

说明书

发明名称: 蛋白类似物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域。具体地说, 本发明涉及经修饰的蛋白, 特别是脂肪酸修饰的蛋白, 及其在治疗疾病中的用途。

背景技术

[0002] 非酒精性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH)是非酒精性脂肪肝病(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的炎症亚型, 以肝细胞炎症和纤维化为特征, 部分患者可能进展为肝硬化和肝癌。流行病学研究报道, 3-6%的美国成年人口患有NASH, 并且已经成为肝移植的最主要原因之一, 中国NASH患者预计达3000万。NASH是一种病因多样、病理过程复杂的慢性疾病, 伴有多种代谢并发症, 使其治疗复杂, 尚无经过严格随机对照临床试验的NASH治疗药物上市。

[0003] 成纤维细胞生长因子21(FGF21)是一种调节能量平衡和糖脂代谢的应激诱导激素, 属于内分泌型FGFs。临床前研究表明, FGF21具有减轻体重、改善血脂异常、增加胰岛素敏感性、减少肝脏脂肪变性和纤维化等生理药理活性, 显示出巨大的NASH治疗潜力。

[0004] 虽然FGF21对NASH具有潜在的疗效, 但是其半衰期短、稳定性较差, 需频繁注射, 严重影响患者顺应性。因此生物制药公司采取了多种技术手段对其进行改造以改善其成药性。Lilly公司开发的LY-2405319采用截短N端HPIP序列和引入半胱氨酸突变形成额外二硫键的方式(L118C、A134C)增强其稳定性, 并引入S167A突变消除酵母表达产生的O糖基化。Bristol-Myers Squibb公司开发的一周一次皮下注射长效FGF21 BMS-986036(pegbelfermin)通过插入非天然氨基酸pAcF(Q108pAcF), 与含有烷氧基-氨基基团的PEG进行生物正交反应修饰得到, 在延长半衰期的同时增加的溶解度和稳定性。Amgen公司开发的AKR-001对人FGF21进行三处点突变(L98R、P171G和A180E), 并与IgG1 Fc片段融合表达, 达到了降低聚集、减少体内酶解并延长半衰期的目的。Pfizer公司则通过两种手段对

FGF21进行修饰：一是将FGF21连接至框架抗体CVX-2000Fab的特异位点(PF-05231023)，使其具有与抗体类似的药代动力学性质；二是突变CHO细胞表达FGF21潜在的糖基化位点，并与Fc片段融合(PF-06645849)。

[0005] 然而，这些FGF21类似物的改造手段仍然存在诸多问题，例如PEG在体内无法代谢并且产生毒性问题，以及Fc融合蛋白存在的稳定性问题、糖基化问题等。近年来，除了PEG修饰和Fc融合技术，另有多项技术用于多肽和蛋白药物的长效化改造，例如与人血清白蛋白融合、脂肪酸修饰和类PEG的重复多肽序列修饰等。人血清白蛋白(HSA)是人血浆中丰度最高的蛋白质，分子量约67kDa，其在人血浆中的半衰期长达19d。与抗体Fc段类似，HSA同样具有与新生儿受体(FcRn)以pH依赖性方式结合从而逃逸溶酶体降解途径的性质，因而具有较长的半衰期。因此，与HSA融合表达是一种理想的生物药物长效手段，例如阿必鲁肽的体内半衰期长达4-7d。然而，HSA分子量较大，与功能多肽或蛋白融合表达后容易造成生物活性的降低，以及可能限制药物的生物分布。随着PEG修饰的缺点逐渐暴露，许多发挥类似PEG作用的技术逐渐开始成为优化生物药物药代动力学性质的替代手段。德国XL Protein生物技术公司发现了3种氨基酸，Pro、Ala、Ser(PAS)组成的多肽链具有高亲水性、高水溶性等与PEG类似的特点，并且与生长激素、干扰素和Fab片段融合表达后能够显著增加体内活性和半衰期，且相对于PEG修饰等需体外修饰的方法，PAS修饰具有可在大肠杆菌中融合表达的优点。

[0006] 发明内容

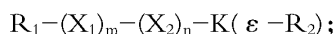
[0007] 本发明的目的在于提供一种活性蛋白药物，例如FGF21的突变体，所述突变体不仅能够保留原有的活性，还能够具备改善的半衰期。

[0008] 在第一方面，本发明提供一种经修饰的蛋白，所述经修饰的蛋白包括蛋白部分和修饰部分，所述蛋白部分在N端任选连接有PAS，所述修饰部分直接或通过连接体与所述蛋白部分中的半胱氨酸残基或所述PAS中的半胱氨酸残基相连，所述半胱氨酸残基是天然存在的或者通过突变引入的。

[0009] 在优选的实施方式中，所述突变是取代或插入；优选取代。

[0010] 在优选的实施方式中，所述蛋白是细胞生长因子、生长激素、干扰素、酶、抗体或其活性片段。

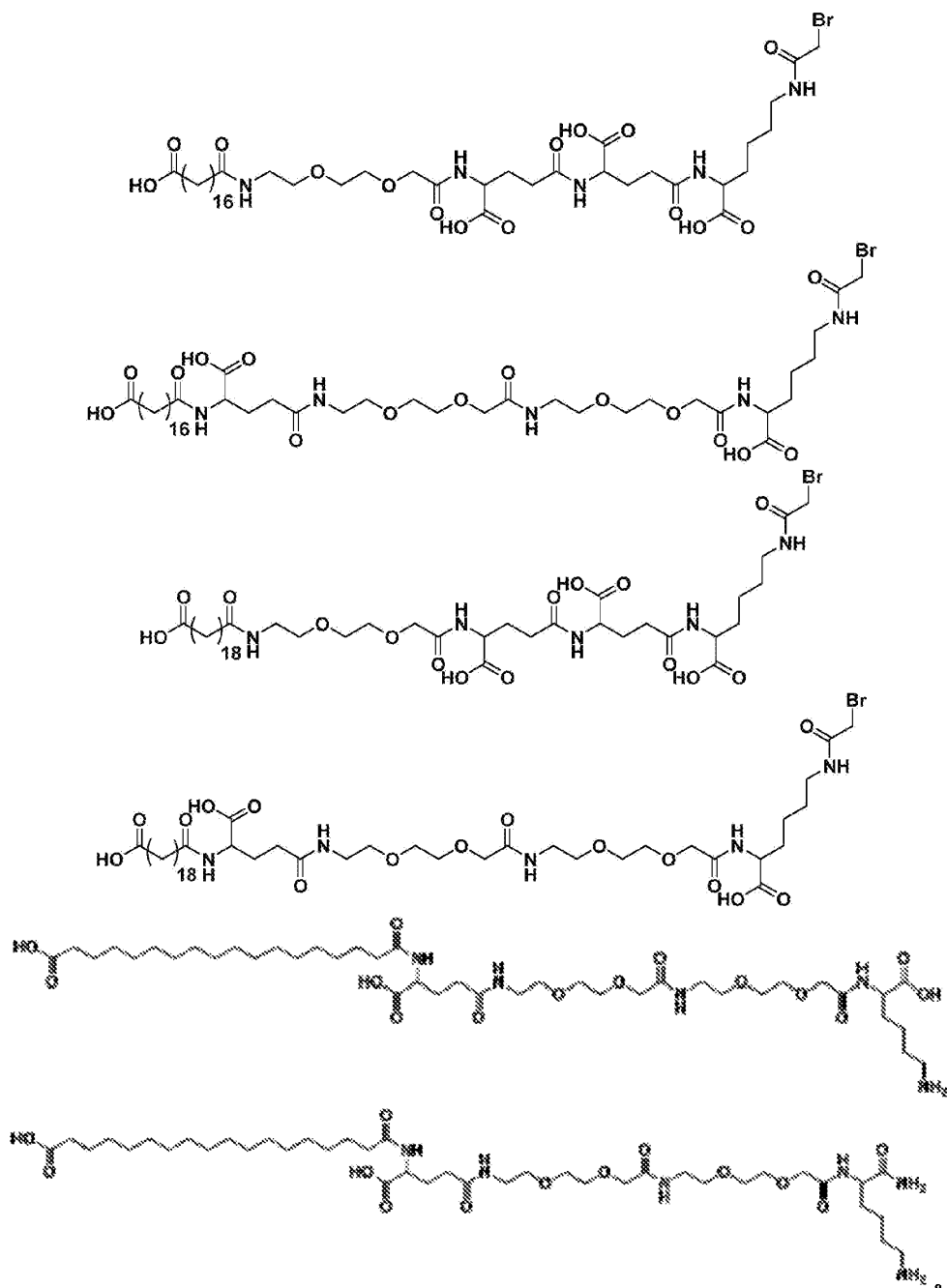
- [0011] 在优选的实施方式中，所述细胞生长因子是表皮纤维细胞生长因子、血小板类纤维细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、类胰岛素纤维细胞生长因子、神经纤维细胞生长因子、白介素类纤维细胞生长因子、红细胞生长素或集落刺激因子。
- [0012] 在具体的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子是成纤维细胞生长因子21。
- [0013] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或2所示。
- [0014] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或2所示，并且其中通过突变引入了半胱氨酸残基。
- [0015] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或2所示，并且Q28、E30、D38、D46、K122或H125突变为半胱氨酸残基。
- [0016] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:4-9中任一所示。
- [0017] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:5-9中任一所示。
- [0018] 在优选的实施方式中，所述修饰部分能够延长所述蛋白部分的体内半衰期。
- [0019] 在优选的实施方式中，所述修饰部分能够与血浆中的蛋白特异性或非特异性结合。
- [0020] 在优选的实施方式中，所述血浆中的蛋白具有长的半衰期；例如，所述血浆中的蛋白的半衰期为10天或以上，优选15天或以上，更优选19天或以上。
- [0021] 在优选的实施方式中，所述血浆中的蛋白是人血清白蛋白。
- [0022] 在具体的实施方式中，所述修饰部分是白蛋白结合剂。
- [0023] 在优选的实施方式中，所述白蛋白结合剂是脂肪酸。
- [0024] 在优选的实施方式中，所述脂肪酸是C18-22脂肪酸。
- [0025] 在优选的实施方式中，所述脂肪酸与人血清白蛋白的结合亲和力 EC_{50} 值宜低于约10 μM ；优选低于约1 μM 。
- [0026] 在具体的实施方式中，所述白蛋白结合剂的结构如下式所示：



- [0027] 式中，K是赖氨酸
- [0028] R_1 为取代或未取代的 C_{1-20} 酰基；
- [0029] m为0-5的整数；
- [0030] n为0-5的整数；
- [0031] X_1 和 X_2 独立选自下组：丙氨酸(Ala)、D-丙氨酸(D-Ala)、 β -丙氨酸(β -Ala)、4-氨基丁酸(GABA)、2-氨基异丁酸(Aib)、2-氨基丁酸(ABU)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酸(Glu)、D-谷氨酸(D-Glu)、 γ -谷氨酸(γ -Glu)、谷氨酰胺(Gln)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、酪氨酸(Tyr)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、氨甲环酸(Trx)、AEEA、PEG；
- [0032] R_2 选自卤素取代的 C_{1-6} 酰基或H。
- [0033] 在优选的实施方式中， R_1 选自：庚酰基、甲基庚酰基、辛酰基、甲基辛酰基、壬酰基、甲基壬酰基、癸酰基、甲基癸酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、十八烷酰基、17-羧基十七酰基、15-羧基十五酰基、13-羧基十三酰基、11-羧基十一酰基。
- [0034] 在优选的实施方式中， R_1 选自：月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、十八烷酰基、17-羧基十七酰基、19-羧基十九酰基。
- [0035] 在优选的实施方式中，m为1-3的整数。
- [0036] 在优选的实施方式中，n为1-3的整数。
- [0037] 在优选的实施方式中， X_1 和 X_2 独立选自下组：为4-氨基丁酸(GABA)、2-氨基异丁酸(Aib)，D-丙氨酸(D-Ala)， β -丙氨酸(β -Ala)，天冬氨酸(Asp)，半胱氨酸(Cys)，谷氨酸(Glu)， γ -谷氨酸(γ -Glu)，甘氨酸(Gly)，丝氨酸(Ser)，酪氨酸(Tyr)。
- [0038] 在优选的实施方式中， X_1 和 X_2 独立选自下组：谷氨酸(Glu)， γ -谷氨酸(γ -Glu)，酪氨酸(Tyr)。
- [0039] 在优选的实施方式中， R_2 选自卤素取代的 C_{1-3} 酰基或H。

[0040] 在优选的实施方式中， R_2 选自碘乙酰基、溴乙酰基或H；更优选溴乙酰基或H。

[0041] 在具体的实施方式中，所述白蛋白结合剂选自下组：



[0042] 在具体的实施方式中，所述PAS是PAS₁₅–PAS₂₀₀；优选PAS₁₅–PAS₁₀₀；例如PAS₅₀。

[0043] 在优选的实施方式中，所述PAS₅₀如SEQ ID NO:11所示。

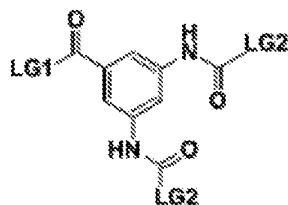
[0044] 在优选的实施方式中，在所述PAS₅₀的N端第3位插入有半胱氨酸残基。

[0045] 在优选的实施方式中，所述PAS可以替换为接头序列(GSSSS)_p，p选自1–3的整数。

[0046] 在具体的实施方式中，所述连接体是多价连接体，从而可以连接一个或多个白蛋白结合剂，以及一个或多个蛋白部分。

[0047] 在优选的实施方式中，所述多价连接体连接一个白蛋白结合剂，以及多个蛋白部分。

[0048] 在具体的实施方式中，所述多价连接体的结构如下式所示：



[0049] 式中，

[0050] LG1是对伯氨基具有反应性的离去基团；

[0051] LG2是对巯基具有反应性的离去基团。

[0052] 在优选的实施方式中，LG1是对Lys具有反应性的离去基团。

[0053] 在优选的实施方式中，LG2是对Cys具有反应性的离去基团。

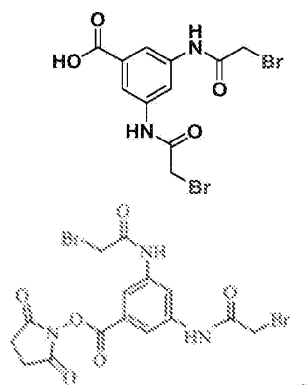
[0054] 在优选的实施方式中，LG1连接白蛋白结合剂，LG2连接蛋白部分。

[0055] 在优选的实施方式中，LG1选自肽合成中常规使用的活性酯基团，包括但不限于：N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯基团、磺基-NHS酯基团、五氟苯酚(PFP)酯基团、对硝基苯酚(PNP)酯基团、羟基苯并三唑(HOBt)酯基团和(羟基亚氨基)氰基乙酸乙酯(Oxyma)基团。

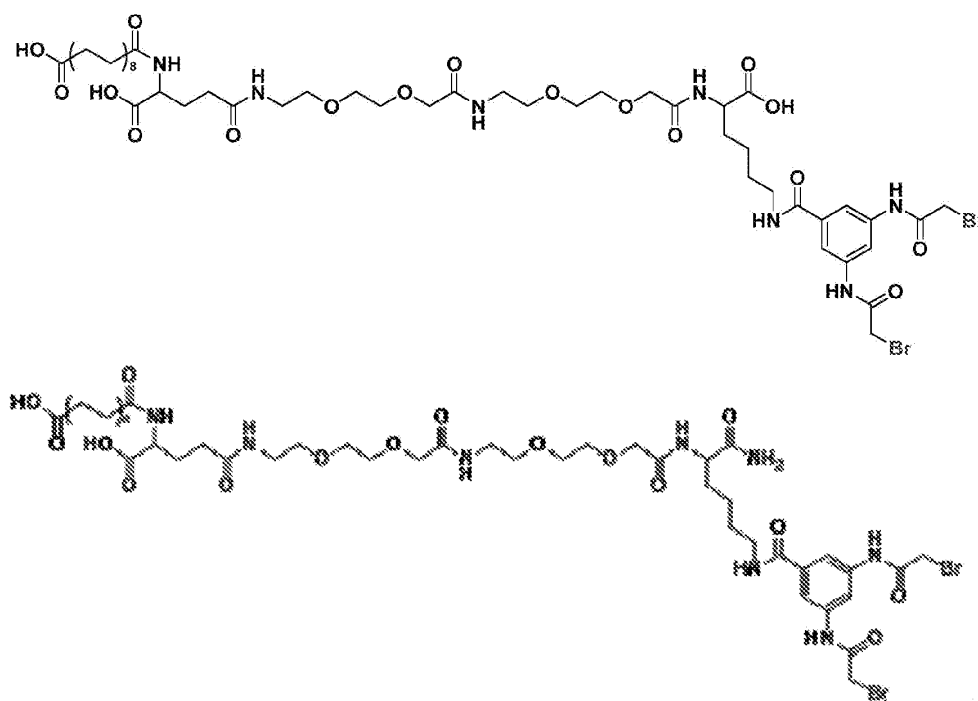
[0056] 在优选的实施方式中，LG1是由琥珀酰亚胺酯(OSu酯)活化的羧酸部分或羟基。

