

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2018 年 11 月 1 日 (01.11.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/196616 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/50 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/082669

(22) 国际申请日: 2018 年 4 月 11 日 (11.04.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710302732.X 2017年4月28日 (28.04.2017) CN

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(71) 申请人: 中国科学院合肥物质科学研究院 (HEFEI INSTITUTES OF PHYSICAL SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市蜀山区蜀山湖路350号, Anhui 230031 (CN)。

(72) 发明人: 王俊峰(WANG, Junfeng); 中国安徽省合肥市蜀山区蜀山湖路350号, Anhui 230031 (CN)。赵宏鑫(ZHAO, Hongxin); 中国安徽省合肥市蜀山区蜀山湖路350号, Anhui 230031 (CN)。朱磊(ZHU, Lei); 中国安徽省合肥市蜀山区蜀山湖路350号, Anhui 230031 (CN)。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限公司 (CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.); 中国北京市海淀区西三环北路87号4-1105室, Beijing 100089 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: MUTANT HUMAN FGF21 AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 人FGF21突变体、其制备方法及应用

(57) Abstract: Provided are a mutant human fibroblast growth factor 21 (FGF21), an encoding gene thereof, a method for preparing the mutant, and a method for treating type 2 diabetes, obesity, dyslipidemia, or a metabolic disorder.

(57) 摘要: 提供了人成纤维细胞生长因子21(FGF21)突变体及其编码基因, 制备所述突变体的方法, 和治疗2型糖尿病、肥胖、异常血脂症、或代谢紊乱的方法。



WO 2018/196616 A1

人 FGF21 突变体、其制备方法及用途

技术领域

本发明属于蛋白质工程领域，具体涉及人成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 突变体，其编码基因，以及所述突变体的制备方法和使用所述突变体用于治疗 2 型糖尿病、肥胖、异常血脂症、或代谢紊乱的方法。

背景技术

FGF21 属于成纤维细胞生长因子 (FGF) 19 亚家族的分泌蛋白，所述成纤维细胞生长因子 (FGF) 亚家族包括 FGF19、FGF21、和 FGF23 (Itoh 等，2004，Trend Genet. 20:563 —69)。FGF21 是一种非典型的 FGF，其独立于肝素，并在葡萄糖、脂类和能量代谢中发挥功能。其通过上调 GLUT1 表达，促进脂肪细胞中的葡萄糖摄取，其机制不同于胰岛素。在患有糖尿病的啮齿动物、猴子和人中，FGF21 降低葡萄糖空腹血清浓度，并降低甘油三酯、胰岛素和胰高血糖素的空腹血清浓度。此外，在饮食诱导的肥胖啮齿类动物模型中，施用 FGF21 导致累计体重呈剂量依赖性丧失。实验研究提供了 FGF21 具有用于治疗糖尿病、肥胖、异常血脂症、代谢综合症的药理学给药的支持。

人 FGF21 易降解，用量大，稳定性及药效较差，因此需要对野生型 FGF21 进行改造，提高人 FGF21 的有效性和稳定性，以减少对患者给药的剂量。

发明概述

为了解决上述问题，本发明提供了替代性的人 FGF21 突变体，其编码基因以及所述突变体的制备方法和用途。

具体而言，本发明一方面提供了一种人 FGF21 突变体，其在野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的基础上具有以下氨基酸改变：

1) 在野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的第 31 位 Ala 和第 32 位 His 之间增加一个 Cys，并且第 43 位 Gly、第 44 位 Ala 中的任意 1 个或 2 个位置处的氨基酸突变为 Cys，其中这两个 Cys 形成分子内二硫键，

2) 野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的第 171 位 Pro 突变为 Gly；和/或

3)野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的第 24 位至 31 位的氨基酸片段用 5-15 个氨基酸, 优选 6-14 个氨基酸, 更优选 7-13 个氨基酸, 还优选 8-10 个氨基酸, 最优选 8 个氨基酸的片段替换。

在优选的实施方案中, 用于所述替换的氨基酸片段是任意氨基酸的组合。

本文中使用的氨基酸的缩写如下:

氨基酸	3-字母	1-字母
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

在优选的实施方案中, 用于所述替换的氨基酸片段为 8 个氨基酸的片段, 用式 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 表示。

在优选的实施方案中, X_1 - X_8 各自独立地选自任意氨基酸, 优选 X_1 是 Ser 或 Asp, X_2 是 Gly 或 Asp, X_3 是 Pro 或 Ala, X_4 是 Ala 或 Gln, X_5 是 Gly 或 Gln, X_6 是 Leu 或 Tyr, X_7 是 Ser 或 His, X_8 是 Ser 或 Ala。

本发明的方案中, 基于 FGF21 的空间结构, 本发明人发现, FGF21 C 端的第 171 位的氨基酸 P 容易暴露在表面易被酶所降解, 本发明将其突变为 G, 从而

