



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201632545 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 16 日

(21) 申請案號：104143111 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 22 日

(51) Int. Cl. : C07K14/475 (2006.01) A61K38/18 (2006.01)
 A61K47/48 (2006.01) A61P3/00 (2006.01)

(30) 優先權：2014/12/23 歐洲專利局 14199935.9

(71) 申請人：諾佛 農迪克股份有限公司 (丹麥) NOVO NORDISK A/S (DK)
 丹麥

(72) 發明人：維左瑞克 柏基特 WIECZOREK, BIRGIT (DE)；塔格摩斯 蒂娜 莫勒
 TAGMOSE, TINA MOELLER (DK)；薩斯 歐倫 克里斯堤恩 SASS-OERUM,
 KRISTIAN (DK)；安德森 柏吉特 ANDERSEN, BIRGITTE (DK)；歐爾森 傑
 根 OLSEN, JOERGEN (DK)

(74) 代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：0 共 197 頁

(54) 名稱

F G F 2 1 衍生物及其用途

FGF21 DERIVATIVES AND USES THEREOF

(57) 摘要

本發明係關於在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175 且特別是位置 180 或位置 181 的位置具有半胱胺酸殘基的 FGF21 蛋白質之衍生物與其具有接附至此半胱胺酸的側鏈的衍生物。本發明之 FGF21 衍生物對 FGF 受體顯示高程度的效力。本發明亦係關於包含如此 FGF21 衍生物與醫藥上可接受的賦形劑的醫藥組成物、以及該 FGF21 衍生物之醫藥用途。

The invention relates to a derivative of a FGF21 protein having a cysteine residue at a position corresponding to position 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 and in particular position 180 or position 181 of mature human FGF21 and derivatives thereof having a side chain attached to this cysteine. The FGF21 derivatives of the invention display high potency towards the FGF receptors. The invention also relates to pharmaceutical compositions comprising such FGF21 derivatives and pharmaceutically acceptable excipients, as well as the medical use of the FGF21 derivatives.

201632545

發明摘要

※ 申請案號：104143111

※ 申請日：104.12.22

※IPC 分類：C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

FGF21 衍生物及其用途

FGF21 DERIVATIVES AND USES THEREOF

【中文】

本發明係關於在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175 且特別是位置 180 或位置 181 的位置具有半胱胺酸殘基的 FGF21 蛋白質之衍生物與其具有接附至此半胱胺酸的側鏈的衍生物。本發明之 FGF21 衍生物對 FGF 受體顯示高程度的效力。本發明亦係關於包含如此 FGF21 衍生物與醫藥上可接受的賦形劑的醫藥組成物、以及該 FGF21 衍生物之醫藥用途。

【英文】

The invention relates to a derivative of a FGF21 protein having a cysteine residue at a position corresponding to position 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 and in particular position 180 or position 181 of mature human FGF21 and derivatives thereof having a side chain attached to this cysteine. The FGF21 derivatives of the invention display high potency towards the FGF receptors. The invention also relates to pharmaceutical compositions comprising such FGF21 derivatives and pharmaceutically acceptable excipients, as well as the medical use of the FGF21 derivatives.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 無 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

FGF21 衍生物及其用途

FGF21 DERIVATIVES AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於 FGF21 類似物之衍生物，尤其係關於在位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 具有側鏈的 FGF21 之類似物、以及其等的醫藥用途。

序列表之以參考方式納入

【0002】 序列表(標題為「序列表」)係 33 kb，係於 2015 年 12 月 21 日製作，且係以參考方式納入本文中。

【先前技術】

【0003】 FGF21 屬於具有新陳代謝功效而非促細胞分裂功效的非典型的纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor, FGF)之 FGF19 次家族。FGF21 與 FGF 受體(FGFR1c、FGFR2c 與 FGFR3c)結合並活化之，但此僅在非傳訊性共受體貝他-klotho(BKL)存在下發生。BKL 之組織專一性表現決定了 FGF21 之新陳代謝活性。FGF21 基因轉殖小鼠對膳食誘發性肥胖有抗性且壽命變長。FGF21 係一種能量消費(葡萄糖與脂質代謝)之新陳代謝調節子，其在逆轉具有糖尿病與異常血脂症的肥胖患者中的體重、高血

糖症與異常血脂症方面具有很大的潛力。

【0004】 FGF21 的問題在於活體內不穩定，而此係導因於蛋白質水解，且高達一半的內源性循環性人類 FGF21 是不活性的。活性之喪失係導因於 C 端之降解，且此等代謝物大部分在 P171 而非 S181 終止。因此，對抗 C 端區域中的新陳代謝分解的保護對治療性 FGF21 分子而言是所欲的。改造 C 端區域可能提供對抗降解的保護，然而目前為止如此改造之代價為經改造的 FGF21 化合物之效力降低或喪失。FGF21 之 N 端區域與 FGFR 結合而 FGF21 之 C 端區域與 BKL 結合。截短 C 端胺基酸導致效力顯著喪失。

【0005】 於[180C]FGF21 之位置 180 的 PEG 化導致試管內活性引人注目地降低 (J. Xu et al, Bioconjugate Chemistry (2013), 24, 915-925)。透過將 Fc 接附至 FGF21 之 C 端而得的 Fc 融合蛋白質之效力遠比天然 FGF21 與 FGF21 之 N 端 Fc 融合之效力差 (Hecht et al, PLoS One 2012, 7(11), e49345)。

【發明內容】

【0006】 本發明係關於在對應至相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 的位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 之一者的位置具有側鏈的 FGF21 衍生物。本發明係關於在對應至相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 的位置 180 或 181 之一者的位置具有側鏈的 FGF21 衍生物。更特別地，該側鏈係共價地接附至對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 的 FGF21 類似物之位置，或共價地接附至對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 181 的 FGF21 類似物之位置。

【0007】 更特別地，該側鏈係共價地接附至對應於成熟的人類 FGF21

(SEQ ID NO: 1) 之位置 170、174 或 175 的 FGF21 類似物之位置，或共價地接附至對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、171、172 或 173 的 FGF21 類似物之位置。

【0008】 半胱胺酸係存在於 FGF21 類似物之側鏈接附位置。側鏈係共價地接附至其所接附的半胱胺酸殘基之硫原子。側鏈包含連接子與延伸子 (protractor)。延伸子可為脂肪二酸。

【0009】 連接子可包含數個連接子元件，諸如一或多個 gGlu 殘基、及／或一或多個 Ado 殘基 (Ado 係 8-胺基-3,6-二氧辛酸)、及／或一或多個其他併入*-NH 基團與*-CO 基團的二基。延伸子與連接子係經由醯胺鍵連接。連接子係經由硫醚鍵連接至 FGF21 蛋白質之 180Cys 或 181Cys 之硫原子。

【0010】 連接子可包含數個連接子元件，諸如一或多個 gGlu 殘基、及／或一或多個 Ado 殘基 (Ado 係 8-胺基-3,6-二氧辛酸)、及／或一或多個 Trx 元件 (Trx 係傳明酸 (tranexamic acid))、及／或一或多個*-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-*及／或一或多個其他併入*-NH 基團與*-CO 基團的二基。延伸子與連接子是經由醯胺鍵連接，而連接子係經由在位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 的半胱胺酸之硫原子透過硫醚鍵與 FGF21 蛋白質連接。

【0011】 在本發明之 FGF21 衍生物中併入的 FGF21 蛋白質係成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之類似物，而該類似物在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 之一者的位置包含半胱胺酸殘基。

【0012】 相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1)，本發明之衍生

物之 FGF21 類似物可具有至多達總計 30 個胺基酸改變，其中在位置 180 或 181 之一者的半胱胺酸殘基算作一個胺基酸改變。該等最多 29 個其他改變可獨立地係一或多個延伸、一或多個插入、一或多個刪除、及／或一或多個取代。

【0013】 特別地，在第一方面，本發明係關於 FGF21 蛋白質之衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；其中該延伸子係選自以下者之群組：

Chem. 1A : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

Chem. 1B : $\text{HOOC}-\text{苯}-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 與

Chem. 1C : $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

其中 x 係範圍在 8-18 的整數；且其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者之至少一者；

其中 Chem. 2 係選自：

Chem. 2A : $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-*$ 、

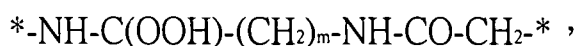
Chem. 2B : $*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-*$ 與

Chem. 2C : $*-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{環已烷}-\text{CO}-*$ 、

其中 Chem. 3 係 $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自：

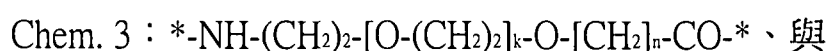
$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ 與



其中 m 係範圍在 1-5 的整數且

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係彼此相連，而該彼此相連係經由醯胺鍵且係以所指示的順序，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

【0014】 更特別地，在第一方面，本發明係關於 FGF21 蛋白質之衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，且相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 包含最多 30 個胺基酸修飾；其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；其中該延伸子係 Chem. 1：HOOC-(CH₂)_x-CO-*，其中 x 係範圍在 10-18 的整數；且其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者之至少一者：



其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且 m 係範圍在 1-5 的整數。Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係彼此相連，而該彼此相連係經由醯胺鍵且係以所指示的順序，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子。

【0015】 被稱作化合物 13 至化合物 24 的較佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0016】 被稱作化合物 13 至化合物 18 的更佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0017】 被稱作化合物 35 至化合物 41 的更佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0018】 被稱作化合物 43 至化合物 56 的更佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0019】 在一個進一步的方面，本發明係關於 FGF21 類似物，其在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 的位置包含 Cys 殘基。較佳地，該類似物與人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有高程度的一致性。一致性之程度可藉由相較於人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 的胺基酸取代或修飾之數目來描述。

【0020】 在一個進一步的方面，本發明係關於 FGF21 類似物，其在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，且相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 包含最多個 30 個胺基酸修飾。

【0021】 在第三方面，本發明係關於本發明之 FGF21 衍生物與類似物之醫藥用途，例如用於治療及／或預防所有類型的糖尿病與相關的疾病，諸如飲食疾患、心血管疾病、糖尿病併發症；及／或用於改善脂質參數、改善 β -細胞功能；及／或用於延遲或預防糖尿病疾病進展；及／或用於治療及／或預防肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver

disease, NAFLD)。

【0022】 本發明之 FGF21 衍生物係生物活性的。例如其等係非常有效的，且（亦或是供選擇地）其等與 FGF 受體極佳地結合。此外（或供選擇地），其等具有延長的藥物動力學輪廓。例如，當 i.v.投予至小鼠及／或迷你豬時，其等具有極長的最終半生期。良好效力與長半生期之特殊組合可能是高度所欲的。

【0023】 在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含側鏈的 FGF21 衍生物皆保留效力是另人感興趣的。

【0024】 此外（或供選擇地），已注意到在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 180 與 181 之一者（且特別是位置 180）的位置包含側鏈的 FGF21 衍生物已保留高效力。

【圖式簡單說明】

無

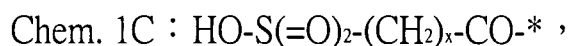
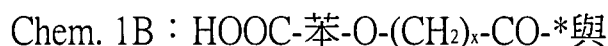
【實施方式】

【0025】 於隨後的部分，希臘字母可以其等之符號或相對應書面名稱（例如： α =阿爾法； β =貝他； ϵ =艾普西龍； γ =伽瑪； ω =奧米伽；等等）來表示。此外，希臘字母 μ 可以「u」表示（例如於 $\mu\text{l}=\text{ul}$ ，或於 $\mu\text{M}=\text{uM}$ ）。

【0026】 化學式中的星號（*）指明接附點。

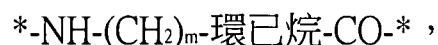
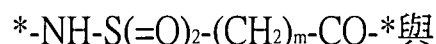
【0027】 在第一方面，本發明係關於 FGF21 蛋白質之衍生物，其中

該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；其中該延伸子係選自以下者之群組：



其中 x 係範圍在 8-18 的整數；且其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者之至少一者；

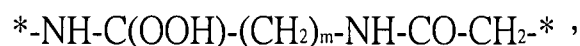
其中 Chem. 2 係選自：



其中 m 係獨立地選自範圍在 1-5 的整數，

其中 Chem. 3 係 $\text{* -NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-[O-(CH}_2\text{)}_2\text{]}_k\text{-O-[CH}_2\text{]}_n\text{-CO-*}$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數， n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自：



其中 m 係範圍在 1-5 的整數。

【0028】 在進一步的具體態樣中，Chem. 2 係選自：



*-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-*與

-NH-CH₂-環己烷-CO-。

【0029】 在進一步的具體態樣中，Chem. 2 係 *-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-*。

【0030】 在一個進一步的具體態樣中，Chem. 2 係 *-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-*。

【0031】 在一個進一步的具體態樣中，Chem. 2 係 *-NH-CH₂-環己烷-CO-*。

【0032】 如以上所提及的，該衍生物包含經由醯胺鍵彼此相連的 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 之各者之至少一者。此外，該連接子元件係以所指示的順序連接。Chem. 2 係於其*-NH 端連接至該延伸子之 CO-*端，且 Chem. 4 係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

【0033】 在一個進一步的方面，本發明係關於 FGF21 蛋白質之衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，且相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 包含最多個 30 個胺基酸修飾；其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；其中該延伸子係 Chem. 1：HOOC-(CH₂)_x-CO-*，其中 x 係範圍在 10-18 的整數；且其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者之至少一者：

Chem. 2：*-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-*、

Chem. 3 : $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-^*$ 、與

Chem. 4 : $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$ ，

其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且 m 係範圍在 1-5 的整數。Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其 $^*-\text{NH}$ 端連接至該延伸子之 $\text{CO}-^*$ 端，且係於其 CH_2-^* 端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基的巰基。

FGF21 蛋白質與類似物

【0034】 在性質上，天然的 FGF21 蛋白質係以具有用於分泌的 28 個胺基酸的訊息胜肽的形式合成。由剩下的 181 的胺基酸所組成的成熟的 FGF21 多肽係以 SEQ ID NO: 1 包含在序列表中。