[0057] 在优选的实施方式中，LG2选自卤素，例如碘、溴或氯。

[0058] 在优选的实施方式中，所述多价连接体如下式所示：



[0059] 在优选的实施方式中，所述白蛋白结合剂与多价连接体形成以下结构：



[0060] 在具体的实施方式中，其特征在于，所述经修饰的蛋白选自以下编号的化合物：5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、5.10、5.11、5.12、5.13、5.14、5.15、7.2、7.3、7.4、7.5、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6。

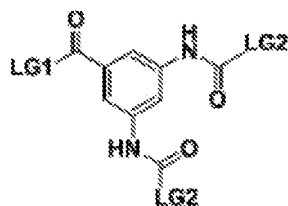
[0061] 在优选的实施方式中，所述经修饰的蛋白选自以下编号的化合物：5.3、5.4、5.5、5.15、7.4、7.5、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6。

[0062] 在第二方面，本发明提供一种蛋白多聚体，所述蛋白多聚体中包含多价连接体和多个蛋白单体，所述蛋白单体在N端任选连接有PAS，所述多价连接体与所述

蛋白单体中的半胱氨酸残基或所述PAS中的半胱氨酸残基相连，所述半胱氨酸残基是天然存在的或者通过突变引入的。

- [0063] 在优选的实施方式中，所述蛋白多聚体中包含2-3个；优选2个蛋白单体。
- [0064] 在优选的实施方式中，所述蛋白多聚体中，所述多价连接体与所述PAS中的半胱氨酸残基相连。
- [0065] 在具体的实施方式中，所述PAS是PAS₁₅-PAS₂₀₀；优选PAS₁₅-PAS₁₀₀；例如PAS₅₀。
- [0066] 在优选的实施方式中，所述PAS可以替换为接头序列(GSSSS)_p，p选自1-3的整数。
- [0067] 在优选的实施方式中，所述突变是取代或插入；优选取代。
- [0068] 在优选的实施方式中，所述蛋白是细胞生长因子、生长激素、干扰素、酶、抗体或其活性片段。
- [0069] 在优选的实施方式中，所述细胞生长因子是表皮纤维细胞生长因子、血小板类纤维细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、类胰岛素纤维细胞生长因子、神经纤维细胞生长因子、白介素类纤维细胞生长因子、红细胞生长素或集落刺激因子。
- [0070] 在具体的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子是成纤维细胞生长因子21。
- [0071] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或2所示。
- [0072] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或2所示，并且其中通过突变引入了半胱氨酸残基。
- [0073] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或2所示，并且Q28、E30、D38、D46、K122或H125突变为半胱氨酸残基。
- [0074] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:4-9中任一所示。
- [0075] 在优选的实施方式中，所述成纤维细胞生长因子21的氨基酸序列如SEQ ID NO:5-9中任一所示。

[0076] 在具体的实施方式中，所述多价连接体的结构如下式所示：



[0077] 式中，

[0078] LG1是对伯氨基具有反应性的离去基团；

[0079] LG2是对巯基具有反应性的离去基团。

[0080] 在优选的实施方式中，LG1是对Lys具有反应性的离去基团。

[0081] 在优选的实施方式中，LG2是对Cys具有反应性的离去基团。

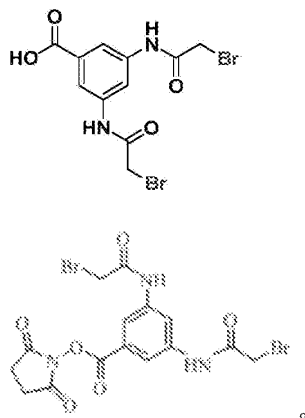
[0082] 在优选的实施方式中，LG1连接白蛋白结合剂，LG2连接蛋白部分。

[0083] 在优选的实施方式中，LG1选自肽合成中常规使用的活性酯基团，包括但不限于：N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯基团、磺基-NHS酯基团、五氟苯酚(PFP)酯基团、对硝基苯酚(PNP)酯基团、羟基苯并三唑(HOBT)酯基团和(羟基亚氨基)酞基乙酸乙酯(Oxyma)基团。

[0084] 在优选的实施方式中，LG1是由琥珀酰亚胺酯(OSu酯)活化的羧酸部分或羟基。

[0085] 在优选的实施方式中，LG2选自卤素，例如碘、溴或氯。

[0086] 在优选的实施方式中，所述多价连接体如下式所示：



[0087] 在优选的实施方式中，所述蛋白多聚体选自以下编号的化合物：10.1、10.2、10.3、10.4、10.5。

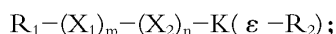
[0088] 在第三方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含第一方面所述的经修饰的蛋白或第二方面所述的蛋白多聚体和药学上可接受的赋形剂。

[0089] 在优选的实施方式中，所述药物组合物适用于非酒精性脂肪肝炎、2型糖尿病、高脂血症、动脉粥样硬化；优选非酒精性脂肪肝炎。

[0090] 在第四方面，本发明提供第一方面所述的经修饰的蛋白或第二方面所述的蛋白多聚体在制备药物中的用途。

[0091] 在优选的实施方式中，所述药物适用于非酒精性脂肪肝炎、2型糖尿病、高脂血症、动脉粥样硬化；优选非酒精性脂肪肝炎。

[0092] 在第五方面，本发明提供一种白蛋白结合剂，所述白蛋白结合剂的结构如下式所示：



[0093] 式中，K是赖氨酸；

[0094] R_1 为取代或未取代的 C_{1-20} 酰基；

[0095] m为0-5的整数；

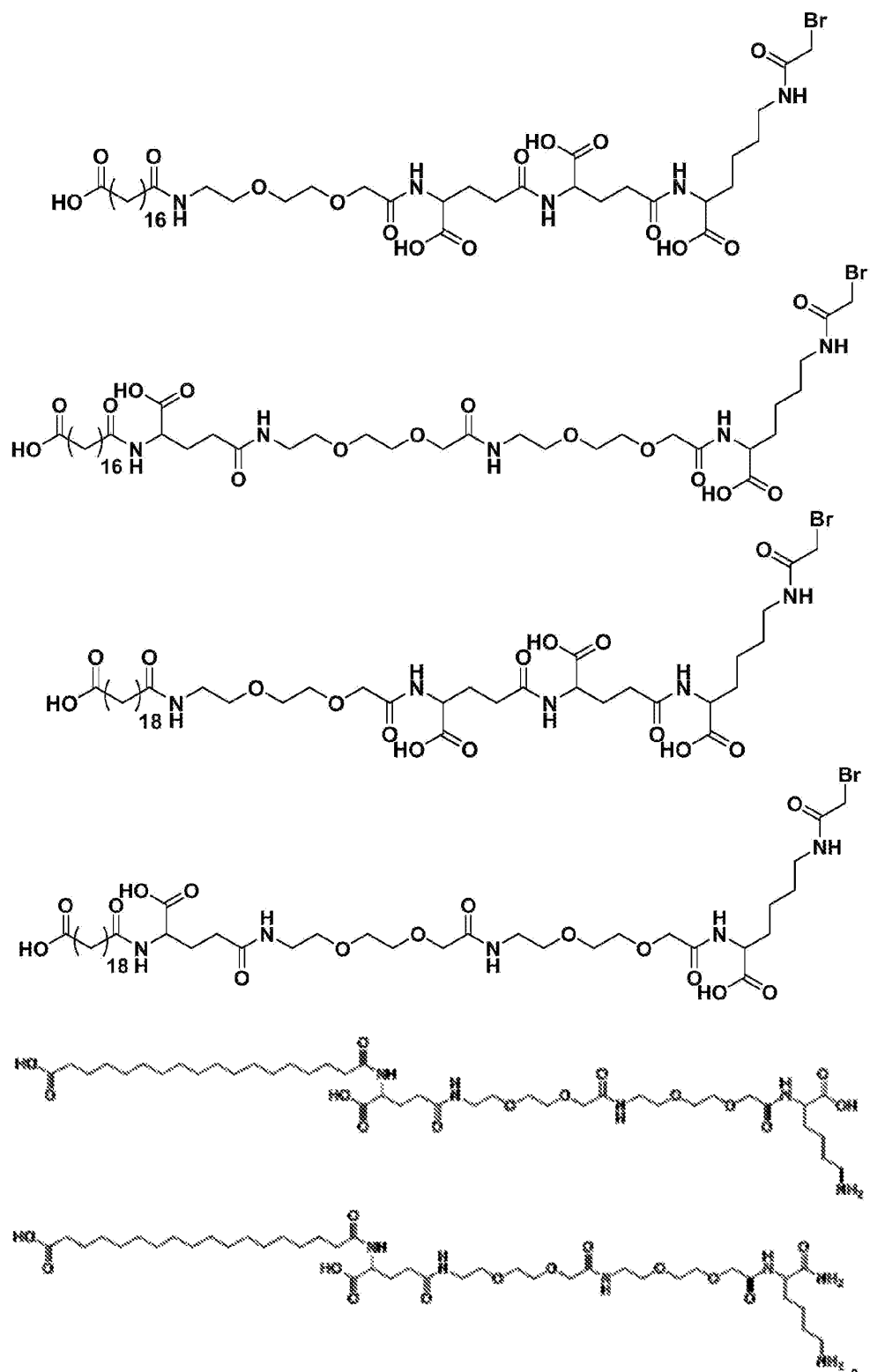
[0096] n为0-5的整数；

[0097] X_1 和 X_2 独立选自下组：丙氨酸(Ala)、D-丙氨酸(D-Ala)、 β -丙氨酸(β -Ala)、4-氨基丁酸(GABA)、2-氨基异丁酸(Aib)、2-氨基丁酸(Abu)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酸(Glu)、D-谷氨酸(D-Glu)、 γ -谷氨酸(γ -Glu)、谷氨酰胺(Gln)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、酪氨酸(Tyr)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、氨甲环酸(Trx)、AEEA、PEG；

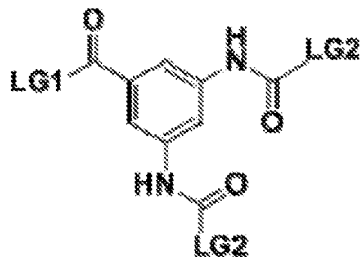
[0098] R_2 选自卤素取代的 C_{1-6} 酰基或H。

[0099] 在优选的实施方式中， R_1 选自：庚酰基、甲基庚酰基、辛酰基、甲基辛酰基、壬酰基、甲基壬酰基、癸酰基、甲基癸酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、十八烷酰基、17-羧基十七酰基、15-羧基十五酰基、13-羧基十三酰基、11-羧基十一酰基。

- [0100] 在优选的实施方式中， R_1 选自：月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、十八烷酰基、17-羧基十七酰基、19-羧基十九酰基。
- [0101] 在优选的实施方式中， m 为1-3的整数。
- [0102] 在优选的实施方式中， n 为1-3的整数。
- [0103] 在优选的实施方式中， X_1 和 X_2 独立选自下组：为4-氨基丁酸(GABA)、2-氨基异丁酸(Aib)，D-丙氨酸(D-Ala)， β -丙氨酸(β -Ala)，天冬氨酸(Asp)，半胱氨酸(Cys)，谷氨酸(Glu)， γ -谷氨酸(γ -Glu)，甘氨酸(Gly)，丝氨酸(Ser)，酪氨酸(Tyr)。
- [0104] 在优选的实施方式中， X_1 和 X_2 独立选自下组：谷氨酸(Glu)， γ -谷氨酸(γ -Glu)，酪氨酸(Tyr)。
- [0105] 在优选的实施方式中， R_2 选自卤素取代的 C_{1-3} 酰基或H。
- [0106] 在优选的实施方式中， R_2 选自碘乙酰基、溴乙酰基或H；更优选溴乙酰基或H。
- [0107] 在具体的实施方式中，所述白蛋白结合剂选自下组：



[0108] 在第六方面，本发明提供一种多价连接体，所述多价连接体的结构如下式所示：



[0109] 式中，

[0110] LG1是对伯氨基具有反应性的离去基团；

[0111] LG2是对巯基具有反应性的离去基团。

[0112] 在优选的实施方式中，LG1是对Lys具有反应性的离去基团。

[0113] 在优选的实施方式中，LG2是对Cys具有反应性的离去基团。

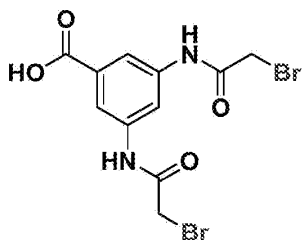
[0114] 在优选的实施方式中，LG1连接白蛋白结合剂，LG2连接蛋白部分。

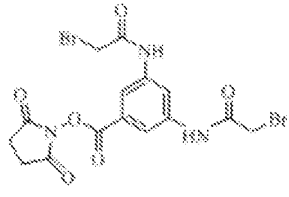
[0115] 在优选的实施方式中，LG1选自肽合成中常规使用的活性酯基团，包括但不限于：N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯基团、磺基-NHS酯基团、五氟苯酚(PFP)酯基团、对硝基苯酚(PNP)酯基团、羟基苯并三唑(HOBt)酯基团和(羟基亚氨基)氰基乙酸乙酯(Oxyma)基团。

[0116] 在优选的实施方式中，LG1是由琥珀酰亚胺酯(OSu酯)活化的羧酸部分或羟基。

[0117] 在优选的实施方式中，LG2选自卤素，例如碘、溴或氯。

[0118] 在优选的实施方式中，所述多价连接体如下式所示：





- [0119] 在第七方面，本发明提供一种多肽，所述多肽包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。
- [0120] 在第八方面，本发明提供一种多肽，所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示，但在N端第3位插入有半胱氨酸残基。
- [0121] 在第九方面，本发明提供一种多肽，所述多肽包含SEQ ID NO:4-9中任一项所示的氨基酸序列；优选SEQ ID NO:5-9中任一项所示的氨基酸序列。
- [0122] 在第十方面，本发明提供一种分离的核酸分子，所述核酸分子编码第七-第九方面的任一方面的所述的多肽。
- [0123] 在第十一方面，本发明提供一种表达载体，所述表达载体包含第十方面所述的分离的核酸分子。
- [0124] 在第十二方面，本发明提供一种宿主细胞，所述宿主细胞包含第十一方面所述的表达载体或者所述宿主细胞的基因组上整合有第十方面所述的核酸分子。
- [0125] 在第十三方面，本发明提供第十-十二方面所述的多肽在制备第一方面所述的经修饰蛋白、第二方面所述的蛋白多聚体或第三方面所述的药物组合物中的用途。
- [0126] 在第十四方面，本发明提供一种治疗方法，所述方法包括将治疗有效量的第一方面所述的经修饰的蛋白、第二方面所述的蛋白多聚体或第三方面所述的药物组合物给予有此需要的受试者的步骤。
- [0127] 在优选的实施方式中，所述治疗方法适用于非酒精性脂肪肝炎、2型糖尿病、高脂血症、动脉粥样硬化；优选非酒精性脂肪肝炎。
- [0128] 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

[0129] 图1显示了小鼠体内药代动力学曲线；

[0130] 图2显示了小型猪体内药代动力学曲线。

具体实施方式

[0131] 发明人经过广泛而深入的研究，出乎意料地发现一种代谢调节蛋白FGF21的类似物，从而获得具备NASH治疗潜力的FGF21类似物。这类FGF21类似物不仅与其受体具有优异的结合亲和力，其体内半衰期也显著改善。在此基础上完成了本发明。

[0132] 除非另有说明，本文所用的术语具有本领域技术人员通常理解的含义。当本文中出現商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。为清晰起见，对本文所用的一些术语定义如下：

[0133] 本文所用的术语“分离的核酸分子”具有本领域技术人员常规理解的含义，其是指：1)从总核酸从来源细胞分离时与之天然共存的至少约50%的蛋白质、脂质、碳水化合物或其它材料中分离出来，2)不与“分离核酸分子”天然连接的多核苷酸的全部或部分连接，3)与天然不与之连接的多核苷酸有效连接，或4)天然不作为较大多核苷酸序列的部分存在。优选地，分离的核酸分子基本上无任何其它的污染核酸分子或在其自然环境存在的可能干扰其在多肽产生中的用途或其治疗、诊断、预防或研究用途的其它污染物。

