAGCTTTGAGAAG(SEQ ID NO:7)。此示例核酸序列编码具有对应于嵌合
FGF19多肽cFGF21/19-2的氨基酸序列的多肽,如在表3中所示。

[0335] 在另一示例实施方案中,本发明的嵌合FGF19核酸包括以下序列:
ATGGACTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGgCTGTGGGTTTCTGTGCTGGCTGGTCTTCTGCTGGGAGCCTG
CCAGGCACACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTCCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACCT
CCGGCCCCCACGGGCTCTCCAGCTGCTTCTGCGCATCCGTGCCGACGGCGTCGTGGACTGCGCGCGGGGCCAGAGC
GCGCACAGTTTGTGAGATCAAGGCAGTCGCTCTGCGGACCGTGGCCATCAAGGGCGTGACAGCGTGCAGGTACCT
CTGCATGGGCGCCGACGGCAAGATGCAGGGGCTGCTTCAGTACTCGGAGGAAGACTGTGCTTTCGAGGAGGAGATCC
GCCAGATGGCTACAATGTGTACCGATCCGAGAAGCACCGCCTCCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAG
CTGTACAAGAACAGAGGCTTTCTTCCACTCTCTCATTTCTGCCCATGCTGCCCATGGTCCCAGAGGAGCCTGAGGA
CCTCAGGGGCCACTTGGAATCTGACATGTTCTTTCGCCCCCTGGAGACCGACAGCATGGACCCATTTGGGCTTGTC
CCGACTGGAGGCCGTGAGGAGTCCCAGCTTTGAGAAGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTGA(SEQ ID NO:
281)。此示例核酸序列编码具有包含嵌合FGF19多肽cFGF21/19-2的序列的氨基酸序列的多
肽,如在表3中所示。该多肽也包含C端表位标签DYKDDDK(SEQ ID NO:280)和hFGF21多肽的N
端天然信号序列(MDSDETFEHSGLWVSVLAGLLLGACQA;SEQ ID NO:282)。

[0336] 在另一示例实施方案中,本发明的嵌合FGF19核酸包括以下序列:
ATGCGGAGCGGGTGTGTGGTGGTCCACGTATGGATCCTGGCCGGCCTCTGGCTGGCCGTGGCCGGGCGCCCCCTCGC
CTTCTCGGACGCGGGGCCCCACGTGCACTACGGCTGGGGCGACCCCATCCGCCTGCGGCACCTGTACACAGATGATG
CCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCCGAAAGT
CTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTGCCAGCG
GCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTGAGGACG
GATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACGGGACCCCT
GCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCTGCCACTACCAGGCCTGCCCCCGCACTCCCGGAGCCACCCGGAATCCTGGC
CCCCCAGCCCCCGATGTGGGCTCCTCGGACCCCTCTGAGCATGGTGGGACCTTCCCAGGGCCGAAGCCCCAGCTACG
CTTCCGACTACAAGGACGACGATGACAAGTGA(SEQ ID NO:283)。

[0337] 此示例核酸序列编码具有包含嵌合FGF19多肽cFGF19/21-2的序列的氨基酸序列的
多肽,如在表6中所示。该多肽也包含C端表位标签DYKDDDK(SEQ ID NO:280)和hFGF19多
肽的N端天然信号序列(MRSGCVVHVWILAGLWLAVAG;SEQ ID NO:284)。

[0338] 在另一示例实施方案中,本发明的嵌合FGF19核酸包括以下序列:
ATGGAcTCGGACGAGACCGGGTTCGAGCACTCAGGGCTGTGGGTTTCTGTGCTGGCTGGTCTTCTGCTGGGAGCCTG
CCAGGCACACCCCATCCCTGACTCCAGTCCTCTCCTGCAATTCGGGGGCCAAGTCCGGCAGCGGTACCTCTACACAG
ATGATGCCCAGCAGACAGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGGACGGTGGGGGGCGCTGCTGACCAGAGCCCC
GAAAGTCTCCTGCAGCTGAAAGCCTTGAAGCCGGGAGTTATTCAAATCTTGGGAGTCAAGACATCCAGGTTCTGTG
CCAGCGGCCAGATGGGGCCCTGTATGGATCGCTCCACTTTGACCCCTGAGGCCTGCAGCTTCCGGGAGCTGCTTCTTG
AGGACGGATACAATGTTTACCAGTCCGAAGCCACGGCCTCCCGCTGCACCTGCCAGGGAACAAGTCCCCACACCGG
GACCCCTGCACCCCGAGGACCAGCTCGCTTCTTCCACTCTCTCATTTCTGCCCATGCTGCCCATGGTCCCAGAGGA
GCCTGAGGACCTCAGGGGCCACTTGGAATCTGACATGTTCTTTCGCCCCCTGGAGACCGACAGCATGGACCCATTTG
GGCTTGTCACCGGACTGGAGGCCGTGAGGAGTCCCAGCTTTGAGAAGGACTACAAAG ACGATGACGACAAGTGA
(SEQ ID NO:285)。

[0339] 此示例核酸序列编码具有包含嵌合FGF19多肽cFGF21/19-13的序列的氨基酸序列的
多肽,如在表5中所示。该多肽也包含C端表位标签DYKDDDK(SEQ ID NO:280)和hFGF21多

肽的N端天然信号序列(MDSDETGFHSGSLWVSVLAGLLLGACQA;SEQ ID NO:282)。

[0340] hFGF19基因的全长天然核酸序列,FGF21基因的全长天然核酸序列,本发明的嵌合FGF19多肽的全长天然核酸序列或前述中任何一个的部分,可以被用于检测或筛选编码本发明的嵌合FGF19多肽的核酸的杂交探针。任选地,探针的长度将是约20至约50个碱基。例如,筛选方法将包括使用已知DNA序列合成具有约40个碱基的选定的探针来分离FGF19基因的编码区。可以用多种标记物来标记杂交探针,所述标记物包括放射性核苷酸如³²P或³⁵S,或经由抗生物素蛋白/生物素偶联系统偶联到探针的酶标记如碱性磷酸酶。具有与本发明的FGF19基因的序列互补的序列的经标记的探针可以被用于筛选cDNA、基因组DNA或mRNA的文库以确定探针与这些文库中的那些成员杂交。杂交技术在以下实施例中得到进一步详细描述。

[0341] 相似地,可以使用本文中公开的方法将在本申请中公开的任何EST序列用作探针。

[0342] 嵌合FGF19核酸的其他有用片段包括这样的反义或正义寡核苷酸,所述反义或正义寡核苷酸包含能够与目标嵌合FGF19mRNA(正义)或嵌合FGF19DNA(反义)序列结合的单链核酸序列(RNA或DNA)。根据本发明,反义或正义寡核苷酸包含嵌合FGF19DNA的编码区的片段。这种片段通常包含至少约14个核苷酸,优选约14至30个核苷酸。基于编码指定蛋白的cDNA序列,驱动反义或正义寡核苷酸的能力在例如Stein和Cohen(Cancer Res.(癌症研究)48:2659,1988)以及van der Krol等(BioTechniques(生物技术)6:958,1988)中得到描述。

[0343] 反义或正义寡核苷酸与目标核酸序列的结合导致双链体的形成,所述双链体通过若干方式中的一种来阻止目标序列的转录或翻译,所述若干方式包括双链体的增强的降解,转录或翻译的过早终止,或其他方式。因此,反义寡核苷酸可以被用于阻止嵌合FGF19多肽的表达。反义或正义寡核苷酸还包括这样的寡核苷酸,其具有经修饰的糖-磷酸二酯骨架(或其他糖键,如在W0 91/06629中所述的那些),并且其中这些糖键对内源核酸酶有抵抗力。这些含有有抵抗力的糖键的寡核苷酸在体内是稳定的(即,能够抵抗酶降解)而且保留了能够与目标核苷酸序列结合的序列特异性。

[0344] 正义或反义寡核苷酸的其他实例包括与有机部分(如在W0 90/10048中所述的那些)以及增加寡核苷酸对目标核酸序列的亲和其他部分(如聚-(L-赖氨酸))共价连接的那些寡核苷酸。此外,可以将插入剂(如椭圆玫瑰树碱)和烷化剂或金属络合物连接到正义或反义寡核苷酸以改变反义或正义寡核苷酸对目标核苷酸序列的结合特异性。

[0345] 可以通过任何基因转移方法将反义或正义寡核苷酸引入到包含目标核酸序列的细胞中,所述基因转移方法包括例如CaPO₄介导的DNA转染;电穿孔,或使用基因转移载体如Epstein-Barr病毒。在优选的方法中,将反义或正义寡核苷酸插入到合适的反转录病毒载体。将包含目标核酸序列的细胞在体内或体外与重组反转录病毒载体接触。合适的反转录病毒载体包括但不限于来源于鼠反转录病毒M-MuLV、N2(来源于M-MuLV的反转录病毒)的那些,或被称为DCT5A、DCT5B和DCT5C的双拷贝载体(参见W0 90/13641)。

[0346] 也可以通过与配体结合分子形成缀合物来将正义或反义寡核苷酸引入到包含目标核苷酸序列的细胞中,如在W0 91/04753中所述。合适的配体结合分子包括但不限于细胞表面受体、生长因子、其他细胞因子或与细胞表面受体结合的其他配体。优选地,配体结合分子的缀合基本不妨碍配体结合分子结合其对应的分子或受体的能力,或基本不阻碍正义或反义寡核苷酸或其缀合形式进入细胞。

[0347] 备选地,可以通过形成寡核苷酸-脂质复合体来将正义或反义寡核苷酸引入到包含目标核酸序列的细胞中,如在WO 90/10448中所述。优选地,正义或反义寡核苷酸-脂质复合体在细胞内被内源的脂酶解离。

[0348] 也可以将探针用于PCR技术以产生用于鉴别密切相关的嵌合FGF19编码序列的序列库。

[0349] 也可以将编码嵌合FGF19多肽的核酸用于基因疗法中。在基因疗法应用中,将基因引入到细胞中以实现治疗有效遗传产品的体内合成,例如取代缺陷基因。“基因疗法”包括常规基因疗法和给药基因治疗药剂两者,在所述常规基因疗法中通过单次治疗来实现持续效果,而所述给药基因治疗药剂包括一次或重复给药治疗有效的DNA或mRNA。可以将反义RNA和DNA用作用于阻止特定基因在体内表达的治疗药剂。已经显示可以将短的反义寡核苷酸输入到细胞中,在所述细胞中它们充当抑制剂,尽管细胞膜使其吸收受限从而导致它们在胞内的浓度低。(Zamecnik等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报)83:4143-4146[1986])。可以改造寡核苷酸以增强其吸收,例如通过用不带电的基团取代它们带负电的磷酸二酯基团。

[0350] 多种技术可用于将核酸引入到活细胞中。所述技术取决于是在体外将核酸转移到培养的细胞中还是在体内将核酸转移到目的宿主的细胞中而不同。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀法等。目前优选的体内基因转移技术包括用病毒(典型地反转录病毒)载体转染和病毒外壳蛋白-脂质体介导的转染(Dzau等,Trends in Biotechnology(生物技术趋势)11, 205-210[1993])。在某些情况中,需要的是提供具有定位到目标细胞的药剂的核酸源,所述药剂如对细胞表面膜蛋白或目标细胞特异的抗体,目标细胞上的受体的配体等。当使用脂质体时,与胞吞相关的细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可以被用于定位和/或促进摄取,例如具有对特定细胞类型的向性的衣壳蛋白或其片段,在循环中经历内化的蛋白的抗体,在细胞内局部定位并且增强胞内半衰期的蛋白质。例如,Wu等,J.Biol.Chem.(生物化学杂志)262,4429-4432(1987);以及Wagner等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院院报)87, 3410-3414(1990)描述了受体介导的胞吞技术。要回顾基因标记和基因疗法流程,请参见Anderson等,Science(科学)256,808-813(1992)。

[0351] X. 制品

[0352] 在本发明的另一个实施方案中,提供含有可以用于治疗上述代谢相关疾病、病症或症状的物质的制品。优选地,所述制品包括:(a)容器,在所述容器内装有包含本文所述的嵌合FGF19多肽和药用载体或稀释剂的组合物;以及(b)药品说明书,所述药品说明书具有对将所述组合物给药于遭受或展示代谢相关疾病、病症或症状的个体的说明。

[0353] 在一些实施方案中,个体具有代谢相关疾病、病症或症状。在一些实施方案中,个体处于发展出代谢相关疾病、病症或症状的风险中。在一些实施方案中,个体具有选自以下组成的组的一种或多种特征:(a)男性具有约102cm以上的腰围而女性具有约88cm以上的腰围,(b)禁食甘油三酯为约150mg/dL以上,(c)禁食葡萄糖为约95mg/dL以上,以及(d)高水平的氧化LDL。在一些实施方案中,个体还具有与糖尿病相关的炎症。在一些实施方案中,在过夜禁食后个体的血糖水平为约95mg/dL以上。在一些实施方案中,在过夜禁食后个体的血糖水平为约126mg/dL以上。在一些实施方案中,在两小时口服葡萄糖耐受测试后个体的血

糖水平为约140mg/dL。在一些实施方案中,在两小时口服葡萄糖耐受测试后个体的血糖水平为约200mg/dL。在一些实施方案中,个体具有前驱糖尿病。在一些实施方案中,个体具有糖尿病。在一些实施方案中,糖尿病选自由以下组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病和妊娠糖尿病。在一些实施方案中,糖尿病是II型糖尿病。

[0354] 所述制品包括容器和在所述容器上或与所述容器相关联的标签或药品说明书。合适的容器包括例如瓶、针剂药水瓶(vial)、注射器等。容器可由多种物质(如玻璃或塑料)形成。容器盛有或容纳对于治疗多发性硬化有效的组合物并且可以具有无菌接入端(例如该容器可以是静脉溶液包或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的瓶)。组合物中的至少一种活性药剂是嵌合FGF19多肽。标签或药品说明书表明该组合物在关于抗体和提供的任何其他药物的用量和间隔时间的具体指导下被用于治疗遭受代谢相关疾病、病症或症状的个体的代谢相关疾病、病症或症状。该制品还可以包括第二容器,所述第二容器包含药用稀释缓冲液,如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲液、Ringer氏溶液和葡萄糖溶液。该制品还可以包括从商业和使用者角度看是需要的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0355] 任选地,本文中的制品还包括盛有除治疗用多肽外的第二试剂的容器,并且还包含有关使用这种药剂治疗哺乳动物的说明。在一些实施方案中,第二试剂是消炎剂、抗糖尿病剂和/或“他汀”类降胆固醇药。在一些实施方案中,第二活性药剂是胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是速效、短效、长效、间歇作用或长效胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是和/或包含优泌乐(Humalog)、赖脯胰岛素(Lispro)、Novolog、Apidra、优泌林(Humulin)、门冬胰岛素(Aspart)、常规胰岛素、NPH、Lente(人胰岛素锌混悬液)、Ultralente、来得时(Lantus)、甘精胰岛素(Glargine)、Levemir、或Detemir。在一些实施方案中,第二活性药剂是他汀。在一些实施方案中,他汀是和/或包含阿托伐他汀(Atorvastatin)(例如,立普妥(Lipitor)或Torvast)、西立伐他汀(Cerivastatin)(例如,Lipobay或拜可(Baycol))、氟伐他汀(Fluvastatin)(例如,来适可(Lescol)或来适可(Lescol))、洛伐他汀(Lovastatin)(例如,美降脂(Mevacor)、Altacor或Altoprev)、美伐他汀(Mevastatin)、匹伐他汀(Pitavastatin)(例如,Livalo或Pitava)、普伐他汀(Pravastatin)(例如,普拉固(Pravachol)、Selektine或Lipostat)、罗苏伐他汀(Rosuvastatin)(例如,克来斯妥(Crestor))、辛伐他汀(Simvastatin)(例如,舒降之(Zocor)或Lipex)、Vytorin、Advicor、Besylate(苯磺酸盐)Caduet或辛可(Simcor)。

[0356] 使用“药品说明书”来指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其包含关于指示、用法、剂量、给药、禁忌、与所包装产品结合的其他治疗产品和/或关于使用这些治疗产品的警告等的信息。

[0357] 以下实施例仅因例示目的而被给出,并且无论如何不意在限制本发明的范围。

[0358] 在本说明书中引用的所用专利和文献参考通过引用完整地结合于此。

实施例

[0359] 除非另有说明,根据生产商的说明来使用实施例中涉及的市售试剂。在以下实施例中并且贯穿本说明书,通过ATCC编号识别的细胞的来源是American Type Culture Collection(美国典型培养物保藏中心),Manassas,VA。除非另有说明,在37℃在5%的CO₂

下在补充有10%胎牛血清(FBS)的Dulbecco's改进Eagle培养基(DMEM)中培养细胞。

[0360] 实施例1:嵌合和天然FGF多肽的不依赖KLB的FGFR结合活性

[0361] 使用酶联免疫吸附测定(ELISA)来在体外测量本发明的嵌合FGF多肽的FGF受体结合活性。参考图3A(顶部),描绘了用于测量FGF受体(FGFR)体外结合活性及其相应对照的ELISA的示意图。

[0362] 通过用100 μ l/孔的2 μ g/ml抗体溶液过夜孵育,将对人IgG-Fc片段特异的单克隆抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)固定在Maxisorp™平底96孔板(Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, 纽约)的孔中。然后用1 μ g/ml的FGFR4-Fc(重组多肽,其包含融合到人IgG1Fc片段的人FGFR4胞外结构域;产品目录号685-FR-050, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota)或1 μ g/ml FGFR1c-Fc(重组多肽,其包含融合到人IgG1Fc片段的人FGFR1c胞外结构域;产品目录号658-FR-050, R&D Systems)来孵育每个孔。

[0363] 将表面固定的FGFR4-Fc或FGFR1c-Fc多肽以1 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.16 μ g/mL、0.064 μ g/mL、0.0256 μ g/mL、0.004096 μ g/mL或0.0016384 μ g/mL的浓度与具有C端表位标签的天然人FGF19-Flag多肽(参见表10中的FGF19-Flag, SEQ ID NO:237)孵育1hr,各自具有2 μ g/mL肝素,从而允许FGF19多肽与受体结构域结合。相似地,将表面固定的FGFR4-Fc或FGFR1c-Fc多肽以1 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.16 μ g/mL、0.064 μ g/mL、0.0256 μ g/mL、0.004096 μ g/mL或0.0016384 μ g/mL的浓度与具有C端表位标签的嵌合FGF19多肽(参见表10中的cFGF21/19-2/Flag; SEQ ID NO:242)孵育1hr,各自具有2 μ g/mL肝素,从而允许嵌合FGF19多肽与受体结构域结合。孵育后,使用生物素化的抗人FGF19多克隆抗体(产品目录号BAF969, R&D Systems)、链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP)(产品目录号RPN1231V, Amersham Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania)和3,3',5,5'-四甲联苯胺底物(产品目录号TMBE-1000, Moss, Inc., Pasadena, Maryland),并且通过HRP相关产物在450nm处的吸收测量其浓度,确定在指定的FGF19多肽浓度与受体结构域结合的天然或嵌合FGF19多肽的量。进行对照ELISA实验以证明抗人FGF19多克隆抗体以相当的效率识别天然和嵌合FGF19多肽(数据未示)。