增加了 FGF21 稳定性,但不影响 FGF21 的活性(数据未显示)。进一步地,本发明人基于结构发现,FGF21 的 N 端的第 24-31 的空间结构为一段 loop 环,loop 环的长度在对 FGF21 的稳定性有显著影响的情况下仍然保持 FGF21 的活性。此外,基于 FGF21 的空间结构,本发明人还发现野生型 FGF21 的第 31 位和第 32 位与第 43 位和第 44 位的氨基酸在空间上是靠近的,但是结构不够稳定。经过深入研究,本发明人出人意料地发现:在不影响第 23-32 位间 loop 环的长度的情况下,在第 31 位和第 32 位之间插入了一个半胱氨酸 Cys 后,该半胱氨酸通过与第 43 位或第 44 位突变的半胱氨酸形成二硫键,从而稳定了其结构;另外,突变 loop 环上的氨基酸,在插入在第 31-32 位间的 Cys 与第 43 位或与第 44 位突变的 Cys 形成二硫键并稳定结构的基础上改变第 24-31 位 Loop 环的氨基酸组成,能够充分提高 FGF21 的活性。本实验室已经解析出 FGF21 的结构。通过 CD 实验和 NMR 实验充分说明了突变体形成二硫键后更加稳定了结构。本实验室做了 FGF21 改变 loop 环的氨基酸组成前后的对比,改变后的活性明显高于改变前的活性。

在本发明的方案中,野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列在 31-32 位增加的 Cys 和第 43 位或 44 位的 Cys 之间形成稳定二硫键时,在野生 FGF21 第 23-32 位间的氨基酸的长度对于 FGF21 的稳定性影响效果明显。因此,在本说明书公开内容的基础上,本领域技术人员能够任意选择所述片段的长度和氨基酸种类来对本发明进行效果可以预期的改变或改进。

在优选的实施方案中,用于所述替代的氨基酸片段是 DDAQQTEA(其相应的突变体在下文中也称为 FGF21-AG),编码该突变体的核酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示,氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

在另一个优选的实施方案中,用于所述替代的氨基酸片段是 SGPHGLSS(其相应的突变体在下文中也称为 FGF21-LG),编码该突变体的核酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

本发明中“野生型 FGF21”是从 <http://www.uniprot.org/> 中搜索 FGF21,在得到的结果中选择物种(organism)为人类(Homo sapiens)而得到的。人源 FGF21 在 uniprot 的编号为(Q9NSA1),我们得到 FGF21 的蛋白质序列有 209 个残基。去除 N 端 28 个氨基酸的信号肽,得到的 FGF21 的序列有 181 个残基,即为野生型 FGF21 序列,其核酸序列为 SEQ ID NO:2,相应氨基酸序列为 SEQ ID NO:1。

因此，本发明中所述的“野生型人 FGF21 蛋白”是指天然存在于人中的成熟 FGF21 蛋白(下文中也称为 FGF21)，在典型的情况下，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，或与 SEQ ID NO: 1 具有 90%以上，95%以上，优选 98%以上，更优选 99%以上的同源性的氨基酸序列。

相对于参比多肽序列的"%同源性"被定义为在对序列进行比对并且在必要时引入空隙(gap)以实现最大百分比序列同一性，而不将任何保守置换认为是序列同一性的一部分后，候选序列中与参比多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了确定百分比氨基酸序列同一性的比对可以在本领域中的技术内的多种方式实现，例如，使用公众可获得的计算机软件如 BLAST, BLAST-2, ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数，包括在比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而，对于本文来说，%同源性值使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生。ALIGN-2 序列比较计算机程序的作者是 Genentech, Inc.，并且源代码已经与用户文件一起被提交于美国版权局, Washington D.C., 20559, 其以美国版权登记号 TXU510087 被登记。公众可自 Genentech, Inc., South San Francisco, California 获得 ALIGN-2 程序，或者所述程序可自源代码编译。ALIGN-2 程序应当被编译为用于 UNIX 操作系统，包括数字 UNIX V4.0D。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定并且不需要改变。

另一方面，本发明提供一种核酸，其编码以上所述的任一突变体。

本发明还提供一种载体，其包含以上所述的核酸。在优选的实施方案中，所述载体为表达载体，更优选为原核表达载体。

本发明还提供一种宿主细胞，其包含以上所述的载体。

在优选的实施方案中，所述宿主细胞为大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞。

本发明还提供一种制备人 FGF21 突变体的方法，所述方法包括将所述人 FGF21 突变体的编码基因与所述表达载体可操作性的连接，得到重组表达载体；将重组表达载体转化宿主细胞；培养重组宿主细胞，诱导重组蛋白表达，收集并纯化表达的蛋白。

在优选的实施方案中，所述方法包括将 SUMO 标签基因 (SUMO 标签基因 N 端有 6 个 his 标签) 和编码所述人 FGF21 突变体的核酸序列依次连接在一起。将该基因与表达载体可操作性的相连接，得到重组表达载体；将重组表达载体转

化宿主细胞,培养重组宿主细胞,诱导重组蛋白表达,收集并纯化所表达的蛋白, SUMO 酶切割,再纯化。

所述的宿主细胞为大肠杆菌 (E.coli) 细胞。

本发明人发现,对于本发明所述的突变体,诱导表达条件为: 10-37℃培养细胞到 OD₆₀₀ 达到 0.2-1.0 时加入终浓度为 0.1-1mM 的 IPTG, 4-37℃诱导表达 2-20h。在更优选的实施方案中,条件为 37℃培养细胞到 OD₆₀₀ 达到 0.8 时加入终浓度为 1mM 的 IPTG, 25℃诱导表达 6h。