[0134] 本文所用的术语“载体”具有本领域技术人员常规理解的含义，其是指用于向宿主细胞传递编码信息的任何分子(例如核酸、质粒或病毒)。

[0135] 本文所用的术语“表达载体”具有本领域技术人员常规理解的含义，其是指适于宿主细胞转化并含有指导和/或控制插入异源核酸序列表达的核酸序列的载体。表达包括但不限于诸如转录、翻译和RNA剪接(如果内含子存在的话)等过程。

[0136] 本文所用的术语“有效连接”具有本领域技术人员常规理解的含义，其是指侧翼序列的排列方式，其中配置或装配如此所述的侧翼序列从而发挥其常规功能。因此，与编码序列有效连接的侧翼序列可能能够实现编码序列的复制、转录和/或翻译。例如，当启动子能够指导编码序列转录时，该编码序列与该启动子有效连接。侧翼序列不必与编码序列邻接，只要其正确起作用即可。因此，例

如，间插的非翻译但却转录的序列可存在于启动子序列和编码序列之间，启动子序列仍可被视为与编码序列“有效连接”。

- [0137] 本文所用的术语“宿主细胞”具有本领域技术人员常规理解的含义，其是指被核酸序列(例如本文提供的核酸)转化或能够被所述核酸序列转化然后能够表达选定的目标基因的细胞。该术语包括亲代细胞的子代，无论子代在形态或遗传组成上是否与最初的亲代相同，只要存在选定的基因。
- [0138] 在本发明上下文中，本文所用术语“FGF21”意指人成纤维细胞生长因子21和所述FGF21的突变体。本文所用“FGF21”和“人成纤维细胞生长因子21”可互换使用。所述突变体应理解为通过以下步骤获得的化合物：用另一天然或非天然氨基酸取代FGF21序列中的一个或多个氨基酸残基；和/或将一个或多个天然或非天然氨基酸添加到FGF21序列中；和/或从FGF21序列中缺失一个或多个氨基酸残基，其中这些步骤中的任何一个可任选后接一个或多个氨基酸残基的进一步衍生。具体而言，在一个氨基酸残基被来自相同组的另一氨基酸残基取代(即被另一具有相似特性的氨基酸残基取代)的情况下，这类取代为保守的。可基于其特性将氨基酸适宜地分为以下组别：碱性氨基酸(例如精氨酸、赖氨酸、组氨酸)、酸性氨基酸(例如谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(例如谷氨酰胺、半胱氨酸和天冬酰胺)、疏水氨基酸(例如亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(例如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸)和小氨基酸(例如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸)。通常FGF21突变体与人FGF21具有至少80%同一性。
- [0139] “基本上”意指几乎全部或完全，例如满足以下中的一项或多项：大于50%、51%或更大、75%或更大、80%或更大、90%或更大以及95%或更大的情况。
- [0140] 如在此所使用，通过以下方式确定“序列同一性”：将参比DNA的序列与另一个DNA序列对齐比较，从而使这两个序列之间的重叠最大化并且同时使序列空位最小化来确定，其中忽略这两个序列之间的任何突出序列。就在此描述的任何序列同一性来说，优选的是至少80%，更优选的是85%，又更优选的是90%，再又优选的是95%序列同一性，并且最优选的是96%、97%、98%以及99%序列同一性。

- [0141] 蛋白中的氨基酸残基缩写如下：苯丙氨酸是Phe或F；亮氨酸是Leu或L；异亮氨酸是Ile或I；甲硫氨酸是Met或M；缬氨酸是Val或V；丝氨酸是Ser或S；脯氨酸是Pro或P；苏氨酸是Thr或T；丙氨酸是Ala或A；酪氨酸是Tyr或Y；组氨酸是His或H；谷氨酰胺是Gln或Q；天冬酰胺是Asn或N；赖氨酸是Lys或K；天冬氨酸是Asp或D；谷氨酸是Glu或E；半胱氨酸是Cys或C；色氨酸是Trp或W；精氨酸是Arg或R；甘氨酸是Gly或G。
- [0142] 术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生，该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。例如，乙基“任选”被卤素取代，指乙基可以是未被取代的(CH₂CH₃)、单取代的(如CH₂CH₂F)、多取代的(如CHFCH₂F、CH₂CHF₂等)或完全被取代的(CF₂CF₃)。本领域技术人员可理解，对于包含一个或多个取代基的任何基团，不会引入任何在空间上不可能存在和/或不能合成的取代或取代模式。
- [0143] 本文所用的C_{m-n}指该部分中具有m-n个碳原子。例如，“碳0-6亚烷基”指该亚烷基具有0-6个碳原子，当亚烷基具有0个碳原子时，该基团为键。
- [0144] 本文中的数字范围，是指给定范围中的各个整数。例如“C₁₋₆”是指该基团可具有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子、4个碳原子、5个碳原子或6个碳原子。
- [0145] 当任何变量(例如R)在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被2个R所取代，则每个R都有独立的选项。
- [0146] 术语“被取代”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧代(即=O)时，意味着两个氢原子被取代，氧代不会发生在芳香基上。
- [0147] 术语“缀合(物)”作为名词表示经修饰的蛋白质，即为了修改所述蛋白质的性质而与其键合的部分的蛋白质；作为动词，该术语表示让部分与蛋白质键合以修改所述蛋白质性质的过程。
- [0148] 本文使用的术语“FGF21融合蛋白”是指一个或多个氨基酸残基(例如异源蛋白或肽)在本文所述的任何FGF21多肽突变体的N末端或C末端的融合。异源肽和多肽包括但不限于可供检测和/或分离FGF21多肽突变体的表位：跨膜受体蛋白

或其部分，例如胞外结构域或跨膜和胞内结构域；与跨膜受体蛋白结合的配体或其部分；酶或其有催化活性的部分；促进寡聚化的多肽或肽，例如亮氨酸拉链域；提高稳定性的多肽或肽，例如免疫球蛋白恒定区(例如，结构域)：半寿期延长序列，其包含两个或更多个(例如，2、5、10、15、20、25个等)天然存在或非天然存在的、带电荷和/或不带电荷的氨基酸(例如，丝氨酸、甘氨酸、谷氨酸或天冬氨酸)的组合，将其设计形成主要亲水的或主要疏水的突变体的融合配偶体；功能性或非功能性抗体，或者其重链或轻链；以及具有不同于本发明FGF21多肽突变体的诸如治疗活性等多肽。FGF21融合蛋白可通过使异源序列与FGF21多肽突变体的N末端或C末端融合来制备。本文所述的异源序列可以是氨基酸序列或含有非氨基酸的聚合物。异源序列可与FGF21多肽突变体直接融合或者通过接头或衔接分子融合。接头或衔接分子可为一个或多个氨基酸残基(或氨基酸聚体)，例如1、2、3、4、5、6、7、8或9个残基(或氨基酸聚体)，优选10–50个氨基酸残基(或氨基酸聚体)，例如10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50个残基(或氨基酸聚体)，更优选15–35个氨基酸残基(或氨基酸聚体)。接头或衔接分子还可设计成具有DNA限制性内切核酸酶或蛋白酶的切割位点以供分离融合部分。

[0149] 本文所涉及的在FGF21前后的术语“类似物”或“衍生物”，即FGF21类似物或FGF21衍生物，是指由或者可以由天然FGF21、特别是由或者可以由SEQ ID NO:1推导出或衍生的多肽，即通过其氨基酸序列的修饰这样的修饰(modification)、修改(amendment)或变化(change)可包括一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加。例如，可以在氨基酸序列中的C-末端、N-末端或内部添加和/或缺失氨基酸。优选在C-末端和/或N-末端、更优选在N-末端添加和/或缺失氨基酸。具有C-末端或N-末端缺失的氨基酸的氨基酸序列也可以称为截短的序列，这是本领域已知的。同样地，在序列内部添加的氨基酸可以称为插入。

[0150] “侧链”是一种化学单元，本身不具备特殊性质尤其是生物学活性，在本发明的一个或多个实施例中，侧链包括白蛋白结合剂侧链和多价连接体侧链。

- [0151] 术语“白蛋白结合剂”本身不是限制性的，而是描述性的，因为它反映出与FGF21连接的总体目标或目的，也就是所得缀合物(或类似物)能够与人血清白蛋白结合，结合的目的在于为本发明的类似物提供或至少贡献持效性效果。如果需要，该术语也可以用例如化合物等其它通用化学术语替代。
- [0152] “多价连接体”：在本发明的背景下，连接体是用来共价连接所讨论的蛋白质的化学部分或残基。当连接体与蛋白质反应时，形成连接体基团。因此，术语“-连接体-”旨在表示缀合物的化学单元，其与蛋白质缀合物的每个多肽的氨基酸残基共价连接。然而，使用根据本发明的多价连接体(包括二价连接体、三价连接体)，获得FGF21二聚体。
- [0153] “PAS”用于描述以脯氨酸(P)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)组成的重复氨基酸序列，由0至约400个氨基酸残基组成的氨基酸序列，例如约10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400。PAS氨基酸的数目以下标形式标注，例如PAS₁₀即为10个由脯氨酸(P)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)残基组成的PAS。在一些方案中，所述的PAS的脯氨酸残基占多肽PAS的总氨基酸残基的10%–40%。在具体的实施方式中，所述PAS是PAS₁₅–PAS₂₀₀；优选PAS₁₅–PAS₁₀₀；例如PAS₅₀。
- [0154] 在本发明上下文中，术语“药学上可接受的盐”表示对患者无害的盐。所述盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷化铵盐。酸加成盐包括无机酸以及有机酸的盐。合适的无机酸的代表性实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等。合适的有机酸的代表性实例包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、富马酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、扑酸、双亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡萄糖酸、柠檬酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等。另外金属盐包括锂盐、钠盐、

钾盐、镁盐等。铵盐和烷化铵盐包括铵盐、甲基铵盐、二甲基铵盐、三甲基铵盐、乙基铵盐、羟基乙基铵盐、二乙基铵盐、丁基铵盐、四甲基铵盐等。

[0155] 本申请还包括与本文中记载的那些相同的，但一或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数不同的原子置换的同位素标记的本申请化合物。可结合到本申请化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

[0156] 某些同位素标记的本申请化合物(例如用 ^3H 及 ^{14}C 标记的那些)可用于化合物和/或底物组织分布分析中。氚化(即 ^3H)和碳-14(即 ^{14}C)同位素对于由于它们易于制备和可检测性是尤其优选的。此外，用较重同位素(诸如氙(即 ^3H))取代可以提供某些由更高的代谢稳定性产生的治疗优点(例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求)，并且因此在某些情形下可能是优选的。正电子发射同位素，诸如 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{11}C 和 ^{18}F 可用于正电子发射断层扫描(PET)研究以测定底物占有率。通常可以通过与公开于下文的方案和/或实施例中的那些类似的下列程序，通过同位素标记试剂取代未经同位素标记的试剂来制备同位素标记的本申请化合物。

[0157] FGF21类似物的治疗用途：FGF21类似物可用来治疗、诊断、改善或预防多种疾病、病症或病况，包括但不限于代谢紊乱。包括糖尿病；血脂异常；高血压；脂肪肝变性，例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH)；心血管疾病，例如动脉粥样硬化。

[0158] 在应用中，可通过以治疗有效剂量的量给予有需要的患者本文所述的FGF21多肽突变体来治疗诸如糖尿病或肥胖症等病症或病况。可按本文所述方法给药，例如通过静脉内注射、腹膜内注射、肌肉注射，或者以片剂或液体制剂的形式口服。在大多数情况下，所需剂量可按本文所述由临床工作人员确定，并且可代表FGF21突变体多肽的治疗有效剂量。对本领域技术人员显而易见的是，治疗有效剂量的FGF21突变体多肽尤其将取决于给药方案、所给予的物质的单位剂量(不论核酸分子或多肽是否与其它治疗剂组合给予)、免疫状态和接受者的健康状况。本文使用的术语“治疗有效剂量”意指由研究人员或其它临床医师所寻求的

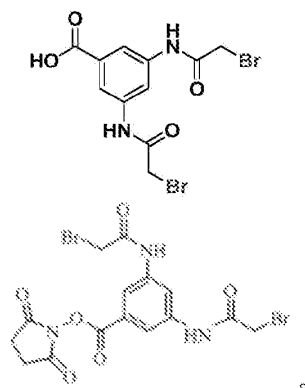
在组织系统、动物或人中引发生物反应或药物反应的FGF21突变体多肽的量，它包括减轻待治疗的疾病或病症的症状。

- [0159] 在具体的实施方式中，本发明的FGF21变体包含SEQ ID NO:4-9中任一项所示，优选SEQ ID NO:5-9中任一项所示的氨基酸序列。
- [0160] 本发明的经修饰的蛋白
- [0161] 在本发明中，将蛋白药物和能够结合在体内具有长半衰期的蛋白的特定化学分子或结构域(如ABD)偶联，则可以延长药物的体内半衰期，同时对药物的生物分布影响较小。所述体内具有长半衰期的蛋白是血浆中的蛋白，优选人血清白蛋白。
- [0162] 所述体内具有长半衰期的蛋白是人血清白蛋白的情况下，所述能够结合在体内具有长半衰期的蛋白的特定化学分子是白蛋白结合剂。所述白蛋白结合剂是能够特异性或非特异性与人血清白蛋白结合的物质，例如脂肪酸。
- [0163] 在具体的实施方式中，本发明的白蛋白结合剂的结构如下式所示：
$$R_1-(X_1)_m-(X_2)_n-K(\epsilon-R_2);$$
- [0164] 式中，K、 R_1 、m、n、 X_1 、 X_2 和 R_2 如上所述。
- [0165] 基于上述白蛋白结合剂，本发明提供这样一种经修饰的蛋白，所述经修饰的蛋白中白蛋白结合剂与所述蛋白部分中的半胱氨酸残基相连。基于本发明的教导，本领域技术人员知晓，所述半胱氨酸残基可以是天然存在的或者通过突变引入。突变的方式可以是取代或插入，但优选取代。
- [0166] 在本发明的经修饰的蛋白中，所述蛋白部分还可以在N端连接有PAS。此处的“PAS”的含义如上文所解释的。在具体的实施方式中，本发明的经修饰的蛋白中在N端包含的PAS是PAS₅₀；优选如SEQ ID NO:11所示。基于本发明的教导，本领域技术人员可以理解，白蛋白结合剂也可以通过所述PAS与所述经修饰的蛋白中的蛋白部分相连。因此，为与白蛋白结合剂相连，可以通过突变的方式(优选插入的方式)在所述PAS中引入半胱氨酸残基。在优选的实施方式中，在所述PAS₅₀的N端第3位插入半胱氨酸残基。
- [0167] 本发明人进一步发现，在本发明的经修饰的蛋白中，所述修饰部分还可以通过连接体与所述蛋白部分中的半胱氨酸残基或所述PAS中的半胱氨酸残基相连，所

述半胱氨酸残基是天然存在的或者通过突变引入的。所述连接体可以是多价连接体，从而可以连接一个或多个白蛋白结合剂，以及一个或多个蛋白部分。优选地，在本发明的经修饰的蛋白中，通过多价连接体连接一个白蛋白结合剂，以及多个蛋白部分。所述多价连接体的在具体结构如上文所示。

- [0168] 基于本发明的教导，本领域技术人员知晓如何获得本发明的经修饰的蛋白，例如通过常规的合成技术获得本发明的白蛋白结合剂和连接体，通过常规的生物技术获得蛋白部分和连接PAS的蛋白部分，随后将白蛋白结合剂直接或经连接体连接到蛋白部分。例如，本领域技术人员可以凭借常规技术手段获得编码本发明的经修饰蛋白中的蛋白部分或PAS的核酸分子，随后可以通过常规的生物技术手段，利用宿主细胞获得蛋白部分或连接有PAS的蛋白部分。本发明也包括了这种核酸分子、或包含所述核酸分子的表达载体以及宿主细胞。
- [0169] 在制备得到本发明的经修饰的蛋白后，可以通过本领域已知的技术来纯化经修饰的蛋白。所述技术包括但不限于反相高效制备液相层析、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等。纯化蛋白的实际条件将部分取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素，而且对于本领域中的技术人员将是显而易见的。可以使用高效制备液相层析来分离经修饰的蛋白。可以通过多种已知的分析方法中的任一种来测定经修饰的蛋白的纯度，包括凝胶电泳、高效液相层析等，并通过质谱验证分子量。
- [0170] 在进一步的实施方式中，本发明提供了具有N端PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白。N端PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白获得成功制备，并以报告基因法测定细胞活性。为本领域技术人员所熟知，通过二硫键相连接的化合物，包括但不限于与FGF21融合蛋白游离Cys反应加合所得Cys、还原型谷胱甘肽、半胱胺等化合物也包含在FGF21融合蛋白之内。
- [0171] 在N端PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白的基础上，本发明人得到了白蛋白结合剂侧链修饰的FGF21缀合物。
- [0172] 本发明的白蛋白结合剂可以通过连接体，例如多价连接体连接于蛋白部分，例如PAS₅₀修饰的FGF21蛋白。在具体的实施方式中，白蛋白结合剂通过多价连接体连接于N端PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白。