[0364] 参考图3A,与表面固定的FGFR4-Fc或FGFR1c-Fc多肽的体外FGFR结合测定的结果显示天然人FGF19多肽以依赖浓度、不依赖Klotho-beta的方式与FGFR4-Fc结合,但是根本不结合FGFR1c-Fc。没有检测到嵌合FGFR19多肽(cFGF21/19-2/Flag; SEQ ID NO:242)与FGFR4-Fc或FGFR1c-Fc的不依赖Klotho-beta的结合。

[0365] 参考图3B,描绘了FGFR激活测定的示意图。在此测定中,瞬时转染的L6细胞在它们的细胞表面表达FGF受体,如人FGFR1c或人FGFR4。配体与FGF受体的有效结合可以导致内源MAP激酶通路的激活,其可以导致具有Elk-1激活结构域和GAL4DNA-结合结构域的嵌合转录激活子的磷酸化。磷酸化的转录激活子可以激活在合适的上游激活序列(UAS)(如酵母GAL4UAS)的控制下的报告基因的表达。该报告基因可以编码酶如荧光素酶,尤其是萤火虫荧光素酶。还可以用组成型表达的海肾荧光素酶来转染L6细胞,所述海肾荧光素酶可以充当可诱导的萤火虫荧光素酶的归一化对照。

[0366] 在此测定中,用编码人FGFR4多肽的表达载体、编码GAL4-Elk-1转录激活子的表达载体(产品目录号219005, pFA2-Elk1, Stratagene, La Jolla, California)、编码在酵母GAL4上游激活子的控制下的萤火虫荧光素酶报告基因的表达载体(产品目录号219050, pFR-

luc, Stratagene) 瞬时转染 96 孔板中的大鼠 L6 成肌细胞。将用于海肾荧光素酶的组成型表达的载体(产品目录号 E2231, pRL-SV40, Promega, Madison, Wisconsin) 也转染到细胞中。使用 FuGENE HD 转染试剂(产品目录号 04 709 705 001, Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana) 根据生产商的说明来进行转染。

[0367] 在含有 10% FBS(产品目录号 F2442, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) 的 DMEM (制备自 Cellgro 50-013-PC, Mediatech, Inc., Manassas, Virginia) 中过夜培养经转染的 L6 细胞。然后将细胞在来自 F12/DME 50:50 混合液的含有 25mg/L 猪肝素和指定浓度的 FGF19 多肽的富集无血清培养基中清洗并培养另外的 6 小时。测定的 FGF19 多肽是天然 FGF19-Flag 多肽(参见表 10 中的 FGF19-Flag; SEQ ID NO: 237)、天然 FGF21-His 多肽(参见表 10 中的 FGF21-His; SEQ ID NO: 238) 和嵌合 FGF19-Flag 多肽(参见表 10 中的 cFGF21/19-2/Flag; SEQ ID NO: 242)。用浓度为 10 μ g/mL、1666.7ng/mL、277.8ng/mL、46.3ng/mL、7.7ng/mL、1.3ng/mL、0.21ng/mL、0.036ng/mL、0.0060ng/mL、0.00099ng/mL、0.00017ng/mL 或 0.000028ng/mL 的多肽来孵育细胞。然后用 PLB 试剂(产品目录号 E1941, Promega) 来裂解细胞, 并且使用 Dual-Glo Luciferase Assay System(荧光素酶测定系统)(产品目录号 E2940, Promega) 和 EnVision Multilabel Reader(多标记阅读器)(产品目录号 2103, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts) 根据各自的生产商说明来确定每孔中的荧光素酶活性。相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个萤火虫荧光素酶活性, 并且将每个样品条件进行一式三份。

[0368] 表 10: 多肽序列

[0369]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
FGF19-Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDC ARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSE EDCAFEEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL PMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGL VTGLEAVRSPSFEKDYKDDDDK	237
FGF21-His	IIHHHHHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGVGG AADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEA CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	238
FGF21-FlagC	IIPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACSFRE LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPA LPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDDK	239
FGF21-FlagN	KDYKDDDDKLEHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRE DDGTGVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGP ARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS	240
cFGF21/19- 1/Flag	HPIPDSSPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARG QSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDC	241

[0370]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	AFEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML PMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEKD YKDDDDK	
cFGF21/19- 2/Flag	HIPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQS AHSLLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAF EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEKDY KDDDDK	242
cFGF21/19- 3/Flag	HIPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDPHGLSSCFLRIRADGVVDCARGQ SAHSLLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCA FEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEKDY KDDDDK	243
cFGF21/19- 4/Flag	HIPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQLSSCFLRIRADGVVDCARGQS AHSLLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAF EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEKDY KDDDDK	244
cFGF21/19- 5/Flag	HIPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTSCFLRIRADGVVDCARGQS AHSLLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAF EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEKDY KDDDDK	245
cFGF21/19- 6/Flag	HIPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAFLRIRADGVVDCARGQS AHSLLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAF EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEKDY KDDDDK	246
cFGF21/19- 7/Flag	HIPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRADGVVDCARGQS AHSLLLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAF EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP	247

[0371]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDY KDDDDK	
cFGF21/19- 8/Flag	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGVVDCARGQS AHSLEIKAAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGILLQYSEEDCAF EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDY KDDDDK	248
cFGF21/19- 9/Flag	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAAD QSAHSLEIKAAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGILLQYSEEDC AFEEEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML PMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKD YKDDDDK	249
cFGF21/19- 10/Flag	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLEIKAAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGILLQYSEEDCAF EEEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLP MVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDY KDDDDK	250
cFGF21/19- 11/Flag	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVHVSRYLCMGADGKMQGILLQYSEEDCAFE EEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPM VPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDYK DDDDK	251
cFGF21/19- 12/Flag	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCMGADGKMQGILLQYSEEDCAFE EEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPM VPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDYK DDDDK	252
cFGF21/19- 13/Flag	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQS PESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGAHYGSLHFDPEACSFRE LLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPMLPMVPE EPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDYKDDD	253

[0372]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	DK	
cFGF19/21- 1/Flag	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAA DQSPESLLQLKALKPGVVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEACS FRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP PALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDDK	254
cFGF19/21- 2/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEA CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDDK	255
cFGF19/21- 3/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEA CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDDK	256
cFGF19/21- 4/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGTVGG AADQSPESLLQLKALKPGVVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEA CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDDK	257
cFGF19/21- 5/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDC ARGQSPESLLQLKALKPGVVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPEA CSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP GLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDDK	258
cFGF19/21- 6/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDC ARGQSAHSLLQLKALKPGVVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPE ACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPL PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDD K	259
cFGF19/21- 7/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFRIRADGVVDC ARGQSAHSLLLEIKAVLRVIAIKGVKTSRFLCQRPDGALYGSLLHFDPE ACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPL PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDD	260

[0373]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	K	
cFGF19/21- 8/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDC ARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCQRPDGALYGSLHFDPE ACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPL PGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDD K	261
cFGF19/21- 9/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDC ARGQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL PLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDD DDK	262
cFGF19/21/19- 1/Flag	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDCAR GQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEED CAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLP MLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE KDYKDDDDDK	263
cFGF19/21/19- 2/Flag	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDPHGLSSCFLRIRADGVVDCAR GQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEED CAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLP MLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE KDYKDDDDDK	264
cFGF19/21/19- 3/Flag	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQGLSSCFLRIRADGVVDCAR GQSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEED CAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLP MLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE KDYKDDDDDK	265
cFGF19/21/19- 4/Flag	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQLSSCFLRIRADGVVDCARG QSAHSLSLEIKAVALRTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDC AFEEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPML PMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEKD	266

[0374]

名称	氨基酸序列(N-C)	SEQ ID NO
	YKDDDDK	
cFGF19/21/19-5/Flag	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTSCFLRIRADGVVDCAR GQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEED CAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLP MLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE KDYKDDDDK	267
cFGF19/21/19-6/Flag	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAFLRIRADGVVDCAR GQSAHSLSLEIKAVALLRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSEED CAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLP MLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE KDYKDDDDK	268
cFGF19/21/19-29/Flag	RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADGVVDC ARGQSAHSLSLEIKALKPGTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLLQYSE EDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFL PMLPMVPEEPEDLRGHLESDFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFE KDYKDDDDK	269

[0375] 再次参考图3B,将每个归一化的荧光素酶活性显示为三次重复的平均和平均标准差。结果显示:当用天然FGF19多肽处理时,表达FGFR4而不表达Klotho-beta的L6细胞显示出荧光素酶活性的剂量依赖的激活,而天然FGF21多肽或嵌合FGF19多肽都没有显示这种活性。

[0376] 实施例2:嵌合和天然FGF多肽的依赖KLB的FGFR4结合活性

[0377] 在此测定中,用编码人FGFR4多肽(基于NCBI参考序列:NM_002011.3)或人FGFR1c多肽(基于NCBI参考序列:NM_015850.3)的表达载体、编码Klotho-beta(KLB)多肽(基于NCBI参考序列:NM_175737.3,与C端LEDYKDDDDK表位序列融合)的表达载体、编码GAL4-E1k-1转录激活子的表达载体(pFA2-E1k1,Stratagene)以及编码在酵母GAL4上游激活子的控制下的萤火虫荧光素酶报告基因的表达式载体(pFR-luc,Stratagene)来瞬时转染96孔板中的大鼠L6成肌细胞。将用于海肾荧光素酶的组成型表达的载体(pRL-SV40,Promega)也转染到细胞中。使用FuGENE HD转染试剂(Roche Applied Science)根据生产商的说明来进行转染。

[0378] 如以上那样,在含有10%FBS的DMEM中过夜培养经转染的L6细胞。然后将细胞在含有25mg/L猪肝素和指定浓度的FGF多肽的无血清培养基中清洗并培养另外的6小时。测定的FGF多肽有天然人FGF19-Flag多肽(参见表10中的FGF19-Flag,SEQ ID NO:237)、天然人FGF21-His多肽(参见表10中的FGF21-His,SEQ ID NO:238)和嵌合FGF19-Flag多肽(参见表10中的cFGF21/19-2/Flag;SEQ ID NO:242)。用浓度为500ng/mL、83.3ng/mL、13.9ng/mL、2.3ng/mL、0.39ng/mL、0.064ng/mL或0.011ng/mL的FGF19多肽来孵育细胞。用浓度为

2667ng/mL、444.4ng/mL、74.1ng/mL、12.3ng/mL、2.06ng/mL、0.34ng/mL或0.057ng/mL的嵌合FGF19多肽来孵育细胞。然后用PLB试剂(Promega)来裂解细胞,并且使用Dual-Glo Luciferase Assay System(荧光素酶测定系统)(Promega)和EnVision Multilabel Reader(多标记阅读器)(PerkinElmer)根据各自的生产商说明来确定每孔中的荧光素酶活性。相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个萤火虫荧光素酶活性,并且将每个样品条件进行一式三份。

[0379] 参考图4,将每个归一化的荧光素酶活性显示为三次重复的平均和平均标准差。结果显示:在KLB和FGFR1c的存在下,天然FGF19多肽和嵌合FGF19多肽显示出相似的荧光素酶的剂量依赖的激活,并且分别具有34.3ng/mL和22.7ng/mL的EC₅₀。在转化有FGFR4和KLB的细胞中,由嵌合FGF19多肽所致的荧光素酶活性的剂量依赖的激活显著低于由天然FGF19所致的,并且分别具有269ng/mL和2.6ng/mL的EC₅₀。基于使用Prism 5软件(GraphPad Software, La Jolla, California)计算的EC₅₀,评估各个FGF19多肽对FGFR1c和FGFR4的选择性。在此实施例中,相比天然FGF19多肽的相应的相对选择性,嵌合FGF19多肽显示出较高的相对FGFR4的对FGFR1c的相对选择性(基于分别计算的EC₅₀值)。

[0380] 实施例3:嵌合和天然FGF多肽对肝特异性基因的诱导

[0381] 在此实施例中,将FVB小鼠过夜禁食。经由尾静脉用天然人FGF19-Flag多肽(表10中的FGF19-Flag)、天然人FGF21-His多肽(表10中的FGF21-His)、嵌合FGF19-Flag多肽(表10中的cFGF21/19-2/Flag;SEQ ID NO:242)或磷酸盐缓冲液(PBS)载体(vehicle)对照注射禁食小鼠的样品组(n=5或6)。将多肽以1mg/kg的剂量提供于PBS中。在注射后4小时,收获每只鼠的肝组织并在液氮中速冻。使用Qiazol(产品目录号79306, Qiagen, Germantown, Maryland)从收获的肝组织中分离总的组织RNA并且将其用作cDNA合成的模板(Quantitect Reverse Transcription Kit(Quantitect反转录试剂盒),产品目录号205311, Qiagen)。遵照定量实时PCR的标准流程,使用SYBR Green染料(产品目录号11760500, Invitrogen, Carlsbad, California)和7900HT Fast Real-Time PCR System(快速实时PCR系统)(Applied BioSystems, Inc., Foster City, California),以36B4基因作为标准来定量cDNA。参考图5,结果显示:在用天然FGF19多肽注射的样品中Egr-1和cFos mRNA的水平是最高的,而在用天然FGF21多肽或嵌合FGF19多肽注射的样品中Egr-1和cFos mRNA的水平不存在或者显著地更低。在用多肽注射的样品之间,SHP mRNA或Cyp7A1mRNA的相对水平是相当的。p值为<0.05、<0.01和<0.0005的水平分别用“*”、“**”和“***”指示。

[0382] 实施例4:嵌合和天然FGF多肽对脂肪细胞特异基因的诱导

[0383] 如在实施例3中所述的那些进行实施例,在注射后4小时收获褐色脂肪组织(BAT)和白色脂肪组织(WAT)并且在液氮中速冻。参考图6,结果显示:WAT中Egr-1mRNA的水平和BAT中UCP-3mRNA的水平(WAT和BAT都不表达可检测的FGFR4)受到所用FGF多肽相似地调节。p值为<0.05、<0.01和<0.001的水平分别被用“*”、“**”和“***”指示。

[0384] 实施例5:嵌合FGF19和天然FGF21多肽对糖尿病肥胖小鼠血糖的降低

[0385] 在此实施例中,给11周龄ob/ob小鼠(库存#000632, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)皮下植入含有200μL天然人FGF21多肽(表10中的FGF21-FlagN;1mg/mL,在PBS中)、嵌合FGF19多肽(表10中的cFGF21/19-2/Flag;SEQ ID NO:242)(1mg/mL,在PBS中)或载体对照(PBS)的渗透泵(产品目录号2001, Alzet, Cupertino, California)。每个样品组

由九只(9)小鼠组成。将渗透泵配置成以 $\sim 0.4\text{mg/kg/天}$ 的速度提供多肽。

[0386] 参考图7A,从植入泵前的三(3)天开始直到植入后的五(5)天为止,在规定的测量每只小鼠的体重和随机喂养血糖水平。使用One Touch 2Ultra Blood glucose monitoring system(One Touch 2Ultra血糖监测系统)(LifeScan,Milpitas,California)来测量血糖。图7A显示每个样品组的平均体重和血糖水平(p值为 <0.05 、 <0.001 和 $<5\times 10^{-7}$ 的水平分别用“*”、“**”和“***”指示)。在第5天,将小鼠禁食过夜并在第二天早晨测量禁食血糖。参考图7B,每只鼠在第5天和第6天的的血糖水平(经过过夜禁食)得到显示(p值为 <0.002 、 <0.0005 和 $<5\times 10^{-10}$ 的水平分别用“*”、“**”和“***”指示)。结果显示:在这些小鼠中,天然人FGF21多肽和嵌合FGF19多肽两者使血糖下降到相似水平。

[0387] 实施例6:由嵌合FGF19和天然FGF21多肽所致的糖尿病肥胖小鼠的腹膜内葡萄糖耐受

[0388] 在第6天的过夜禁食后,给来自实施例5的小鼠腹膜内注射推注葡萄糖PBS溶液(1g/kg)以测试葡萄糖耐受。推注注射在对应于图8A中的时间 $=0$ 的点发生。在推注注射后,在规定的测量每只小鼠的血糖水平,每个样品组的平均血糖水平显示在图8A中。参考图8B,每个动物在葡萄糖耐受测试(GTT)期间的 $t=0$ 和 120min 之间的曲线下面积(AUC)得到绘制。根据斯氏t检验,用天然人FGF21多肽或嵌合FGF19多肽注射的样品与PBS对照相比的p值都是 <0.001 。结果显示:在这些被禁食的小鼠中,天然人FGF21多肽和嵌合FGF19多肽两者显示相似的葡萄糖耐受。

[0389] 实施例7:天然和嵌合FGF-Fc融合多肽的活性

[0390] 在此实施例中,从用相应的表达载体转染的细胞收获含有FGF-Fc融合多肽的条件培养基。用编码以下多肽的表达载体瞬时转染HEK293S细胞:经由21个氨基酸的接头GGGSGGGGSDYKDDDDKGRAQVT(SEQID NO:286)融合到人IgG1-Fc片段的N末端的天然人FGF19多肽;经由4个氨基酸的接头GGGG融合到人IgG1-Fc片段的N末端的天然人FGF21多肽;或经由4个氨基酸的接头GGGS融合到人IgG1-Fc片段的N末端的人嵌合FGF19多肽(cFGF21/19-2)。将模拟品转染细胞用作对照。将细胞在含有10%FBS的DMEM中培养过夜,如上。然后将细胞在来自F12/DME50:50混合液的富集无血清培养基中清洗并培养两(2)天。从每个样品收获条件培养基。将来自每个样品的等体积($6.5\mu\text{L}$)的每个条件培养基用于免疫印迹分析,使用对人IgG-Fc片段特异的抗体。免疫印迹的结果显示在图9B中,该图显示:在收获自用FGF19-Fc、FGF21-Fc和cFGF21/19-2-Fc融合转染的细胞的条件培养基中存在具有预期分子量的含有Fc片段的多肽。

[0391] 在此实施例中,条件培养基被用于证明FGF-Fc融合多肽的活性。用编码GAL4-E1k-1转录激活子的表达载体(pFA2-E1k1,Stratagene)和编码在酵母GAL4上游激活子的控制下的萤火虫荧光素酶报告基因的载体(pFR-luc,Stratagene)瞬时转染96孔板中的HEK293S细胞。在一些实验中,同样用编码Klotho-beta(KLB)多肽的表达载体转染细胞。将用于海肾荧光素酶的组成型表达的载体(pRL-SV40,Promega)也转染到细胞中。使用FuGENE HD转染试剂(Roche Applied Science)根据生产商的说明来进行转染。