本发明的纯化方法是将收集到的菌体用裂解缓冲液 (20Mm Tris-HCl 100 Mm NaCl, pH 8.0) 重悬,进行细胞破碎,离心,收集上清液,将上清液与纯化填料混合后孵育 0.1-10 个小时,将混合物转移到层析柱中,进行蛋白的纯化,将纯化得到的 SUMO 融合的人 FGF21 突变体蛋白用 SUMO 酶酶切,酶切条件包括:温度为 0-37℃,缓冲液为 20Mm Tris-HCl 100 mM NaCl pH8.0, PBS, Tris-HCl, pH 值为 6.8-8.0,切割 0-24 小时,利用 Ni 金属螯合亲和层析,得到人 FGF21 突变体,再利用分子排阻层析对 FGF21 突变体蛋白进行再纯化。

另一方面,本发明提供所述突变体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 2 型糖尿病、肥胖、异常血脂症、或代谢综合征。

另一方面,本发明提供药物组合物,其包含本发明所述的突变体以及药用载体。术语“药用载体”是指与制剂的其他成分相容的载体和辅助物质如稀释剂或赋形剂。术语“药物组合物”包括包含预定量或比例的特定成分的产品,以及通过组合特定量的特定成分直接地或间接地得到的任何产品。优选地,它包括包含一种或多种活性成分,和任选的包含惰性成分的载体的产品,以及由任何两种以上的成分的组合、复合或聚集,或者由一种或多种成分的分解,或由一种或多种成分的其他类型的反应或相互作用直接地或间接地得到的任何产物。本发明中所述的“突变”包括氨基酸的置换、缺失、添加。

综上所述,本发明的突变体具有野生型 FGF21 没有的优点。这种优点包括改善的药理学效力和/或改善的药物稳定性。本发明的 FGF21 突变体蛋白具有一种或多种有利的生理学特征,包括在体内具有更显著的药效,具有更强热稳定性。另外,本发明的 FGF21 变体对 2 型糖尿病、肥胖、异常脂血症、或代谢综合征、或其任意的治疗具有潜在的作用。

附图简述

图 1.SUMO-FGF21 突变体表达载体示意图。

图 2.纯化后 SUMO-FGF21-LG 核酸电泳图，M 是 DL5000DNA Marker，1 是 SUMO-FGF21-LG 基因的纯化产物。

图 3.纯化后 SUMO-FGF21-AG 核酸电泳图，M 是 DL5000DNA Marker，1 是 SUMO-FGF21-AG 基因的纯化产物。

图 4.纯化后 pET22b (DE3) SUMO-FGF21-LG 蛋白的 SDS-PAGE 图。

图 5.纯化后 FGF21-LG 蛋白的 SDS-PAGE 图，M 是蛋白分子量标准，1 是 FGF21-LG。

图 6.纯化后 FGF21-AG 蛋白的 SDS-PAGE 图，M 是蛋白分子量标准，1 是 FGF21-AG。

图 7.FGF21-LG 蛋白动物药效试验（降低血糖）结果图。

图 8.FGF21-AG 蛋白动物药效试验（降低血糖）结果图。

图 9.FGF21-LG 蛋白动物药效试验（对体重的影响）结果图。

图 10.FGF21-AG 蛋白动物药效试验（对体重的影响）结果图。

图 11.FGF21-LG 蛋白的热稳定性试验。

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

实施中实验主要试剂耗材及仪器：克隆所用引物均为上海生工合成。聚合酶链式反应（PCR）中 DNA 聚合酶（primer star）、限制性内切酶、连接酶、Dpn I 均购于 Takara 公司；DNA marker 购于 Thermo 公司；普通 DNA 产物回收试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 TIANGEN 公司。*E. coli*DH5 α 菌株，*E. coli*BL21 菌株，pET22b-SUMO-FGF21 质粒，SUMO 蛋白酶购置北京索莱宝科技有限公司。Tris、咪唑购于上海生工，其他盐类购于国药，浓缩管购于 Millipore。FPLC 仪器使用的是 GE 公司的 ÄKTA 系统，使用的 Ni-Sepharose 层析柱和分子排阻层析

柱 Hiload 16/60 Superdex75 pg 均购于 GE 公司。BCA 试剂盒购于 Thermo。

表 1. FGF21 分子克隆所使用的引物

引物名称	引物序列 (5'到3')
SUMO-F	GGGAATTCCATATGCATCATCATCATCAC(SEQ ID NO:7) ^a
FGF21-R	CCGCTCGAGTCAGGAAGCGTAGCT(SEQ ID NO:8) ^b
SFmid-F	CAGAGAACAGATTGGTGGTCACCCCATCCCTGACTCCA(SEQ ID NO:9)
SFmid-R	TGGAGTCAGGGATGGGGTGACCACCAATCTGTTCTCTG(SEQ ID NO:10)
171G-F	CATGGTGGGAGGTTCCCAGGGCCGAAG(SEQ ID NO:11)
171G-R	CTTCGGCCCTGGGAACCTCCCACCATG(SEQ ID NO:12)
43C-F	GGGACGGTGGGGTGCGCTGCTGACCAG(SEQ ID NO:13)
43C-R	CTGGTCAGCAGCGCACCCACCGTCCC(SEQ ID NO:14)
31-32C-F	CAGCAGACAGAAGCTTGCCACCTGGAGA(SEQ ID NO:15)
31-32C-R	TCTCCAGGTGGCAAGCTTCTGTCTGCTG(SEQ ID NO:16)
FGF21-LG-F	AGCGGTACCTCTACACATCAGGACCTCATGGGCTCTCAAGTTGCCACCT GGAGATCAG(SEQ ID NO:17)
FGF21-LG-R	CTGATCTCCAGGTGGCAACTTGAGAGCCCATGAGGTCCTGATGTGTAG AGGTACCGCT(SEQ ID NO:18)