- [0173] 在具体的实施方式中，本发明的经修饰的蛋白选自以下编号的化合物：5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、5.10、5.11、5.12、5.13、5.14、5.15、7.2、7.3、7.4、7.5、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6；优选以下编号的化合物：5.3、5.4、5.5、5.15、7.4、7.5、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6，并由报告基因法鉴定其生物活性。
- [0174] 利用本发明的多价连接体，本发明人还得到了蛋白多聚体，所述蛋白多聚体中包含通过多价连接体连接的多个蛋白单体。所述蛋白单体在N端任选连接有PAS，所述多价连接体与所述蛋白部分中的半胱氨酸残基或所述PAS中的半胱氨酸残基相连，所述半胱氨酸残基是天然存在的或者通过突变引入的。
- [0175] 所述蛋白多聚体中的蛋白单体数量可以由本领域技术人员根据实际情况确定，例如本发明的蛋白多聚体中可以包含2-3个；优选2个蛋白单体。
- [0176] 本领域技术人员可以知晓，蛋白多聚体中的PAS也可以替换为接头序列(GSSSS)_p，p选自1-3的整数。
- [0177] 在具体的实施方式中，所述多价连接体的结构如下式所示：



- [0178] 在具体的实施方式中，本发明的蛋白多聚体选自以下编号的化合物：10.1、10.2、10.3、10.4、10.5。
- [0179] 本发明的优点：
- [0180] 1.本发明提供一种全新的经修饰的蛋白或蛋白多聚体；
- [0181] 2.本发明的经修饰的蛋白或蛋白多聚体保留了蛋白原有的活性，其在体内的半衰期也得到显著改善；

- [0182] 3.本发明的经修饰的蛋白或蛋白多聚体制备工艺简单，可以通过生物技术、化学合成技术等技术手段方便地获得；和
- [0183] 4.本发明的经修饰的蛋白或蛋白多聚体为适用于非酒精性脂肪肝炎、2型糖尿病、高脂血症、动脉粥样硬化等一系列治疗药物的开发奠定了全新的物质基础。
- [0184] 下面的具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如(Sambrook和Russell等人，分子克隆：实验室手册(Molecular Cloning—A Laboratory Manual)(第三版)(2001)CSHL出版社)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。
- [0185] 实施例
- [0186] 以下实施例中采用的缩写具有本领域技术人员常规理解的意义。为清晰起见，对这些缩写解释如下：
- [0187] Tris-HCl：三羟甲基氨基甲烷盐酸盐
- [0188] SDS：十二烷基硫酸钠
- [0189] DMF：N,N-二甲基甲酰胺
- [0190] DTT：二硫苏糖醇
- [0191] EDTA：乙二胺四乙酸
- [0192] TFA：三氟乙酸
- [0193] HSA：人血清白蛋白
- [0194] PBS：磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.24g/L，磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)1.44g/L，氯化钠(NaCl)8g/L，氯化钾(KCl)0.2g/L，pH7.4
- [0195] TCEP：三(2-羧乙基)膦
- [0196] Tris：三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-羟甲基丙烷-1,3-二醇
- [0197] LCMS：液相色谱质谱法
- [0198] AEEA：2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸

- [0199] RP-HPLC：反相高效液相色谱
- [0200] DCM：二氯甲烷
- [0201] Fmoc：9-苄基甲氧羰基
- [0202] DIEA：N,N-二异丙基乙胺
- [0203] HOBt：1-羟基苯并三唑
- [0204] DIC：N,N-二异丙基碳二亚胺
- [0205] PIP：哌啶
- [0206] 通用检测与表征方法
- [0207] RP-HPLC

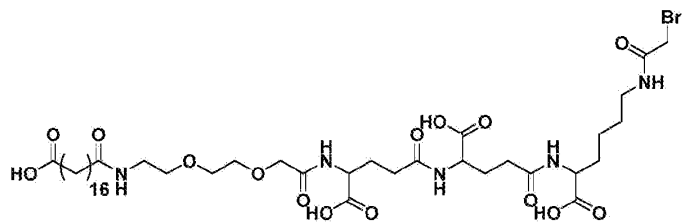
色谱系统	Waters Alliance HPLC
色谱柱	YMC Triart Bio C4 5μm
柱温	50℃
流速	0.8 ml/min
流动相 A	0.1%TFA(v/v)水溶液
流动相 B	0.1%TFA(v/v)乙腈溶液
梯度	34%-35% 10min； 35%-40% 5min； 40%-60% 5min

- [0208] LC-MS方法

质谱系统	Waters Xevo Q-Tof
色谱系统	Waters Acquity UPLC
色谱柱	YMC Triart Bio C4 1.9μm
柱温	40℃
流速	0.4 ml/min
流动相 A	0.1%甲酸(v/v)水溶液
流动相 B	0.1%甲酸(v/v)乙腈溶液
梯度	5%-95% 10min

- [0209] 实施例1：FGF21及其突变体的制备
- [0210] 人成熟FGF21的序列是公开的，可在UniProt数据库由登记号Q9NSA1查询，如SEQ ID NO:1所示。PLoS One.2012； 7(11):e49345； Endocrinology.2017； 158(5):1314-1327等文献报道，L98R、P171G、A180E突变有效提高了FGF21的抗聚集、抗降解能力。该突变体(SEQ ID NO:2)，即FGF21RGE的制备过程如下所述。

- [0211] (1)采用标签融合蛋白的形式进行FGF21RGE的表达。构建用于FGF21RGE表达的含有N末端6聚组氨酸(His₆)标签和类泛素修饰蛋白(SUMO)标签的表达盒,插入至pET30质粒中。然后转化至感受态E.coli BL21(DE3)细菌中,通过筛选得到用于表达His₆-SUMO-FGF21RGE(SEQ NO:3)融合蛋白的工程菌株。工程菌经过高密度发酵,表达His₆-SUMO-FGF21RGE融合蛋白在胞浆中以可溶形式较高水平的表达。
- [0212] (2)先纯化可溶性融合蛋白His₆-SUMO-FGF21RGE(SEQ NO:3),在酶切获得可溶性目标FGF21RGE蛋白,在纯化获得纯度较高的可溶性目标FGF21RGE蛋白。首先利用高压均质破壁释放胞内表达的可溶性融合蛋白;随之调节浑浊均质液pH至3.0,离心后进而调节pH至8.0;在以金属离子螯合层析(IMAC)HisTrap Ni excel(5ml,购自Cytiva)对融合蛋白进行富集,含有His₆-SUMO标签的融合蛋白被250mM咪唑洗脱;进而向洗脱峰中加入ULP1酶(可以特异性切割SUMO标签)进行酶切,酶切体系中含有0.2mM TCEP,并对酶切后溶液采用阴离子交换层析(AEX)例如HiTrap Q HP(5ml,购自Cytiva)进行纯化,维持层析pH为8.0,以0-500mM NaCl的线性盐梯度进行洗脱,经过SDS-PAGE分析和RP-HPLC分析后合并得到纯度较高的可溶性目标FGF21RGE蛋白。最后将FGF21RGE蛋白以MWCO 10kDa滤膜超滤至PBS中。
- [0213] 经过LC-MS分析,按照上述方法制备的FGF21RGE实际分子量为19453.0Da,与理论分子量(19453.8Da)相符。
- [0214] 在随后的实施例中,在如E.coli BL21(DE3)的细菌表达系统中表达各种FGF21蛋白,包括FGF21RGE和FGF21突变体等。除非另有说明,均将按照本实施例所述方法进行表达与纯化。
- [0215] 实施例2:修饰侧链的合成
- [0216] 2.1 C18二酸-AEEA-gGlu-gGlu-Lys(溴乙酰基)-COOH的合成



[0217] (1)材料及试剂

[0218] 2-CTC树脂，取代值1.15mmol/g

[0219] 氨基酸为：Fmoc-Lys(Alloc)-OH，Fmoc-AEEA-OH，Fmoc-Glu-otBu，十八烷二酸单叔丁酯

[0220] 合成试剂：HOBt，DIC，DMF，DCM，PIP，DIEA。

[0221] (2)仪器

[0222] CS-BIO型多肽合成仪、Waters600半制备型高效液相色谱仪、Beckman离心机、BUCHI旋蒸仪。

[0223] (3)合成溴代脂肪酸侧链

[0224] a.固相化学合成多肽

[0225] 称取2-CTC树脂1.00g，置于多肽合成仪反应器中，加入10ml DCM，溶胀1h，称取2-3倍量的Fmoc-Lys(Alloc)-OH及吸取4-6倍量的DIEA，加入10ml DMF溶解后，投入反应器中，室温下反应2h，即第一个氨基酸偶联到了树脂上，然后DCM洗涤树脂6次，测定此时树脂的取代值(SD)；随后加入20% PIP/DMF溶液10ml，混合10min脱除氨基保护基Fmoc，此过程重复一次，随后DCM洗涤树脂6次，偶联第二个氨基酸，称取三倍量的Fmoc-Glu-otBu，HOBt及DIC，加入10ml DMF/DCM(1:1)混合溶剂溶解后，室温下反应，以茚三酮监测反应进程，无色则为反应完成，用DCM洗涤树脂6次。而后，即可按照上述偶联的方法继续进行AEEA，谷氨酸和十八烷二酸的偶联反应，如此循环，直至全部氨基酸偶联完成。

[0226] 其次，通过正交保护法选择性的脱除Fmoc-Lys(Alloc)-OH侧链Alloc保护基，具体脱除Alloc保护基的方法如下：称取四(三苯基磷)钼(0.1倍量)及苯硅烷(10倍量)加入15ml DCM溶解后加入到反应器中与树脂肽反应25min，此过程全程需在避光及氮气保护条件下进行。反应结束后，依次用DCM(15ml*6次，每

次2min), 0.02mol/L N,N-二乙基二硫代氨基甲酸/DMF溶液(15ml*3次, 每次2min), DMF(15ml*6次, 每次2min)并取少量树脂进行茚三酮检测, 树脂颗粒呈紫黑色说明脱保护完全。

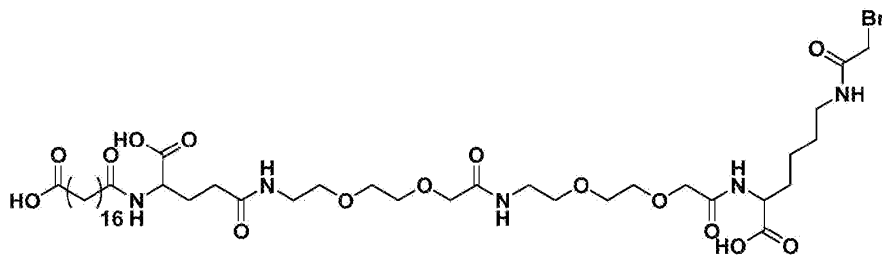
[0227] 最后, 加入2倍当量的溴乙酰溴, 10ml DMF, 室温下反应1h, 以茚三酮监测反应进程, 无色则为反应完成, 用DCM洗涤树脂6次, 真空干燥树脂肽, 备用。

[0228] b.裂解及沉淀

[0229] 按照10ml裂解试剂/1g树脂的比例加入裂解试剂, 试剂配比为TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5(V:V), 室温下反应1h, 过滤除去树脂, 滤液40℃旋蒸尽可能除去TFA, 7-10倍冰乙醚沉淀脂肪酸侧链, 放置-20℃冰箱中20min, 离心, 真空干燥, 获得脂肪酸侧链粗品。

[0230] 纯度: 66%; 理论分子量: 966.96Da; 实际分子量经LC-MS验证正确。

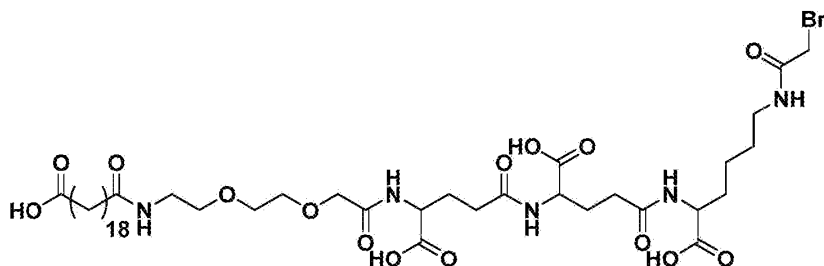
[0231] 2.2 C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys(溴乙酰基)-COOH的合成



[0232] 依照2.1及常规固相合成方法合成。

[0233] 纯度: 57%; 理论分子量: 983.01Da; 实际分子量经LC-MS验证正确。

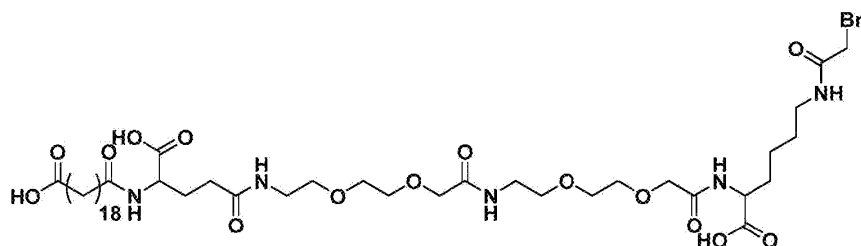
[0234] 2.3 C20二酸-AEEA-gGlu-gGlu-Lys(溴乙酰基)-COOH的合成



[0235] 依照2.1及常规固相合成方法合成。

[0236] 纯度: 44%; 理论分子量: 995.02Da; 实际分子量经LC-MS验证正确。

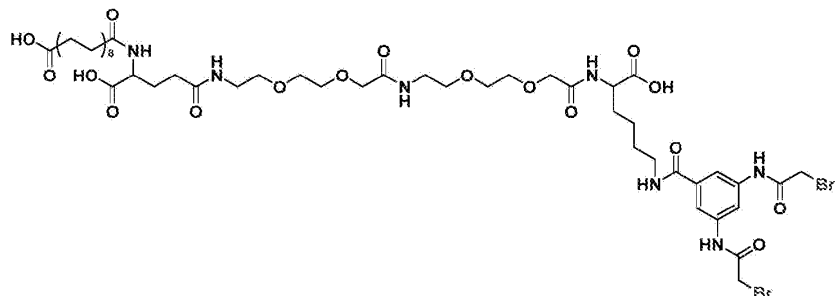
[0237] 2.4 C20二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys(溴乙酰基)-COOH的合成



[0238] 依照实施例2.1及常规固相合成方法合成。

[0239] 纯度：59%；理论分子量：1011.06Da；实际分子量经LC-MS验证正确。

[0240] 2.5 C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys(3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基)-COOH



[0241] 首先依照CN112839681A进行(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸的合成。依照2.2及常规固相合成方法合成C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys-COOH，并溶解于2%三乙胺中。将(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯溶解于乙醇中以1:1.2的摩尔比滴入C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys-COOH中，反应20~30min后加入醋酸调节pH至5.0，37℃旋蒸至固体析出，加水所得白色固体即为所需产物。

[0242] 纯度：40%；理论分子量：1238Da；实际分子量经LC-MS验证正确。

[0243] 实施例3：双荧光素酶报告基因法测定类似物体外活性

[0244] iLite FGF21 assay ready cells(购自SAVR)是一种基因工程报告基因细胞系，通过萤火虫荧光素酶的表达对FGF21激动的下游信号作出反应。受体FGFR1c与辅因子β-Klotho共同在iLite FGF21 assay ready cells表面上过表达，并经过基因优化以增强灵敏度，从而FGF21将以剂量反应的方式导致荧光素酶表达的增加。荧光素酶活性检测试剂盒购自Promega(货号#E2980)。

[0245] 将iLite FGF21 assay ready cells贴壁培养于含有10%胎牛血清(FBS, 购自Gibco)和1%青霉素/链霉素(购自Gibco)的基础培养基(DMEM Gluta Max, 购自Gibco)中。进行活性测定实验时, 全白96孔培养板(购自康宁)中加入1-30000个细胞/孔和如FGF21突变体蛋白、修饰有白蛋白结合剂的FGF21缀合物分子的检测样品, 并按照荧光素酶活性检测试剂盒的说明书在酶标仪中检测化学发光值。最后以四参数拟合的方式获取检测样品的半数有效浓度(EC₅₀)值。