[0392] 在含有10%FBS的DMEM中过夜培养经转染的细胞,如上。然后,将细胞在通过用3份源自F12/DME 50:50混合液的富集无血清培养基来稀释1份条件培养基而制得的培养基(最终的培养基中含有 25mg/L 猪肝素)中清洗并培养另外的6小时。然后用PLB试剂(产品目录号

E1941, Promega) 来裂解细胞, 并且使用 Dual-Glo Luciferase Assay System (荧光素酶测定系统) (Promega) 和 EnVision Multilabel Reader (多标记阅读器) (PerkinElmer) 根据各自的生产商说明来确定每孔中的荧光素酶活性。相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个萤火虫荧光素酶活性, 并且将每个样品条件进行一式三份。

[0393] 参考图9A, 将每个归一化的荧光素酶活性显示为三次重复的平均和平均标准差。结果显示: 在KLB存在下, 经转化的HEK293S细胞的荧光素酶活性可以被天然人FGF19-Fc多肽或嵌合FGF19-Fc多肽以与它们各自的非Fc融合类似物相似的方式激活。然而, 与天然FGF21多肽的相应的非Fc融合类似物相反, FGF21-Fc融合多肽(甚至在KLB存在下)显示基本更低的萤火虫荧光素酶的激活。

[0394] 实施例8: 天然和嵌合FGF多肽的受体特异性

[0395] 在此实施例中, 用编码人FGFR4多肽、人FGFR1c多肽的表达载体或载体对照瞬时转染48孔板中的大鼠L6成肌细胞。同样转染到每种细胞样品中的有编码Klotho-beta(KLB)多肽的表达载体、编码GAL4-Elk-1转录激活子的表达载体(pFA2-Elk1, Stratagene)、编码在酵母GAL4上游激活子的控制下的萤火虫荧光素酶报告基因的表达载体(pFR-luc, Stratagene), 以及用于海肾荧光素酶的组成型表达的载体(pRL-SV40, Promega)。使用FuGENE HD转染试剂(Roche Applied Science)根据生产商的说明来进行转染。

[0396] 如以上那样, 在含有10% FBS的DMEM中过夜培养经转染的L6细胞。然后将细胞在含有25mg/L猪肝素的无血清条件培养基(根据实施例7来制备并收获每个条件培养基, 用等体积的无血清培养基将其稀释以供使用)中清洗并培养另外的6小时。所述条件培养基包含载体对照(图10中的组A)(含有CMV启动子的pUC来源的载体); 天然人FGF21-FlagC多肽(表10中的FGF21-FlagC; 图10中的组B); 天然人FGF19-Flag多肽(表10中的FGF19-Flag; 图10中的组C); 具有来源于天然人FGF21的N端序列的第一嵌合FGF19多肽(图10中的组D)(表10中的cFGF21/19-13/Flag,

[0397]

HPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQR
PDGALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPNGKSPHRDPAPRGPARFLPMLPMVPEEPEDLRGHL
ESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDYKDDDDK; SEQ ID NO: 253);

[0398] 具有来源于天然人FGF21的N端序列的第二嵌合FGF19多肽(图10中的组E)(表10中的cFGF21/19-2/Flag;

[0399]

HPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALTVAIKGVHSVRYLCM
GADGKMQGLLQYSEEDCAFEELIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLR
GHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEEKDYK DDDDK; SEQ ID NO: 242)

[0400] 或具有来源于天然人FGF19的N端序列的嵌合FGF19多肽(图10中的组F)(表10中的cFGF19/21-2/Flag;

[0401]

RPLAFSDAGPHVHYGWGDP IRLRHLYTDDAQQTAEHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRF
LCQRPDGALYGLSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPNGKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPP
GILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYASDYKDDDDK; SEQ ID NO: 255).

[0402] 然后用PLB试剂(Promega)来裂解细胞,并且使用Dual-Glo Luciferase Assay System(荧光素酶测定系统)(Promega)和EnVision Multilabel Reader(多标记阅读器)(PerkinElmer)根据各自的生产商说明来确定每孔中的荧光素酶活性。相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个萤火虫荧光素酶活性,并且将每个样品条件进行一式三份。

[0403] 参考图10,将每个归一化的荧光素酶活性显示为相对样品组A中经对应转染的细胞的诱导倍数,所述组A中经对应转染的细胞被培养在来源于用载体对照转染的细胞的对照条件培养基中。将每个诱导倍数显示为三次重复的平均和平均标准差。结果显示:在非对照样品之间,在表达FGFR1c的L6细胞中经归一化的荧光素酶活性的诱导倍数是可比的。然而,在表达FGFR4的L6细胞中,诱导倍数在用天然FGF19孵育的细胞中比在用天然FGF21或嵌合FGF19多肽孵育的那些细胞中显著更高。

[0404] 实施例9:嵌合FGF19多肽的活性-部分1

[0405] 在此实施例中,测定具有来源于天然人FGF19多肽的N端结构域的嵌合FGF19多肽的活性。所有被测定的多肽也包含C端Flag表位标签。用编码Klotho-beta(KLB)多肽的表达载体、编码GAL4-Elk-1转录激活子的表达载体(pFA2-Elk1, Stratagene)、编码在酵母GAL4上游激活子的控制下的萤火虫荧光素酶报告基因的表达式载体(pFR-luc, Stratagene)以及用于海肾荧光素酶的组成型表达的载体(pRL-SV40, Promega)瞬时转染HEK293S细胞。用编码人FGFR4多肽或人FGFR1c多肽的表达式载体、编码Klotho-beta(KLB)多肽的表达式载体、编码GAL4-Elk-1转录激活子的表达式载体(pFA2-Elk1, Stratagene)、编码在酵母GAL4上游激活子的控制下的萤火虫荧光素酶报告基因的表达式载体(pFR-luc, Stratagene)以及用于海肾荧光素酶的组成型表达的载体(pRL-SV40, Promega)瞬时转染大鼠L6成肌细胞。使用FuGENE HD转染试剂(Roche Applied Science)根据生产商的说明来进行转染。

[0406] 如以上那样,在含有10%FBS的DMEM中过夜培养经转染的HEK293S和L6细胞。然后将细胞在含有25mg/L猪肝素的无血清条件培养基(根据实施例7来制备并收获每个条件培养基,用等体积的无血清培养基将其稀释以供使用)中清洗并培养另外的6小时。条件培养基收获自以下多肽转染的细胞:天然人FGF21-FlagC多肽(图11中的A)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-1/Flag(表10中的cFGF19/21-1/Flag;图11中的B)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-2/Flag(表10中的cFGF19/21-2/Flag;图11中的C)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-3/Flag(表10中的cFGF19/21-3/Flag;图11中的D)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-4/Flag(表10中的cFGF19/21-4/Flag;图11中的E)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-5/Flag(表10中的cFGF19/21-5/Flag;图11中的F)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-6/Flag(表10中的cFGF19/21-6/Flag;图11中的G)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-7/Flag(表10中的cFGF19/21-7/Flag;图11中的H)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-8/Flag(表10中的cFGF19/21-8/Flag;图11中的I)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21-9/Flag(表10中的cFGF19/21-9/Flag;图11中的J)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21/19-29/Flag(表10中的cFGF19/21/19-29/Flag;图11中的K)或天然FGF19-Flag多肽(图11中的L)。

[0407] 参考图11,相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个样品的萤火虫荧光素酶活性,并且将每个样品条件进行一式三份。将经归一化的荧光素酶活性与天然人FGF19-Flag多肽的活性进行比较,其中“+”指示与天然人FGF19-Fc融合多肽的活性基本相当的活性,“+/-”指示中间活性,而“-”指示无可检测的活性。不将在HEK293S细胞中显示无可检测活性或显示中间活性的条件培养基在L6细胞中进行测试。

[0408] 实施例10:嵌合FGF19多肽的活性-部分2

[0409] 在此实施例中,测定具有来源于天然人FGF21多肽的N端结构域的嵌合FGF19多肽的活性。所有被测定的多肽也包含C端Flag表位标签。如在实施例9中所述的那样进行测定。条件培养基收获自以下多肽转染的细胞:天然人FGF19-Flag多肽(表10中的FGF19-Flag;图12的A)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-1/Flag(表10中的cFGF21/19-1/Flag;图12的B)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-2/Flag(表10中的cFGF21/19-2/Flag;图12的C)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-7/Flag(表10中的cFGF21/19-7/Flag;图12的D)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-8/Flag(表10中的cFGF21/19-8/Flag;图12的E)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-9/Flag(表10中的cFGF21/19-9/Flag;图12的F)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-10/Flag(表10中的cFGF21/19-10/Flag;图12的G)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-11/Flag(表10中的cFGF21/19-11/Flag;图12的H)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-12/Flag(表10中的cFGF21/19-12/Flag;图12的I)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-13/Flag(表10中的cFGF21/19-13/Flag;图12的J)或天然FGF21-FlagC多肽(表10中的FGF21-FlagC;图12的K)。

[0410] 参考图12,相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个样品的萤火虫荧光素酶活性,并且将每个样品条件进行一式三份。将经归一化的荧光素酶活性与天然人FGF19-Fc融合多肽的活性进行比较,其中“+”指示与天然人FGF19-Fc融合多肽的活性基本相当的活性,“+/-”指示中间活性,而“-”指示无可检测的活性。不将在HEK293S细胞中显示无可检测活性或显示中间活性的条件培养基在L6细胞中进行测试。

[0411] 实施例11:嵌合FGF19多肽的活性-部分3

[0412] 在此实施例中,测定具有来源于天然人FGF21多肽的N端结构域的嵌合FGF19多肽的活性。所有被测定的多肽也包含C端Flag表位标签。如在实施例9中所述的那样进行测定,不同之处仅在于在该测定中使用经转染的HEK293S细胞和用FGFR4转染的L6细胞。条件培养基收获自以下多肽转染的细胞:天然人FGF21-FlagC多肽(表10中的FGF21-FlagC;图13中的A)、天然人FGF19-Flag多肽(表10中的FGF19-Flag;图13中的B)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-1/Flag(表10中的cFGF21/19-1/Flag;图13中的C)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-2/Flag(表10中的cFGF21/19-2/Flag;图13中的D)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-3/Flag(表10中的cFGF21/19-3/Flag;图13中的E)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-4/Flag(表10中的cFGF21/19-4/Flag;图13中的F)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-5/Flag(表10中的cFGF21/19-5/Flag;图13中的G)或嵌合FGF19多肽cFGF21/19-6/Flag(表10中的cFGF21/19-6/Flag;图13中的G)。

[0413] 参考图13,相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个样品的萤火虫荧光素酶活性,并且将每个样品条件进行一式三份。将经归一化的荧光素酶活性与天然人FGF19-Flag多肽的活性进行比较,其中“+”指示与天然人FGF19-Flag多肽的活性基本相当的活性,“+/-”指示中间活性,而“-”指示无可检测的活性。不将在HEK293S细胞中显示无可检测活性或显示中间活性的条件培养基在L6细胞中进行测试。

[0414] 图13还显示了建议的对被测定多肽的相应的N端部分的氨基酸序列的比对。在比对中,通过画出的框来指示每个多肽中对应于保守的LYT和LxxIxxG基序的选定的氨基酸残基。

[0415] 实施例12:嵌合FGF19多肽的活性-部分4

[0416] 在此实施例中,测定具有来源于天然人FGF21多肽的N端和内部结构域的嵌合

FGF19多肽的活性。所有被测定的多肽也包含C端Flag表位标签。如在实施例9中所述的那样进行测定。条件培养基收获自以下多肽转染的细胞：天然人FGF21-FlagC多肽(如在图14中指示的)、天然人FGF19-Flag多肽(如在图14中指示的)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-2/Flag(表10中的cFGF21/19-2/Flag;图14中的A)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-3/Flag(表10中的cFGF21/19-3/Flag;图14中的B)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-4/Flag(表10中的cFGF21/19-4/Flag;图14中的C)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-5/Flag(表10中的cFGF21/19-5/Flag;图14中的D)、嵌合FGF19多肽cFGF21/19-6/Flag(表10中的cFGF21/19-6/Flag;图14中的E)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21/19-1/Flag(表10中的cFGF19/21/19-1/Flag;图14中的F)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21/19-2/Flag(表10中的cFGF19/21/19-2/Flag;图14中的G)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21/19-3/Flag(表10中的cFGF19/21/19-3/Flag;图14中的H)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21/19-4/Flag(表10中的cFGF19/21/19-4/Flag;图14中的I)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21/19-5/Flag(表10中的cFGF19/21/19-5/Flag;图14中的J)、嵌合FGF19多肽cFGF19/21/19-6/Flag(表10中的cFGF19/21/19-6/Flag;图14中的K)或嵌合FGF19多肽cFGF19/21-1/Flag(表10中的cFGF19/21-1/Flag;图14中的L)。

[0417] 参考图14,相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化每个样品的萤火虫荧光素酶活性,并且将每个样品条件进行一式三份。将经归一化的荧光素酶活性与天然人FGF19-Flag多肽的活性进行比较,其中“+”指示与天然人FGF19-Flag多肽的活性基本相当的活性,“+/-”指示中间活性,而“-”指示无可检测的活性。不将在HEK293S细胞中显示无可检测活性或显示中间活性的条件培养基在L6细胞中进行测试。

[0418] 图14还显示了建议的对被测定多肽的相应的N端部分的氨基酸序列的比对。在比对中,通过画出的框来指示每个多肽中对应于保守的LYT和LxxIxxG基序的选定的氨基酸残基。

[0419] 实施例13:由嵌合FGF19多肽所致的减少的STAT5去磷酸化

[0420] 在此实施例中,测试本发明的嵌合FGF19多肽对STAT5去磷酸化的作用。一式两份地给五周龄雄性C57BL/6J小鼠(每只约为18至19克)皮下注射天然人FGF21-His多肽(产品目录号2539-FG-025/CF,R&D Systems,Inc.,Minneapolis,Minnesota)、嵌合FGF19-Flag多肽(表10中的cFGF21/19-2/Flag;SEQ ID NO:242)或磷酸盐缓冲液(PBS)载体对照。将多肽溶解在PBS中并且以1mg/kg的剂量(约20 μ g多肽/注射)提供两天、每天提供两次。在接下来的第三天的早晨,给小鼠腹膜内注射第五剂也是最后一剂的1mg/kg的相应的多肽或对照,并在2小时后宰杀。从每只小鼠回收肝,并且使用Nuclear Extraction Kit(核提取试剂盒)(产品目录号10009277,Cayman Chemical,Ann Arbor,Michigan)从肝制备核提取物。对每个核提取物样品,通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳来分解22.5 μ g的蛋白质,并且通过免疫印迹法使用对在Tyr694处被磷酸化的Stat5蛋白质特异的抗体(产品目录号9314,Cell Signaling Technology,Danvers,Massachusetts)来进行分析。被用作加样对照的非特异性条带(“NS”)显示出在每条道中具有大致相同的量。关于使用对在Tyr694磷酸化的Stat5具有特异性的另一种单克隆抗体(产品目录号9359,Cell Signaling Technology)时的Tyr694磷酸化的Stat5的水平,观察到相似的结果(数据未示)。

[0421] 参考图15,结果显示:在用天然人FGF21多肽注射的小鼠中检测不到Tyr694磷酸化的Stat5蛋白质。然而,用嵌合FGF19多肽注射的小鼠显示显著水平的磷酸化的Stat5蛋白

质。

[0422] 实施例14:由嵌合FGF19多肽所致的减少的对不依赖贴壁的生长的促进

[0423] 在此实施例中,测试本发明的嵌合FGF19多肽对表达KLB和FGFR4的人肝细胞瘤HepG2细胞的依赖接触的生长的作用。将96孔板填充以50 μ L/孔的熔化的基底琼脂(DMEM、0.5%琼脂糖和10%FBS)。在基底琼脂已经固化后,将悬浮在50 μ L熔化的顶部琼脂溶液(DMEM、0.35%琼脂糖和10%FBS)中的约670个HepG2细胞加入到每孔中的基底琼脂,并使其固化。

[0424] 在细胞悬浮液固化后,在指定的第零天(0)将20 μ L生长培养基(DMEM和10%FBS)加入到每孔中。对于指定的实验样品,生长培养基还包含天然人FGF19-Flag多肽、天然人FGF21-His多肽(产品目录号2539-FG-025/CF, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota)、嵌合FGF19带flag标签的多肽(cFGF21/19-2/Flag; SEQ ID NO:242)或者不包含FGF多肽作为对照。在第零天加入的生长培养基中的多肽浓度是120ng/mL或1200ng/mL,以致每孔中的终浓度分别为20ng/mL或200ng/mL。在随后的第2、4、6、8天的每一天,向每孔中再加入20 μ L生长培养基,其中向指定孔中再加入的生长培养基含有与在之前施加到该孔中的相同的FGF多肽,但是FGF多肽的浓度是第零天量的六分之一(即20ng/mL或200ng/mL)。也用G418蛋白合成抑制剂来处理样品孔的子集从而提供背景荧光信号。

[0425] 在第9天,将10 μ L AlamarBlue试剂(产品目录号DAL1100, Invitrogen)加入到每个样品孔中,并且将所述板再孵育5hr以测定每孔中总的代谢活性。使用EnVision Multilabel Reader(PerkinElmer)来测量所得的荧光强度。每种样品重复测试五(5)次。

[0426] 参考图16,将结果显示为在背景之上的荧光强度并且表示五(5)次重复的平均和标准差。结果显示:加入天然人FGF19多肽使得作为建议的细胞不依赖贴壁的生长的指示物的总代谢活性得到促进,但是当加入天然人FGF21或嵌合FGF19多肽时这种活性下降(根据斯氏t检验,与用模拟品处理的样品相比, p 值<0.05)。

[0427] 实施例15:FGF19经由依赖和不依赖FGFR4的通路调节细胞增殖、葡萄糖和胆汁酸代谢

[0428] 通过使用Fgfr4缺陷型小鼠以及其激活FGFR4的能力被特异性破坏的FGF19的蛋白变体来研究在介导FGF19活性中对FGFR4的需要。

[0429] 材料和方法

[0430] 重组FGF蛋白质的表达

[0431] 构建FGF19、FGF21和嵌合体的氨基酸序列,制备的嵌合构建体的图显示在图18B)中。显示在图18B中的具有编号1-17的构建体分别对应于包含以下氨基酸序列的构建体: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:270

[0432]

(RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFRLIRADGVVDCARGQSAHSLEIKALKPGTVAIKGVHVSRYLCMGADGKMQGLLQYSEEDCAFEIEIRPDGYNVYRSEKHRLPVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESDMFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSFEK),

[0433] SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:271、SEQ ID NO:272、SEQ ID NO:273、SEQ ID NO:274、SEQ ID NO:275、SEQ ID NO:276、SEQ ID NO:277、SEQ ID NO:278、SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:2。所有显示在图18B中的构建