^a 第 1-8 位为保护碱基，第 9 至 14 位为限制性内切酶位点；

^b 第 1-3 位为保护碱基，第 4 至 9 位为限制性内切酶位点。

实施例 1：重组 FGF21 突变体表达载体的构建

以 pET22b-SUMO-FGF21 质粒为模板，第一次突变：利用上游引物 171G-F 和下游引物 171G-R 进行 PCR 定点突变。得到 FGF21-P171G 突变体。第二次突

变利用 FGF21-P171G 突变体为模板，以 43C-F 为上游引物和 43C-R 为下游引物进行 PCR 定点突变，得到 FGF21-G43C-P171G 突变体。第三次突变：利用 FGF21-G43C-P171G 突变体为模板，以 31-32C-F 为上游引物和 31-32C-R 为下游引物进行 PCR 定点突变，得到 FGF21-AG 突变体。第四次突变：以 FGF21-AG 为模板，以 FGF21-LG-F 为上游引物，以 FGF21-LG-R 为下游引物进行突变。得到 FGF21-LG 突变体。PCR 反应条件如下。以上突变过程的 PCR 反应体系及反应程序如下：

PCR 反应体系：2×Prime STAR HS (Premix) 25μl，上游引物 (10μM) 1μl，下游引物 (10μM) 1μl，模板 1 μl，ddH₂O 22μl，总体积 50μl。

PCR 反应程序：第 1 步、预变性温度 98℃ 10 mins；第 2 步、变性温度 98℃ 10 secs；3、退火温度 57℃ 5 secs；第 4 步、延伸温度 72℃，1 min。从第 2 到 4 步重复 30 个循环。

每次突变后的产物用 Dpn I 酶在 37℃ 酶切反应 1h。将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，并利用胶回收试剂盒回收质粒，取 1ul 质粒放入 100ul 的感受态细胞中，将细胞放入冰上 30 分钟，42℃ 热激 90 秒，加入 400ul LB 培养基，37℃ 振荡培养 45 分钟后涂平板，37℃ 倒置过夜培养。挑取单克隆作为模板，利用 SUMO-F 为上游引物和 FGF21-R 为下游引物进行 PCR 鉴定，其中 FGF21-LG 的鉴定结果如图 2 所示，FGF21-AG 的鉴定结构如图 3 所示。经初步鉴定成功的 FGF21 突变体进行基因的测序与结果分析。样品由生工生物工程（上海）有限公司进行序列测定。采用 DNAMAN 软件进行序列分析。序列测定的结果：突变体 FGF21-AG 的核酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示，相应氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示；突变体 FGF21-LG 的核酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示，相应氨基酸序列如 SEQ ID NO. 6 所示。其构建载体示意图见图 1。

将测序成功的含有编码 FGF21 突变体的核酸序列的质粒转化到 BL21(DE3) 菌株中，挑取单克隆菌株进行扩大培养，并将菌株保存在 -80℃ 冰箱中。

实施例 2：人重组 FGF21 突变体的表达

将 FGF21 突变体菌株按 2% 的接种量接种于 5ml LB 培养基(含 100 μg/ml 氨苄青霉素)中，37℃、220rpm 振荡培养过夜，取过夜培养菌液按 2% 接种于每瓶中，每 2000ml 三角瓶装 500ml LB 培养基（含 100 μg/ml 氨苄青霉素）。培养到

OD₆₀₀ 为 0.8 时加入 1.0M IPTG 500ul, 在 25°C 诱导表达 4 个小时。4°C, 8000r/min 离心 10 分钟, 弃上清, 收集菌体, 将菌体放于-80°C 冻存。

实施例 3: 重组人 FGF21 突变体纯化

(1) 重组人 FGF21 突变体初纯化

将表达得到的菌体用裂解缓冲液 (50mM Tris, 300 mM NaCl, pH8.5) 重悬, 然后进行超声破碎 (30%功率, 超 2 秒, 停 5 秒, 总时间 45 分钟), 4°C 14000rpm 离心 40 分钟, 收集上清液。将上清液加入已经用缓冲液预平衡的 Ni-Sepharose 层析柱, 4°C 旋转混合 30 分钟。将溶液穿出后, 用 5 倍柱体积的缓冲液冲洗以去除未结合的蛋白和杂质, 再用 5 倍柱体积的含 30mM 咪唑的缓冲液 (50mM Tris, 300 mM NaCl, pH8.5) 将非特异性的杂蛋白洗脱下来, 再用 5 倍柱体积的含 300mM 咪唑的缓冲液 (50mM Tris, 300 mM NaCl, pH8.5) 将目的蛋白洗脱下来, 用 SDS-PAGE 检测纯化结果(结果见图 4)。

(2) 重组人 FGF21 突变体酶切纯化

检测透析后的融合蛋白: 以分子摩尔比为 0.1% 的比例加入 SUMO 酶, 在 4°C 下酶切 2h, 向酶切后的蛋白溶液加入终浓度为 20mM 咪唑, 然后加入到已经用缓冲液 (50mM Tris, 300 mM NaCl, pH8.5) 预平衡的 Ni-Sepharose 层析柱上, 4°C 旋转混合 30 分钟。收集流穿的溶液, 用浓缩管将样品浓缩到 10mg/ml, 再经 Superdex 75 分子排阻层析柱纯化, 分子排阻层析缓冲液 (20mM PBS, 100mM NaCl, pH7.2), 得到的蛋白即为 FGF21 突变体蛋白, 实验中的 FGF21 及突变体如 FGF21-LG 和 FGF21-AG 蛋白都是用上述方法纯化。并经 12% SDS-PAGE 电泳检测, 其中 FGF21-LG 蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果如图 5, FGF21-AG 蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果见图 6。