[0246] 实施例4: FGF21突变体的体外活性

[0247] 选择FGF21RGE的Q28(SEQ ID NO:4)、E30(SEQ ID NO:5)、D38(SEQ ID NO:6)、D46(SEQ ID NO:7)、K122(SEQ ID NO:8)和H125(SEQ ID NO:9)进行半胱氨酸突变。这些FGF21半胱氨酸突变体按照实施例1所述进行工程菌株构建、发酵和纯化。除FGF21Q28C突变体难以表达和纯化外, 其余突变体均得到成功制备。

蛋白或者突变体	理论分子量/Da	实际分子量/Da
FGF21RGE (SEQ ID NO: 2)	19453.8	19453.0
FGF21Q28C (SEQ ID NO: 4)	19427.8	—
FGF21E30C (SEQ ID NO: 5)	19427.8	19428.0
FGF21D38C (SEQ ID NO: 6)	19441.9	19442.1
FGF21D46C (SEQ ID NO: 7)	19441.9	19441.3
FGF21K122C (SEQ ID NO: 8)	19428.8	19428.3
FGF21H125C (SEQ ID NO: 9)	19419.8	19419.4

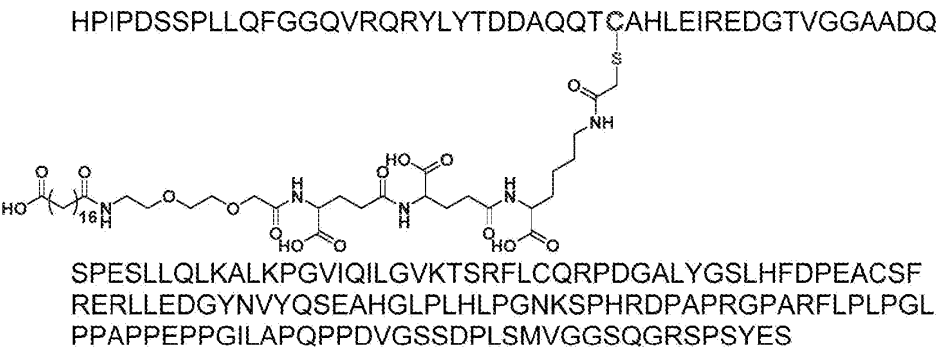
[0248] 通过实施例3的方法对FGF21RGE及FGF21半胱氨酸突变体进行体外活性的评估。结果如下表所示。成功表达的FGF21突变体均有激动FGFR1c受体传递下游信号的活性。相对于FGF21RGE对照蛋白, FGF21Q28C活性下降较大, 其余突变体均具有与对照蛋白相当的体外活性。

蛋白或者突变体	EC ₅₀ (nM)
FGF21RGE (SEQ ID NO: 2)	0.25
FGF21Q28C (SEQ ID NO: 4)	—
FGF21E30C (SEQ ID NO: 5)	1.31
FGF21D38C (SEQ ID NO: 6)	1.00
FGF21D46C (SEQ ID NO: 7)	0.28
FGF21K122C (SEQ ID NO: 8)	0.30
FGF21H125C (SEQ ID NO: 9)	0.28

[0249] 实施例5：侧链修饰的FGF21类似物的制备

[0250] 代表性化合物的制备过程由化合物5.1给出。

[0251] 5.1的制备(化合物5.1)



[0252] 该化合物是如SEQ NO:5的FGF21E30C突变体(实施例4)由如实施例2.1所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物，具体制备过程和鉴定如下。

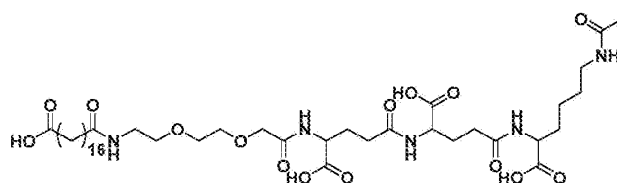
[0253] 修饰反应前，将FGF21E30C突变体超滤至Tris-HCl缓冲液(pH8.0)中，终浓度为0.5–2mg/ml。同时加入至0.2mM TCEP(三(2-羧乙基)膦，溶解于Tris-HCl缓冲液中，调pH为8.0)、2–2.5mM EDTA · 2Na。如实施例2.1所述的侧链以5M碘化钾(溶解于Tris-HCl缓冲液中，调pH为8.0)溶液溶解(浓度为4–10mg/ml)，以FGF21E30C突变体:白蛋白结合剂为1:3的摩尔比将溶解的白蛋白结合剂溶液加入至FGF21E30C突变体中，搅拌条件下过夜反应。反应结束以阴离子交换纯化白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物。加入纯化水至反应液中条件电导率为6mS/cm，上样至预先平衡的HiTrap Q HP(购自Cytiva)，A流动相为25mM Tris-

HCl(pH 8.0)、B流动相为25mM Tris-HCl 1M NaCl(pH 8.0), 流速5ml/min, 运行时间40min梯度0-50%。经过RP-HPLC分析和SDS-PAGE分析对目标峰进行合并, 得到纯度较高的SEQNO:4的FGF21E30C突变体(实施例4)由如实施例2.1所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物。

[0254] 纯度: >90%; 理论分子量: 20313.9Da; 实际分子量: 20313.8Da。

[0255] 5.2的制备(化合物5.2)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIRECGTVGGAADQ



SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSF
ERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPLGLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

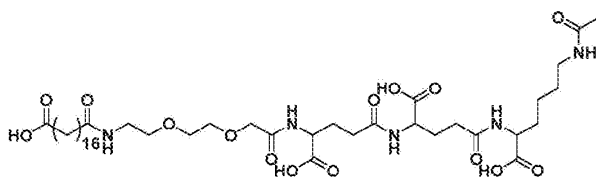
[0256] 该化合物是如SEQ NO:6的FGF21D38C突变体(实施例4)由如实施例2.1所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0257] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0258] 纯度: >90%; 理论分子量: 20328Da; 实际分子量: 20327.6Da。

[0259] 5.3的制备(化合物5.3)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTAEHLEIRECGTVGGAACQ



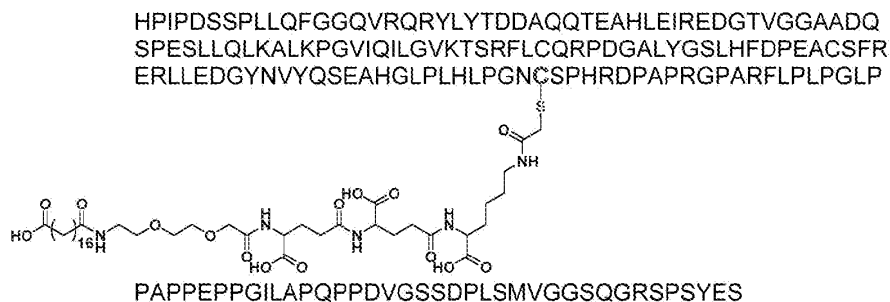
SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSF
ERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPLGLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0260] 该化合物是如SEQ NO:7的FGF21D46C突变体(实施例4)由如实施例2.1所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0261] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0262] 纯度: >90%; 理论分子量: 20328Da; 实际分子量: 20327.6Da。

[0263] 5.4的制备(化合物5.4)

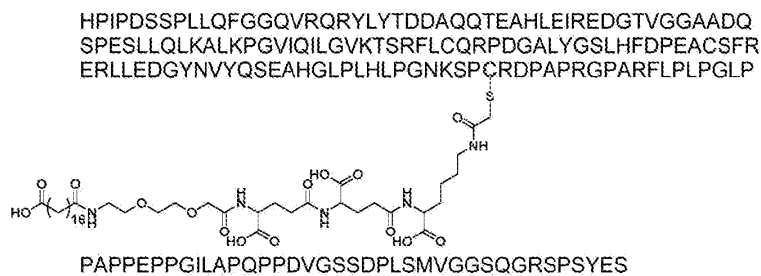


[0264] 该化合物是如SEQ NO:8的FGF21K122C突变体(实施例4)由如实施例2.1所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0265] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0266] 纯度: >90%; 理论分子量: 20314.9Da; 实际分子量: 20314.7Da。

[0267] 5.5的制备(化合物5.5)



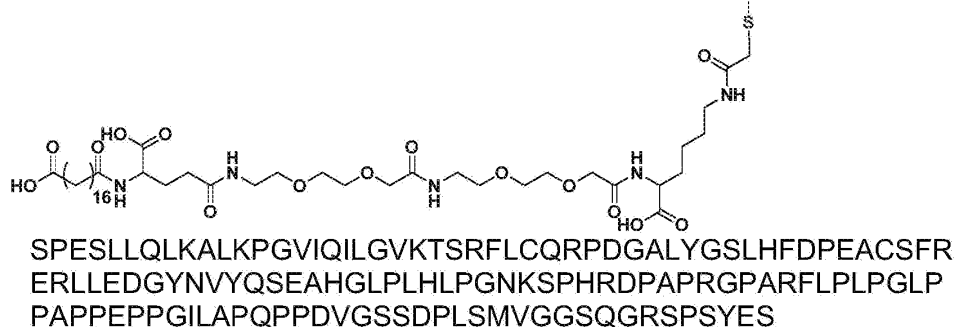
[0268] 该化合物是如SEQ NO:9的FGF21H125C突变体(实施例4)由如实施例2.1所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0269] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0270] 纯度: >90%; 理论分子量: 20305.9Da; 实际分子量: 20306.6Da。

[0271] 5.6的制备(化合物5.6)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRECGTVGGAADQ



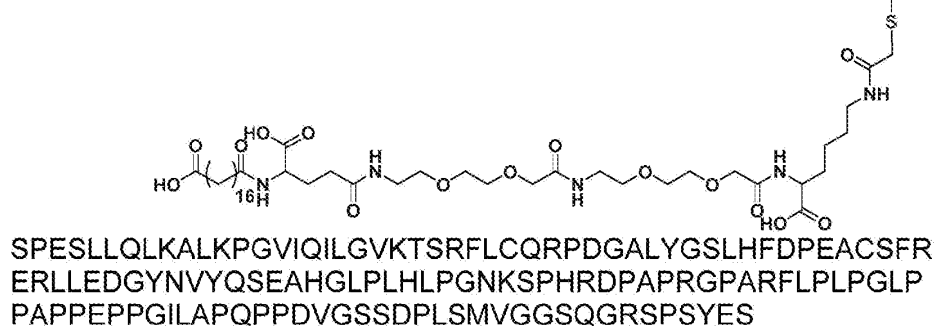
[0272] 该化合物是如SEQ ID NO:6的FGF21D38C突变体(实施例4)由如实施例2.2所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0273] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0274] 纯度: >90%; 理论分子量: 20344Da; 实际分子量: 20343.5Da。

[0275] 5.7的制备(化合物5.7)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRECGTVGGAACQ

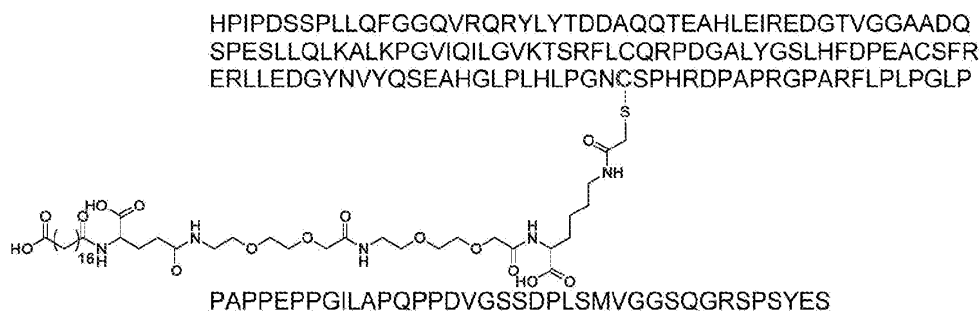


[0276] 该化合物是如SEQ ID NO:7的FGF21D46C突变体(实施例4)由如实施例2.2所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0277] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0278] 纯度: >90%; 理论分子量: 20344Da; 实际分子量: 20343.1Da。

[0279] 5.8的制备(化合物5.8)

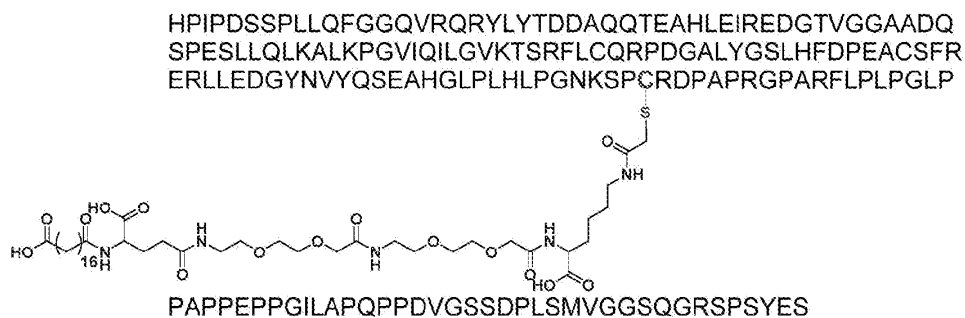


[0280] 该化合物是如SEQ NO:8的FGF21K122C突变体(实施例4)由如实施例2.2所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0281] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0282] 纯度: >90%; 理论分子量: 20330.9Da; 实际分子量: 20330.3Da。

[0283] 5.9的制备(化合物5.9)



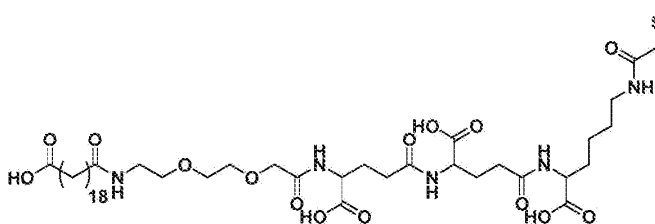
[0284] 该化合物是如SEQ NO:9的FGF21H125C突变体(实施例4)由如实施例2.2所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0285] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0286] 纯度: >90%; 理论分子量: 20321.9Da; 实际分子量: 20321.4Da。

[0287] 5.10的制备(化合物5.10)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGVGAACQ



SPESLLQLKALKPGVILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSF
ERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVGGSQGRSPSYES

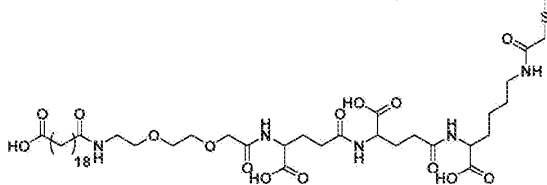
[0288] 该化合物是如SEQ ID NO:7的FGF21D46C突变体(实施例4)由如实施例2.3所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0289] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0290] 纯度: >90%; 理论分子量: 20356Da; 实际分子量: 20355.2Da。

[0291] 5.11的制备(化合物5.11)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGVGAADQ
SPESLLQLKALKPGVILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLLHFDPEACSF
ERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNCSPHRDPAPRGPARFLPLPLP



PAPPEPPGILAPQPPDVGSDDLPLSMVGGSQGRSPSYES

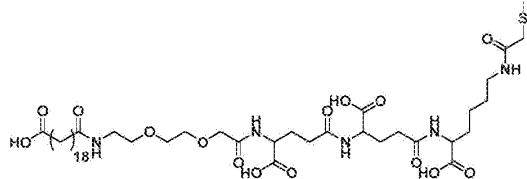
[0292] 该化合物是如SEQ NO:8的FGF21K122C突变体(实施例4)由如实施例2.3所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0293] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0294] 纯度: >90%; 理论分子量: 20342.9Da; 实际分子量: 20342.3Da。

[0295] 5.12的制备(化合物5.12)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQ
 SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSF
 ERLLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPCRDPAPRGPARFLPLPGLP



PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

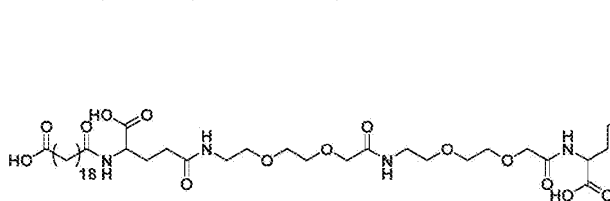
[0296] 该化合物是如SEQ ID NO:9的FGF21H125C突变体(实施例4)由如实施例2.3所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0297] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0298] 纯度: >90%; 理论分子量: 20333.9Da; 实际分子量: 20333.1Da。