体同样包含在N末端的信号序列(当分泌时被切去)以及C末端处的flag标签(DYKDDDDK(SEQ ID NO:279))。

[0434] 除非另外说明,在瞬时转染的CHO细胞中产生并在PBS中纯化至具有同质性的重组人FGF21、FGF19和变体被用于实验。对于某些实验,使用来源于大肠杆菌的FGF21(2539-FG/CF,R&D systems)。在用于其他测定前,通过基于细胞的GAL-Elk1测定来检测所有经纯化的蛋白质的活性。对于图18B、18C和20中的实验,将FGF蛋白质表达在瞬时转染的HEK293细胞中,并且将新鲜的条件无血清培养基不经过纯化地用于测定。

[0435] 荧光素酶测定

[0436] 将所有细胞在37℃在5%的CO₂下在补充以10%胎牛血清(FBS)的Dulbecco's改进Eagle培养基(DMEM)中培养。使用FuGENE HD Transfection Reagent(FuGENE HD转染试剂)(Roche Applied Science),用编码海肾荧光素酶(pRL-SV40,Promega)、人KLB、适当的人FGFR、GAL4-Elk-1转录激活子(pFA2-Elk1,Stratagene)和萤火虫荧光素酶报告基因驱动的GAL4结合位点(pFR-luc,Stratagene)的表达载体瞬时转染96孔板中的大鼠L6成肌细胞。在第二天,将经转染的细胞在含有25mg/L猪肝素(Sigma)和不同浓度的FGF蛋白质的无血清培养基中再培养6-8小时。然后用PLB试剂(Promega)来裂解细胞,并且使用Dual-Glo Luciferase Assay System(荧光素酶测定系统)(Promega)和EnVision Multilabel Reader(多标记阅读器)(PerkinElmer)来确定每孔中的荧光素酶活性。相对共表达的海肾荧光素酶活性来归一化萤火虫荧光素酶活性,并且将其显示为三次重复的平均和平均标准差。

[0437] 不依赖贴壁的细胞增殖测定

[0438] 将96孔板填充以50μL/孔的溶解有0.5%熔化的琼脂糖的生长培养基。在基底琼脂糖已经固化后,将悬浮在50μL熔化的顶部琼脂糖溶液(溶解有0.35%琼脂糖的生长培养基)中的约670个HepG2细胞加入到每孔中的基底琼脂,并使其固化。在固化后,在指定的第0天将20μL含有适量FGF蛋白质的生长培养基加入到每孔中。在随后的第2、4、6、8天的每一天,向每孔中再加入20μL含有适量FGF蛋白质的生长培养基。也用蛋白合成抑制剂Geneticin(遗传霉素)(Invitrogen)来处理样品孔的子集从而提供背景荧光信号。在第9天,将10μL AlamarBlue试剂(Invitrogen)加入到每个样品孔中,并且将所述板再孵育5hr。使用EnVision Multilabel Reader(PerkinElmer)来测量所得的荧光强度并将其用于指示每孔中总的代谢活性。每种样品重复测试五次。

[0439] FGFR/配体结合测定

[0440] 如在Desnoyers等,Oncogene 27(1):85-97(2008)中所述的那样,使用生物素化的抗FGF19抗体(BAF969,R&D systems),在2μg/mL肝素的存在下,测量FGF19和FGF19v的FGFR-结合活性。使用抗FGF19抗体(AF969,R&D systems)和生物素化的抗FGF 19抗体(BAF969,R&D systems)来进行对照ELSA实验以确定所述抗体以可区分的方式与FGF19和FGF19v反应。

[0441] 小鼠研究

[0442] 将小鼠供养在21℃的无病原体动物设施中在标准12hr明/12hr暗循环下,并使其接近食物(标准啮齿动物食物(Labdiet 5010,12.7%卡路里来自脂肪)或高脂肪、高碳水化合物饮食(Harlan Teklad TD.03584,58.4%卡路里来自脂肪)和无限量的水。在所有实验中使用雄性小鼠。之前在Weinstein等,Development(发育)1998125(18):3615-23(1998)中描述了C57BL/6背景的FGFR4K0小鼠。C57BL/6小鼠、C57BL/6背景的ob/ob小鼠以及FVB/NJ小

鼠购自Jackson Laboratory。为了持续地注入FGF蛋白质,经皮下植入渗透泵(Alzet 2001)。对于葡萄糖耐受测试,使用One Touch Ultraglucometer(葡萄糖计)来测量葡萄糖水平。通过斯氏t检验来进行统计。将值表示成平均值 $\pm$ 平均标准差。如{Nicholes,2002#79}所述那样进行BrdU染色并且通过使用Ariol自动图像分析系统来给BrdU阳性肝细胞计数。在Genentech's Institutional Animal Care and Use Committee(Genentech动物保护和利用委员会)批准的流程下进行所有动物研究。

[0443] 血清分析

[0444] 通过使用酶反应来确定总胆固醇、甘油三酯、 β -羟基丁酸(BHB)、乳酸Thermo DMA)和非酯化脂肪酸(Roche)。通过ELISA(crystal chem)来确定血清胰岛素水平。通过如之前Stedman等,J Biol Chem.(生物化学杂志)279(12):11336-43(2004)所述的液相色谱-质谱分析来确定BA组合物。

[0445] 基因表达分析

[0446] 通过使用QIAzol试剂(Qiagen)来分离组织RNA。使用QuantitectReverse Transcription Kit(Quantitect反转录试剂盒)(Qiagen)来合成cDNA。对于实时qPCR,通过使用SYBR绿色通用化合物(Invitrogen)或通过Taqman通用混合物(Roche),将样品在ABI Prism 7900HT(Applied Biosystems)中运行三次,并且通过36B4的水平来归一化。预先设计的GK、SHP、Cyp8b1、IGFBP2和AFP的Quantitect引物获得自Qiagen,并且使用引物表达软件(Applied Biosystems)来设计所有其他的引物。

[0447] A.FGFR4调节血清胆汁酸,但是不调节通过重组FGF19的葡萄糖耐受的改善

[0448] 为确定哪些由FGF19引发的代谢作用是由FGFR4介导的,用重组FGF19或载体对照处理HFD喂养的WT或Fgfr4KO小鼠,并且研究代谢表型和基因表达。为实现对FGF19的持续暴露,给用高脂肪饮食喂养了6周的12至15周龄FGFR4WT和KO小鼠植入渗透泵从而以1ng/hr持续注入FGF19。此方法获得如由ELISA确定的26ng/ml的平均FGF19血清浓度,这是人中的循环FGF19浓度的约50至250倍。在第6天,通过以1g/kg腹腔内注射葡萄糖来对过夜禁食的小鼠进行葡萄糖耐受测试。在WT和Fgfr4KO小鼠中,FGF19注入将葡萄糖耐受改善至相似的程度(图17A),表明FGFR4对于HFD喂养的小鼠中的葡萄糖耐受的改善不是必要的。持续注入FGF19不引起显著的重量减轻,因此葡萄糖耐受的改善不依赖于体重。到第7天,在WT和Fgfr4KO小鼠两者中,FGF19使肝重量和血清胰岛素下降并且使酮体(BHB)形成增加(图17B)。FGF19还使WT中的血清乳酸和甘油三酯减少,但是不使Fgfr4KO小鼠中的血清乳酸和甘油三酯减少(图17B),即使后者在治疗前就显示下降的乳酸和甘油三酯水平。

[0449] 为评估BA代谢的改变,通过液相色谱-质谱来确定血清BA组成(图17C)。FGF19注入使WT小鼠中的游离和牛磺酸缀合的胆酸(CA)以及来源于CA的次级胆汁酸脱氧胆酸减少,而对CDCA(CDCA)代谢物具有最小的作用。此发现与以下一致:BA合成转向备选的(酸性)通路,绕过被FGF19抑制的Cyp7a1并且经由Cyp7b1继续(图17D)。对应地,Fgfr4的损失提高了CA和它的代谢物的基础水平同时使鼠胆酸(CDCA的羟基化代谢物)减少,这表明FGFR4不仅是胆汁酸合成的重要的调节物,而且还是CA与CDCA生成比率的决定因素。为确定FGFR4在调节肝基因表达中的作用,通过QPCR检查多种肝mRNA(图17D)。FGF19注入诱导细胞增殖标记如Egr-1、c-Fos和AFP的表达,并且抑制Cyp7a1在WT中的表达但是不抑制其在Fgfr4KO小鼠中的表达。相反,FGF19抑制WT和Fgfr4KO小鼠两者中的Cyp8b1和葡萄糖激酶(GK),而与WT小鼠相

比Cyp8b1的基础表达和Cyp27a1水平在Fgfr4K0中高得多。Cyp8b1对于胆汁的合成是必须的,但是对于CDCA的合成不是必须的,因此观察到的Cyp8b1表达的变化导致Fgfr4K0小鼠中CA和CDCA代谢产物(鼠胆酸)之间平衡的变化(图17C和D)。一并考虑,我们的发现揭示了:FGFR4是BA合成的调节物并且影响肝细胞增殖,但是其对于调节由FGF19所致的葡萄糖利用、胰岛素敏感性和酮体产生不是必须的。

[0450] B.以特异的FGFR4激活的减少来识别FGF19变体

[0451] 为定量评估FGF19对FGFRs的特异激活,将FGF响应性GAL-E1k1荧光素酶报告基因测定引入到大鼠L6细胞中。在此测定中,配体与FGFR的有效结合导致内源MAP激酶通路的激活,从而导致由E1k-1激活结构域和GAL4DNA结合结构域组成的嵌合转录激活子的激活。L6细胞缺乏功能性FGFR或KLB并且当用同源受体共转染时仅响应FGF19或FGF21。用KLB和FGFR(FGFR1c或FGFR4)以及GAL-E1k1、SV40-海肾荧光素酶和Gal响应性萤火虫荧光素酶报告基因的表达式载体共转染L6细胞。在荧光素酶测定前,将经转染的细胞在含有增加浓度的FGF19或FGF21的培养基中培养6小时。荧光素酶测定的结果显示:在KLB存在下,FGF19和FGF21以相似的能力和效力激活FGFR1c、2c和3c(图18A和19)。相反,FGF19有效的激活FGFR4,而FGF21却不能,甚至在KLB存在下(图18A)。为定位FGFR4激活所需的信号,制备大量FGF19和FGF21之间的嵌合构建体,使用保守残基以形成接点(图18B)。序列在上面的题为重组FGF蛋白质的表达的材料和方法部分中得到讨论。将每个FGF构建体表达在经瞬时转染的HEK293细胞中,并且使用GAL-E1k1报告基因测定来检测含有分泌的嵌合FGF蛋白的培养物上清对表达KLB的L6细胞中的FGFR1c和/或FGFR4的激活。基于FGFR1c和FGFR4的活性,嵌合构建体被分为4类:高FGFR1c和FGFR4活性(类型I,FGF19样);高FGFR1c活性以及低的但是可检测的FGFR4活性(类型II);高FGFR1c活性而没有可检测的FGFR4活性(类型III,FGF21样)以及由于较少的表达所致的非常低的或没有可检测的FGFR1c和FGFR4活性(类型IV)(I-III,图18C和20;IV未示)。此定位表明:当转移到FGF21时,FGF19的N端39个氨基酸足以给予一定的FGFR4活性。此外,FGF19的N端24个氨基酸和C端49个氨基酸对于完全的FGFR4活性是必须的,但是当转移到FGF21时不足以给予FGFR4活性。因此在FGF19的N末端和C末端的多个信号有助于FGFR4激活。

[0452] 选择被分类为II类分子并由FGF21的氨基酸1-20与FGF19的25-194组成的一个嵌合构建体(与FGF19的同一性>90%)用于在CHO细胞中的大规模合成,而此变体被称为“FGF19v”。当使用荧光素酶报告基因测定来与FGF19比较时,在用KLB和FGFR1c共转染的L6细胞中,FGF19v蛋白显示与FGF19相似的依赖剂量的活性(Fig 18D)。然而,在用单独的FGFR4或FGFR4与KLB的组合共转染的L6细胞中,FGF19v活性显著减小(图18D),之前FGF19已经显示出即使在不存在KLB时也可以直接结合FGFR4。FGF19显示出对FGFR4的依赖剂量的结合活性,而FGF19v则没有(图18E和F)。

[0453] C.FGFR4在体外和体内介导肝细胞增殖

[0454] 通过静脉注射过夜禁食的FVB小鼠,进一步在体内检测FGF19v的活性,并且与FGF19和FGF21比较。在注射后4小时收获肝,并且通过QPCR来确定肝mRNA表达。由FGF19(但不由FGF21)剧烈诱导的基因如Egr-1和c-Fos不被FGF19v有效诱导,这与FGF19v的减小的FGFR4活性一致(图21A)。FGF19v对由FGF19和FGF21共同调节的基因如GK具有与FGF19或FGF21类似的活性。使用Fgfr4K0小鼠,FGFR4有助于FGF19对Egr-1和c-Fos的调节,但是不有

助于对GK的调节(图21B)。出人意料的,FGF21(以及FGF19和FGF19v)改变SHP和Cyp7a1的表达(图21A),所述SHP和Cyp7a1被认为是FGF19的依赖FGFR4的调节的主要靶标。甚至在Fgfr4K0小鼠中都观察到FGF19和FGF21对SHP和Cyp7a1的改变,这表明:以此急性处理,两种内分泌FGF都能够经由不依赖FGFR4的通路来调节这些基因的表达(图21B)。

[0455] FGF19使HepG2细胞在软琼脂中的不依赖贴壁的增殖增加,但是对于FGF19v或FGF21蛋白,此作用要不明显的多(图21C)。为了解FGF19v在体内是否也显示减小的诱导肝细胞增殖的能力,通过渗透微型泵将FGF19、FGF19v(1ng/h)或载体对照注入小鼠。此外,每天(共7天)经腹腔给相同的小鼠注射1mg/kg/天的FGF蛋白质以实现高峰值暴露。为捕获间歇增殖事件(intermittent proliferative event),每天注射两次BrdU溶液(30mg/kg),总共注射13次。通过测量在第7天收获的肝中的BrdU阳性肝细胞来确定肝细胞增殖。如之前报道的,FGF19处理导致BrdU掺入的显著增加;然而,FGF19v的此种反应显著减弱(图21D和E)。Egr-1、c-Fos以及肝细胞增殖标记AFP的肝mRNA都显著地被FGF19所诱导,而对FGF19v大多数都不存在这些诱导,同时对GK、Cyp7a1和Cyp8b1的调节在FGF19和FGF19v之间没有区别(图21F)。

[0456] D.FGF19对ob/ob小鼠中高血糖的改善不需要FGFR4

[0457] 上述体外和体内结果产生这样的问题,即FGF19v(具有减弱的FGFR4活性和增殖潜能的FGF19的变体)是否能够像FGF21那样改善糖尿病动物中的高血糖。使用渗透微型泵将FGF21、FGF19v(1ng/h)或载体对照持续经皮下注入到ob/ob小鼠中。虽然注入对体重没有显著影响(图22A),但是FGF21和FGF19v两者都使随机喂养和禁食小鼠中的血液葡萄糖水平显著降低(图22A和B),使循环的游离脂肪酸水平降低(图22C),并且改善葡萄糖耐受(图22D)。

[0458] 为使肝细胞增殖直观化,在第7天在宰杀4小时前给动物注射BrdU。FGF21和FGF19v都不使肝BrdU掺入增加(未示),反而肝的总重显著减小(图22E)并且没有观察到AFP mRNA肝表达的显著变化(图22F)。一并考虑,FGF19v可以改善肥胖小鼠的代谢状态而不诱导肝细胞增殖。

[0459] 鉴别出许多在用FGF21和FGF19v处理的ob/ob小鼠中通常显示改变的表达的基因。在肝中,两种蛋白质都诱导IGFBP2(目前证明的抗糖尿病蛋白质),并且抑制硬脂酰-辅酶A去饱和酶1(SCD-1;生脂基因)和Cyp8b1(CA和CDCA产生之间的平衡的决定因素)。此外,它们都诱导褐色脂肪组织中的UCP-1(适应性生热作用)、SCD-1和中链酰基-CoA脱氢酶(MCAD;线粒体脂肪酸氧化),以及白色脂肪组织中的SREBP-1c(生脂转录因子)(图22F)。因此,多个组织中的作用可以经由不依赖FGFR4的机制介导FGF21和FGF19v的抗糖尿病作用。

[0460] 通过检查个体血清BA,证明通过Fgfr4发挥作用的重组FGF19抑制Cyp7a1并且使胆汁酸合成通过不依赖Cyp7a1的备选(酸性)通路进行,导致以消耗CA为代价的CDCA的产生。Cyp8b1表达在Fgfr4敲除小鼠中增加了数倍并且FGF19处理抑制Cyp8b1(CA合成所必须的酶促步骤)。通过Cyp7a1和Cyp8b1两者的负调节,FGFR4是CDCA与CA生成比率的决定因素。FGFR4激活使BA生成转向CDCA,而它的废除导致CA形成。此外,FGF19使肝AFP表达以依赖Fgfr4的方式增加。FGF19改善HFD喂养的FGFR4K0小鼠中的葡萄糖耐受(图17),而FGF19v(与FGFR4的结合和对FGFR4的激活被特异性破坏的蛋白质)改善ob/ob小鼠中的高血糖(图18和21-22)。除了在胰岛素抗性和葡萄糖代谢中的作用,如同FGF21,FGF19甚至使FGFR4K0小鼠中的血清BHB水平提高(图17)。在KLB的存在下,FGF19和FGF21两者都可以结合并激活

FGFR1c、FGFR2c和FGFR3c。因此FGFR1c、FGFR2c或FGFR3c协同KLB可以介导FGF19和FGF21的共同代谢作用。

SEQ ID NO: 1 - hFGF19 (194 aa)

```

1      RPLAF SDAGP HVHYG WGDPI RLRHL YTSGP HGLSS CFLRI RADGV VDCAR
51     GQSAH SLLEI KAVAI RTVAI KGVHS VRYLC MGADG KMQGL LQYSE EDCAF
101    EEEIR PDGYN VYRSE KHRLP VSLSS AKQRQ LYKNR GFLPL SHFLP MLPMV
151    PEEPE DLRGH LESDM FSSPL ETDSM DPFGL VTGLE AVRSP SFEK

```

SEQ ID NO: 3 - Pre-hFGF19 (216 aa)

```

1      MRSGC VVVHV WILAG LWLAV AG
23     RPLAF SDAGP HVHYG WGDPI RLRHL YTSGP HGLSS CFLRI RADGV VDCAR
74     GQSAH SLLEI KAVAI RTVAI KGVHS VRYLC MGADG KMQGL LQYSE EDCAF
123    EEEIR PDGYN VYRSE KHRLP VSLSS AKQRQ LYKNR GFLPL SHFLP MLPMV
174    PEEPE DLRGH LESDM FSSPL ETDSM DPFGL VTGLE AVRSP SFEK