【0035】 本發明之衍生物之 FGF21 蛋白質現在與以下可被稱為衍生物之「骨架」或「蛋白質骨架」或被稱為「FGF21 類似物」。

【0036】 用於本文，術語「FGF21 蛋白質」意指一種人類 FGF21 (FGF21 (1-181)) 之類似物或變異物，其序列係以 SEQ ID NO: 1 包含在序列表中。具有 SEQ ID NO: 1 之序列的蛋白質亦可被稱為「天然的」FGF21、「成熟的」FGF21、及／或「成熟的人類」FGF21。

【0037】 於序列表中，SEQ ID NO: 1 之成熟的人類 FGF21 之第一個胺基酸殘基（組胺酸）被指定為 no. 1。

【0038】 FGF21 類似物之一個實例係具有 N 端甲硫胺酸的 SEQ ID NO: 1 之蛋白質，其亦被命名為 MetFGF21 (SEQ ID NO: 2)。當成熟的人類 FGF21

在大腸桿菌中表現時，N 端 Met 被加入，參見例如 WO 2006/050247，表 6。位於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 1 的組胺酸之前的附加的 N 端胺基酸殘基被指定為位置 no. -1。用於 SEQ ID NO: 2 之 MetFGF21 的適合命名法的非限制性實例為 MetFGF21、[Met]FGF21 或[-1M]FGF21。

【0039】 MetFGF21 顯示可與 SEQ ID NO: 1 之成熟的人類 FGF21 相比的生物活性，且基於實用的理由往往係使用其而非 SEQ ID NO: 1 之成熟的人類 FGF21 作為參考化合物。MetFGF21 之胺基酸序列係以 SEQ ID NO: 2 包含在序列表中。

【0040】 於本文中，本發明之 FGF21 蛋白質可藉由參考以下者來描述：i) 對應於被改變的胺基酸殘基的成熟的人類 FGF21 (1-181) 中的胺基酸殘基之編號，(即，在成熟的人類 FGF21 中的對應位置)，與 ii) 實際的改變。

【0041】 本發明之一個方面係關於一種 FGF21 蛋白質 (FGF21 類似物)，其包含其中野生型胺基酸殘基係以半胱胺酸殘基取代的胺基酸取代。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174 與 175 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、170、171、172、173、174、175 與 180 之一者的位置包含 Cys 殘基。

【0042】 在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21(1-181)

(SEQ ID NO: 1) 之位置 169、170、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21(1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173、174、175 與 180 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173、174、175 與 180 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173、174 與 175 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173、174、180 與 181 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173、174 與 180 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173 與 174 之一者的位置包含 Cys 殘基。在一個具體態樣中，該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 與 181 之一者的位置包含 Cys 殘基。

【0043】 例如，本發明之 FGF21 蛋白質被定義以在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 位置或在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 181 的位置包含 Cys 殘基。本發明之 FGF21 蛋白質之此等 Cys 殘基可分別被命名為 Cys180 與 Cys181。例如，在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 181 的位置具有 Cys 殘基的本發明之 FGF21 蛋白質可被稱為 Cys181 FGF21 及／或被稱為 181C FGF21，供選擇地被稱為

[Cys181]FGF21 及／或被稱為[181C]FGF21。

【0044】 以下者為適合的類似物命名法之非限制性實例。

【0045】 Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 指明一種成熟的人類 FGF21 之類似物，其中丙胺酸被加至 N 端（即 Ala 位於對應於成熟的人類 FGF21（SEQ ID NO: 1）之位置-1 的位置），在位置 121 天然存在的天門冬醯胺酸已被麩醯胺酸取代，在位置 168 天然存在的甲硫胺酸已被白胺酸取代，且在位置 180 天然存在的丙胺酸已被半胱胺酸取代。

【0046】 以下者為用於 FGF21 類似物之衍生物的適合命名法之非限制性實例。S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 指明一種成熟的人類 FGF21（SEQ ID NO: 1）之類似物之衍生物，其中 Ala[Gln121,Leu168,Cys180]指明相較於成熟的人類 FGF21（SEQ ID NO: 1）的胺基酸改變（其中數字指出成熟的 FGF21 之相對應位置），且其中該取代基 [2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]-胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙基胺基]-2-側氧基乙基]-係共價地接附至在對應於成熟的人類 FGF21（SEQ ID NO: 1）之位置 180 的位置的半胱胺酸之硫原子。

【0047】 相較於 FGF21（SEQ ID NO: 1），本發明之 FGF21 蛋白質可具有另外的胺基酸改變，然而其限於最多 30 個胺基酸改變。此等改變亦係相較於成熟的人類 FGF21（1-181）（SEQ ID NO: 1），且其等可獨立地代表一或多個胺基酸取代、插入、延伸、及／或刪除。

【0048】 在一個特殊的具體態樣中，胺基酸改變係位於一或多個對應於 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置-1、121、與 168 之一或多者的位置。

【0049】 在一個具體態樣中，本發明之 FGF21 蛋白質除了半胱胺酸胺基酸取代外包含-1Ala、121Gln 與 168Leu。

【0050】 在一個具體態樣中，本發明之 FGF21 蛋白質除了 167Cys、170Cys、171Cys、172Cys、173Cys、174Cys、175Cys、180Cys 與 181Cys 之任一者之外包含-1Ala、121Gln、與 168Leu。特殊的本發明之 FGF21 蛋白質（其亦被併入實驗章節中揭示的本發明之特殊的衍生物中）係序列表之 SEQ ID NO: 8、10、12、14、15、16、17、18、19 與 20。

【0051】 在另一個特殊的具體態樣中，本發明之 FGF21 蛋白質除了 180Cys 或 181Cys 之任一者之外包含-1Ala、121Gln、與 168Leu。

【0052】 特殊的本發明之 FGF21 蛋白質（其亦被併入實驗章節中揭示的特殊的本發明之衍生物中）係序列表之 SEQ ID NO: 8 與 SEQ ID NO: 10。

【0053】 當與成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 比較時，「包含」某種指定的改變的蛋白質可包含另外的改變。

【0054】 如自以上實例可清楚瞭解的，胺基酸殘基可藉由其等之全名、其等之單字母代碼、及／或其等之三字母代碼識別。此三種方法是完全相等的。

【0055】 術語「等同於…的位置」或「相對應位置」可用於藉由參考成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 來表示在變異物 FGF21 序列中的改變之位置。等同或相對應位置（以及改變的數目）可被輕易推演（例如藉由簡

單書寫與目視)；及／或可使用標準蛋白質或胜肽排比程式（諸如基於 Needleman-Wunsch 演算法的「排比」）。此演算法係於以下者描述：Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453，與 "Optimal alignments in Linear Space" CABIOS (computer applications in the biosciences) (1988) 4:11-17 中的 Myers 及 W. Miller 之排比程式。關於排比，可使用預設的計分矩陣 BLOSUM62 與預設的一致性矩陣，且對於空隙中的第一個殘基而言罰分可設為-12，或較佳地設為-10，而對於空隙中額外的殘基而言罰分可設為-2，或較佳地設為-0.5。

【0056】 一個如此排比之實例係如下，其中序列 no. 1 為成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1)，而序列 no. 2 為類似物 Ala[121Q, 168L, 181C]FGF21 (SEQ ID NO: 10)。所計算得的一致性因此為 97.8%。

1: FGF21

2: Ala[121Q, 168L, 181C]FGF21

矩陣：EBLOSUM62

空隙_罰分：10.0

延伸_罰分：0.5

長度：182

#一致性：178/182 (97.8%)

類似性：179/182 (98.4%)

空隙：1/182 (0.5%)

分數：952.0

```

1  1  -HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP  49
      |
2  1  AHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSP  50

1  50  ESSLQKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELL  99
      |
2  51  ESSLQKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGLHFDPEACSFRELL  100

1  100 LEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEP  149
      |
2  101 LEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGQKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEP  150

1  150 PGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS  181
      |
2  151 PGILAPQPPDVGSSDPLSLVGPSQGRSPSYAC  182

```

【0057】 在進一步的具體態樣中，FGF21 蛋白質或類似物或 FGF 衍生物之 FGF21 骨架與人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80% 一致性，諸如至少 85 % 一致性，諸如至少 90 % 一致性，諸如至少 92、93、94、95、96、97、98 或 99 % 一致性，相較於人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1)。

【0058】 術語「蛋白質」意指一種化合物，其包含一連串藉由醯胺(或胜肽)鍵彼此相連的胺基酸。

【0059】 本發明之蛋白質包含至少 151 個藉由胜肽鍵連接的構成性胺基酸。在特殊的具體態樣中，該蛋白質包含至少 160 個，較佳至少 170 個，更佳至少 180，甚至更佳至少 181，或最較佳至少 182 個。在另外的特殊的具體態樣中，該蛋白質係 a) 包含 181 或 182 個胺基酸，或 b) 由 181 或 182 個胺基酸所組成。

【0060】 在又進一步的特殊的具體態樣中，蛋白質係由藉由胜肽鍵彼

此相連的胺基酸所組成。

【0061】 胺基酸可被定義成一種化合物，其包含一胺基團與一羧酸基團，且視需要包含一或多個往往被稱為側鏈其他基團。該胺基團可（例如）係一級或二級胺基。

【0062】 胺基酸殘基係胺基酸之基被併入胜肽或蛋白質中的形式。

【0063】 在一個特殊的具體態樣中，本發明之蛋白質之胺基酸係阿爾法胺基酸，其中一級或二級胺基基團之氮原子係與阿爾法-碳原子結合。

【0064】 在另一個特殊的具體態樣中，本發明之蛋白質之胺基酸係選自編碼胺基酸與非編碼胺基酸。

【0065】 在一個具體態樣中，本發明之蛋白質之所有胺基酸皆係編碼胺基酸。

【0066】 編碼胺基酸可如 IUPAC（國際理論與應用化學聯合會（INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY））之推薦之章節 3AA-1 之表 1 中定義（參見 <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/>），其給出了 20 個編碼胺基酸之結構、俗名、系統標準名、單字母符號與三字母符號。

【0067】 術語「非編碼胺基酸」意指所有其他胺基酸。非編碼胺基酸之非限制性實例為編碼胺基酸之 D-異構物，諸如 D-丙胺酸與 D-白胺酸。

【0068】 於以下部分，當未提及是何種光學異構物時，所有的特別胺基酸均應被理解成意謂 L-異構物（除非另有指明），例如當提及麩醯胺酸之特別胺基酸，此係意欲意指 L-麩醯胺酸，除非另有指明。另一方面，當胺基酸係藉由更一般的式（諸如分子式或結構式）來描述時且當未顯示立體

化學時，此等式係意欲涵蓋所有立體異構物。

【0069】 根據技術領域中的一般慣例，本發明之 FGF21 蛋白質係以 N 端在左邊且 C 端在右邊的方式顯示。

FGF21 衍生物

【0070】 用於本文，當在 FGF21 蛋白質或類似物之前後文中時，術語「衍生物」意指一種經化學修改的 FGF21 蛋白質或類似物，其中已充分界定數字的取代基已被共價地接附至該蛋白質之一或多個特別的胺基酸殘基。該（等）取代基可被稱為側鏈。

【0071】 在一個特殊的具體態樣中，側鏈能夠與白蛋白形成非共價的聯系，藉此促進衍生物在血流中的循環，且亦具有延長衍生物有作用的時間之功效，而其係因為以下事實：FGF21 衍生物與白蛋白之聯系僅緩慢地崩解以釋放活性醫藥成分。

【0072】 側鏈包含於本文中被稱為延伸子的部分。

【0073】 延伸子可位於（或靠近）側鏈之遠端（相對於延伸子與蛋白質的接附點）。

【0074】 在又進一步的特殊的具體態樣中，側鏈包含位於延伸子與和蛋白質的接附點之間的部分，而該部分可被稱為連接子。連接子可由一或多個連接子元件所組成。

【0075】 於特殊的具體態樣中，側鏈及／或延伸子於生理 pH（7.4）係親脂性的及／或帶負電的。

【0076】 側鏈可藉由烷基化共價地接附至 FGF21 蛋白質之半胱胺酸

殘基。

【0077】 在一個較佳的具體態樣中，側鏈係以鹵乙醯胺基團之形式合成與以鹵乙醯胺基團活化，而其與半胱胺酸殘基之巰基團反應，且此係在亦被稱為硫醚鍵的共價的巰基-碳鍵形成下（此程序被稱為 Cys-烷基化）。因此，巰基基團並未出現在衍生物中，而側鏈係透過硫原子聯結。在關係到衍生物而提及巰基基團的情況下，其必須被了解成在 Cys-烷基化之前是半胱胺酸之巰基基團之一部份的硫原子。

【0078】 在另一個具體態樣中，側鏈係以順丁烯二醯亞胺基團活化，其在共價的巰基-碳鍵之形成下與半胱胺酸殘基之巰基基團反應。

【0079】 為了本發明之目的，術語延伸子、與連接子可包含此等分子之未經反應形式以及經反應形式。當該術語被使用時，其意謂哪種形式可自前後文明確得知。

【0080】 在一個方面，各延伸子包含式 Chem. 1 之延伸子，或係由式 Chem. 1 之延伸子所組成：

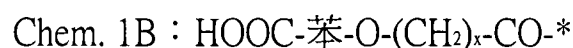


其中 x 係範圍在 10-18 的整數。

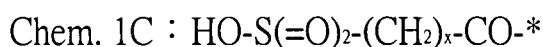
【0081】 在可供選擇的具體態樣中，延伸子 Chem. 1 係選自由 Chem. 1A、Chem. 1B 與 Chem. 1C 所定義的延伸子之群組：



其中 x 係範圍在 8-18 的整數、



其中 x 係範圍在 8-18 的整數、與



其中 x 係範圍在 8-18 的整數。

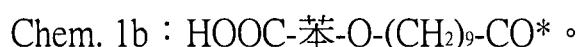
【0082】 對於各個不同的 Chem. 1 結構，藉由 x 定義的碳鏈之長度範圍可在 8-18，而如以下所描述的，不同種類的延伸子元件可能偏好較長或較短的版本。

【0083】 在一個 1A 之特殊的具體態樣中，*-(CH₂)_x-* 意指直鏈伸烷基，其中 x 係範圍在 10-18 的整數，諸如 14-18 或諸如 14-16。