实施例 4: FGF21 突变体降血糖实验

使用突变体蛋白进行动物降血糖实验。将 ob/ob 小鼠 (购置于南京大学动物模式所) 模型分成 3 组, 每组 8 只, 分别为载体对照组, 即注射生理盐水, FGF21 组和 FGF21-LG 组, 实施方式为背部皮下注射, 0.1mg/kg/天, 连续给药七天, 并且记录每天给药前的血糖值, 如图 7 所示, FGF21-LG (如图 7) 组相对于野生型 FGF21 蛋白而言表现出更强的药效。同样, 以 FGF21-AG 进行相同的实验,

实施方式为 0.6mg/kg/天，并记录每天给药前的血糖值。实验说明 FGF21-AG 同样有很明显的降血糖作用，结果如图 8 所示。

实施例 5：FGF21 突变体降体重实验

使用 FGF21 突变体蛋白进行动物的降体重试验。将 ob/ob 小鼠分成 4 组，分别为载体对照组，即注射生理盐水，FGF21 组和人 FGF21-LG 组，FGF21-AG 组，每组 8 只。将纯化后的蛋白按照 0.6mg/kg/天给药，连续给药 6 天，并且记录 6 天后体重变化，实验证实 FGF21-LG（如图 9）和 FGF21-AG（如图 10）组相对于野生型 FGF21 蛋白具有更明显的减轻体重作用，具有更强的药效。

实施例 6：热稳定性试验

使用人 FGF21 突变蛋白进行实验，利用圆二色谱(CD)对 FGF21 及 FGF21-LG 进行变温实验，20-95°C，每 5°C 作为一个测试点进行测试。测试结果为 FGF21 的转化温度在 69°C，而 FGF21-LG 的转化温度在 98°C，实验证明人 FGF21-LG 相对于野生型 FGF21 具有更强的热稳定性（如图 11）。同样，利用 FGF21-AG，得到类似的 CD 结果。

可见，根据本发明的突变体与野生型相比具有更强的热稳定性。

权 利 要 求 书

1. 一种人 FGF21 突变体,其在野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的基础上具有以下氨基酸改变:

1) 在野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的第 31 位 Ala 和第 32 位 His 之间增加一个 Cys, 并且第 43 位 Gly、第 44 位 Ala 中的任意 1 个或 2 个位置处的氨基酸突变为 Cys,

2) 野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的第 171 位 Pro 突变为 Gly; 和/或

3) 野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列的第 24 位至第 31 位的氨基酸片段用 5-15 个氨基酸, 优选 6-14 个氨基酸, 更优选 7-13 个氨基酸, 还优选 8-10 个氨基酸, 最优选 8 个氨基酸的片段替换。

2. 根据权利要求 1 所述的突变体, 其中用于所述替换的氨基酸片段为由式 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 表示的 8 个氨基酸的片段, 其中 X_1 - X_8 各自独立地选自任意氨基酸, 优选 X_1 是 Ser 或 Asp, X_2 是 Gly 或 Asp, X_3 是 Pro 或 Ala, X_4 是 Ala 或 Gln, X_5 是 Gly 或 Gln, X_6 是 Leu 或 Tyr, X_7 是 Ser 或 His, 和/或 X_8 是 Ser 或 Ala。

3. 根据权利要求 2 所述的突变体, 其中用于所述替换的氨基酸片段的氨基酸序列是 DDAQQTEA 或 SGPHGLSS。

4. 根据权利要求 3 所述的突变体, 其中所述突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 6 所示。

5. 根据权利要求 1 所述的突变体, 其中所述野生型人 FGF21 蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示或是与 SEQ ID NO: 1 具有 90%以上, 95%以上, 优选 98%以上, 更优选 99%以上的同源性的氨基酸序列。

6. 核酸, 其编码权利要求 1-5 中任一项所述的突变体。

7. 载体, 其包含权利要求 6 所述的核酸, 所述载体优选为表达载体, 更优选为原核表达载体。

8. 宿主细胞, 其包含权利要求 7 所述的载体。

9. 药物组合物, 其包含权利要求 1-5 中任一项所述的突变体以及药用载体。

10. 权利要求 1-5 中任一项所述的突变体、权利要求 6 所述的核酸、权利要求 7 所述的载体或权利要求 8 所述的宿主细胞在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗 2 型糖尿病、肥胖、异常血脂症、或代谢综合征。