```

图1

SEQ ID NO: 2 - hFGF21 (181 aa)

```

1      HPIPD SSPLL QFGGQ VRQRY LYTDD AQQTE AHLEI REDGT VGGAA DQSPE
51     SLLQL KALKP GVIQI LGVKT SRFLC QRPDG ALYGS LHFDP EACSF RELLL
101    EDGYN VYQSE AHGLP LHLPG NKSPH RDPAP RGPAP FLPLP GLPPA LPEPP
151    GILAP QPPDV GSSDP LSMVG PSQGR SPSYA S

```

SEQ ID NO: 4 - Pre-hFGF21 (209 aa)

```

1      MDSDE TGFEH SGLWV SVLAG LLLGA CQA
29     HPIPD SSPLL QFGGQ VRQRY LYTDD AQQTE AHLEI REDGT VGGAA DQSPE
79     SLLQL KALKP GVIQI LGVKT SRFLC QRPDG ALYGS LHFDP EACSF RELLL
129    EDGYN VYQSE AHGLP LHLPG NKSPH RDPAP RGPAP FLPLP GLPPA LPEPP
179    GILAP QPPDV GSSDP LSMVG PSQGR SPSYA S

```

图2

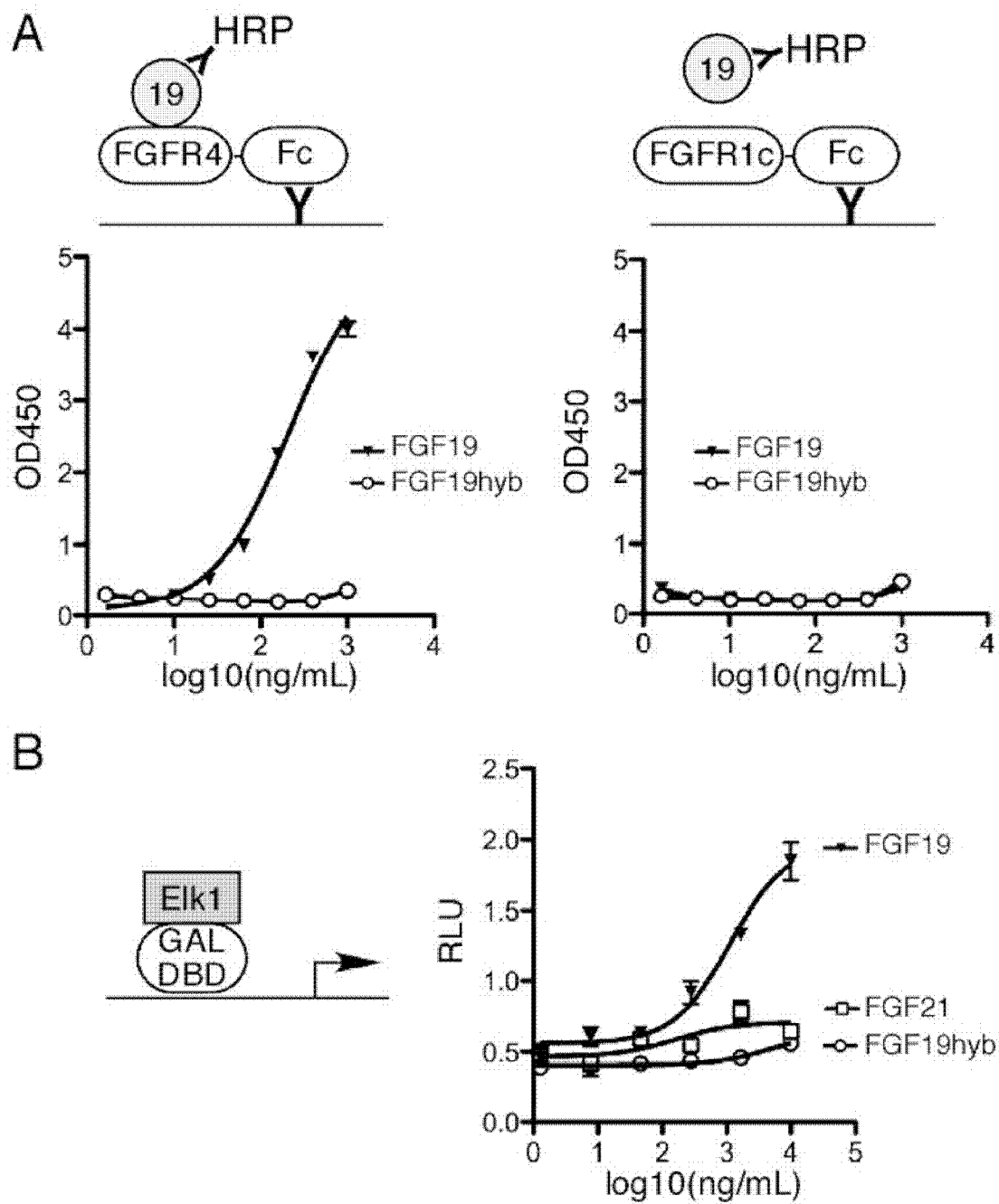


图3

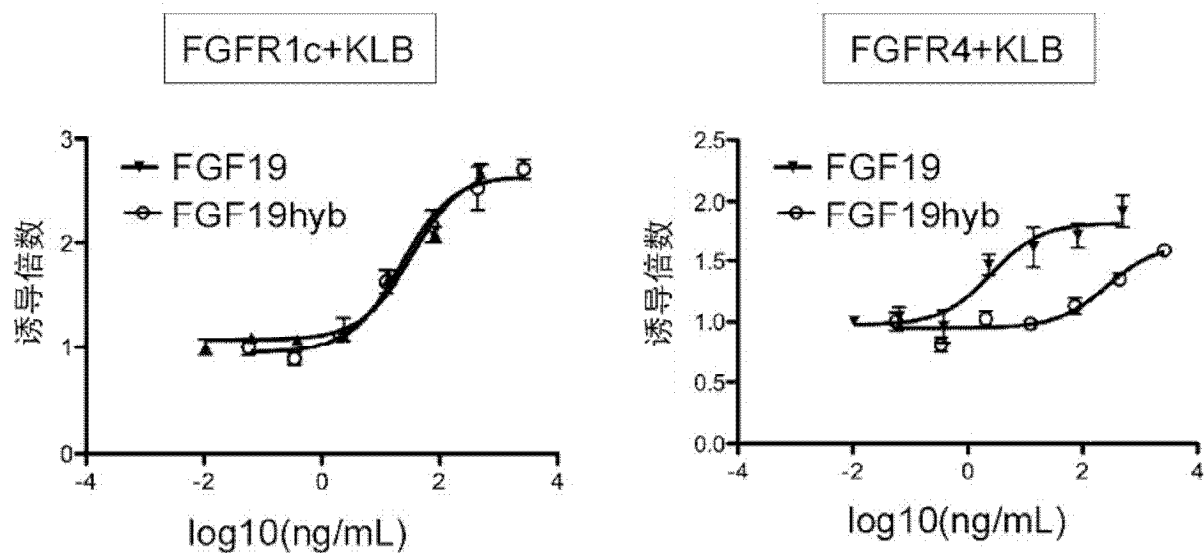


图4

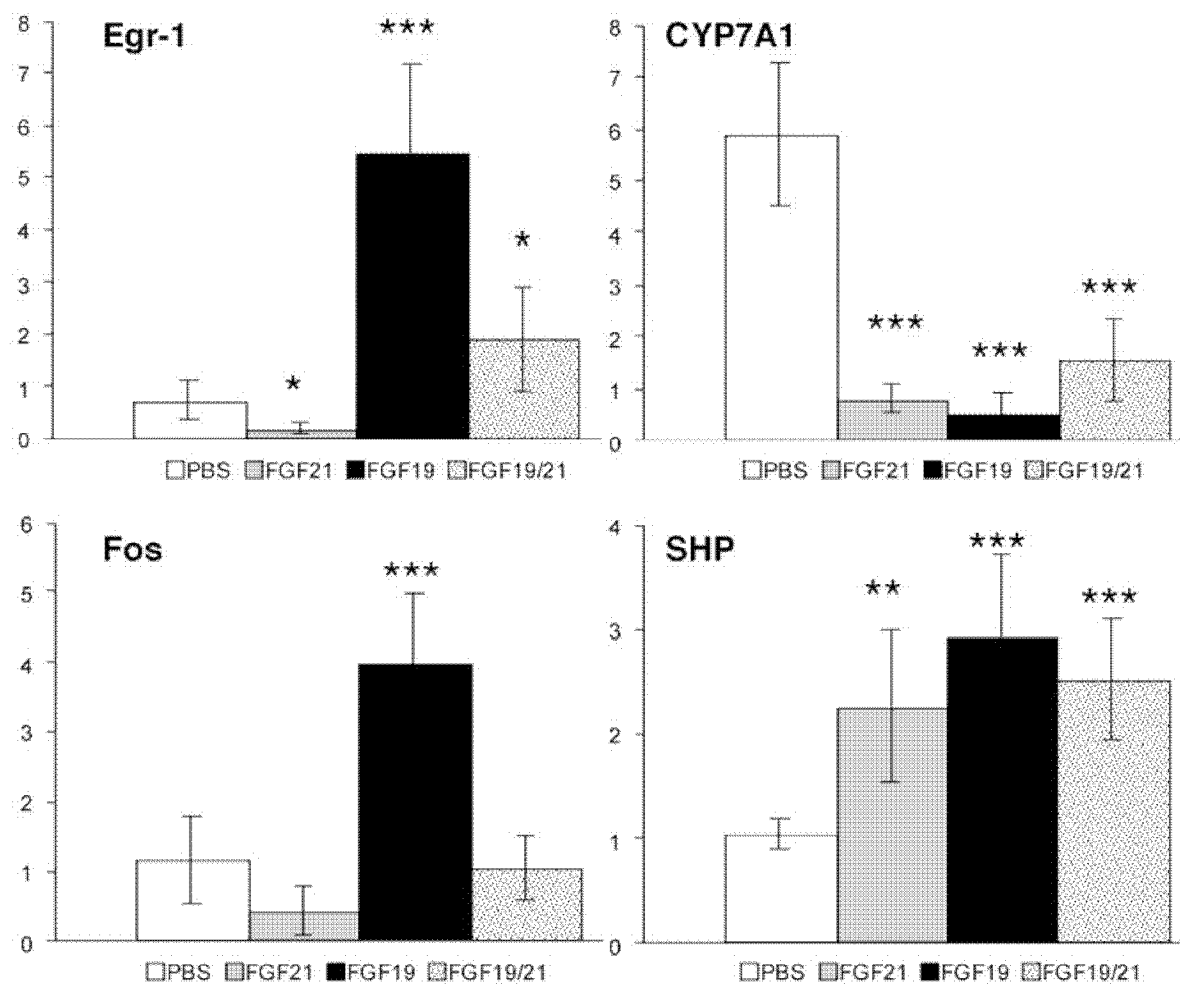


图5

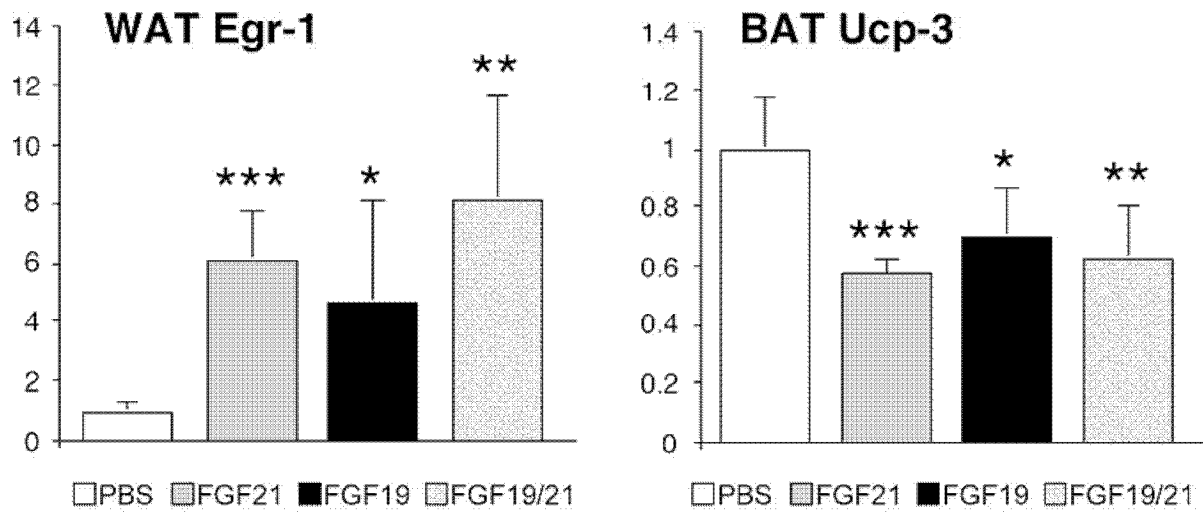


图6

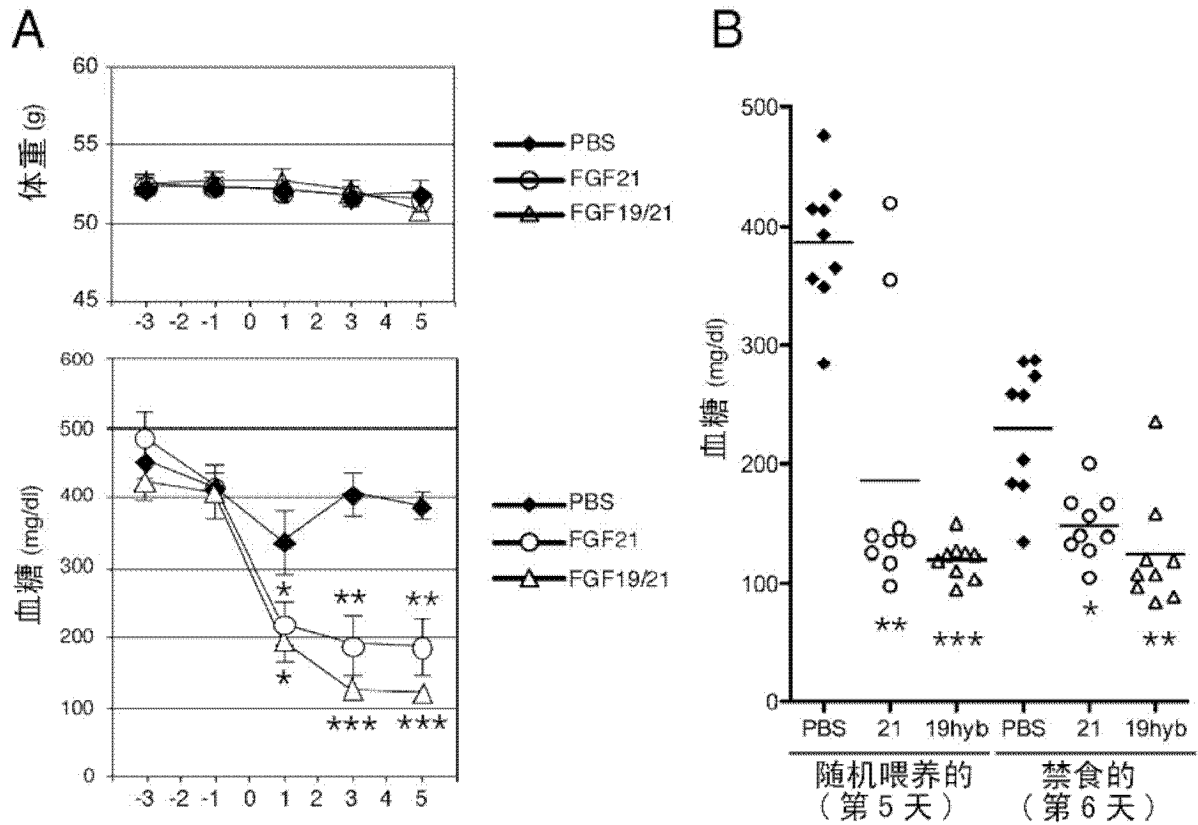


图7

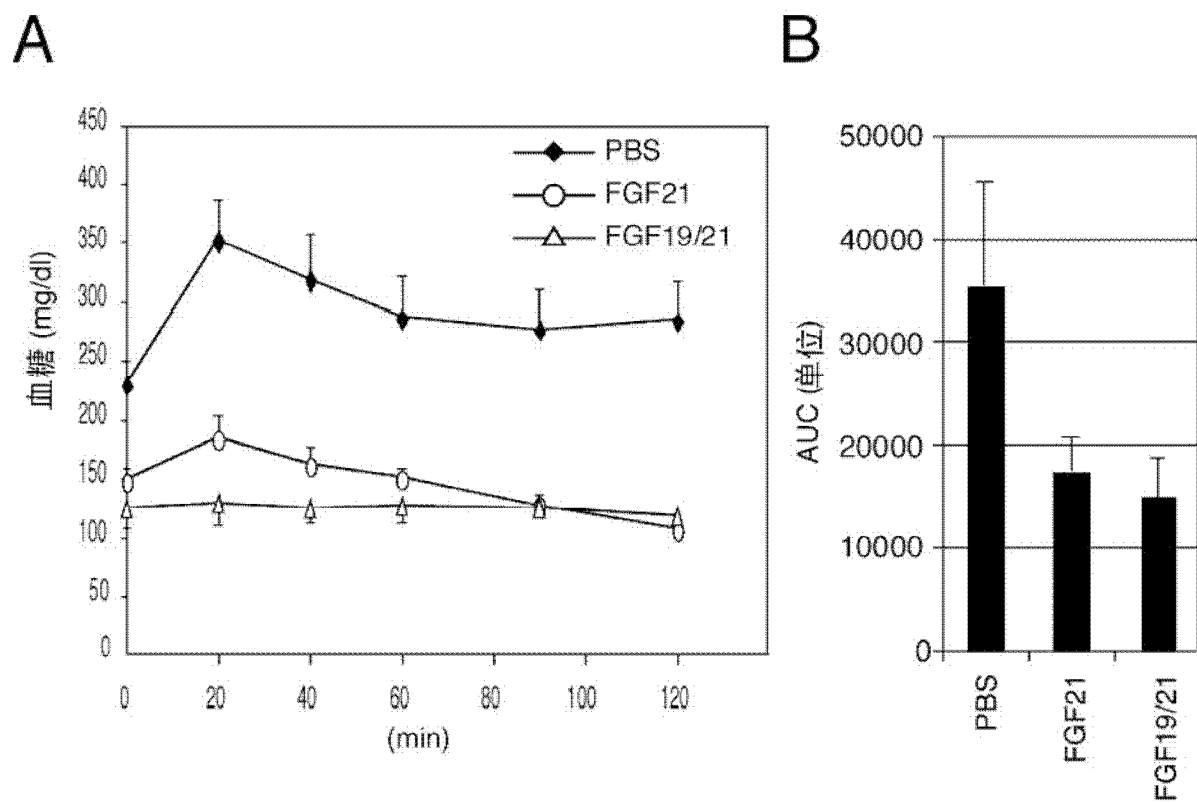


图8

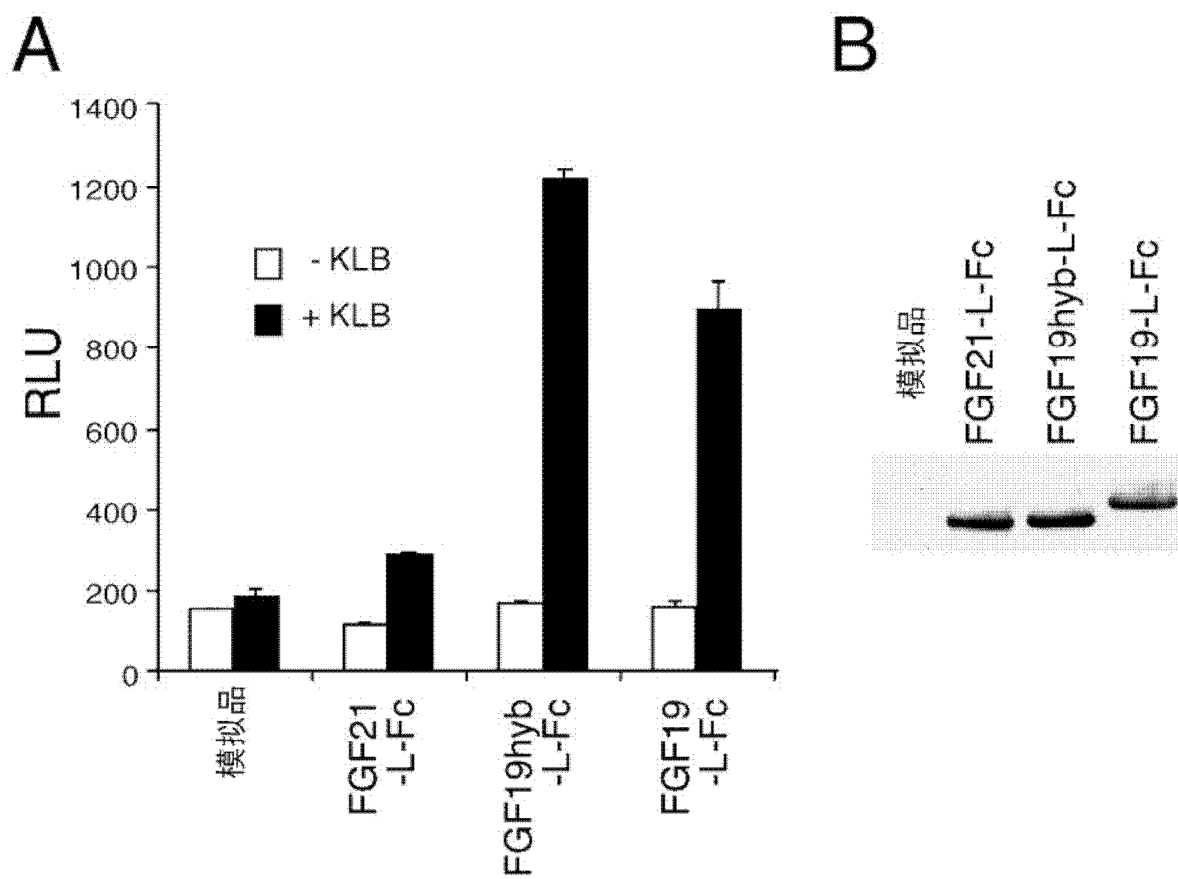


图9

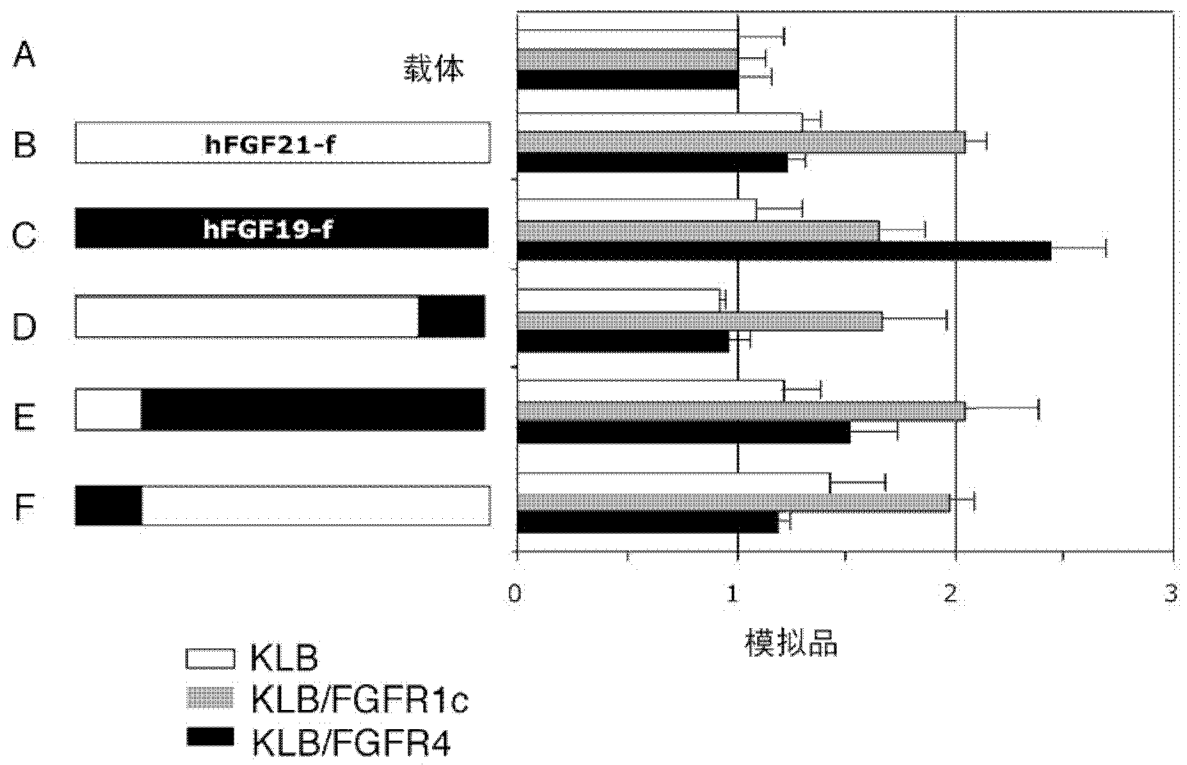


图10

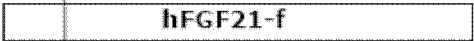
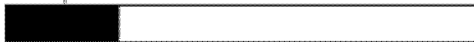
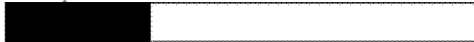
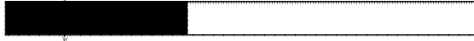
		293	R1c	R4
A	 hFGF21-f	+	+	-
B		+	+	-
C		+	+	-
D		+	+	+/-
E		+	+	+/-
F		+	+	+
G		+	+	+
H		+	+	+
I		+/-		
J		-		
K		+	+	+
L	 hFGF19-f	+	+	+

图11

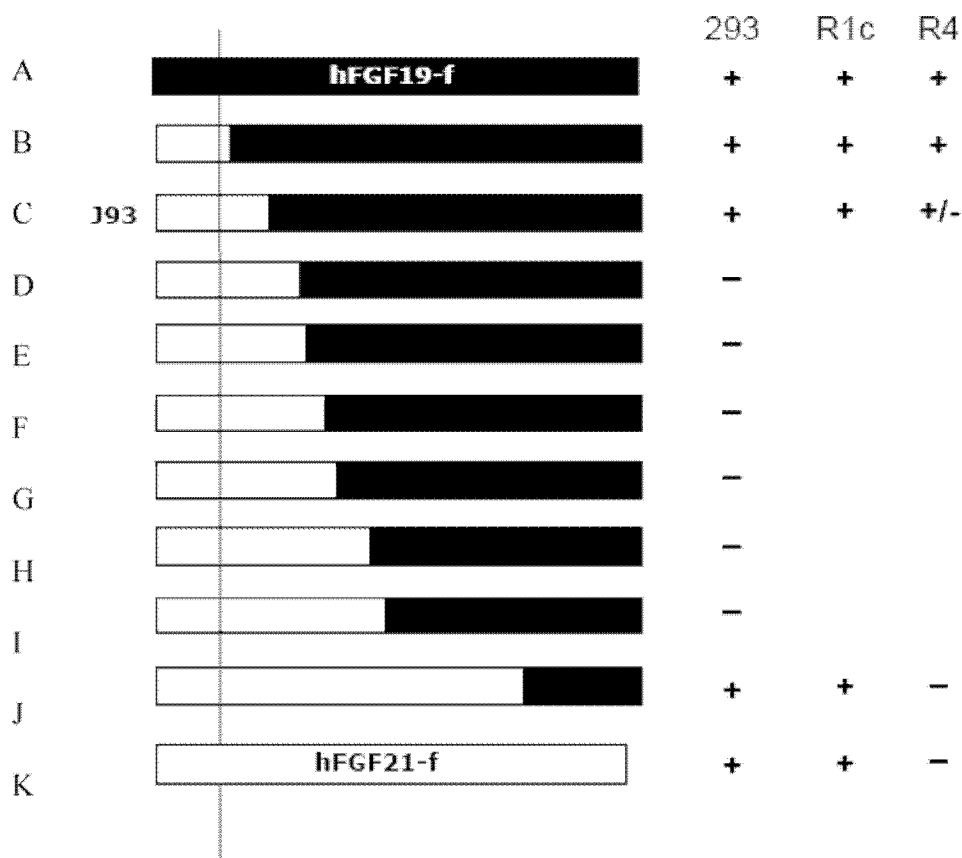


图12

			293/ KLB	L6/ R4+KLB
A	hFGF21:	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTEAHLEIREDG..	+	-
B	hFGF19:	RPLAFSDAGPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG..	+	+
C		HPIPDSSPHVHYGWGDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG..	+	+