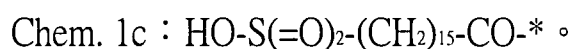
【0084】 在另一個 1A 之特殊的具體態樣中，*-(CH₂)_x-* 意指直鏈伸烷基，其中係 16。此延伸子可簡短地稱為 C18 二酸，即具有 18 個碳原子的脂肪二羧酸。當 x=16 時，此連接子元件之結構對應於 Chem. 1a：



【0085】 在一個具體態樣中，延伸子係 Chem. 1B。在一個 1B 之具體態樣中，*-(CH₂)_x-* 意指直鏈伸烷基，其中 x 係範圍在 8-14 的整數。於 x=9 之特殊的具體態樣中，此連接子元件之結構對應於 Chem. 1b：



【0086】 在一個具體態樣中，延伸子係 Chem. 1C。在一個 1C 之具體態樣中，*-(CH₂)_x-* 意指直鏈伸烷基，其中 x 係範圍在 10-18 的整數，諸 12-18 或 14-18。在一個 x=15 的 1C 之特殊的具體態樣中，此連接子元件之結構對應於 Chem. 1c：



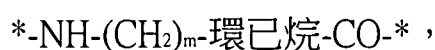
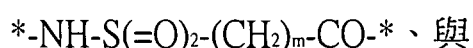
【0087】 本案之命名法係與技術領域中通常的命名法相同，例如在以上的式中，*-CO-* 意指羰基 (*-C(=O)-*)。例如，在本文之任何式(R-CO-*)

中（其中 R 係如由各式所定義者），R-CO-* 意指 R-C(=O)-*。苯意指在 Chem. 1B 中於 C1 及 C4 分別被 O-(CH₂)_x-* 與 -COOH 取代的環結構。HO-S(=O)₂ 描述磺酸。

【0088】 本發明之衍生物之連接子包含至少一個以下的連接子元件 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4。元件 Chem. 2 與 chem3 皆具有-NH-與 CO-端，而該等端允許其等藉由醯胺鍵彼此連結以及與延伸子或 Chem. 4 之-CO-或-NH-連結。

【0089】 Chem. 4 具有-NH-端（其能夠與 Chem. 2 或 Chem. 3 形成醯胺鍵）以及-NH-CO-CH₂-端，其於未經反應的形式係能夠與 FGF21 類似物之半胱胺酸之巰基基團反應的鹵乙醯胺。

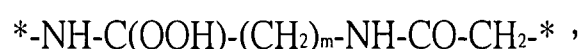
【0090】 本發明之衍生物之連接子包含以下的連接子元件 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之至少一者，其中 Chem. 2 係選自：



其中 m 係獨立地選自範圍在 1-5 的整數。

其中 Chem. 3 係： $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自：



其中 m 係獨立地選自範圍在 1-5 的整數。

【0091】 在一個具體態樣中，Chem. 2 係 $^*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$ ，其中 m 係 1、2 或 3。在一個具體態樣中， m 係 2 或 3。

【0092】 在其中 m 係 2 的具體態樣中，連接子元件 Chem. 2 可被稱為 Chem. 2a，即 $^*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-^*$ 。連接子元件 $^*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-^*$ 可被簡稱為 gGlu、伽瑪 Glu、或 γ -Glu。於 gGlu 中，用於與另一個連接子元件連接的是胺基酸麩胺酸之伽瑪羧基基團。在一個特殊的具體態樣中，(各) gGlu 連接子元件係 L-型。

【0093】 在一個具體態樣中，Chem. 2 係 $^*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$ ，其中 m 係 1、2 或 3。在一個具體態樣中， m 係 2 或 3。連接子元件 $^*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$ 係磺酸衍生物，其中羧基基團係用於與另一個連接子元件連接。在一個具體態樣中， m 係 3 且連接子元件 Chem. 2 可被稱為 Chem. 2b： $^*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-^*$ 。

【0094】 在一個具體態樣中，Chem. 2 係 $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{環已烷}-\text{CO}-^*$ ，其中 m 係 1、2 或 3。在一個具體態樣中， m 係 2 或 3。在 Chem. 2 結構中，環已烷環因此係於 C1 與 C4 分別以 $\text{NH}-\text{CH}_2$ 和 CO 取代。

【0095】 在一個具體態樣中， m 係 1 且連接子元件 Chem2 可被稱為 Chem. 2c： $^*-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{環已烷}-\text{CO}-^*$ 。此連接子元件可進一步被稱為 Trx。

【0096】 於 Chem. 3 之連接子元件中，「 k 」與「 n 」範圍皆可為 1 至 5。當 $k=n=1$ ，此連接子元件之結構對應於 Chem. 3a。

【0097】 在一個具體態樣中，Chem. 3 係 Chem. 3a： $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-^*$ 。由於其係其二基團，Chem. 3a 之連接子元

件可被簡稱為 Ado (8-胺基-3,6-二氧辛酸)。

【0098】 於 Chem. 4 連接子元件中，「m」範圍可在 1 至 5。在一個具體態樣中，Chem. 4 係 $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$ ，其中 m 係 1、2、3 或 4。在一個具體態樣中，m 係 2 或 3。

【0099】 在一個具體態樣中，當 Chem. 4 係 $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$ 且 $m=2$ 時，此連接子元件之結構對應於 Chem. 4a：
 $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$ 。

【0100】 在一個具體態樣中，Chem. 4 係 $^*-\text{NH}-\text{C}(\text{OOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$ ，其中 m 係 1、2、3 或 4。在一個具體態樣中，m 係 2 或 3。在一個具體態樣中，m 係 4 或 5。

【0101】 當 Chem. 4 係 $^*-\text{NH}-\text{C}(\text{OOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$ 且 $m=4$ 時，此連接子元件之結構對應於 Chem. 4b： $^*-\text{NH}-\text{C}(\text{OOH})-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$ 。

【0102】 本發明之衍生物之連接子可包含一或多個此等三個不同類型的連接子元件，且其亦可包含一或多個各個單獨連接子元件。在一個具體態樣中，該連接子僅包含一個 Chem. 4 元件。在一個具體態樣中，該連接子包含一或多個 Chem. 2 與 Chem. 3 之各者和僅僅一個 Chem. 4 元件。

【0103】 作為一個非限制性實例，連接子可由一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3a 元件、與一個 Chem. 4 元件所組成，其等係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於 $^*-\text{NH}$ 端連接至延伸子之 $\text{CO}-^*$ 端，且係於其 $\text{CO}-^*$ 端連接至位於 FGF21 蛋白質之位置 180 或 181 之任一者的 Cys 殘基之硫原子。因此，Chem. 4 元件將 Chem. 2/Chem. 3 元件之 $-\text{CO}-^*$ 端連結至 FGF21 半胱氨酸類似物之硫原子。

【0104】 在一個進一步的實例中，連接子可由兩個 Chem. 2 元件（諸如兩個 Chem. 2a 元件）、兩個 Chem. 3a 元件、與一個 Chem. 4 元件所組成，其等係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連。Chem. 2 元件係於其等之 *-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且 Chem4 係於其 CH₂-*端連接至 FGF21 蛋白質之 Cys 殘基之硫原子。

【0105】 在一個具體態樣中，連接子係連接至位於 FGF21 蛋白質之位置 167、169、170、171、172、173、173、174、175、180 或 181 的 cys 之巰基基團。在進一步的具體態樣中，連接子係連接至位於位置 180 或 181 的 Cys 之硫原子。

【0106】 不用說，僅僅為了良好排列之理由：術語「以所指示的順序」意謂首先提及的連接子元件（在此為 Chem. 2）之 *-NH 端係連接至延伸子之 CO-*端，且最後提及的連接子元件（在此為 Chem. 4）之 CO-*端係連接至所討論的 FGF21 蛋白質之 Cys 殘基之巰基基團。

【0107】 在一個具體態樣中，本發明之衍生物係選自由以下者所組成的群組：

- a. 化合物 13-24
- b. 化合物 35-41 及／或
- c. 化合物 43-56。

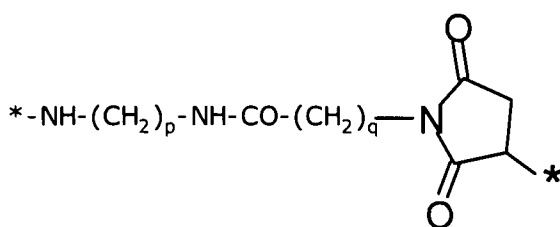
【0108】 在一個進一步的具體態樣中，該衍生物係選自化合物 13-24。

【0109】 在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 13-18。在一個的具體態樣中，該衍生物係選自化合物 20-24。

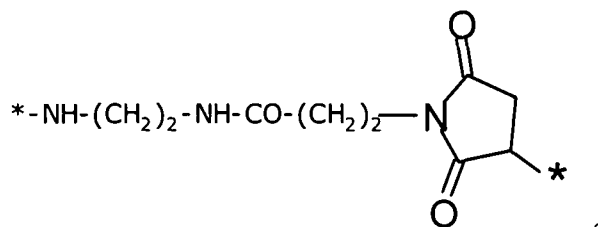
【0110】 在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 35-41。

【0111】 在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 43-56。在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 43-44 與 46-54。在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 44、47 與 50-54。

【0112】 替代 Chem. 4，可使用衍生自順丁烯二醯亞胺的连接子元件，其中 p 與 q 範圍可在 1 與 5 之間：



當 $p=q=2$ 時，此连接子元件之結構對應於 N-(2-胺基乙基)-3-(2,5-二側氧基-吡咯啉-1-基)丙醯胺：



【0113】 本發明之衍生物可以不同的立體異構物的形式存在，其等具有相同的分子式與鍵結的原子之順序，但僅在其等之原子於空間中的三維方向不同。本發明之例示性衍生物之立體異構性係於實驗章節中使用標準命名法以其等之名稱以及結構指示。除非另加指出，本發明係關於所請衍生物之所有立體異構物形式。

功能性質

【0114】 本發明之 FGF21 衍生物係生物活性的。例如其等係非常有效的，且（亦或選擇性地）其等與 FGF 受體之結合性非常好。此外（或選擇性地），其等具有延長的藥物動力學輪廓。例如，當 i.v.投予至小鼠及／或迷你豬時，其等具有非常長的最終半生期。良好的效力與長半生期之特殊組合可是高度所欲的。

【0115】 此外（或選擇性地），令人意外地，在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 167、169、170、171、172、173、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含本發明之側鏈的 FGF21 衍生物具有高效力。

【0116】 根據第一個方面，該 FGF21 衍生物具有 FGF21 活性。例如，本發明之 FGF21 衍生物對人類 FGF 受體具有令人意外地高的效力。

【0117】 在第一個特殊的具體態樣中，效力及／或活性意指試管內效力，即於功能性 FGF 受體分析中的表現，更特別係是意指活化人類 FGF 受體的能力。

【0118】 試管內效力可（例如）於使用表現人類 FGF 受體（FGFR1c、FGFR2c 或 FGFR3c）與 BKL 的完整的細胞的分析中測定。例如，人類 FGF 受體之反應可使用過度表現人類貝他-klotho（BKL）的 HEK（人類胚胎腎臟細胞，Human Embryonic Kidney cell）來測量。HEK293 細胞內源地表現數種 FGF 受體，包含 FGFR1c 與 FGFR3c。此等細胞對 FGF21 是非反應性的，直到其等被以共受體 BKL 轉染。FGF 受體／BKL 複合物之活化導致 MAPK／ERK 傳訊途徑之活化與 ERK 之磷酸化。於給定時間點的經磷酸化的 ERK（pERK）之水平隨著 FGF21 之濃度的增加而增加。一個如此分析之非限制性實例係於實施例 6 描述。

【0119】 試管內效力亦可於使用小鼠 3T3-L1 脂肪細胞的分析中測定。例如，可測試 FGF21 類似物與衍生物增加葡萄糖被吸收到脂肪細胞中的量的能力。經分化的 3T3-L1 脂肪細胞內源地表現 FGFR1c 與 BKL。3T3-L1 細胞對 FGF21 是非反應性的，直到其分化後，而此係因為分化會導致共受體 BKL 之表現。FGFR1c 受體/BKL 複合物之活化會增加葡萄糖轉運子 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 之表現且因此 FGF21 類似物會以劑量反應性的方式導致被吸收至脂肪細胞中的葡萄糖之量增加。

【0120】 EC50 值通常被用作為藥物之效力之度量。其意指所關注的化合物誘發在基線與最大值之間之一半的反應的濃度，其係藉由參考劑量反應曲線。一般地說，EC50 表示觀察到最大功效之 50%時的濃度。本發明之衍生物之試管內效力可如以上所描述的測定，且所關注的衍生物之 EC50 經測定。EC50 值越低，效力越好。

【0121】 作為一個非限制性實例，使用過度表現人類貝他-klotho 的 HEK293 細胞測量時，本發明之 FGF21 衍生物具有對應於在 0% HSA EC50 低於 60 nM，較佳地低於 20 nM，或更佳地低於 10 nM 的效力（例如如於實施例 6 中所描述的測定）。

【0122】 作為一個非限制性實例，使用在 3T3-L1 脂肪細胞中的葡萄糖吸收測量時，本發明之 FGF21 衍生物具有對應於低於 60 nM，較佳地低於 20 nM，或更佳地低於 10 nM 的 EC50 的效力（例如如於實施例 7 中所描述的測定）。

【0123】 作為一個非限制性實例，當使用在 3T3-L1 脂肪細胞中的葡萄糖吸收測量時，本發明之 FGF21 衍生物具有至少 50%，較佳地至少 80%，

或更佳地至少 90%的效力 Emax (例如如於實施例 7 中所描述的測定)。

【0124】 作為一個非限制性實例，當使用在 3T3-L1 脂肪細胞中的葡萄糖吸收測量時，本發明之 FGF21 衍生物具有對應於低於 60 nM，較佳地低於 20 nM，或更佳地低於 10 nM 的 EC50 的效力 (例如如於實施例 7 中所描述的測定)，且當使用在 3T3-L1 脂肪細胞中的葡萄糖吸收測量時，具有至少 80%，或更佳地至少 90%的效力 Emax (例如如於實施例 7 中所描述的測定)。

【0125】 在第二個特殊的具體態樣中，效力及/或活性意指活體內效力。本發明之蛋白質與衍生物係活體內有效的，其可如技術領域中已知於任何適合的動物模型中、以及於臨床試驗中測定。