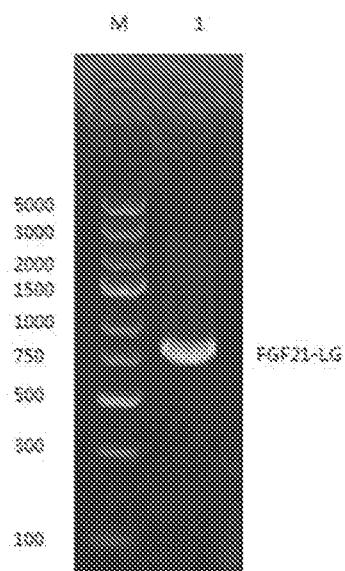
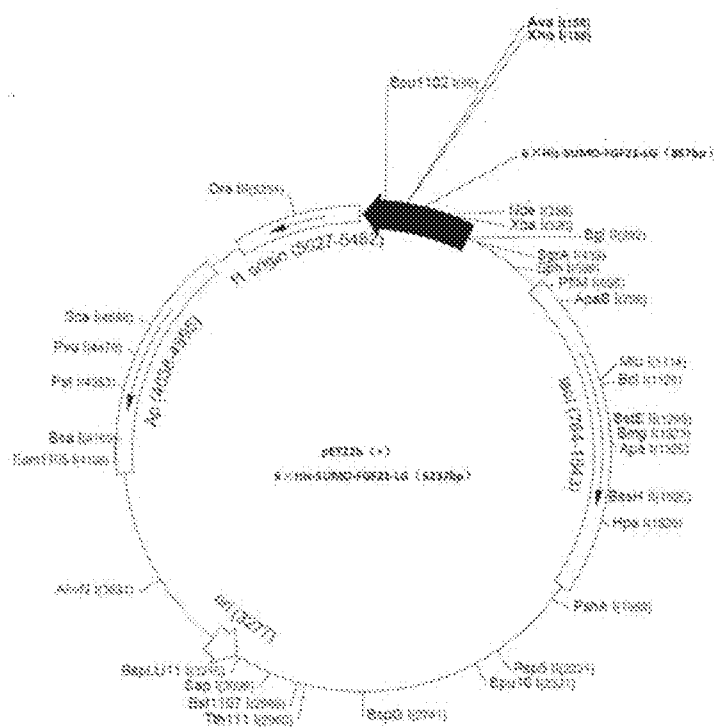