D		HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFLRIRADG..	+	+/-
E		HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDPHGLSSCFLRIRADG..	+	+/-
F		HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_LSSCFLRIRADG..	+	-
G		HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTSCFLRIRADG..	+	-
H		HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTEAFRLRIRADG..	-	NT

图13

		293/ KLB	L6/KLB+ R1c	R4
hFGF21:	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTEAHLEIREDG...	+	+	-
hFGF19:	RPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRIRADG...	+	+	+
A	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFLRIRADG...	+	+	+/-
B	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDPHGLSSCFLRIRADG...	+	+	+/-
C	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_LSSCFLRIRADG...	+	+	-
D	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTSCFLRIRADG...	+	+	-
E	HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTEAFLRIRADG...	-	NT	NT
F	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTSGPHGLSSCFLRIRADG...	+	+	+/-
G	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDPHGLSSCFLRIRADG...	+/-	NT	NT
H	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQGLSSCFLRIRADG...	-	NT	NT
I	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_LSSCFLRIRADG...	-	NT	NT
J	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTSCFLRIRADG...	-	NT	NT
K	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTEAFLRIRADG...	-	NT	NT
L	RPLAFSDAGPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQ_QTEAHLEIREDG...	+	+	-

图14

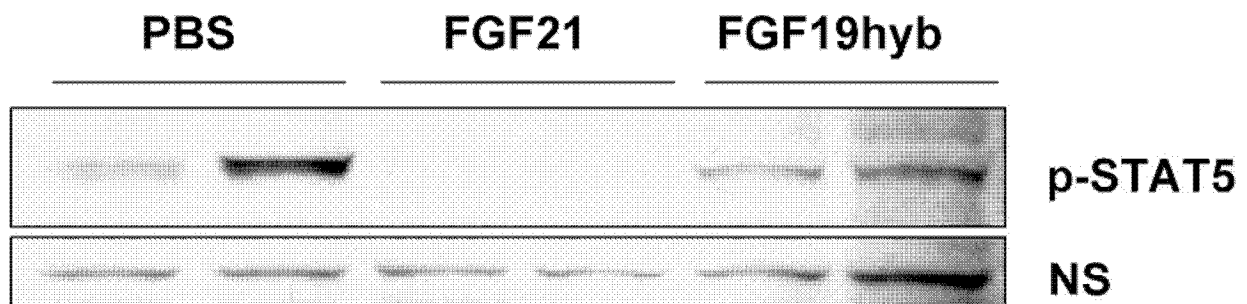


图15

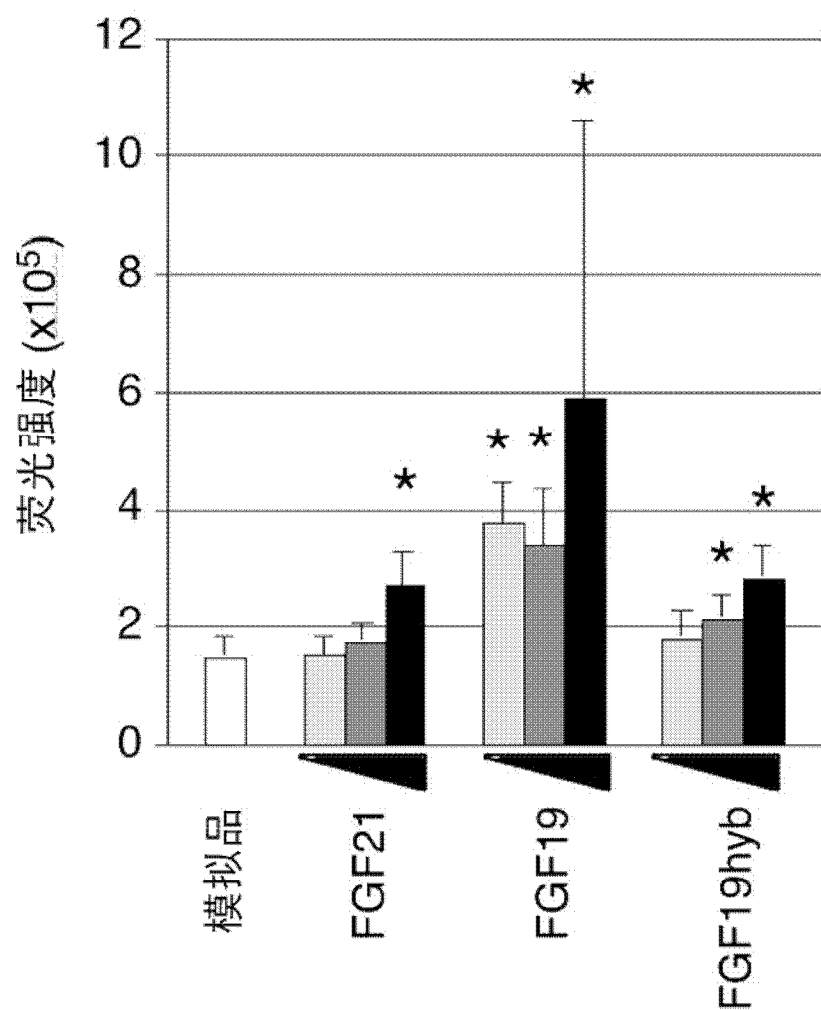
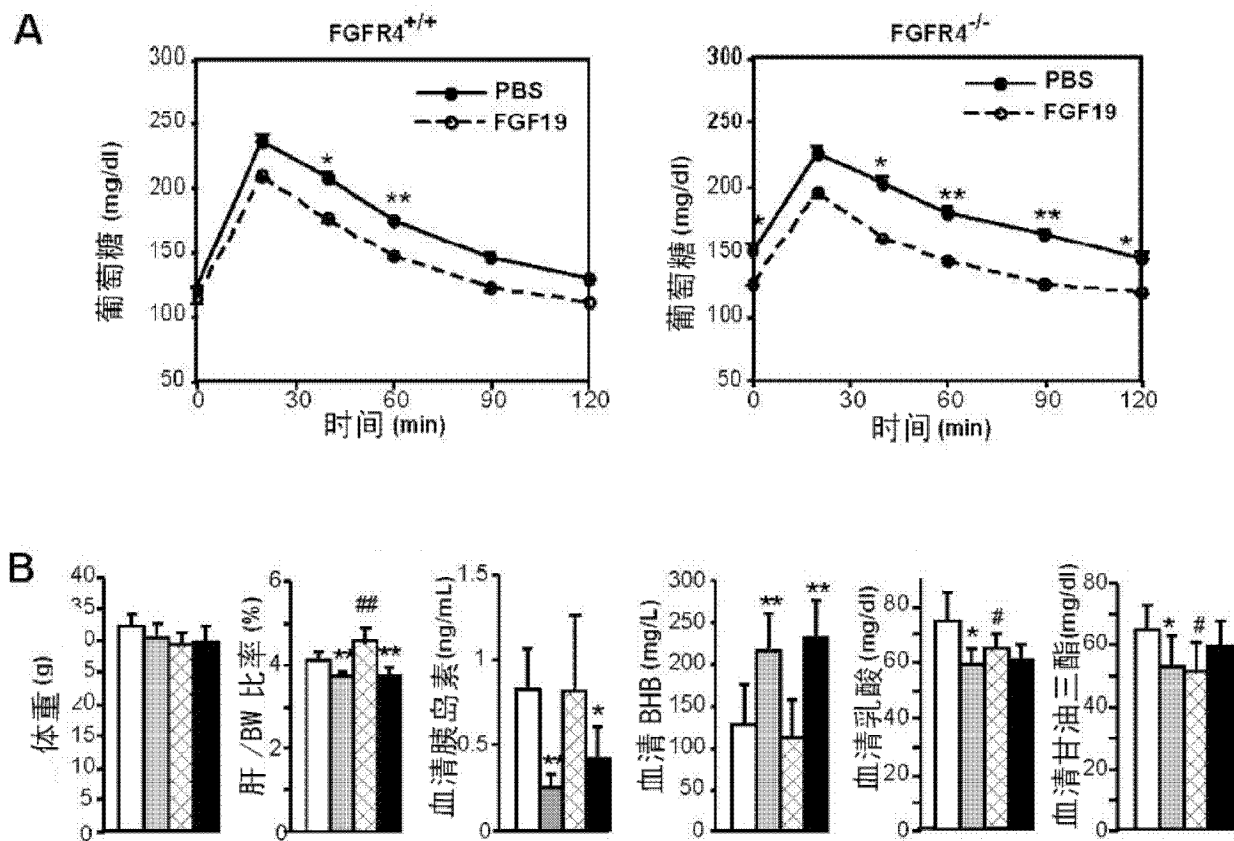