【0126】 之前已有人顯示在瘦的小鼠中由 FGF21 誘發的重量喪失對在肥胖小鼠中的功效有預測性且因此瘦的小鼠被認為是良好的篩選模型。瘦的 C57BL 小鼠係一個適合的動物模型的實例，且體重減輕性功效可於如此小鼠活體內測定 (如於 (例如) 實施例 7 中所描述的測定)。

【0127】 根據第二個方面，本發明之衍生物係延長的。延長可試管內地估計，及/或從藥物動力學活體內研究測定。在血清白蛋白存在下，試管內效力 (EC50 值) 之增加指示對血清白蛋白有親和性且表示用以預測在動物模型中測試物質之延長的藥物動力學輪廓的方法。延長可以 (例如) 在 i.v. 投予至 (例如) 小鼠或迷你豬後的最終半生期 ($t_{1/2}$) 之形式測定。

【0128】 作為一個非限制性實例，在 i.v. 投予至小鼠後，本發明之衍生物具有至少 1 小時，更佳地至少 3 小時，或最較佳地至少 10 小時的最終半生期 (如於 (例如) 實施例 8 中所描述的測定)。

【0129】 作為另一個非限制性實例，在 i.v. 投予至迷你豬後，本發明之衍生物具有至少 2 小時，更佳地至少 10 小時，甚至更佳地至少 20 小時或最佳地至少 50 小時的最終半生期(如於(例如)實施例 8 中所描述的測定)。

【0130】 根據第三個方面，本發明之衍生物係延長的且同時具有非常好的效力。良好的效力／結合與長半生期之特殊組合可是高度所欲的。

【0131】 根據第四個方面，本發明之衍生物具有良好的生物物理學性質。此等性質包含但不限於物理穩定性及／或溶解度。此等與其他生物物理學的性質可使用蛋白質化學之技術領域中已知的標準方法測量。在一個特殊的具體態樣中，此等性質相較於成熟的人類 FGF21 被改善。

【0132】 本發明之衍生物之其他特殊的具體態樣係於實驗章節前標題為「特殊的具體態樣」之章節描述。

FGF21 化合物之生產與純化

【0133】 蛋白質(例如，FGF21)之生產在技術領域中是廣為人知的。FGF21 類似物可藉由包含以下者的方法生產：培養含有編碼該分子的 DNA 序列並在允許該 FGF21 類似物之表現的條件下於適合的營養培養基中能夠表現 FGF21 類似物的宿主細胞。數種重組方法可被用於生產 FGF21 與其類似物。可被用於在微生物(諸如(例如)大腸桿菌與啤酒釀母菌)中生產 FGF21 的方法之實例係(例如)於 WO12010553 中揭示。

【0134】 製備許多本發明之衍生物之方法之特殊實例係包含在實驗部分中。簡言之，FGF21 類似物係在半胱胺酸殘基藉由烷基化衍生。因此，巯基反應性側鏈(諸如以鹵乙醯胺製備的側鏈)可與 FGF21 類似物反應。

FGF 類似物可使用保護半胱胺酸之巰基基團的胱胺製備。若如此，在該類似物與巰基反應性側鏈反應之前，該類似物係以（例如）還原劑（諸如膦）還原。

【0135】 本發明之 FGF21 類似物與衍生物可藉由各種各樣技術領域中已知的程序來純化，而該等程序包含（但不限於）色層分析法（例如，離子交換、親和性、疏水性、色層聚焦（chromatofocusing）、與粒徑篩析）、電泳程序（例如，製備性等電集聚（isoelectric focusing, IEF）、差異溶解度（例如，硫酸鋁沈澱）、或萃取（參見（例如）Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989）。

投予模式

【0136】 除非另加指示或與前後文明顯矛盾，術語「治療」意欲包含所指疾病、疾患、或病況之預防以及最小化兩者（即，「治療」意指本發明之 FGF21 衍生物或包含本發明之 FGF21 衍生物的組成物之預防性與治療性投予兩者）。

【0137】 投予之途徑可為任何有效地將本發明之化合物運輸至所欲的或適當的身體內位置的途徑，諸如非經腸的（例如，皮下的、肌肉內的或靜脈內的）。選擇性地，本發明之化合物可口服地、肺臟地、直腸地、穿皮地、頰地、舌下地或鼻地投予。

醫藥組成物

【0138】 包含本發明之衍生物或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯、與

醫藥上可接受的賦形劑的醫藥組成物可如技術領域中已知的製備。

【0139】 術語「賦形劑」概括地意指任何除了活性治療性成分外的組份。賦形劑可為惰性物質、不活性的物質、及／或非醫藥活性的物質。

【0140】 賦形劑可用於各種的目的，例如作為載劑、媒劑、稀釋劑、錠劑助劑 (tablet aid)，及／或以改善活性物質之投予、及／或吸收。

【0141】 使用各種賦形劑調配醫藥活性成分係技術領域中已知的，參見例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (例如第 19 版(1995)、以及任何之後的版本)。

【0142】 包含本發明之 FGF21 化合物的可注射的組成物可使用醫藥工業之習用技術製備，其包含適當地溶解成分並混合之以得到所欲的終產物。因此，根據一個程序，本發明之 FGF21 化合於適合的 pH 被溶解在適合的緩衝劑中以最小化沈澱或避免沈澱。可注射的組成物係 (例如) 藉由滅菌過濾滅菌地製造。亦可將抗微生物劑加至該組成物。

【0143】 組成物可為經穩定的調配物。術語「經穩定的調配物」意指一種調配物，其物理及／或化學穩定性增加，較佳為兩者皆增加。大體上，調配物必須在使用與儲存 (依從推薦的使用與儲存條件) 期間穩定直到到達截止日期。

【0144】 術語「物理穩定性」意指一種物理狀態與關於此點的改變，其沒有改變共價鍵且因此未改變蛋白質由於暴露至熱-機械壓力、及／或與去穩定性介面與表面 (諸如疏水性表面) 交互作用而形成生物學上不活性及／或不溶解的聚集體及／或纖維體 (fibrillate) 的傾向。一水性蛋白質調配物之物理穩定性可於不同的溫度在暴露至機械／物理壓力 (例如攪動)

各種時間段後藉由目視檢查之手段、及／或藉由混濁測量及／或藉由濃度測量而評估。選擇性地，物理穩定性可使用分光鏡劑或蛋白質之構形性狀態之探針（諸如例如硫代黃素 T 或「疏水性小塊（hydrophobic patch）」探針）評估。

【0145】 術語「化學穩定性」意指在蛋白質結構中的共價鍵之化學的（特別是共價的）改變，其導致形成化學降解產物，該產物相較於完整的蛋白質可能具有減少的生物效力、及／或增加的致免疫性效果。化學穩定性可藉由在暴露至不同的環境條件後的各種時間點測量化學降解產物之量而評估，例如藉由 SEC-HPLC、RP-HPLC、LCMS、及／或胜肽定位（peptide mapping）。

【0146】 在一個方面，本發明提供具有改善的物理穩定性的 FGF21 衍生物。在一個方面，本發明提供具有改善的化學穩定性的 FGF21 衍生物。

組合治療

【0147】 根據本發明的使用 FGF21 衍生物的治療亦可與一或多個其他醫藥活性物質（例如選自抗糖尿病劑、抗肥胖劑、食慾調節劑、降血壓劑、用於治療及／或預防由糖尿病造成或與糖尿病有關的併發症的藥劑以及用於治療及／或預防由肥胖造成或與肥胖有關的併發症與疾患的藥劑）組合。

【0148】 此等醫藥活性物質之實例為：GLP-1 受體促效劑、胰島素、第 IV 型二肽基肽酶（dipeptidyl peptidase-IV，DPP-IV）抑制劑、澱粉素促效劑與瘦素受體促效劑。

醫藥適應症

【0149】 本發明亦係關於用作為醫藥品的本發明之衍生物。

【0150】 於特別地的具體態樣中，本發明之衍生物可用於以下的醫學治療：

(i)預防及／或治療所有形式的糖尿病，諸如高血糖症、第 2 型糖尿病、受損的葡萄糖耐受性、第 1 型糖尿病、非胰島素依賴性糖尿病、年輕人之成年肇始性糖尿病（maturity onset diabetes of the young，MODY）、妊娠糖尿病，及／或用於減少 HbA1C；

(ii)延遲或預防糖尿病疾病進展，諸如第 2 型糖尿病之進展、延遲受損的葡萄糖耐受性（impaired glucose tolerance，IGT）進展成胰島素需要型第 2 型糖尿病、延遲或預防胰島素抗性、及／或延遲非胰島素需要型第 2 型糖尿病進展成胰島素需要型第 2 型糖尿病；

(iii)改善 β 細胞功能，諸如減少 β 細胞凋亡、增加 β 細胞功能及／或 β 細胞質量、及／或用於恢復 β 細胞的葡萄糖敏感性；

(iv)預防及／或治療飲食疾患，諸如肥胖，例如藉由減少食物攝取、增加能量消費、減少體重、抑制食慾、誘發飽足感；治療或預防暴食疾患、心因性暴食症、及／或由投予抗精神病藥或類固醇誘發的肥胖；及／或預防及／或治療肥胖之共生病症，諸如骨關節炎及／或小便失禁；

(v)預防及／或治療糖尿病併發症，諸如腎病變；

(vi)改善脂質參數，諸如預防及／或治療異常血脂症、降低血清總脂質；增加 HDL；降低小型、稠密的 LDL；降低 VLDL；降低三酸甘油酯；降低膽

固醇；於人類降低脂蛋白質 a (Lp(a)) 之血漿水平；試管內及／或活體內抑制脂蛋白元 a (apo(a)) 之產生；

(vii)預防及／或治療心血管疾病，諸如症候群 X、動脈粥樣硬化、心肌梗塞、冠狀動脈心臟病、再灌注損害、中風、大腦缺血、早期心臟疾病或早期心血管疾病、左心室肥大、冠狀動脈疾病、高血壓、原發性高血壓、急性高血壓急症 (acute hypertensive emergency)、心肌病變、心臟功能不全 (heart insufficiency)、運動耐受力缺乏 (exercise intolerance)、急性及／或慢性心臟衰竭、心律不整、心律異常、暈厥、心絞痛、心臟繞道及／或支架再閉塞、間歇性跛行 (閉塞性動脈硬化)、舒張功能障礙、及／或收縮功能障礙；及／或減低血壓，諸如減低收縮壓；

(viii)預防及／或治療肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)；及／或

(ix)預防及／或治療重大疾病 (critical illness)，諸如治療危重病 (critically ill) 患者、重大疾病多發性腎病變 (critical illness poly-nephropathy, CIPNP) 患者、及／或可能的 CIPNP 患者；預防重大疾病或 CIPNP 之發展；預防、治療及／或治癒患者之全身性發炎反應症候群 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)；預防或減少患者在住院治療期間罹患菌血症、敗血症、及／或敗血性休克之可能性。

【0151】 在一個特殊的具體態樣中，適應症係選自由(i)-(vii)所組成的群組。在另一個特殊的具體態樣中，適應症係選自由(i)、(iv)、(vi)及／或(vii)所組成的群組。以下的適應症係特佳的：第 2 型糖尿病、及／或肥胖。在一個具體態樣中，本發明之化合物係用於治療第 2 型糖尿病。在一個具體

態樣中，本發明之化合物係用於治療肥胖。

特殊的具體態樣

【0152】 以下者為本發明之特殊的具體態樣。

【0153】 1.一種 FGF21 蛋白質之衍生物，

其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，

其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；

其中該延伸子係選自由以下者所組成的群組：

Chem. 1A : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

Chem. 1B : $\text{HOOC}-\text{苯}-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 與

Chem. 1C : $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

其中 x 係範圍在 8-18 的整數；且

其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者的至少一者：

其中 Chem. 2 係選自：

$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 、

$*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 與

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{環已烷}-\text{CO}-*$ 、

其中 m 係範圍在 1-5 的整數，

其中 Chem. 3 係 $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數且 n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自：

*-NH-(CH₂)_m-NH-CO-CH₂-*與

-NH-C(OOH)-(CH₂)_m-NH-CO-CH₂-，

其中 m 係範圍在 1-5 的整數；且

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

【0154】 2.根據具體態樣 1 的衍生物，其中該蛋白質包含在位置 170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的 Cys 殘基。

【0155】 3.根據具體態樣 1 的衍生物，其中該蛋白質包含在位置 170、173、174、175、180 或位置 181 的 Cys 殘基。

【0156】 4.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 Chem 2 係選自由以下者所組成的群組：

Chem. 2a：*-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-*、

Chem. 2b：*-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-*與

Chem. 2c：*-NH-CH₂-環己烷-CO-*。

【0157】 5.根據具體態樣 1 的衍生物，其中 Chem. 4 係選自：

Chem. 4a：*-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*與

Chem. 4b：*-NH-C(OOH)-(CH₂)₄-NH-CO-CH₂-*。

【0158】 6.一種 FGF21 蛋白質之衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，

且相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 包含最多個 30 個胺基酸修飾；
其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；

其中該延伸子係選自由以下者所組成的群組：



其中 x 係範圍在 10-18 的整數、



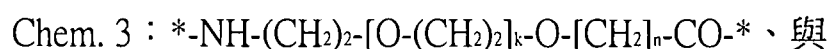
其中 x 係範圍在 8-18 的整數、

與



其中 x 係範圍在 10-18 的整數、

其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者的至少一者：



其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且 m 係範圍在 1-5 的整數；

且

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其-CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

【0159】 7.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 Chem. 1 係選

自由以下者所組成的群組：

Chem. 1a : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-*$ 、

Chem. 1b : $\text{HOOC}-\text{苯}-\text{O}-(\text{CH}_2)_9-\text{CO}-*$ 與

Chem. 1c : $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-*$ 。

【0160】 8.一種 FGF21 蛋白質之衍生物，

其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；

其中該延伸子係：

Chem. 1 : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ ，

其中 x 係範圍在 10-18 的整數；且

其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者的至少一者：

Chem. 2 : $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-*$ 、

Chem. 3 : $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ 、與

Chem. 4 : $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ ，

其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且 m 係範圍在 1-5 的整數；

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其 $*-\text{NH}$ 端連接至延伸子之 $\text{CO}-*$ 端，且係於其 CH_2-* 端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