[0299] 5.13的制备(化合物5.13)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAA CQ



SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSF
 ERLLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP
 PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

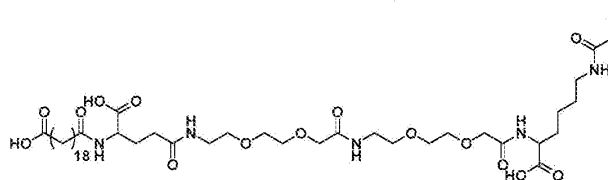
[0300] 该化合物是如SEQ ID NO:7的FGF21D46C突变体(实施例4)由如实施例2.4所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物, 制备过程和鉴定如下。

[0301] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0302] 纯度: >90%; 理论分子量: 20372Da; 实际分子量: 20370.9Da。

[0303] 5.14的制备(化合物5.14)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQ
 SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGS LHFDPEACSF
 ERLLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNCSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP

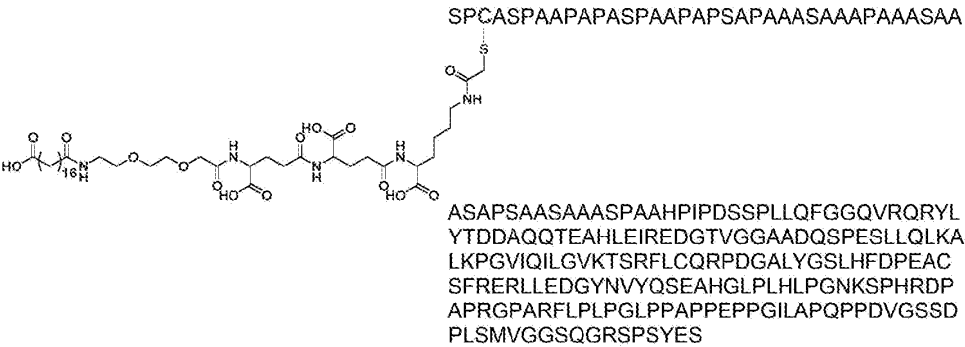


PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

蛋白、突变体或者缀合物	EC ₅₀ (nM)
FGF21RGE	0.25
FGF21E30C	1.31
FGF21D38C	1.00

FGF21D46C	0.28
FGF21K122C	0.30
FGF21H125C	0.28
化合物 5.1	4.61
化合物 5.2	1.99
化合物 5.3	0.24
化合物 5.4	0.99
化合物 5.5	0.52
化合物 5.6	2.06
化合物 5.7	1.06
化合物 5.8	1.13
化合物 5.9	1.18
化合物 5.10	2.69
化合物 5.11	2.09
化合物 5.12	1.40
化合物 5.13	1.84
化合物 5.14	1.02
化合物 5.15	0.47

- [0313] 实施例7：具有PAS₅₀和侧链修饰的FGF21类似物的制备
- [0314] 7.1具有PAS₅₀修饰的FGF21突变体(PAS₅₀FGF21)的制备
- [0315] 按照实施例1所述方法在细菌表达系统E.coli BL21(DE3)中表达如SEQ ID NO:10所示的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白(PAS₅₀FGF21)。
- [0316] 经过LC-MS分析，按照上述方法制备的PAS₅₀FGF21实际分子量为23556.9Da，与理论分子量(23557.3Da)相符。
- [0317] 7.2的制备(化合物7.2)

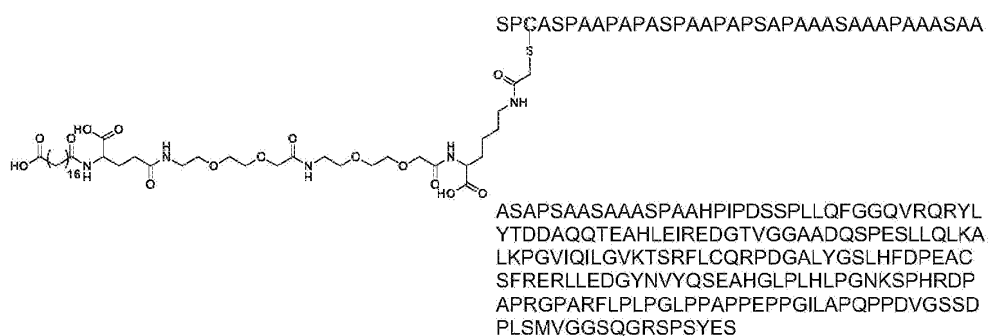


[0318] 该化合物是如SEQ ID NO:10的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白PAS₅₀FGF21(化合物7.1)由如实施例2.1所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物,制备过程和鉴定如下。

[0319] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0320] 纯度: >90%; 理论分子量: 24443.4Da; 实际分子量: 24442.7Da。

[0321] 7.3的制备(化合物7.3)

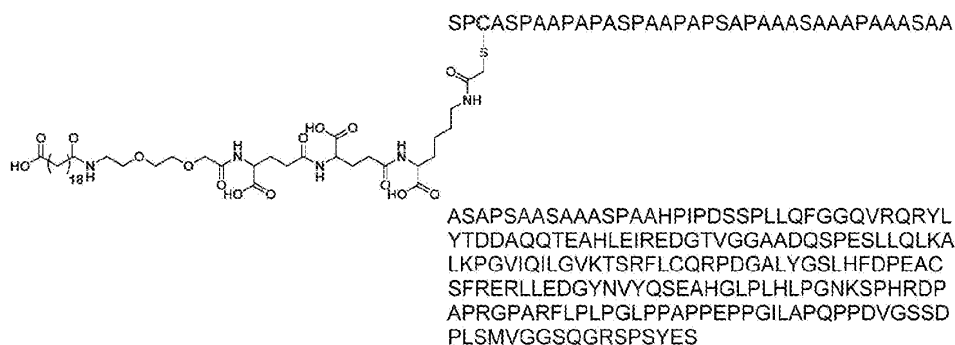


[0322] 该化合物是如SEQ ID NO:10的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白PAS₅₀FGF21(实施例7.1)由如实施例2.2所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物,制备过程和鉴定如下。

[0323] 过程: 如化合物5.1所述进行制备。

[0324] 纯度: >90%; 理论分子量: 24459.4Da; 实际分子量: 24458.9Da。

[0325] 7.4的制备(化合物7.4)

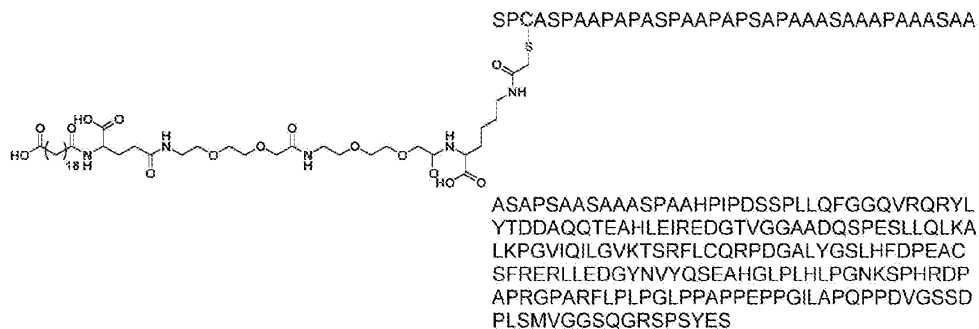


[0326] 该化合物是如SEQ ID NO:10的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白PAS₅₀FGF21(实施例7.1)由如实施例2.3所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物,制备过程和鉴定如下。

[0327] 过程：如化合物5.1所述进行制备。

[0328] 纯度：>90%；理论分子量：24471.4Da；实际分子量：24470.9Da。

[0329] 7.5的制备(化合物7.5)



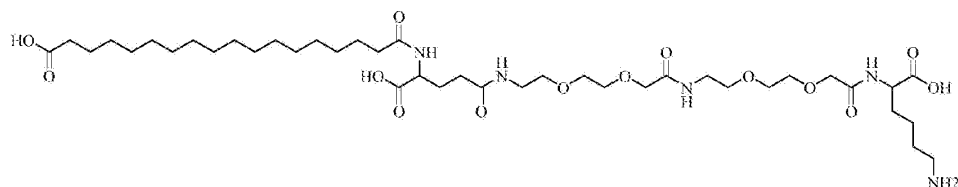
[0330] 该化合物是如SEQ ID NO:10的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白PAS₅₀FGF21(实施例7.1)由如实施例2.4所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物，制备过程和鉴定如下。

[0331] 过程：如化合物5.1所述进行制备。

[0332] 纯度：>90%；理论分子量：24487.4Da；实际分子量：24486.9Da。

[0333] 实施例8：其它修饰侧链的合成

[0334] 8.1 C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys-OH的合成



[0335] (1)材料及试剂

[0336] Fmoc-Lys(BOC)-Wang树脂，取代值0.5mmol/g。

[0337] 氨基酸为：Fmoc-AEEA-OH，Fmoc-Glu-otBu，十八烷二酸单叔丁酯

[0338] 合成试剂：HOBt，DIC，DMF，DCM，PIP，DIEA。

[0339] (2)仪器

[0340] CS-BIO型多肽合成仪、Waters600半制备型高效液相色谱仪、Beckman离心机、BUCHI旋蒸仪。

[0341] (3)合成溴代脂肪酸侧链

[0342] a.固相化学合成多肽

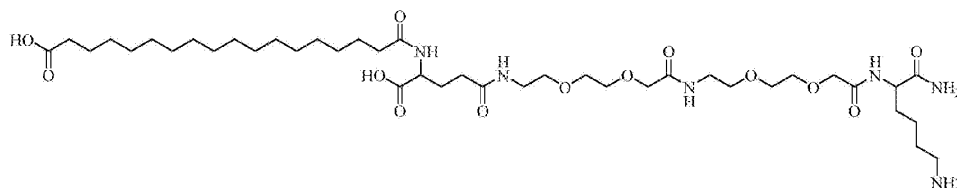
[0343] 称取Fmoc-Lys(BOC)-Wang树脂1.00g,置于多肽合成仪反应器中,加入10ml,溶胀1h,随后加入20% PIP/DMF溶液10ml,混合10min脱除氨基保护基Fmoc,此过程重复一次,随后DCM洗涤树脂6次,偶联第二个氨基酸,称取三倍树脂量的Fmoc-AEEA-OH, HOBt及DIC,加入10ml DMF/DCM(1:1)混合溶剂溶解后,室温下反应,以茚三酮监测反应进程,无色则为反应完成,用DCM洗涤树脂6次。而后,即可按照上述偶联的方法继续进行AEEA,谷氨酸和十八烷二酸的偶联反应,如此循环,直至全部氨基酸偶联完成。

[0344] b.裂解及沉淀

[0345] 按照10ml裂解试剂/1g树脂的比例加入裂解试剂,试剂配比为TFA:TIS:H₂O=95:2.5:2.5(V:V),室温下反应2h,过滤除去树脂,7-10倍冰异丙醚沉淀脂肪酸侧链,放置-20℃冰箱中20min,离心,真空干燥,获得粗肽。

[0346] 纯度:90%;理论分子量:862.07Da;实际分子量经LC-MS验证正确。

[0347] 8.2 C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys-NH₂的合成



[0348] (1)材料及试剂

[0349] Rink Amide MBHA树脂,取代值0.5mmol/g。

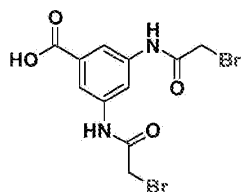
[0350] 氨基酸为: Fmoc-Lys(BOC)-OH、Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-Glu-otBu, 十八烷二酸单叔丁酯

[0351] 合成试剂: HOBt, DIC, DMF, DCM, PIP, DIEA。

[0352] (2)按照8.1中描述的固相合成方法进行合成;

[0353] 纯度:91%;理论分子量:861.07Da;实际分子量经LC-MS验证正确。

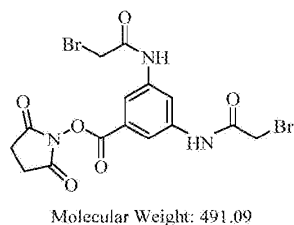
[0354] 8.3 3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸的合成



[0355] 二氨基苯甲酸(2g, 0.013mol)加入40ml DMF(20倍溶剂)溶解, 冰浴条件下加入5.81ml溴乙酰溴(2.2eq), 室温反应3.5h。将反应液加入20倍的水中, 于4℃放置过夜, 抽滤, 水洗3次, 冻干, 得中间体粉末3g。

[0356] 纯度: 87%; 理论分子量: 394Da; 实际分子量经LC-MS验证正确。

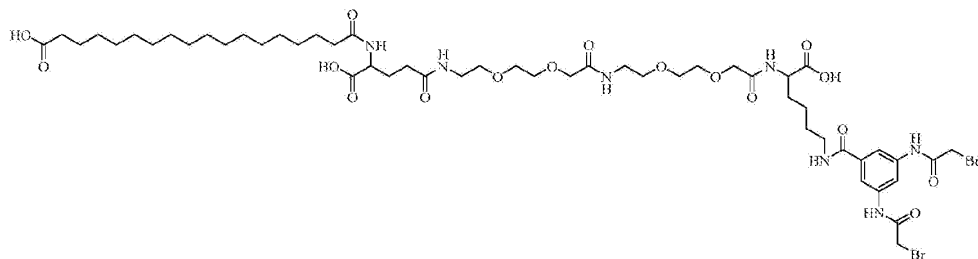
[0357] 8.4 (2,5-二氧化吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯的合成



[0358] 将实施例8.3中得到的中间体(3g, 7.6mmol)粉末溶于60ml THF, 加入HOSU(1.31g, 11.4mmol, 1.5eq)和DCC(2.35g, 11.4mmol, 1.5eq)室温活化1h, 过滤, 除去副产物DCU, 减压蒸馏, 除去THF; 乙酸乙酯复溶, 过滤除去不溶的DCU, 减压蒸馏, 除去乙酸乙酯, 真空干燥24h, 得暗黄色固体粉末4.76g。

[0359] 纯度: 83%; 理论分子量: 491.09Da; 实际分子量经LC-MS验证正确。

[0360] 8.5 C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys(3, 5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基)-OH的合成

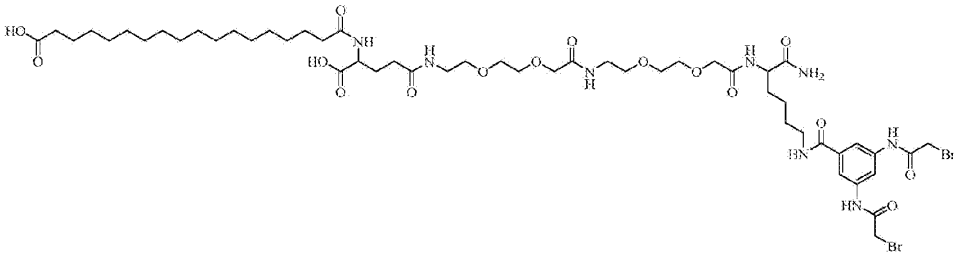


[0361] 将实施例8.1制备的化合物溶解于2%三乙胺中, 将(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯溶解于乙醇中以1:1.2的摩尔比滴入粗肽溶液

中，反应1-3h后加入醋酸调节pH至6.6，旋蒸至固体析出，加水所得白色固体即为所需产物。

[0362] 纯度：52%；理论分子量：1238Da；实际分子量经LC-MS验证正确。

[0363] 8.6 C18二酸-gGlu-AEEA-AEEA-Lys(3, 5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酰基)-NH₂的合成



[0364] 实施例8.2中的粗肽溶解于2%三乙胺中，将(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)-3,5-双[(2-溴乙酰基)氨基]苯甲酸酯溶解于乙醇中以1:1.2的摩尔比滴入粗肽溶液中，反应1-3h后加入醋酸调节pH至6.6，旋蒸至固体析出，加水所得白色固体即为所需产物。

[0365] 纯度：50%；理论分子量：1237Da；实际分子量经LC-MS验证正确。

[0366] 实施例9：FGF21突变体的体外活性

[0367] 这些FGF21突变体按照实施例1所述进行工程菌株构建、发酵和纯化。所有突变体均得到成功制备。

蛋白或者突变体	理论分子量/Da	实际分子量/Da
FGF21RGE(SEQ ID NO: 2)	19453.8	已确证
PAS ₁₅ FGF21(SEQ ID NO: 13)	20803.3	已确证
PAS ₃₀ FGF21(SEQ ID NO: 14)	22005.7	已确证
PAS ₅₀ FGF21(SEQ ID NO: 15)	23557.3	已确证
PAS ₁₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 16)	27671.8	已确证
PAS ₂₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 17)	35682.6	已确证