图16



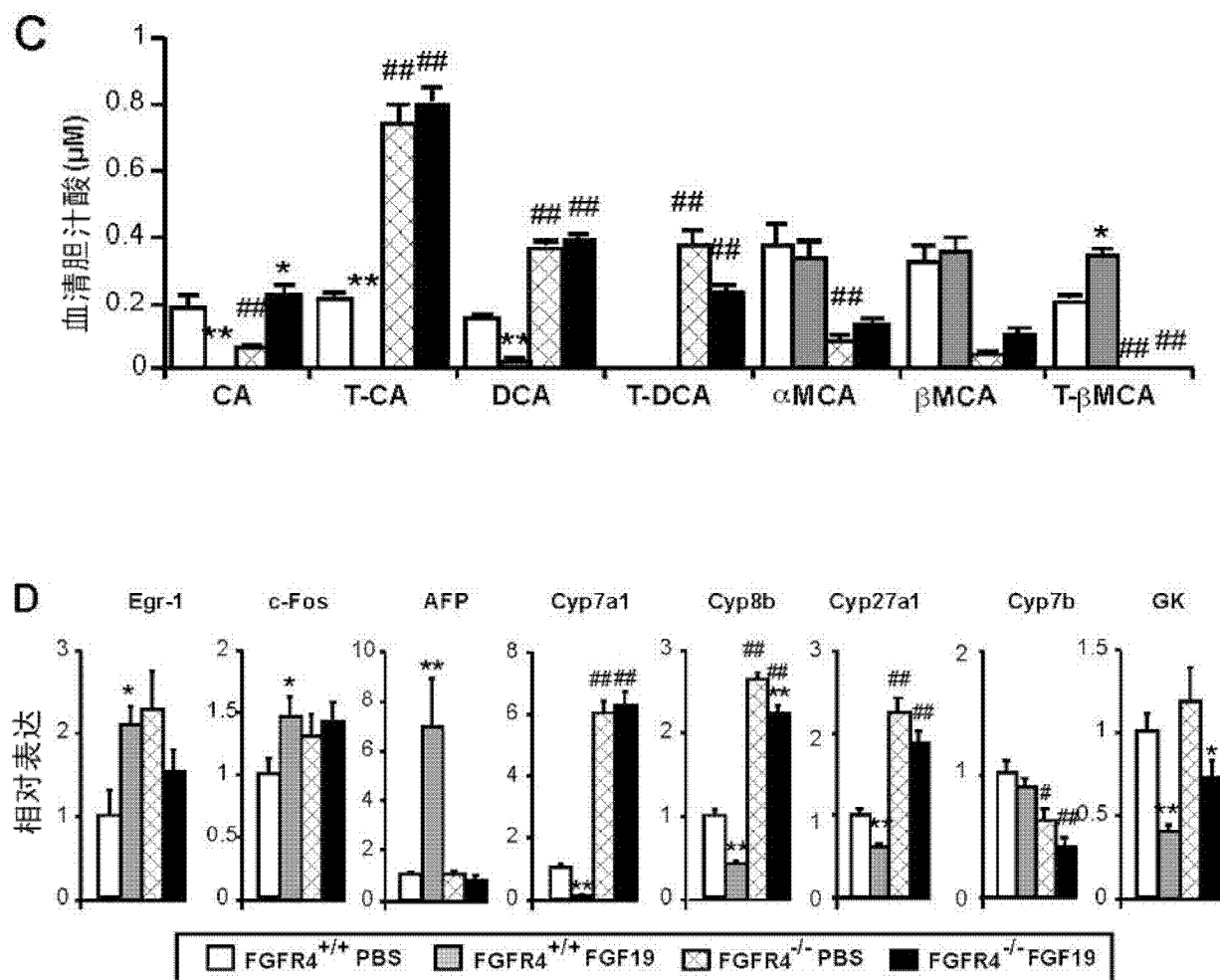
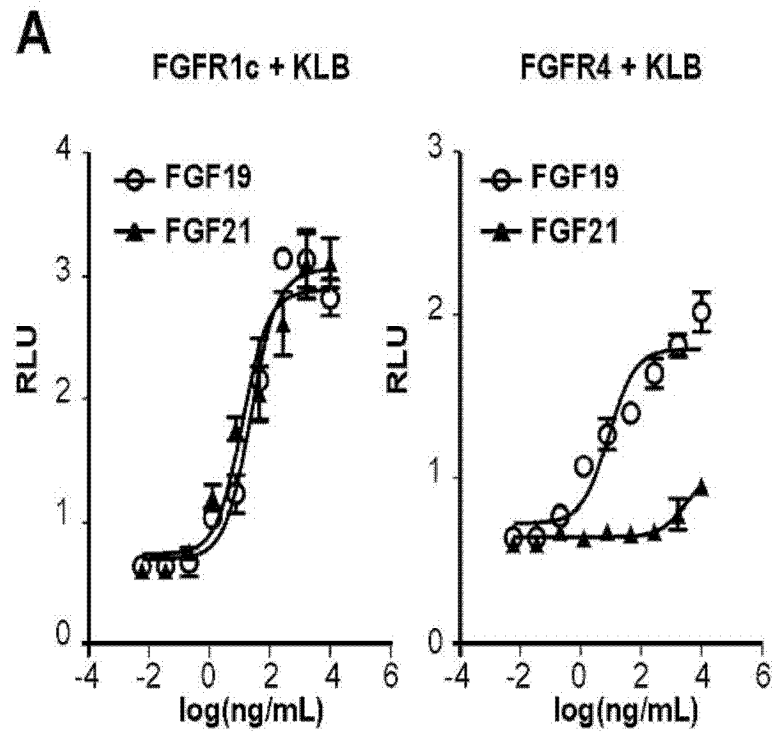
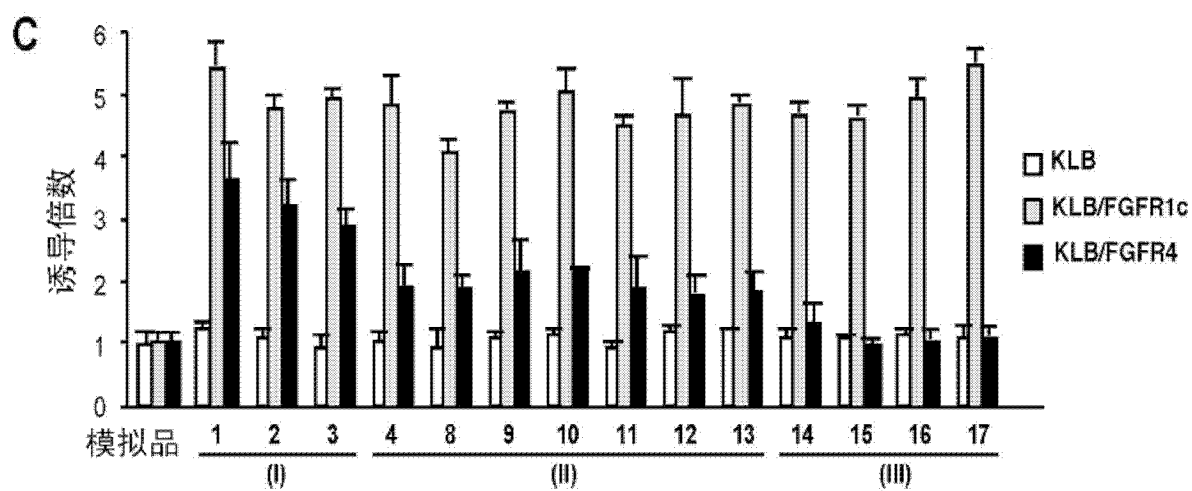
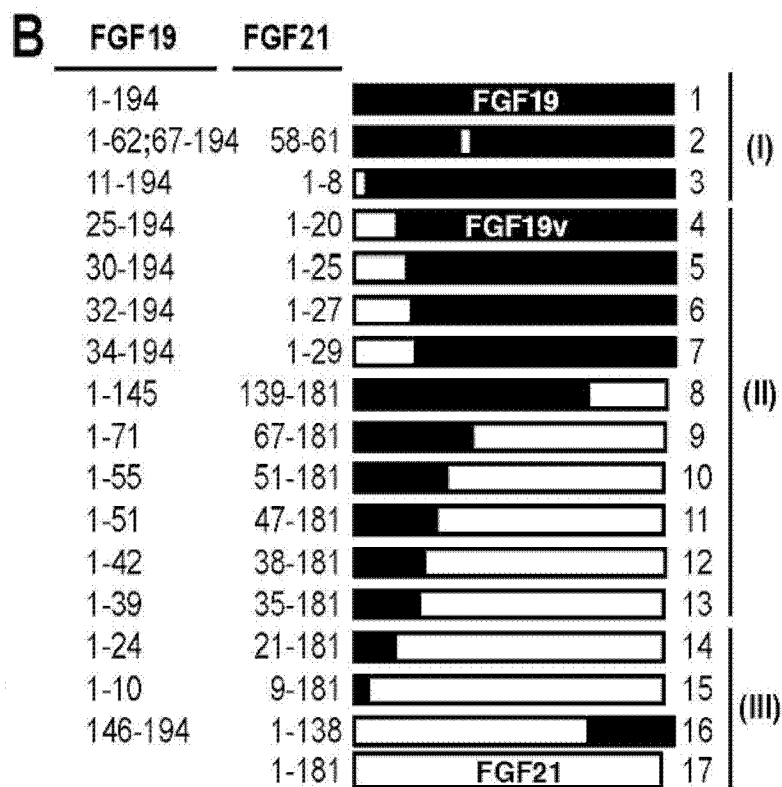
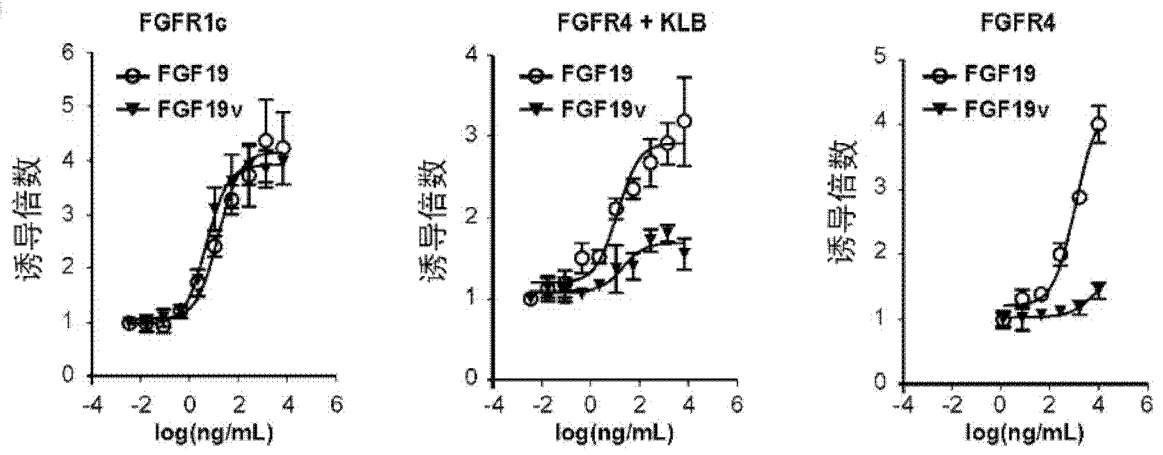