【0161】 9.一種 FGF21 蛋白質之衍生物，

其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，且相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 包含最多個 30 個胺基酸修飾；

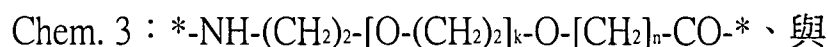
其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；

其中該延伸子係：



其中 x 係範圍在 10-18 的整數；且

其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者的至少一者：



其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且 m 係範圍在 1-5 的整數；

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之巯基基團，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

【0162】 10.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 的位置包含 Cys 殘基。

【0163】 11.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有最多 30 個，諸如 25 個，諸如 20 個，諸如 15 個，諸如 10 個，諸如 8 個，諸如最多 5 個胺基酸修飾。

【0164】 12.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有 4 或 5 個胺基酸修飾。

【0165】 13.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有 4 個胺基酸修飾。

【0166】 14.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該 FGF 蛋白質與成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80 %，諸如 85 %，諸如 90 %，諸如 95 %一致性。

【0167】 15.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該 FGF 蛋白質與成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 96 %，諸如 97 %，諸如 98 %，諸如 99 %一致性。

【0168】 16.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該胺基酸改變係位於對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 121、168、180、或 181 之一或多者的位置之一或多者。

【0169】 17.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該胺基酸改變之一者係在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之 N 端的位置加入 Ala 殘基。

【0170】 18.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質在該蛋白質之 N 端末端包含 Ala。

【0171】 19.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質包含 121Q。

【0172】 20.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質包含 168L。

【0173】 21.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質包含 SEQ ID NO: 8 或 10 之胺基酸序列。

【0174】 22.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該蛋白質具有 SEQ ID NO: 8、10、12、15、16、17、18、19 或 20 之胺基酸序列。

【0175】 23.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 x 係範圍在 12-18 的整數。

【0176】 24.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 x 係範圍在 14-18 的整數。

【0177】 25.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 x 係範圍在 14-16 的整數。

【0178】 26.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 x 係 16。

【0179】 27.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 k 係範圍在 1-2 的整數。

【0180】 28.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 k 係 1。

【0181】 29.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 n 係範圍在 1-2 的整數。

【0182】 30.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 n 係 1。

【0183】 31.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 Chem. 4 之 m 係範圍在 1-2 的整數。

【0184】 32.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 Chem. 4 之 m 係 2。

【0185】 33.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該延伸子包

含 Chem. 1a : HOOC-(CH₂)₁₆-CO-*。

【0186】 34.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該延伸子係由 Chem. 1a : HOOC-(CH₂)₁₄-CO-*所組成。

【0187】 35.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該連接子包含 Chem. 3a : *-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-*。

【0188】 36.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該連接子包含 Chem. 4a : *-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*。

【0189】 37.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該連接子係由至少一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3 元件、與一個 Chem. 4 元件所組成。

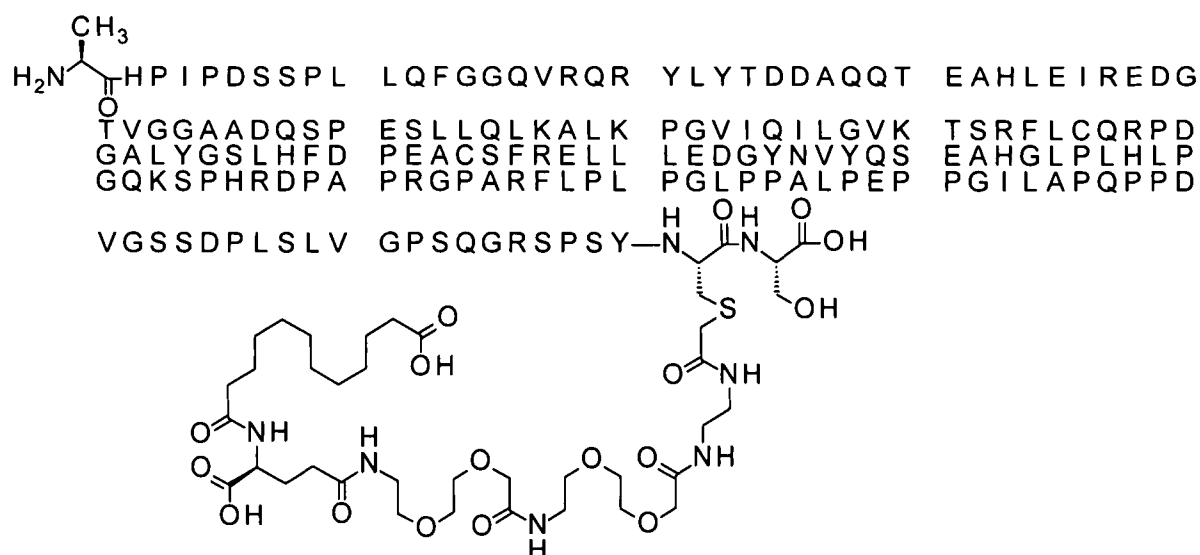
【0190】 38.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該連接子係由一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3 元件、與一個 Chem. 4 元件所組成。

【0191】 39.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該連接子係由兩個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3 元件、與一個 Chem. 4 元件所組成。

【0192】 40.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該連接子係由一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3a 元件、與一個 Chem. 4a 元件所組成。

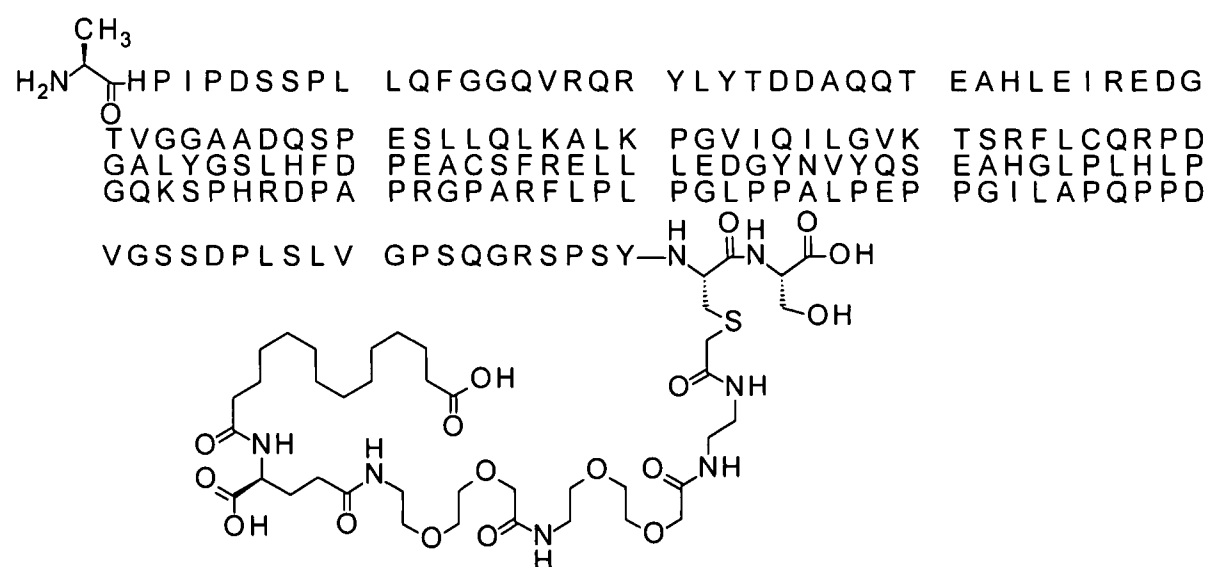
【0193】 41.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係以下者之一者：

S{貝他-180}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 13)



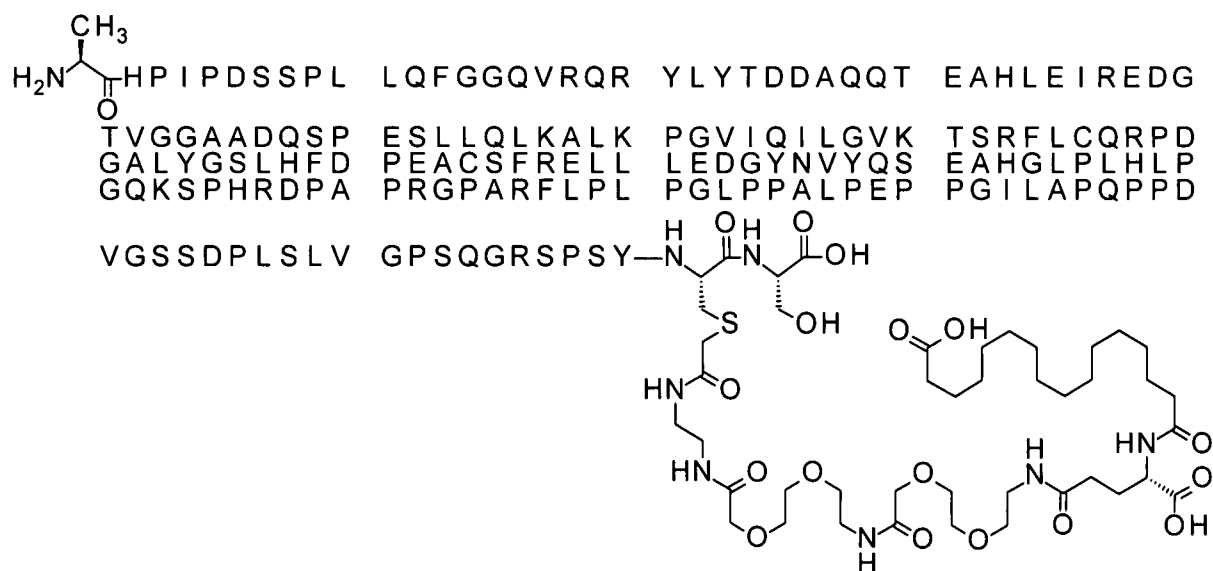
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 14)



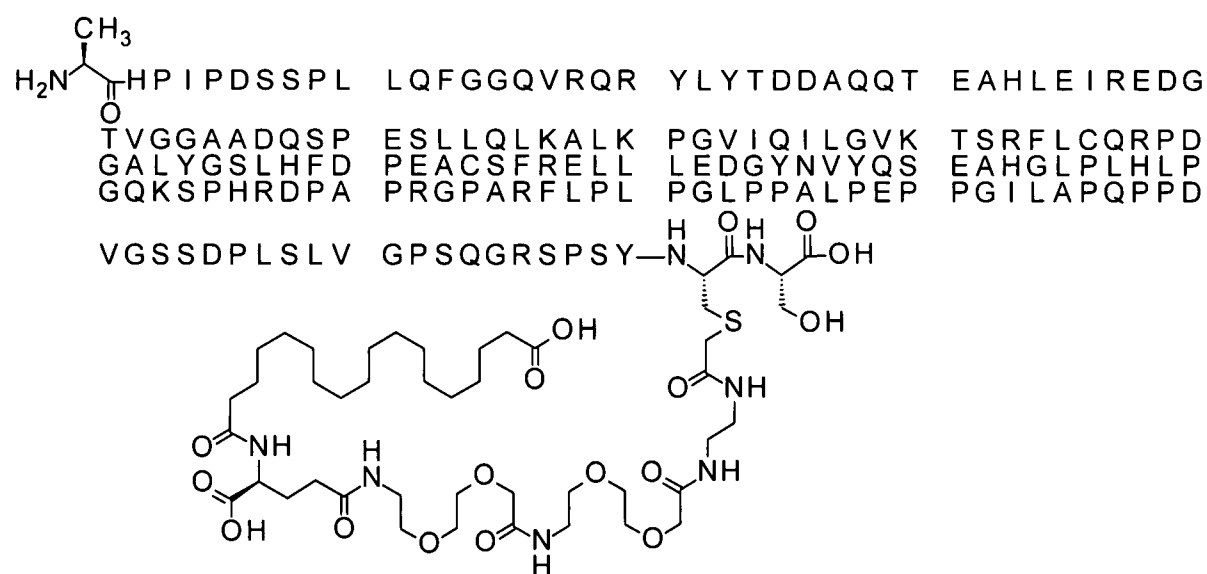
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 15)



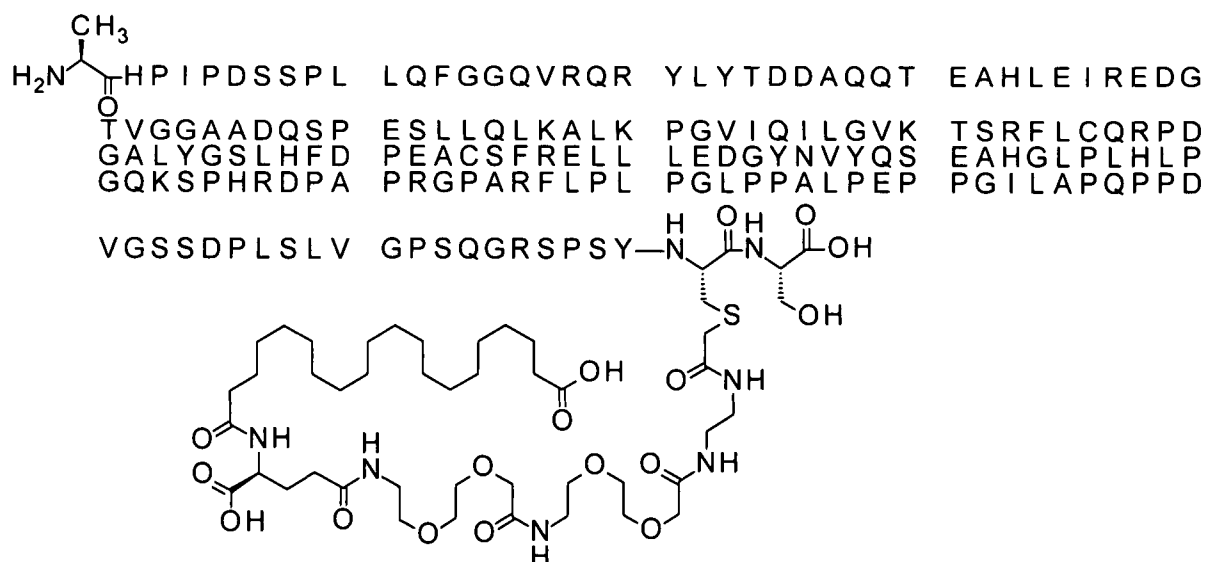
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 16)