图 2

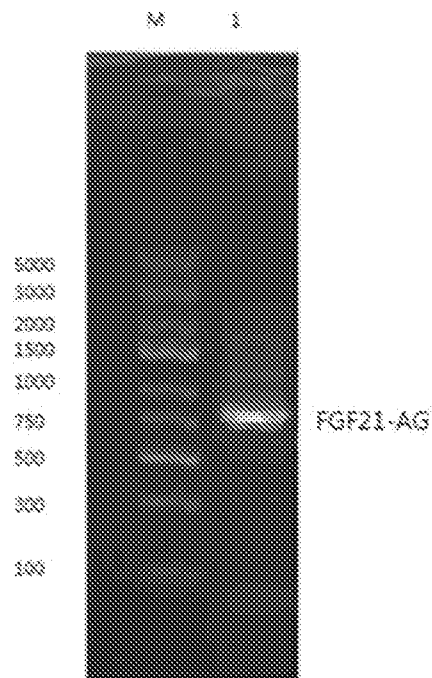


图 3

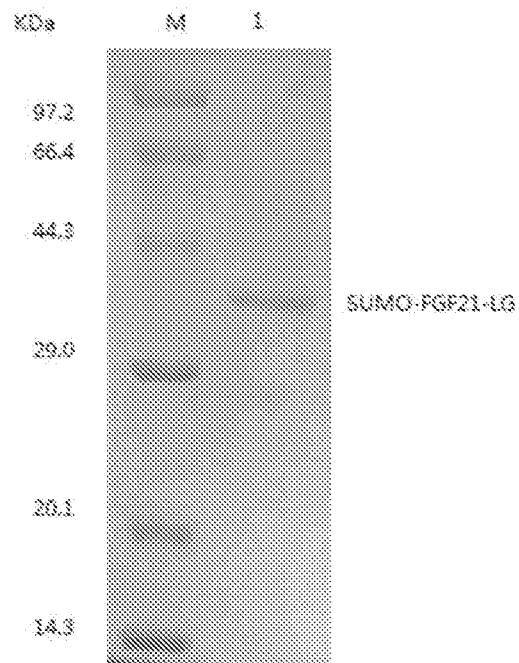


图 4

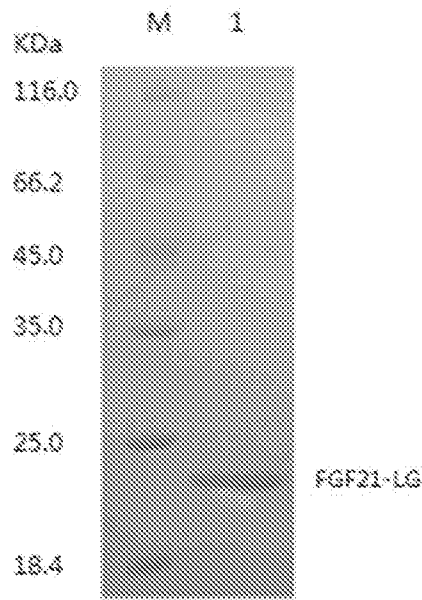


图 5

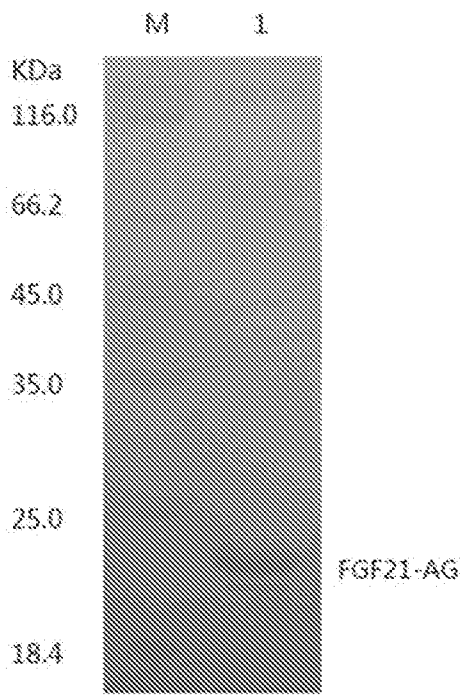


图 6

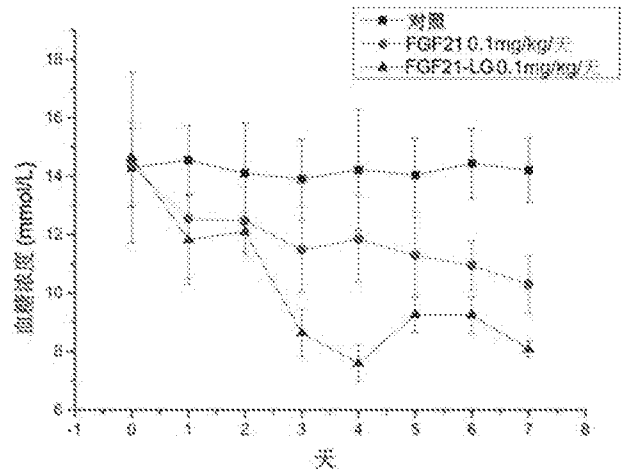


图 7

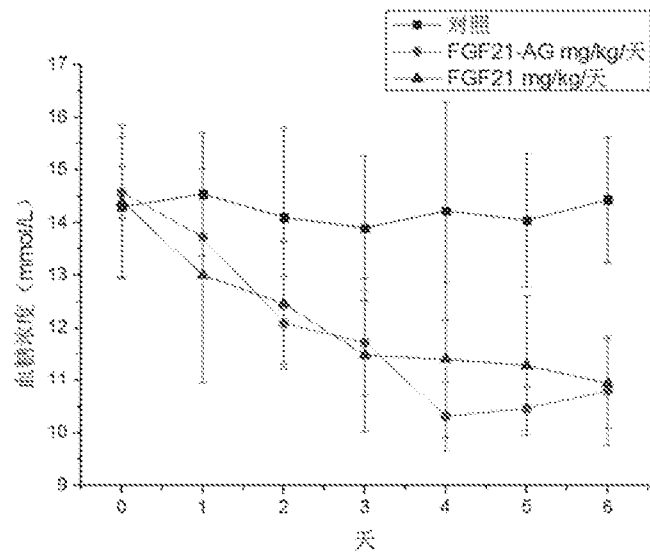


图 8.