图17





D

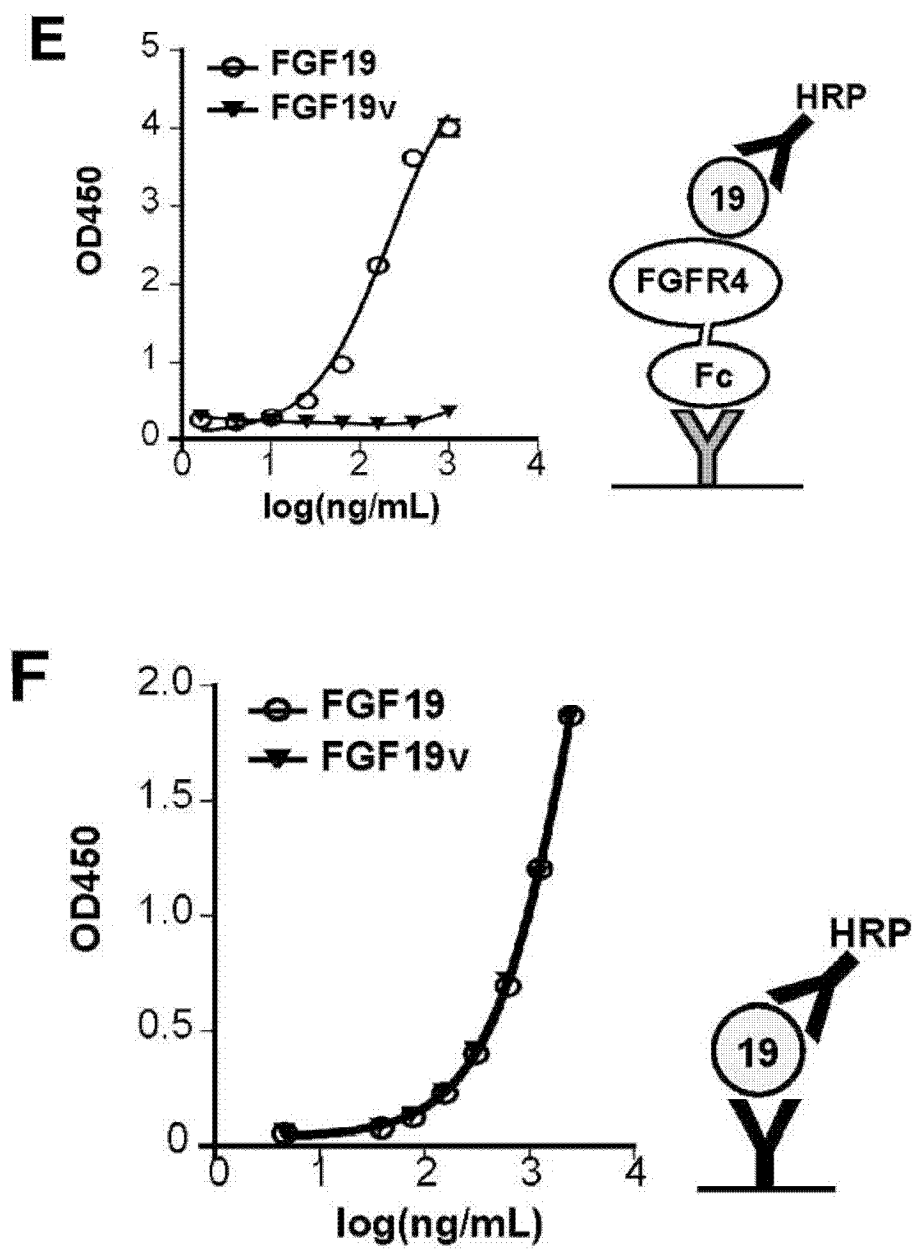


图18

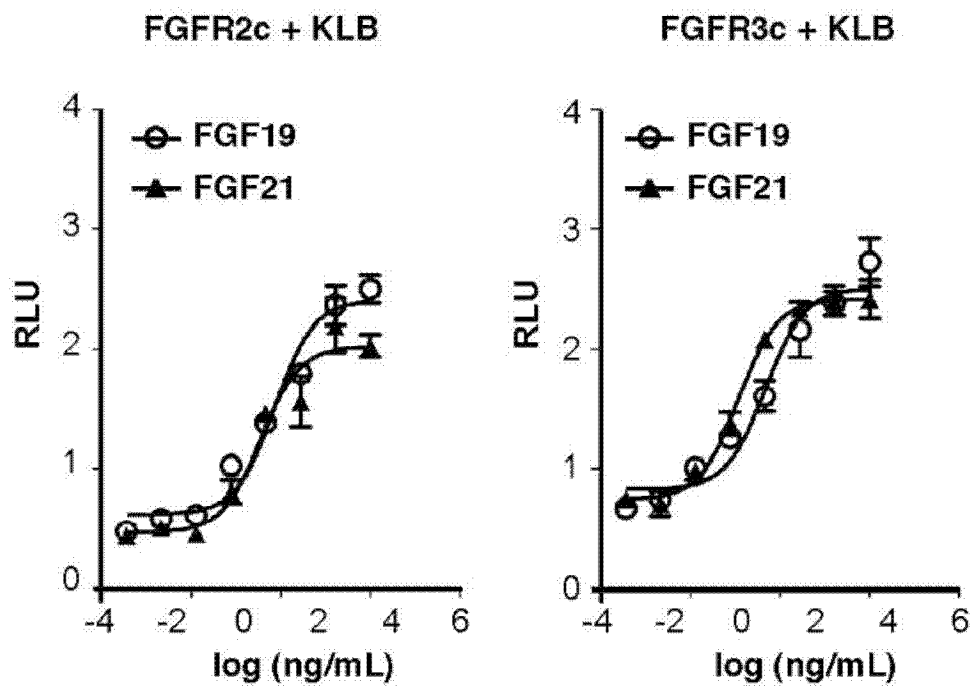


图19

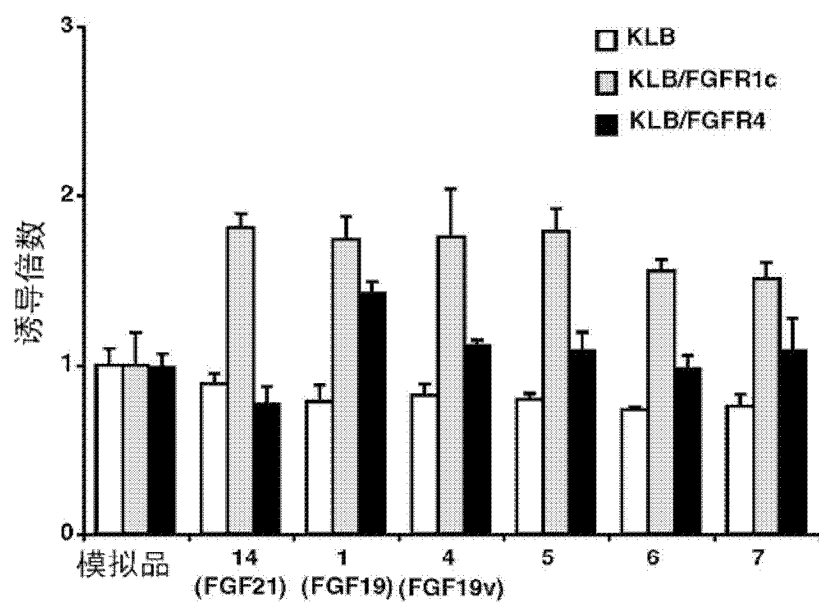
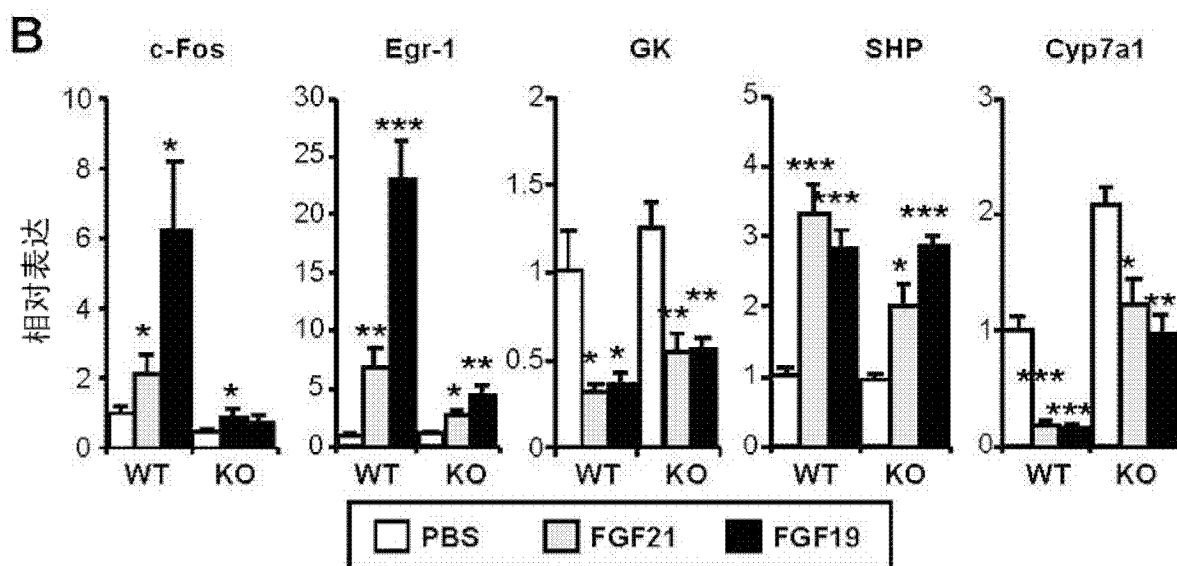
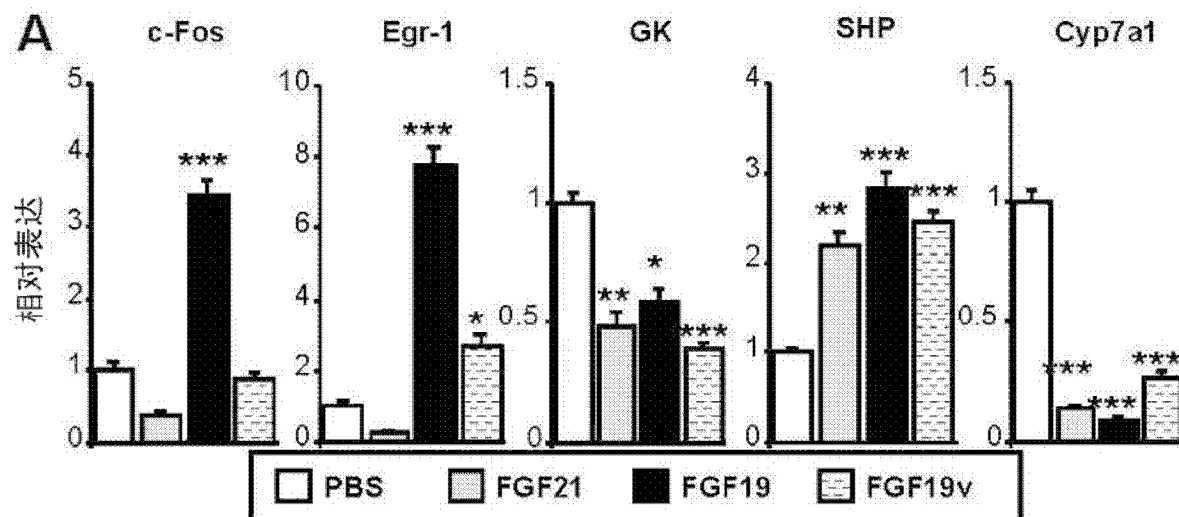
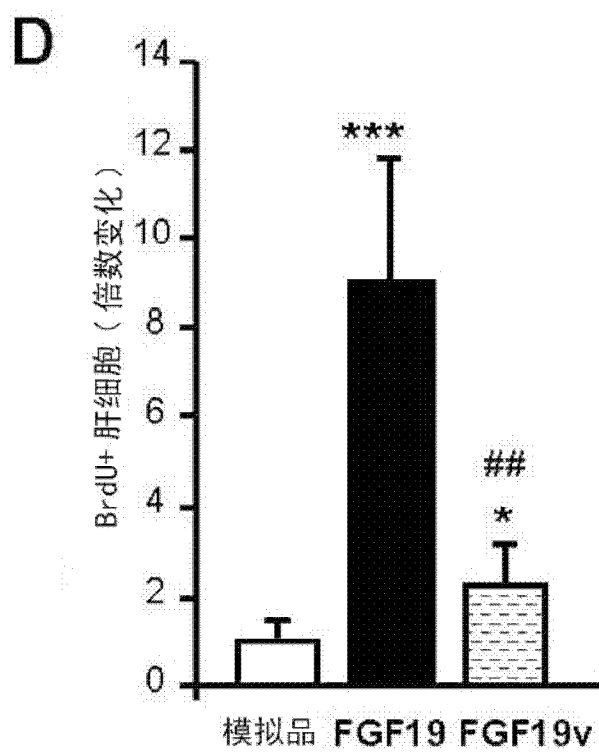
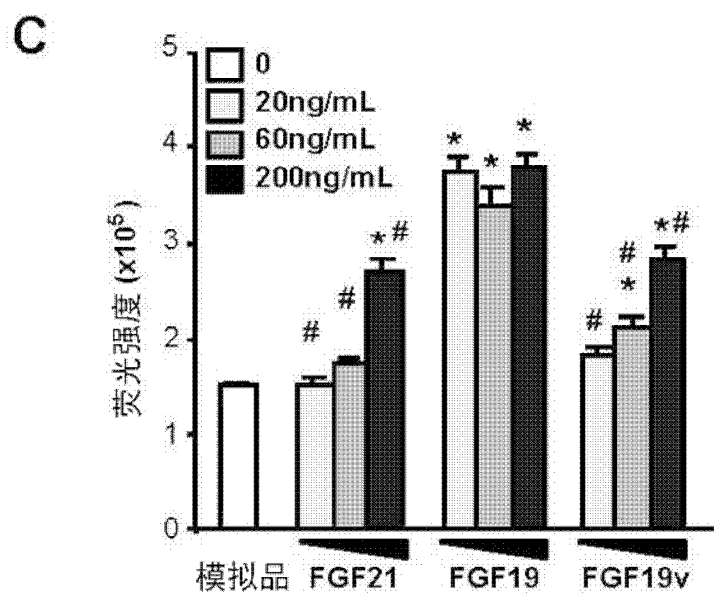


图20





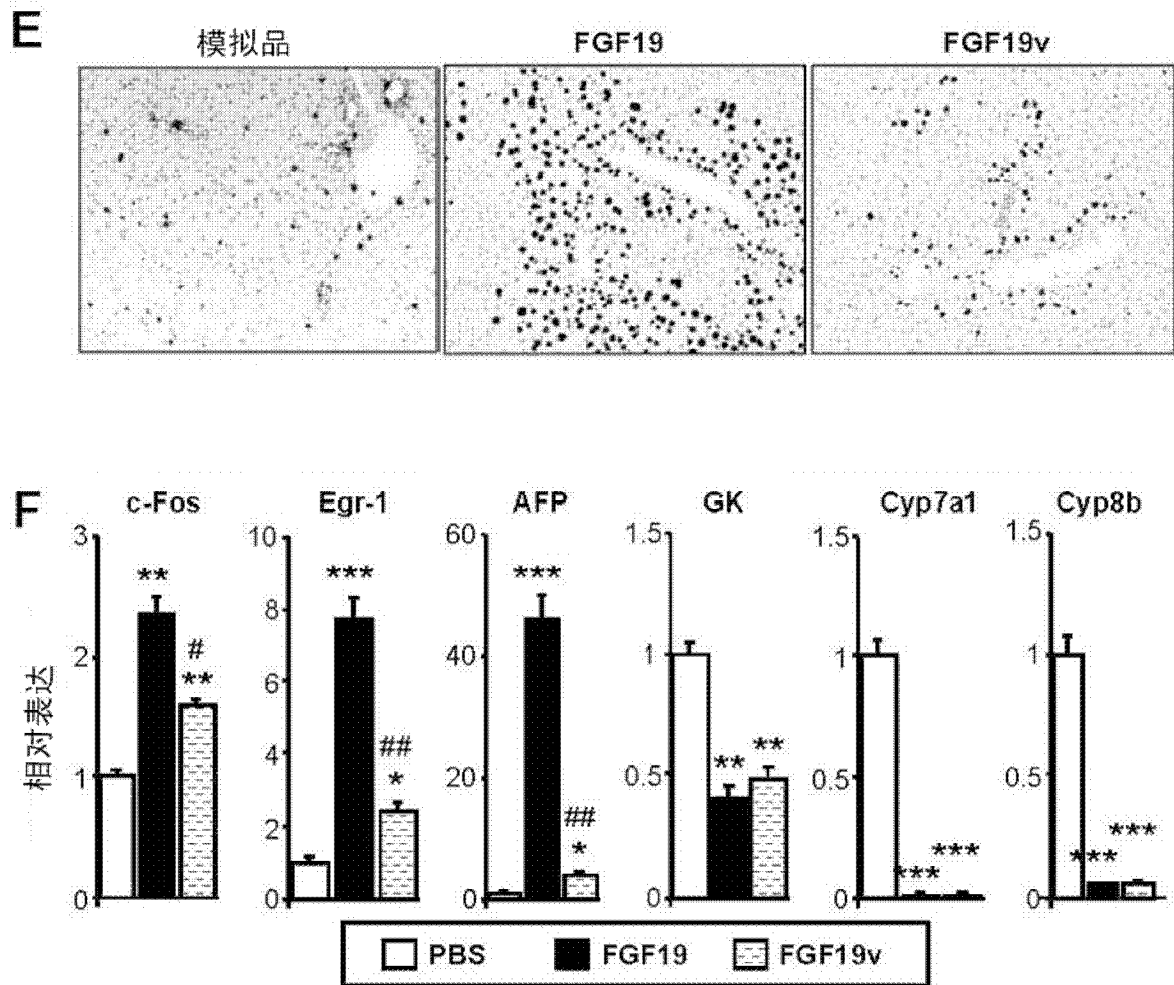
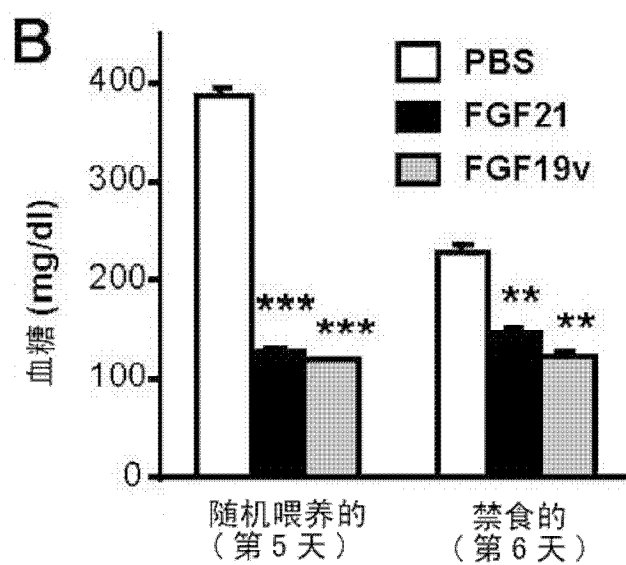
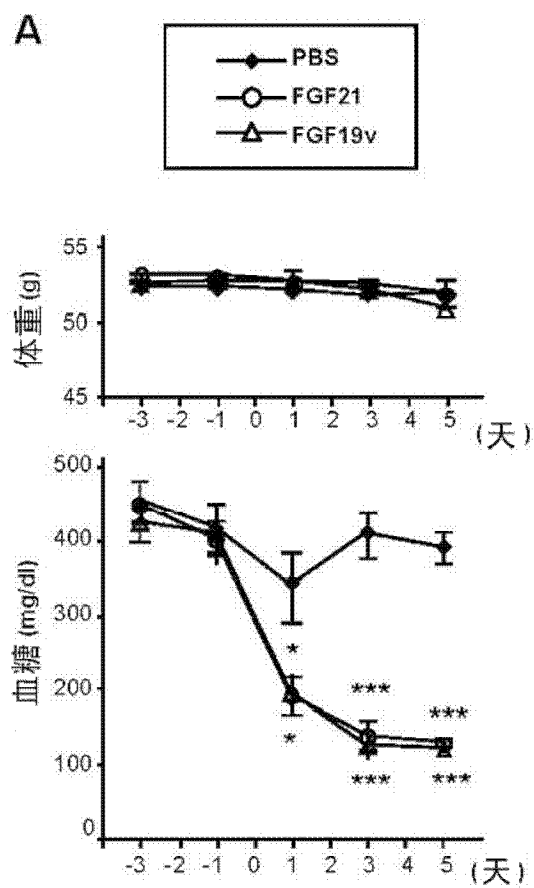
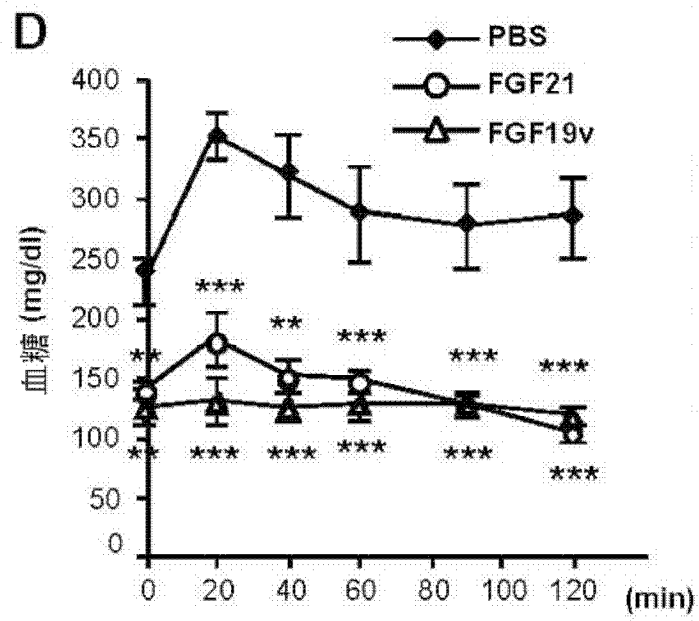
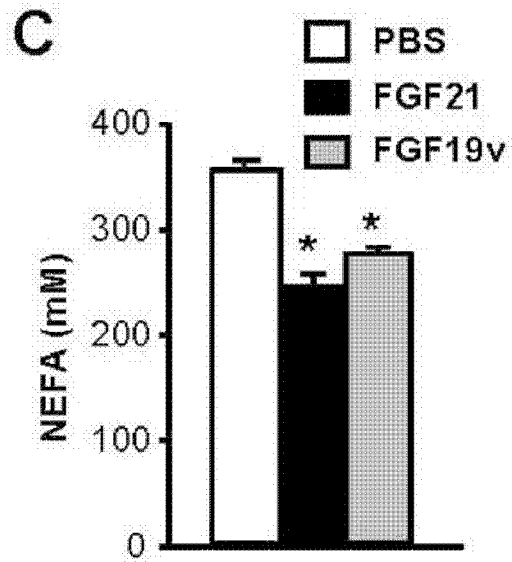


图21





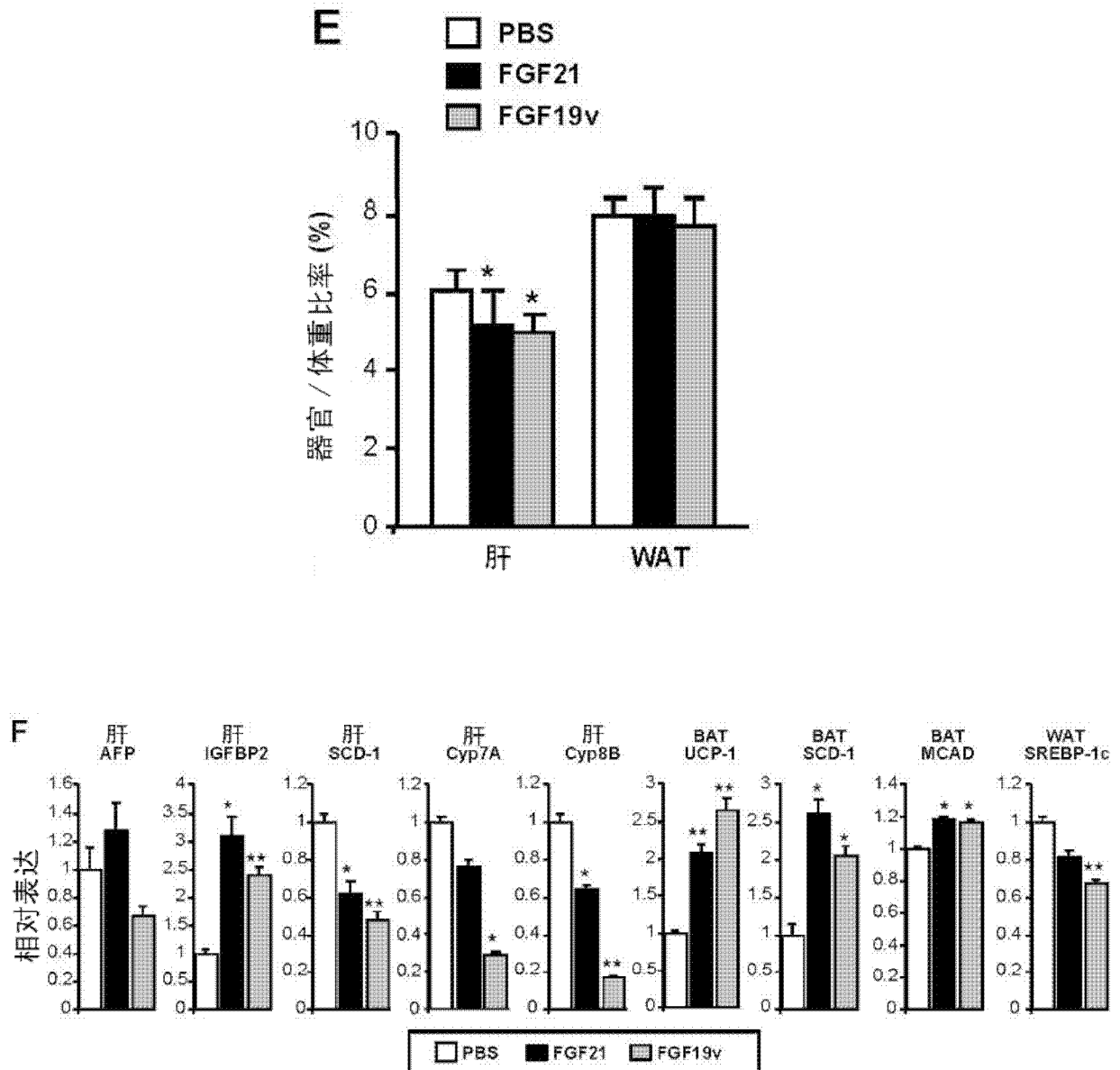


图22