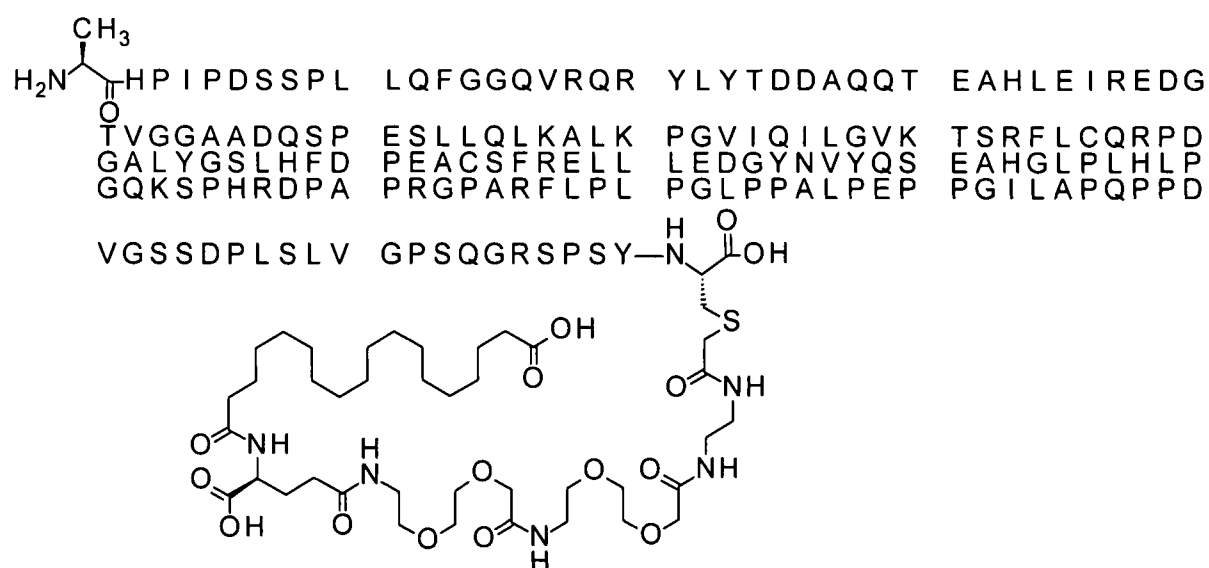
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 17)



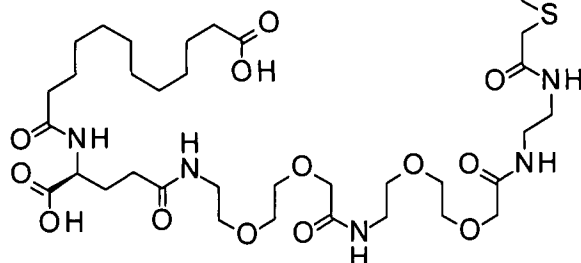
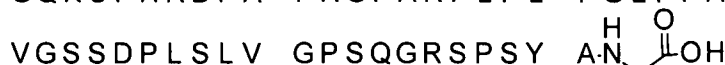
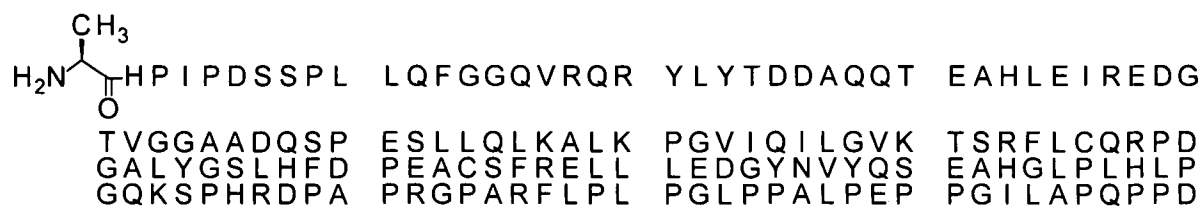
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21 (化合物 18)



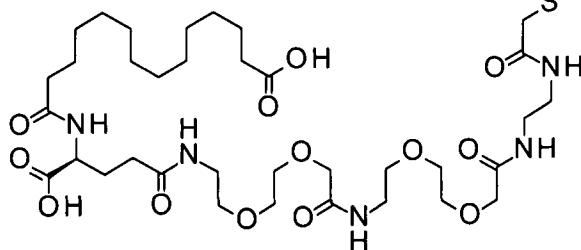
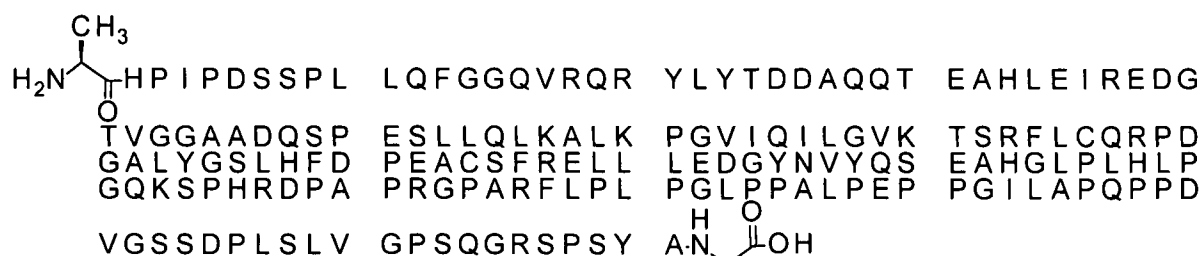
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 19)



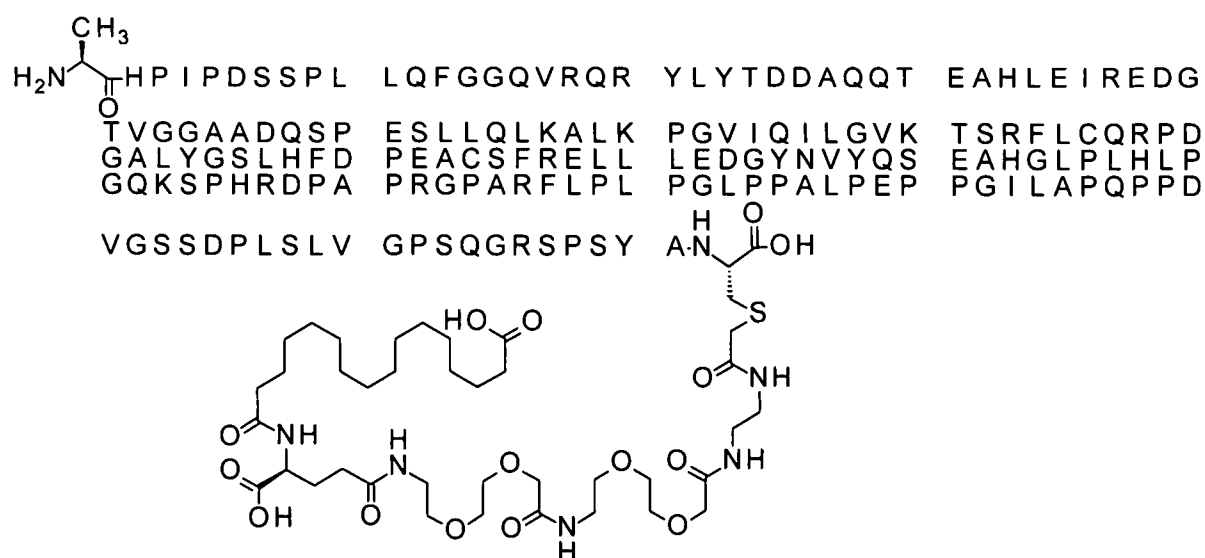
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 20)



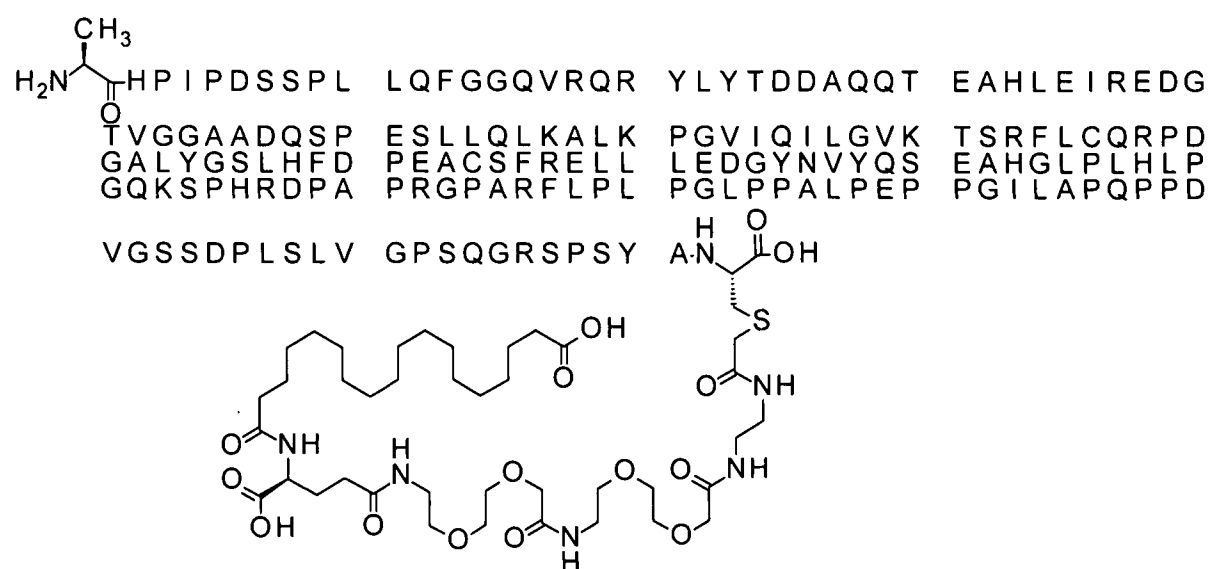
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 21)



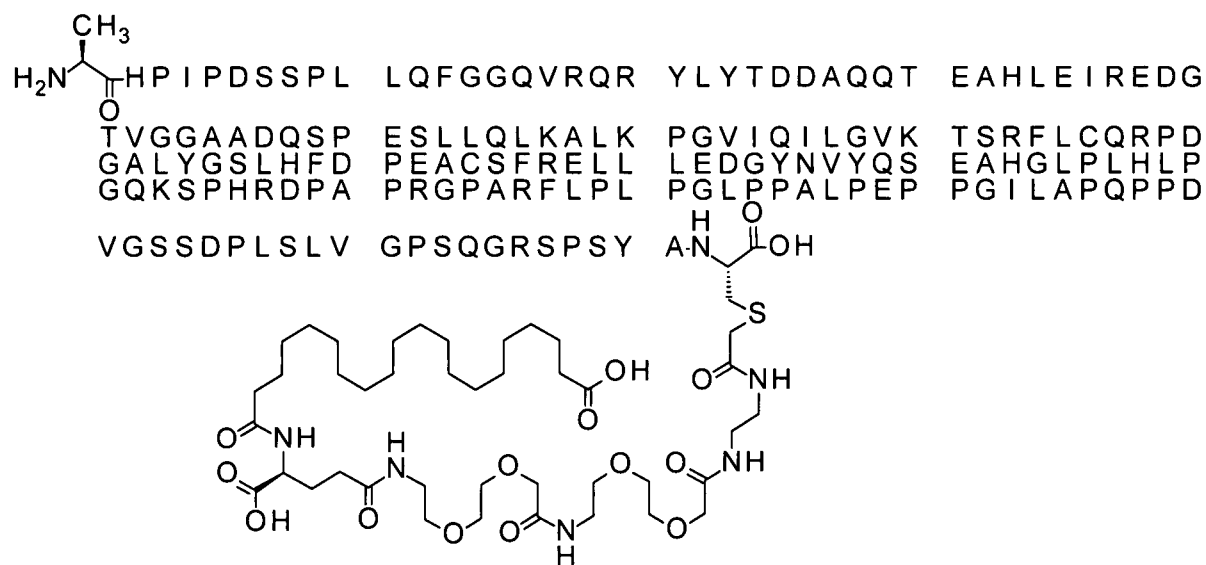
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 22)



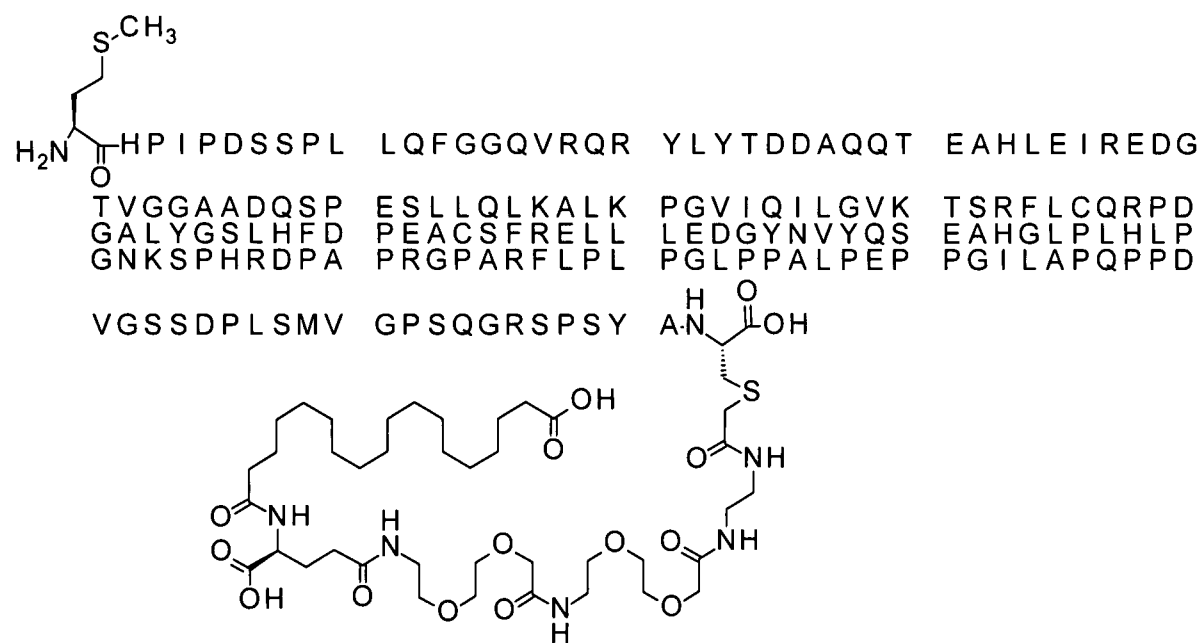
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 23)