[0368] 通过实施例3的方法对FGF21RGE及PAS修饰的FGF21半胱氨酸突变体进行体外活性的评估。结果如下表所示。成功表达的FGF21突变体均有激动FGFR1c受体传递下游信号的活性。相对于FGF21RGE对照蛋白，PAS₂₀₀FGF21活性下降较大，其余突变体均具有与对照蛋白相当的体外活性。

蛋白或者突变体	EC ₅₀ (nM)
FGF21RGE(SEQ ID NO: 2)	0.25
PAS ₁₅ FGF21(SEQ ID NO: 13)	0.22
PAS ₃₀ FGF21(SEQ ID NO: 14)	0.30
PAS ₅₀ FGF21(SEQ ID NO: 15)	0.40
PAS ₁₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 16)	0.62
PAS ₂₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 17)	1.98

[0369] 实施例10：PAS-FGF21二聚体类似物的制备

[0370] 10.1的制备(化合物10.1)

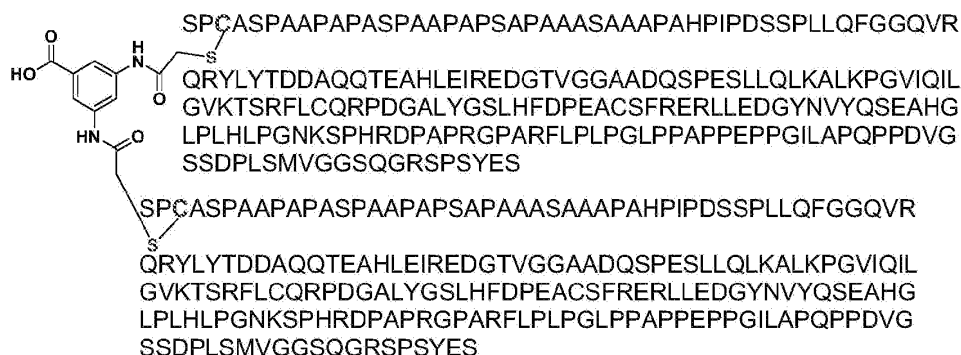


[0371] 该化合物是如SEQ ID NO:13的具有PAS₁₅修饰的FGF21融合蛋白PAS₁₅FGF21由如实施例8.3所述的侧链修饰的FGF21类似物，制备过程和鉴定如下。

[0372] 过程：修饰反应前，将PAS₁₅FGF21突变体超滤至Tris-HCl、10mM EDTA·2Na缓冲液(pH7.5)中，终浓度为1-4mg/ml。同时加入至0.1mM TCEP(三(2-羧乙基)膦，溶解于Tris-HCl缓冲液中，调pH为8.0)。如实施例8.3所述的侧链以乙醇溶解(浓度为4-10mg/ml)，侧链与蛋白的摩尔比为侧链:蛋白=0.9:2，侧链溶液将以分十次、间隔5min的方式加入进行反应，搅拌条件下过夜反应。反应结束以阴离子交换纯化PAS-FGF21二聚体类似物。加入纯化水至反应液中条件电导率为6mS/cm，上样至预先平衡的HiTrap Q HP(购自Cytiva)，A流动相为25mM Tris-HCl(pH 8.0)、B流动相为25mM Tris-HCl 1M NaCl(pH 8.0)，流速5ml/min，运行时间40min梯度0-50%。经过RP-HPLC分析和SDS-PAGE分析对目标峰进行合并，得到纯度较高的SEQ ID NO:13的PAS₁₅FGF21突变体由如实施例8.3所述的白蛋白结合剂修饰的FGF21类似物。

[0373] 纯度：>85%；理论分子量：41838.8Da；实际分子量：已确证。

[0374] 10.2的制备(化合物10.2)

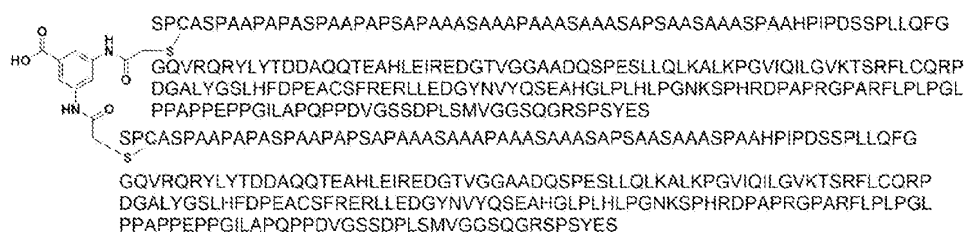


[0375] 该化合物是如SEQ ID NO:14的具有PAS50修饰的FGF21融合蛋白PAS30FGF21由如实施例8.3所述的侧链修饰的FGF21类似物，制备过程和鉴定如下。

[0376] 过程：如化合物10.1所述进行制备，侧链与蛋白的摩尔比为侧链:蛋白=0.9:2，且以乙醇进行侧链的溶解，侧链溶液将以分十次、间隔5min的方式加入进行反应。

[0377] 纯度：>85%；理论分子量：44243.6Da；实际分子量：已确证。

[0378] 10.3的制备(化合物10.3)

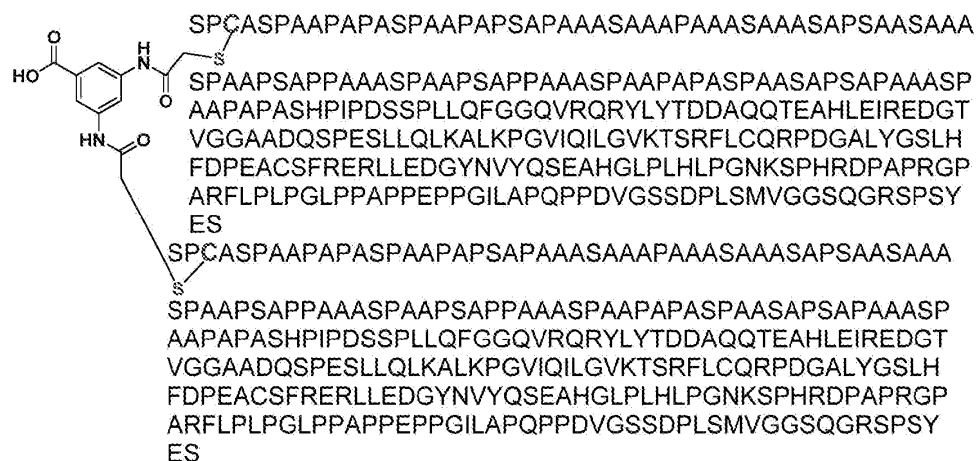


[0379] 该化合物是如SEQ ID NO:15的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白PAS₅₀FGF21由如实施例8.3所述的侧链修饰的FGF21类似物，制备过程和鉴定如下。

[0380] 过程：如化合物10.1所述进行制备，侧链与蛋白的摩尔比为侧链:蛋白=0.9:2，且以乙醇进行侧链的溶解，侧链溶液将以分十次、间隔5min的方式加入进行反应。

[0381] 纯度：>85%；理论分子量：47346.6Da；实际分子量：已确证。

[0382] 10.4的制备(化合物10.4)

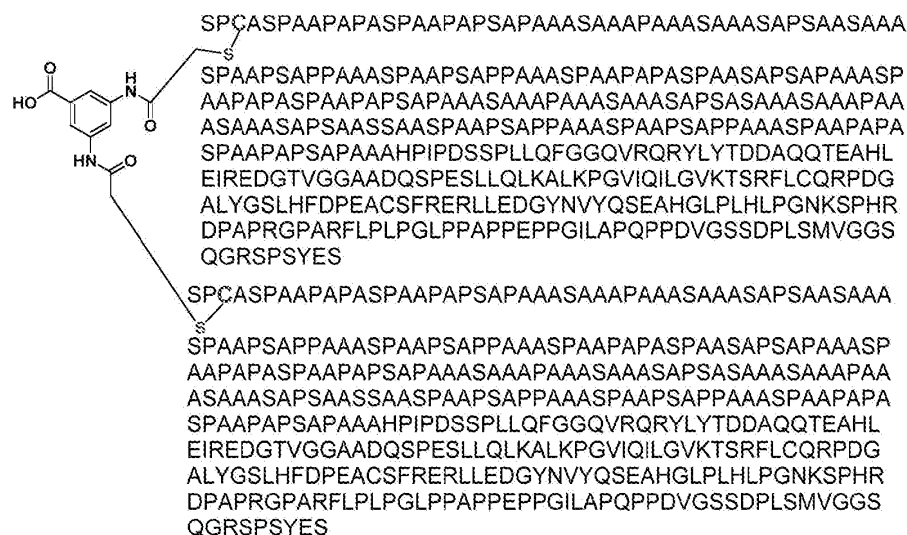


[0383] 该化合物是如SEQ ID NO:16的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白PAS₁₀₀FGF21由如实施例8.3所述的侧链修饰的FGF21类似物，制备过程和鉴定如下。

[0384] 过程：如化合物10.1所述进行制备，侧链与蛋白的摩尔比为侧链:蛋白=0.9:2，且以乙醇进行侧链的溶解，侧链溶液将以分十次、间隔5min的方式加入进行反应。

[0385] 纯度：>85%；理论分子量：55575.8Da；实际分子量：已确证。

[0386] 10.5的制备(化合物10.5)

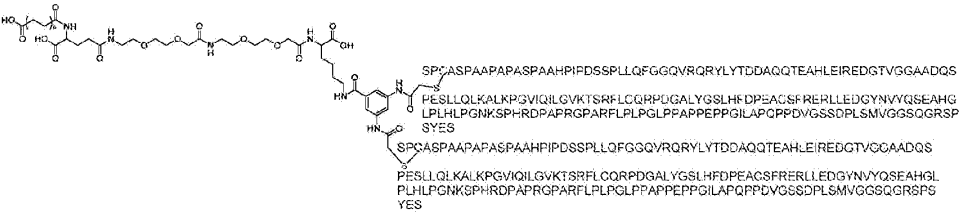


[0387] 该化合物是如SEQ ID NO:17的具有PAS₅₀修饰的FGF21融合蛋白PAS₂₀₀FGF21由如实施例8.3所述的侧链修饰的FGF21类似物，制备过程和鉴定如下。

- [0388] 过程：如化合物10.1所述进行制备，侧链与蛋白的摩尔比为侧链:蛋白=0.9:2，且以乙醇进行侧链的溶解，侧链溶液将以分十次、间隔5min的方式加入进行反应。
- [0389] 纯度：>85%；理论分子量：71597.4Da；实际分子量：已确证。
- [0390] 实施例11：PAS-FGF21二聚体类似物的体外活性
- [0391] 通过实施例3的方法对FGF21RGE、系列PAS-FGF21突变体及PAS-FGF21二聚体类似物进行体外活性的评估。结果如下表所示。

蛋白、突变体或者缀合物	EC ₅₀ (nM)
FGF21RGE	0.25
PAS ₁₅ FGF21(SEQ ID NO: 13)	0.22
PAS ₃₀ FGF21(SEQ ID NO: 14)	0.30
PAS ₅₀ FGF21(SEQ ID NO: 15)	0.40
PAS ₁₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 16)	0.62
PAS ₂₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 17)	1.98
化合物 10.1	0.07
化合物 10.2	0.04
化合物 10.3	0.02
化合物 10.4	0.13
化合物 10.5	0.15

- [0392] 实施例12：具有脂肪酸修饰的PAS-FGF21二聚体类似物的制备
- [0393] 12.1的制备(化合物12.1)



- [0394] 该化合物是如SEQ ID NO:13的具有PAS₁₅修饰的FGF21融合蛋白PAS₁₅FGF21由如实施例8.5所述的侧链修饰的FGF21类似物，制备过程和鉴定如下。
- [0395] 过程：如化合物10.1所述进行制备。
- [0396] 纯度：>85%；理论分子量：42679.8Da；实际分子量：已确证。
- [0397] 12.2的制备(化合物12.2)

[0401] 12.3的制备(化合物12.3)

[0405] 12.4的制备(化合物12.4)

[0409] 12.5的制备(化合物12.5)

[0413] 12.6的制备(化合物12.6)

[0418] 通过实施例3的方法对FGF21RGE、系列PAS-FGF21突变体及具有脂肪酸修饰的PAS-FGF21二聚体类似物进行体外活性的评估。结果如下表所示。

蛋白、突变体或者缀合物	EC ₅₀ (nM)
FGF21RGE	0.25
PAS ₁₅ FGF21(SEQ ID NO: 13)	0.22
PAS ₃₀ FGF21(SEQ ID NO: 14)	0.30
PAS ₅₀ FGF21(SEQ ID NO: 15)	0.40
PAS ₁₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 16)	0.62
PAS ₂₀₀ FGF21(SEQ ID NO: 17)	1.98
化合物 12.1	0.09
化合物 12.2	0.13
化合物 12.3	0.11
化合物 12.4	0.11
化合物 12.5	0.09
化合物 12.6	—

- [0419] 实施例14：药代动力学试验
- [0420] 蛋白类似物的药代动力学性质可以在小鼠或者小型猪中测试。
- [0421] Mice试验(N=3)：注射剂量为1mg/kg，注射方式为皮下注射。血浆样品采血时间点为0.08、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72h，采血到EDTA·2K涂层试管中(须暂时储存在冰上)，在4℃下以1200×g离心10分钟。随后将血浆转移到Micronic管中，并在-20℃下储存。利用Biovendor公司生产的人FGF21检测ELISA试剂盒(RD191108200R)进行血药浓度的监测。
- [0422] Minipig试验(N=3)：注射剂量为1mg/kg，注射方式为皮下注射。血浆样品采血时间点为0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240、264、288h。采血到EDTA·2K涂层试管中(须暂时储存在冰上)，在4℃下以1200×g离心10分钟。随后将血浆转移到Micronic管中，并在-20℃下储存。利用Biovendor公司生产的人FGF21检测ELISA试剂盒(CAT：RD191108200R)进行血药浓度的监测。
- [0423] 图1显示了小鼠体内药代动力学曲线，化合物5.7和化合物5.15在小鼠体内的半衰期分别为15.9h和14.1h，而测定的如SEQ ID NO:2的FGF21RGE的半衰期仅为0.5h。
- [0424] 图2显示了小型猪体内药代动力学曲线，化合物12.2、12.4、12.6在小型猪体内的半衰期为65.9±3.8h、75.4±9.4h、61.3±1.1h。

- [0425] 实施例10高脂饮食诱导的db/db小鼠药效学试验
- [0426] 高脂饮食诱导的db/db小鼠模型建立：雄性db/db小鼠，8周龄，用标准饮食适应性喂养2~3天后，将饲料全部换成60%的高脂饲料进行饲养，高脂饲料喂养3周后，可获得NASH模型。给药：N=6，每三天一次皮下注射给予Vehicle和蛋白类似物(5或者20nmol/kg)，给药周期6周。
- [0427] 在给药末期取肝脏组织切片进行苏木精伊红染色检测蛋白类似物对高脂饮食诱导的db/db小鼠非酒精性脂肪肝病活动评分(NAS score)的影响。

组别	NAS score
Normal	0.00 ± 0.00
Vehicle	6.00 ± 0.63
FGF21RGE 5 nmol/kg	4.83 ± 1.17
FGF21RGE 20 nmol/kg	4.17 ± 0.75
化合物 12.1 5 nmol/kg	3.83 ± 0.98
化合物 12.1 20 nmol/kg	3.33 ± 0.82
化合物 12.2 5 nmol/kg	4.33 ± 1.03
化合物 12.2 20 nmol/kg	3.40 ± 1.14
化合物 12.3 5 nmol/kg	4.33 ± 1.37
化合物 12.3 20 nmol/kg	3.00 ± 0.89

- [0428] 实施例涉及的序列：
- [0429] SEQ ID NO:1
- [0430] >人成熟FGF21

 HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTVGGAADQSPESLLQLKA
LKPGLVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYA

S

[0431] SEQ ID NO:2

[0432] >人成熟FGF21突变体RGE(FGF21RGE)

HIIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYE
S

[0433] SEQ ID NO:3

[0434] >含有N末端6聚组氨酸(His₆)标签和类泛素修饰蛋白(SUMO)标签的人成熟

FGF21突变体RGE(His₆-SUMO-FGF21RGE)

MAHHHHHHSSSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRL
MEAFAKRQGGKEMDSLRFYLDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGHPDSSPLLQF
GGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSR
FLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRG
PARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0435] SEQ ID NO:4

[0436] >人成熟FGF21突变体Q28C(FGF21Q28C)

HIIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQCTEAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYE
S

[0437] SEQ ID NO:5

[0438] >人成熟FGF21突变体E30C(FGF21E30C)

HIIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTCAHLEIREDDGTGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYE
S

[0439] SEQ ID NO:6

[0440] >人成熟FGF21突变体D38C(FGF21D38C)

HIIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRECGTVGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYE
S

[0441] SEQ ID NO:7

[0442] >人成熟FGF21突变体D46C(FGF21D46C)

HIIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGGAACQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGSLSHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYE
S

[0443] SEQ ID NO:8

[0444] >人成熟FGF21突变体K122C(FGF21K122C)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNCSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0445] SEQ ID NO:9

[0446] >人成熟FGF21突变体H125C(FGF21H125C)

HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPCRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0447] SEQ ID NO:10

[0448] >具有N端PAS修饰的人成熟FGF21融合蛋白(PAS₅₀FGF21)

SPCASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAPAAASAAASAPSAASAAASPAAHPIPDSS
PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRD
PAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0449] SEQ ID NO:11

[0450] >PAS₅₀

SPASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAPAAASAAASAPSAASAAASPA

[0451] SEQ ID NO:12

[0452] >在第3位插入半胱氨酸的PAS₅₀

SPCASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAPAAASAAASAPSAASAAASPA

[0453] SEQ ID NO:13

[0454] >具有N端PAS15修饰的人成熟FGF21融合蛋白(PAS15FGF21)

SPCASPAAPAPASPAAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRERLLED
GYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSD
PLSMVGGSQGRSPSYES

[0455] SEQ ID NO:14

[0456] >具有N端PAS30修饰的人成熟FGF21融合蛋白(PAS30FGF21)

SPCASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAPAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDA
QQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLH
FDPEACSFRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEP
PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0457] SEQ ID NO:15

[0458] >具有N端PAS50修饰的人成熟FGF21融合蛋白(PAS50FGF21)

SPCASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAPAAASAAASAPSAASAAASPAAHPIPDSS
PLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILG
VKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRD
PAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0459] SEQ ID NO:16

[0460] >具有N端PAS100修饰的人成熟FGF21融合蛋白(PAS100FGF21)

SPCASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAPAAASAAASAPSAASAAASPAAPSAPPA
AASPAAPSAPPAASPAAPAPASPAASAPSAPAAASPAAPAPASHPIPDSSPLLQFGGQVRQ
RYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD
GALYGSLHFDPEACSFRRERLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLP
GLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0461] SEQ ID NO:17

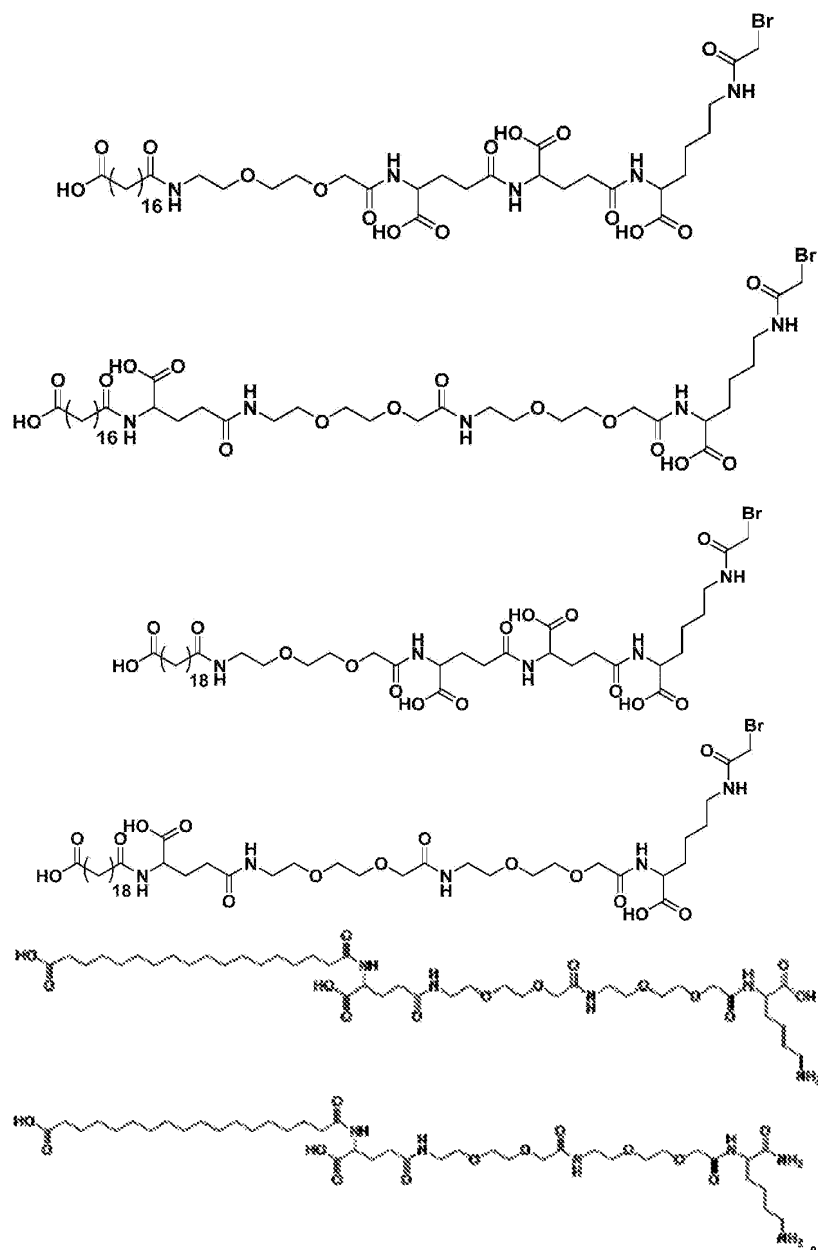
[0462] >具有N端PAS200修饰的人成熟FGF21融合蛋白(PAS200FGF21)

SPCASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAPAAASAAASAPSAASAAASPAAPSAPPA
AASPAAPSAPPAASPAAPAPASPAASAPSAPAAASPAAPAPASPAAPAPSAPAAASAAAP
AAASAAASAPSASAAASAAAPAAASAAASAPSAASSAASPAAPSAPPAASPAAPSAPPA
AASPAAPAPASPAAPAPSAPAAAHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIRED
GTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRRERL
LEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVG
SSDPLSMVGGSQGRSPSYES

[0463] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种经修饰的蛋白，所述经修饰的蛋白包括蛋白部分和修饰部分，所述蛋白部分在N端任选连接有PAS，所述修饰部分直接或通过连接体与所述蛋白部分中的半胱氨酸残基或所述PAS中的半胱氨酸残基相连，所述半胱氨酸残基是天然存在的或者通过突变引入的。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述蛋白是成纤维细胞生长因子21。
- [权利要求 3] 如权利要求1所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述修饰部分是白蛋白结合剂。
- [权利要求 4] 如权利要求3所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述白蛋白结合剂的结构如下式所示： $R_1-(X_1)_m-(X_2)_n-K(\epsilon-R_2)$ ；
式中，K是赖氨酸
 R_1 为取代或未取代的 C_{1-20} 酰基；
m为0-5的整数；
n为0-5的整数；
 X_1 和 X_2 独立选自下组：丙氨酸(Ala)、D-丙氨酸(D-Ala)、 β -丙氨酸(β -Ala)、4-氨基丁酸(GABA)、2-氨基异丁酸(Aib)、2-氨基丁酸(Abu)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酸(Glu)、D-谷氨酸(D-Glu)、 γ -谷氨酸(γ -Glu)、谷氨酰胺(Gln)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、酪氨酸(Tyr)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、氨甲环酸(Trx)、AEEA、PEG；
 R_2 选自卤素取代的 C_{1-6} 酰基或H。
- [权利要求 5] 如权利要求4所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述白蛋白结合剂选自下组：



[权利要求 6]

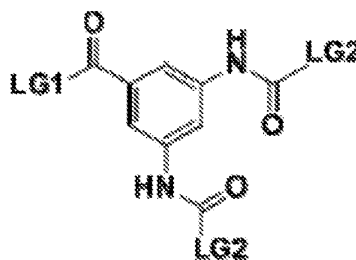
如权利要求1所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述PAS是PAS₁₅-PAS₂₀₀；优选PAS₁₅-PAS₁₀₀；例如PAS₅₀。

[权利要求 7]

如权利要求1所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述连接体是多价连接体，从而可以连接一个或多个白蛋白结合剂，以及一个或多个蛋白部分。

[权利要求 8]

如权利要求7所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述多价连接体的结构如下式所示：



式中，

LG1是对伯氨基具有反应性的离去基团；

LG2是对巯基具有反应性的离去基团。

[权利要求 9]

如权利要求1-8中任一项所述的经修饰的蛋白，其特征在于，所述经修饰的蛋白选自以下编号的化合物：5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、5.10、5.11、5.12、5.13、5.14、5.15、7.2、7.3、7.4、7.5、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6。

[权利要求 10]

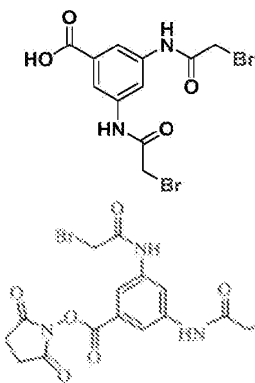
一种蛋白多聚体，所述蛋白多聚体中包含多价连接体和多个蛋白单体，所述蛋白单体在N端任选连接有PAS，所述多价连接体与所述蛋白单体中的半胱氨酸残基或所述PAS中的半胱氨酸残基相连，所述半胱氨酸残基是天然存在的或者通过突变引入的。

[权利要求 11]

如权利要求10所述的蛋白多聚体，其特征在于，所述PAS是PAS₁₅-PAS₂₀₀；优选PAS₁₅-PAS₁₀₀；例如PAS₅₀。

[权利要求 12]

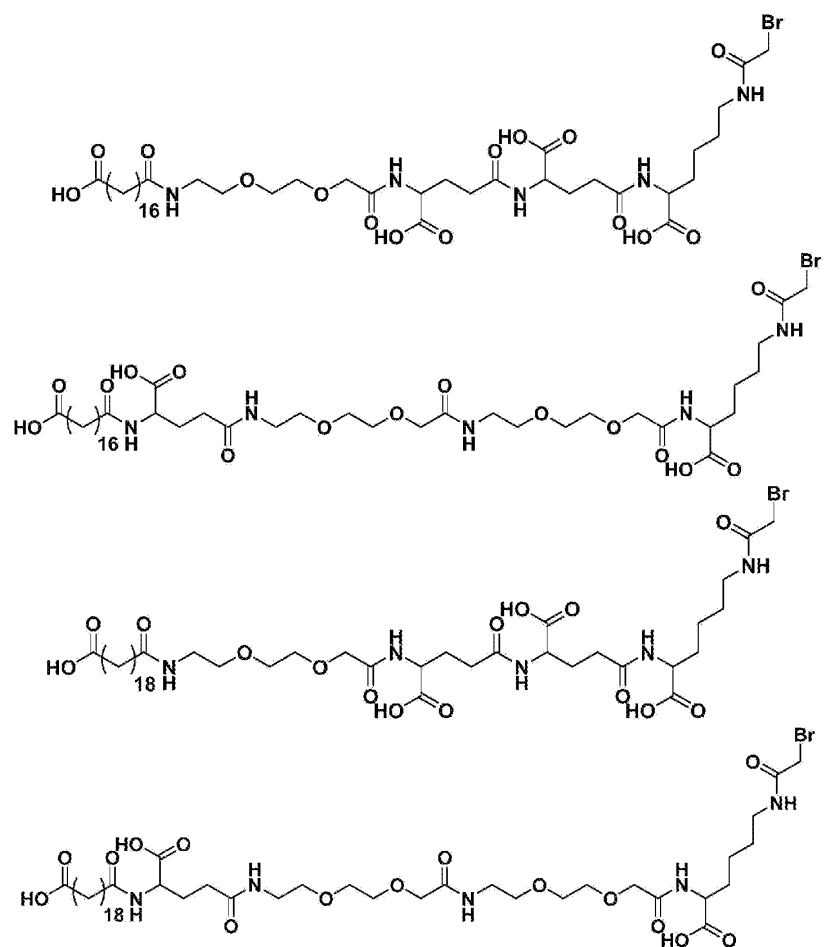
如权利要求10所述的蛋白多聚体，其特征在于，所述蛋白是成纤维细胞生长因子21。

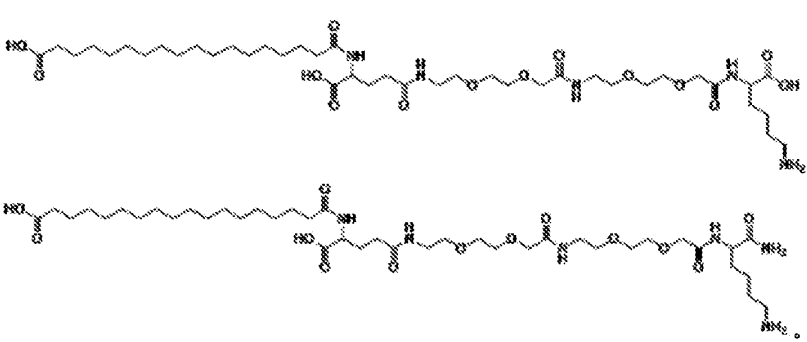
[权利要求 13]	如权利要求10所述的蛋白多聚体，其特征在于，所述多价连接体的结构如下式所示： 	细则 91, 26.06.2024
[权利要求 14]	如权利要求10所述的蛋白多聚体，其特征在于，所述蛋白多聚体选自以下编号的化合物：10.1、10.2、10.3、10.4、10.5。	细则 91, 26.06.2024
[权利要求 15]	一种药物组合物，所述药物组合物包含权利要求1-9中任一项所述的经修饰的蛋白或权利要求10-15中任一项所述的蛋白多聚体和药学上可接受的赋形剂。	细则 91, 26.06.2024
[权利要求 16]	权利要求1-9中任一项所述的经修饰的蛋白或权利要求10-15中任一项所述的蛋白多聚体在制备药物中的用途。	细则 91, 26.06.2024
[权利要求 17]	一种白蛋白结合剂，所述白蛋白结合剂的结构如下式所示：$R_1-(X_1)_m-(X_2)_n-K(\epsilon-R_2)$； 式中，K是赖氨酸； R_1为取代或未取代的C_{1-20}酰基； m为0-5的整数； n为0-5的整数； X_1和X_2独立选自下组：丙氨酸(Ala)、D-丙氨酸(D-Ala)、β-丙氨酸(β-Ala)、4-氨基丁酸(GABA)、2-氨基异丁酸(Aib)、2-氨基丁酸(Abu)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酸(Glu)、D-谷氨酸(D-Glu)、γ-谷氨酸(γ-Glu)、谷氨酰胺(Gln)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、	细则 91, 26.06.2024

R₂选自卤素取代的C₁₋₆酰基或H。

如权利要求18所述的白蛋白结合剂，其特征在于，所述白蛋白结合剂选自下组：

细则 91,
26.06.2024

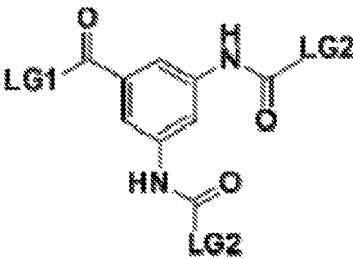




[权利要求 19]

一种多价连接体，所述多价连接体的结构如下式所示：

细则 91,
26.06.2024



式中，
LG1是对伯氨基具有反应性的离去基团；
LG2是对巯基具有反应性的离去基团。

[权利要求 20]

一种多肽，所述多肽包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

细则 91,
26.06.2024

[权利要求 21]

一种多肽，所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示，但在N端第3位插入有半胱氨酸残基。

细则 91,
26.06.2024

[权利要求 22]

一种多肽，所述多肽包含SEQ ID NO:4-9；优选SEQ ID NO:5-9中任一项所示的氨基酸序列。

细则 91,
26.06.2024

[权利要求 23]

一种分离的核酸分子，所述核酸分子编码权利要求21-23中任一项所述的多肽。

细则 91,
26.06.2024

[权利要求 24]

一种表达载体，所述表达载体包含权利要求24所述的核酸分子。

细则 91,
26.06.2024

[权利要求 25]

一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求25所述的表达载体，或者所述宿主细胞的基因组中整合有权利要求24所述的核酸分子。

细则 91,
26.06.2024

[权利要求 26] 权利要求21-23中任一项所述的多肽在制备权利要求1-9中任一项
所述的经修饰蛋白、或权利要求10-15中任一项所述的蛋白多聚体
或权利要求16所述的药物组合物中的用途。

细则 91,
26.06.2024