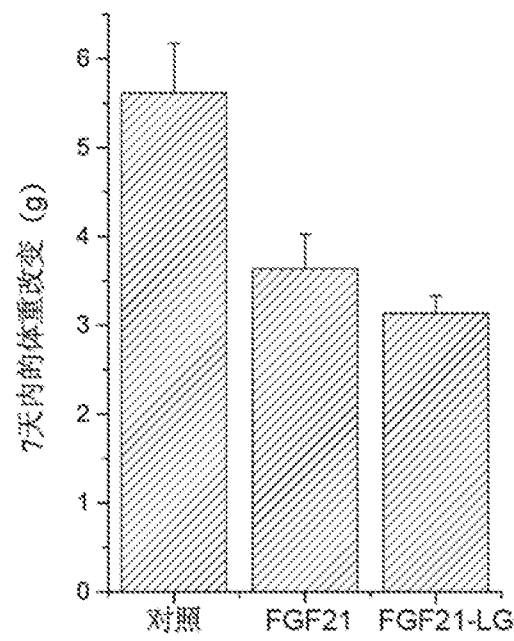


图 9

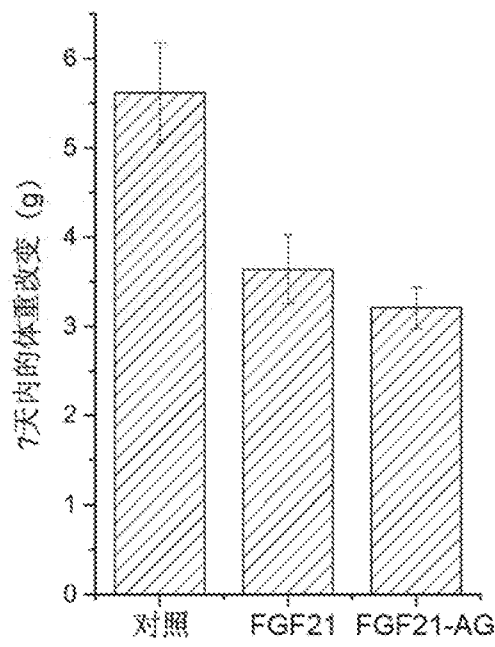


图 10

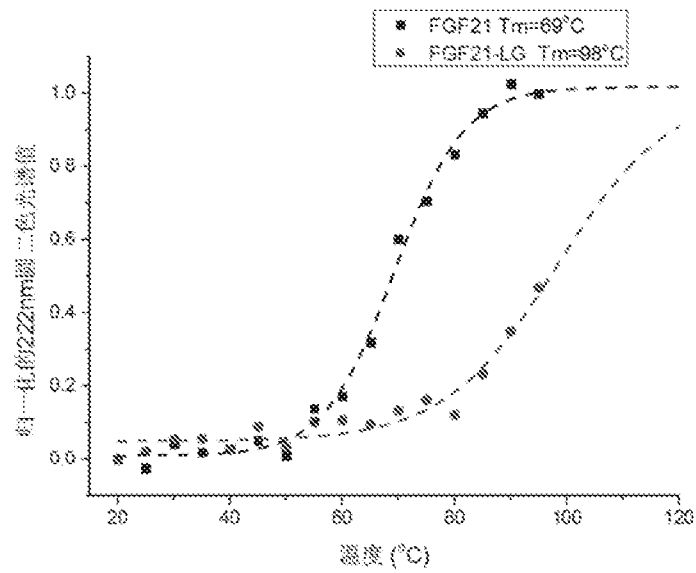


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/082669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/50 (2006.01) i; C12N 15/12 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i; A61K 38/18 (2006.01) i; A61P 3/04 (2006.01) i; A61P 3/06 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, Genbank, EMBL, STN and Search terms: 成纤维细胞生长因子 21, FGF21, 突变, mutation, 31, 32, Cys, 半胱氨酸, 43, 44, 171, Pro, P, Gly, 甘氨酸, G, 24-31, mutant, SEQ ID Nos: 1, 4, 6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014213512 A1 (AMGEN INC.) 31 July 2014 (31.07.2014), claims 1-30, description, paragraphs [0076]-[0083], tables 2, 3, 10 and 11, and sequence list, sequences 4 and 8	1, 2, 5-10, 3-4(partly)
A	US 2014213512 A1 (AMGEN INC.) 31 July 2014 (31.07.2014), claims 1-30, description, paragraphs [0076]-[0083], tables 2, 3, 10 and 11, and sequence list, sequences 4 and 8	3-4(partly)
PX	CN 107056925 A (HEFEI INSTITUTES OF PHYSICAL SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 18 August 2017 (18.08.2017), claims 1-10	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 June 2018	Date of mailing of the international search report 13 July 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Xiangyu Telephone No. (86-10) 62411992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/082669

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- ☐ on paper
☒ in electronic form

b. (time)

- ☒ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/082669

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2014213512 A1	31 July 2014	JP 2017226665 A	28 December 2017
		CA 2845357 A1	07 March 2013
		US 2018000898 A1	04 January 2018
		JP 2014526441 A	06 October 2014
		AU 2012301769 B2	19 May 2016
		EP 2750695 A2	09 July 2014
		MX 2014002260 A	18 August 2014
		WO 2013033452 A2	07 March 2013
		WO 2013033452 A3	25 April 2013
		AU 2012301769 A1	27 February 2014
CN 107056925 A	18 August 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/082669

A. 主题的分类 C07K 14/50(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61K 38/18(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类														
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 成纤维细胞生长因子21, FGF21, 突变, mutation, 31, 32, Cys, 半胱氨酸, 43, 44, 171, Pro, P, Gly, 甘氨酸, G, 24-31, mutant, SEQ ID Nos: 1, 4, 6														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2014213512 A1 (AMGEN INC) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 权利要求1-30, 说明书第76-83段, 表2、3、10、11, 序列表中序列4和8</td> <td>1、2、5-10, 3-4 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014213512 A1 (AMGEN INC) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 权利要求1-30, 说明书第76-83段, 表2、3、10、11, 序列表中序列4和8</td> <td>3-4 (部分)</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 107056925 A (中国科学院合肥物质科学研究院) 2017年 8月 18日 (2017 - 08 - 18) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	US 2014213512 A1 (AMGEN INC) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 权利要求1-30, 说明书第76-83段, 表2、3、10、11, 序列表中序列4和8	1、2、5-10, 3-4 (部分)	A	US 2014213512 A1 (AMGEN INC) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 权利要求1-30, 说明书第76-83段, 表2、3、10、11, 序列表中序列4和8	3-4 (部分)	PX	CN 107056925 A (中国科学院合肥物质科学研究院) 2017年 8月 18日 (2017 - 08 - 18) 权利要求1-10	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	US 2014213512 A1 (AMGEN INC) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 权利要求1-30, 说明书第76-83段, 表2、3、10、11, 序列表中序列4和8	1、2、5-10, 3-4 (部分)												
A	US 2014213512 A1 (AMGEN INC) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 权利要求1-30, 说明书第76-83段, 表2、3、10、11, 序列表中序列4和8	3-4 (部分)												
PX	CN 107056925 A (中国科学院合肥物质科学研究院) 2017年 8月 18日 (2017 - 08 - 18) 权利要求1-10	1-10												
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。														
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件														
国际检索实际完成的日期 2018年 6月 11日		国际检索报告邮寄日期 2018年 7月 13日												
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 王翔宇 电话号码 62411992												

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/082669

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2014213512	A1	2014年 7月 31日	JP	2017226665	A	2017年 12月 28日
				CA	2845357	A1	2013年 3月 7日
				US	2018000898	A1	2018年 1月 4日
				JP	2014526441	A	2014年 10月 6日
				AU	2012301769	B2	2016年 5月 19日
				EP	2750695	A2	2014年 7月 9日
				MX	2014002260	A	2014年 8月 18日
				WO	2013033452	A2	2013年 3月 7日
				WO	2013033452	A3	2013年 4月 25日
				AU	2012301769	A1	2014年 2月 27日
CN	107056925	A	2017年 8月 18日	无			