;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Met[Cys181]FGF21 (化合物 24)

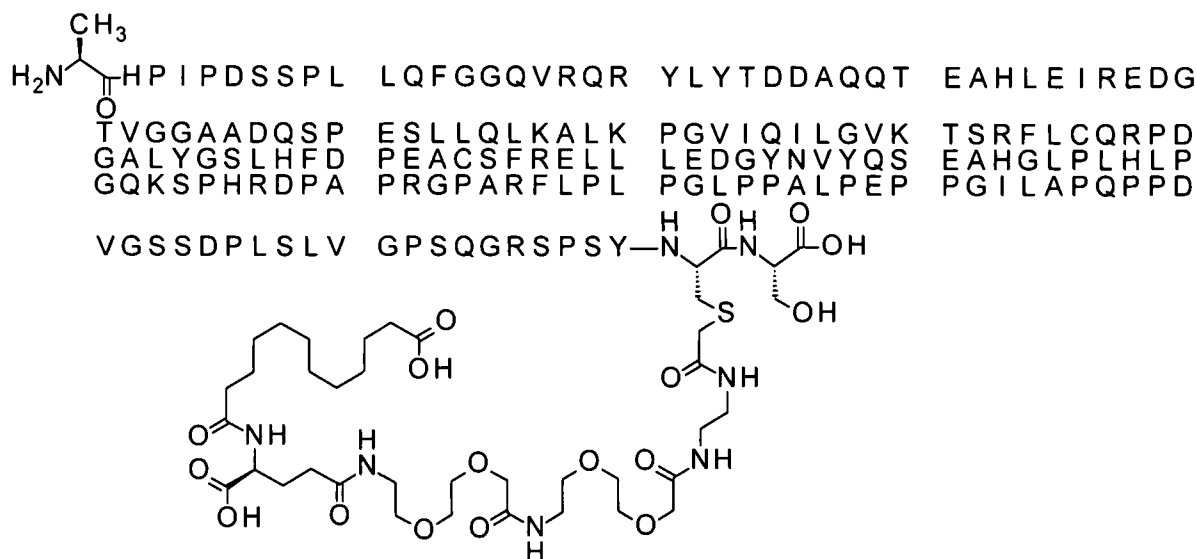


.

【0194】 42.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係以下者之一者：

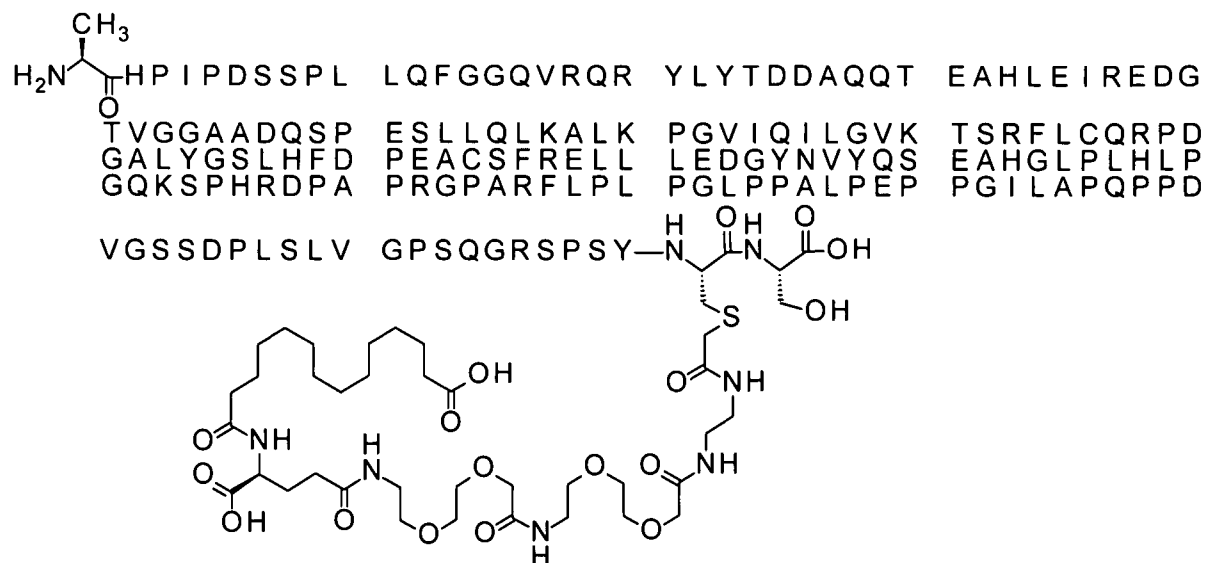
S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷醯基-胺基)

丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 13)



;

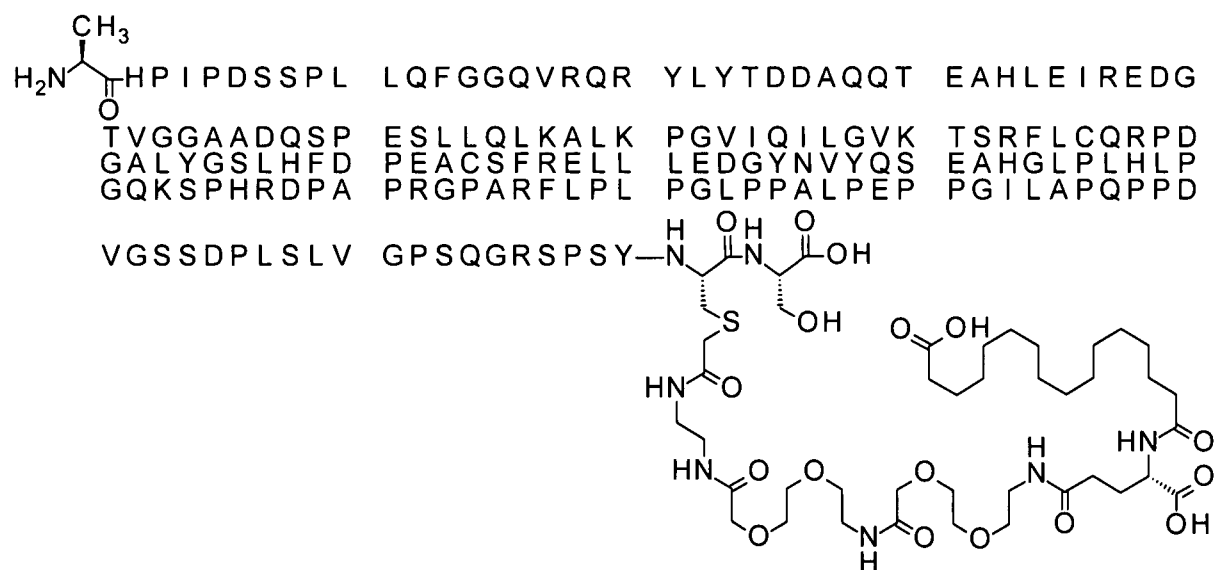
S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)
丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 14)



;

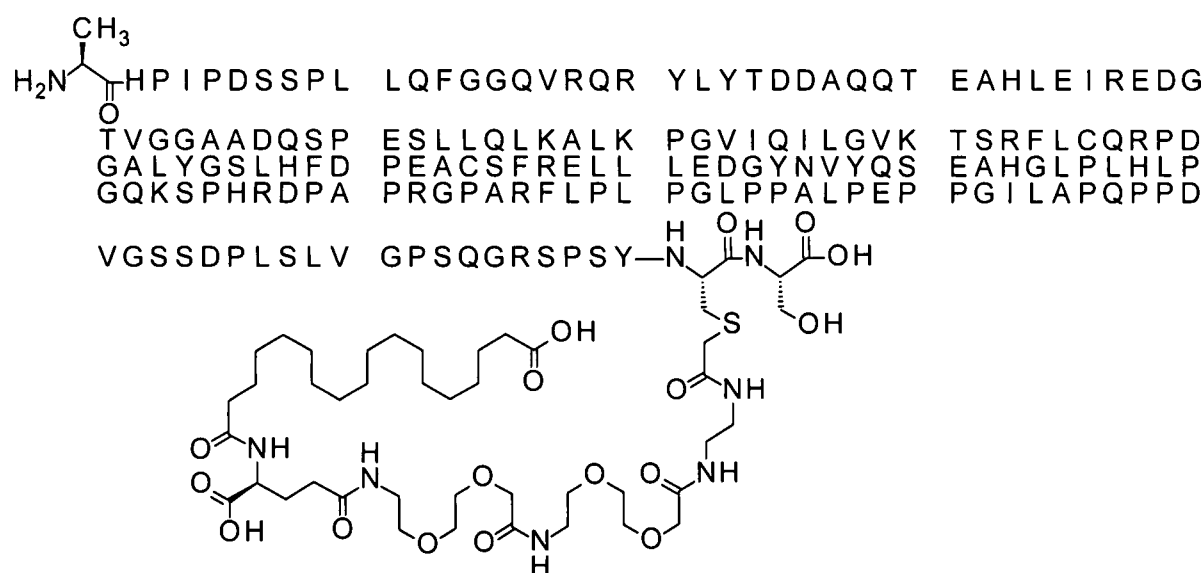
S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)

丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 15)



;

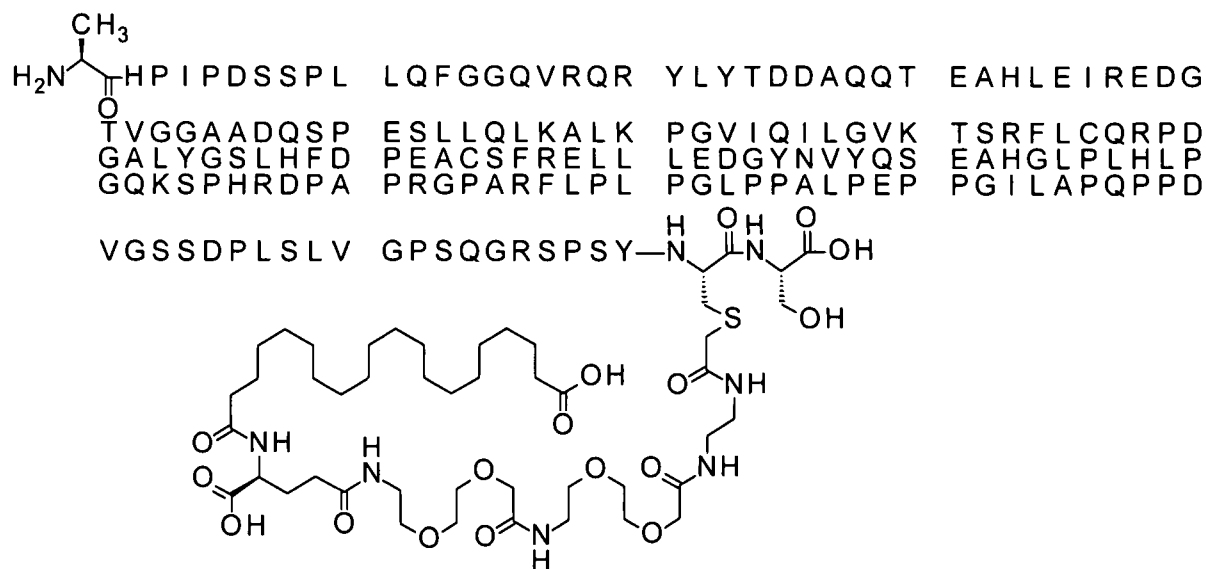
S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)
丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 16)



;

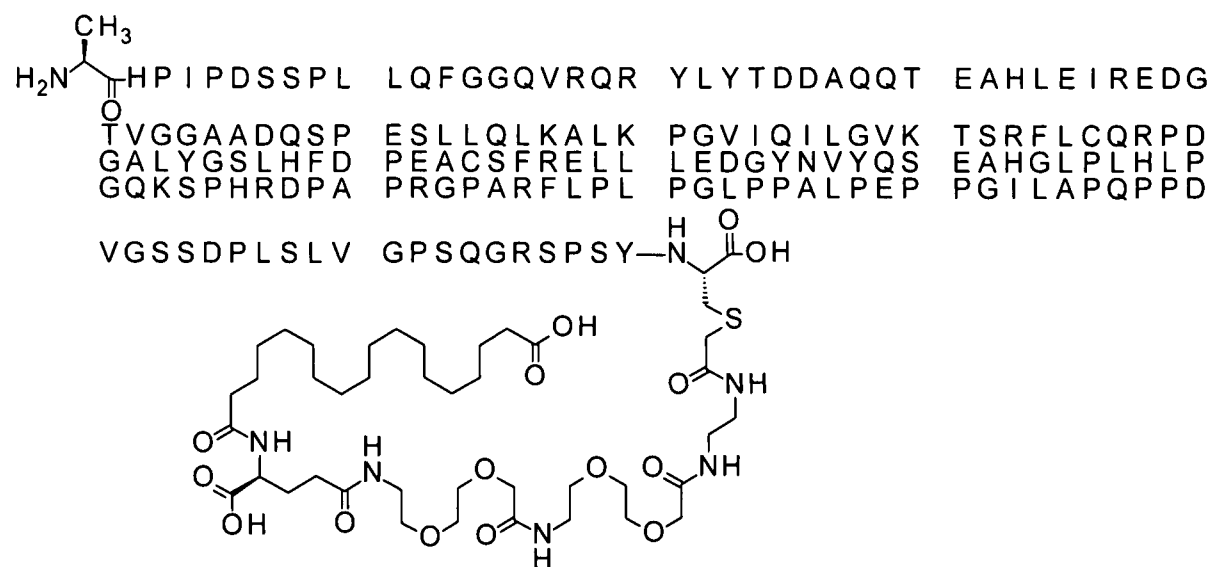
S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)

丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 17)



;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)
丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21 (化合物 18)



。

【0195】 43.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係
選自由化合物 13-24 與 43 至 56 所組成的群組。

【0196】 44.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係選自由化合物 35-41 所組成的群組。

【0197】 45.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係選自由化合物 13-24、35-41 與 43 至 56 所組成的群組。

【0198】 46.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 13。

【0199】 47.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 14。

【0200】 48.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 15。根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 16。

【0201】 49.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 17。

【0202】 50.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 18。

【0203】 51.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 19。

【0204】 52.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 20。

【0205】 53.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係化合物 21。

【0206】 54.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 22。

【0207】 55.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 23。

【0208】 56.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 24。

【0209】 57.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 35。

【0210】 58.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 36。

【0211】 59.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 37。

【0212】 60.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 38。

【0213】 61.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 39。

【0214】 62.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 40。

【0215】 63.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 41。

【0216】 64.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 43。

【0217】 65.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 44。

【0218】 66.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 45。

【0219】 67.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 46。

【0220】 68.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 47。

【0221】 69.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 48。

【0222】 70.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 49。

【0223】 71.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 50。

【0224】 72.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 51。

【0225】 73.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 53。

【0226】 74.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 54。

【0227】 75.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 55。

【0228】 76.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物係

化合物 56。

【0229】 77.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物具有 FGF21 活性。

【0230】 78.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中該衍生物能夠活化 FGF 受體。

【0231】 79.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中在 i.v.投予至迷你豬後的最終半生期 ($t_{1/2}$) 比成熟的人類 FGF21 之最終半生期 ($t_{1/2}$) 高至少 20 倍。

【0232】 80.一種根據具體態樣 1-79 項中任一項的衍生物，其係用作為醫藥品。

【0233】 81.一種根據具體態樣 1-79 項中任一項的衍生物，其係用於供以下者之用的方法：用於治療及／或預防所有形式的糖尿病與相關的疾病之任一者，諸如肥胖、飲食疾患、心血管的疾病、糖尿病併發症；及／或用於改善脂質參數、改善 β 細胞功能；及／或用於延遲或預防糖尿病疾病進展；及／或用於治療及／或預防肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

【0234】 82.一種根據具體態樣 1-79 項中任一項的衍生物之用途，其係用於製造用於供以下者之用的醫藥品：用於治療及／或預防所有形式的糖尿病與相關的疾病，諸如肥胖、飲食疾患、心血管的疾病、糖尿病併發症；及／或用改善脂質參數、改善 β 細胞功能；及／或用於延遲或預防糖尿病疾病進展；及／或用於治療及／或預防肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

【0235】 83.一種供以下者之用的方法：用於治療或預防所有形式的糖尿病與相關的疾病，諸如肥胖、飲食疾患、心血管的疾病、糖尿病併發症；及／或用於改善脂質參數、改善 β 細胞功能；及／或用於延遲或預防糖尿病疾病進展；及／或用於治療及／或預防肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)，其係藉由投予醫藥活性量的根據的具體態樣 1-79 中任一項的衍生物。

【0236】 84.一種 FGF21 蛋白質，其在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含野生型胺基酸被半胱胺酸殘基取代的胺基酸取代。

【0237】 85.根據具體態樣 83 的 FGF21 蛋白質，其中該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173、174、180 與 181 之一者的位置包含 Cys 殘基。

【0238】 86.根據具體態樣 83 的 FGF21 蛋白質，其中該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 170、173 與 174 之一者的位置包含 Cys 殘基。

【0239】 87.根據具體態樣 83 的 FGF21 蛋白質，其中該 FGF21 蛋白質在對應於 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 與 181 之一者的位置包含 Cys 殘基。

【0240】 88.根據具體態樣 83 的 FGF21 蛋白質，其中該 FGF21 蛋白質除了變異 Cys 殘基之外包含-1Ala、121Gln 及／或 168Leu。

【0241】 89.根據具體態樣 83 的 FGF21 蛋白質，其中該 FGF21 蛋白質除了在 FGF21 (1-181) (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、

173、174、175、180 與 181 之一者的半胱胺酸之外包含-1Ala、121Gln 及／或 168Leu。

實施例

縮寫表

【0242】	AcOD：氘代丙酮
	Ado：8-胺基-3,6-二氧辛酸
	BSPP：雙(對-磺酸根基苯基)苯基膦二水合物二鉀鹽
	DCM：二氯甲烷
	DMSO：二甲基亞砜
	DPBS：Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝食鹽水
	EDAC：(3-二甲基胺基丙基)乙基碳二醯亞胺
	ELSD：蒸發光散射偵測器
	Fmoc：9H-芴-9-基甲氧基羰基
	Fc：片段，可結晶的
	GLP-1：類升糖素胜肽-1
	gGlu：伽瑪麩胺酸
	GLUT1：葡萄糖轉運子 1
	HATU：2-(7-氮-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘六氟磷酸酯
	HEPES：4-(2-羥基乙基)-1-哌吡乙磺酸
	HPLC：高效液相色層分析法

IgG4：免疫球蛋白 G4

IBMX：3-異丁基-1-甲基黃嘌呤

IPTG：異丙基 β -D-1-硫代半乳糖糖苷

LCMS：液相色層分析法質譜術

Mtt：4-甲基三苯甲基

NMR：核磁共振

OtBu：第三丁基酯

PBS：磷酸鹽緩衝食鹽水

RF：阻滯因數

Rt：滯留時間

RT：室溫

tBu：第三丁基

TCTU：O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗四氟硼
酸酯

TFA：三氟乙酸

Tris：參(羥基甲基)胺基甲烷或 2-胺基-2-羥基甲基丙-1,3-二
醇

Trx：傳明酸

UPLC：極致效能液相色層分析法

ZOSu：N-(苯甲基氧基羰基氧基)琥珀醯亞胺

偵查與定特徵之一般方法

LCMS 方法 1

【0243】 將樣本稀釋至約 0.2 mg/ml 並注射至 LCMS 系統，例如 3-5 μ L。
LCMS 儀器係由 UPLC 系統與質譜儀所組成。除去類似物之鹽分且可能於逆相管柱(例如 C4、C8、C18 管柱或前置管柱)分離之並使用在 0.02-0.05% TFA (三氟乙酸) 中的乙腈之線性梯度來分析。應校準儀器且若可能應使用鎖定質量噴霧。產生跨越主要色層分析波峰的 MS 光譜並使用反摺積演算法重建完整的質量。

【0244】 LCMS 儀器設定之實例 (Synapt)：

正離子模式

3000 V 毛細電壓，

30V 錐電壓

110 °C 來源溫度，

250 °C 去溶劑溫度

25L/h 之錐氣流 (N₂)。

m/z 範圍 200-3000

給出反摺積質量

LCMS 方法 2

【0245】 系統：安捷倫 (Agilent) 1290 無限 (infinity) 系列 UPLC
管柱：Aeris WIDEPOR 3.6 μ XB-C18 2,1 x 50mm 偵測器：安捷倫科技
(Agilent Technologies) LC/MSD TOF 6230 (G6230A) 偵測器設置 離子

化方法：安捷倫噴流來源 掃描範圍：m/z min. 100，m/z max. 3200 線性反射器模式正模式

【0246】 條件：線性梯度：5 %至 95 % B 梯度運行時間：10 分鐘
0-8 min 5-95% B，8-9 min 95% B，9-9.5 min 95-5% B 9.5-10 min 5% B 流率：
0.40 ml/min 固定 管柱溫度：40°C

【0247】 溶析液 溶劑 A：99.90 % H₂O，0.02% TFA 溶劑 B：99.90
% CH₃CN，0.02% TFA 溶劑 C：NA

【0248】 結果詳述與確認：所找到的質量對 m<4000 的化合物係化合物之 m/z ((m+z)/z)或係如反摺積之結果的質量（平均），使用質量獵人（Masshunter）工作站軟體版本 B.05.00 Build 5.0.519.13 SP1（安捷倫）。計算值質量係所欲化合物之平均分子量計算值 m/z 係所欲化合物之分子量 (m+z)/z。

LCMS 方法 3

【0249】 系統：安捷倫 1290 無限系列 UPLC 管柱：Phenomenex Aeris widepore 3,6μ C4 50x2,1 mm 偵測器：安捷倫科技 LC/MSD TOF 6230(G6230A)

【0250】 偵測器設置 離子化方法：安捷倫噴流來源 掃描範圍：
m/z min. 100，m/z max. 3200 線性反射器模式正模式

【0251】 條件：台階梯度：5 %至 90 % B 梯度運行時間：10 分鐘：
0-1 min 5-20% B，1-7 min 20-90 % B，7-8 min 90% B 8-8.5 min 90-5 %B 8.5-10
min 5% B 流率：0.40 ml/min 固定 管柱溫度：40°C

【0252】 溶析液 溶劑 A：99.90 % H₂O，0.02% TFA 溶劑 B：99.90

% CH₃CN, 0.02% TFA 溶劑 C : NA

【0253】 結果詳述與確認：所找到的質量對於 $m < 4000$ 的化合物係化合物之 m/z ($(m+z)/z$) 或如反摺積之結果的質量 (平均)，使用質量獵人工作站軟體版本 B.05.00 Build 5.0.519.13 SP1 (安捷倫)。計算值質量係所欲化合物之平均分子量計算值 m/z 係所欲化合物之分子量 $(m+z)/z$ 。

LCMS 方法 4

【0254】 系統：沃特斯 (Waters) 自動純化系統

【0255】 管柱：Kinetex C18 4.6 mm x 50 mm

【0256】 偵測器：UV : PDA, ELSD, MS Micromss Quatro micro

【0257】 偵測器設置：離子化方法：ES⁺，掃描範圍 100-1000，Cone 30 V，毛細 300 kV，掃描時間 1.3 s；PDA：210-400 nm；ELSD：噴霧器加熱器-冷卻器 70 %，漂移管 57.0 °C

【0258】 條件：線性梯度乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA，梯度運行時間：4.0 min，總運行時間：6.0 min，流率：1.1 ml/min，管柱溫度：23 °C

本發明之化合物之製備

實施例 1：人類成熟的 FGF21 之選殖與表現

【0259】 人類 FGF21 之 DNA 與胺基酸序列已被 (例如) Nishimura *et al.* 於 *Biochim. Biophys. Acta* 1492(1):203-206 (2000) 中揭示。其等之序列亦可自公開的資料庫分別以登錄號 EMBL:AB021975 與 UNIPROT:Q9NSA1 獲得。

【0260】 選殖成熟的人類 FGF21 蛋白質並將其於大腸桿菌中以胞內

蛋白質且無訊息胜肽但於 N 端添加甲硫胺酸之形式表現。更特別地，對編碼成熟的人類 FGF21（於 N 端添加 Met）的基因序列之密碼子作最優化以於大腸桿菌中表現並將其選殖在載體 pET11c 之 NdeI 與 BamHI 位置間。此使 FGF21 基因在噬菌體 T7 啟動子之控制下。將表現構築體轉型至大腸桿菌 BL21（DE3）中。挑出單一菌落並在 LB + Amp 100 ug/mL 中生長之至 0.5 的 OD₄₅₀。於 37° C 使用 0.3 mM IPTG 誘發表現 4 個小時。藉由音振處理製作細胞之粗萃取物以分析 FGF21 表現。經考馬斯染色的 SDS-PAGE 顯示 FGF21 成功地被表現，其主要於沉澱小丸部分中辨識到。雖然由此表現的 MetFGF21 之計算值 MW 係 19.5 kD，其在凝膠上呈 25 kD 蛋白質而移動，而此可能係因為該蛋白質脯胺酸含量高，延遲其移動。

【0261】 於本案中，使用 MetFGF21 作為參考化合物。當 FGF21 係藉由使用大腸桿菌表現系統生產時，FGF21 之 N 端被導入一個甲硫胺酸。然而，此不會被認為會影響生物活性，且因此 FGF21 與 MetFGF21 兩者皆通常被用作為參考化合物。

實施例 2：FGF21 類似物之選殖與表現

【0262】 表 1（實施例 3）中的類似物之表現構築體係藉由對於實施例 1 中描述的 FGF21 成熟的表現構築體作突變誘發而製造。使用 Stratagene 多位置突變誘發套組。亦應用與於實施例 1 中描述者相同的表現條件。經考馬斯藍染色的 SDS-PAGE 顯示類似物成功地被表現。該類似物係以於 FGF21 序列之 N 端包含二胜肽 Met-Ala 之方式表現，而此允許具有 Ala 作為 N 端胺基酸殘基的 FGF21 類似物之表現，而此係因為大腸桿菌酵素切裂該

Met。

實施例 3：成熟的 FGF21 與 FGF21 類似物之純化

【0263】 為了純化於實施例 1-2 中描述的成熟的 FGF21 與 FGF21 類似物，使用以下的程序或類似的技術。

【0264】 將大腸桿菌細胞沉澱小丸再懸浮於 10 mM 鉀磷酸鹽 pH 6.0，並在 800 巴下藉由均質機瓦解兩次。將包涵體藉由離心（10,000 x g，30 分鐘）沉澱成小丸，再溶解於 50 mM Tris pH 8.0 中，並視需要地添加 2M 尿素及／或 5mM 半胱胺，並於 4°C 將漿液攪拌過夜。在加至管柱前，將漿液於 10,000 x g 再次離心 30 分鐘。將上清液用於離子交換色層分析法(Q Sepharose 快速流動樹脂 (Q Sepharose Fast Flow resin)，GE 醫療 (GE Healthcare)) 並使用 50-250 mM NaCl 溶析。將 0.4M 硫酸銨加至溶析池，接著將其加至於 20 mM Tris pH 8.0，0.4M 硫酸銨中平衡的苯基 FF 管柱 (GE 醫療)。將管柱以 20mM Tris pH 8.0，1.5 M 氯化鈉洗滌，接著以 10% Tris-氯化物緩衝劑 (20mM Tris pH 8.0，1.5M 氯化鈉) 溶析。可使用 30Q 管柱以進一步純化。終產物係藉由 SDS-PAGE 或其他相關的技術來分析。對於化合物 3 及 5-10，導入半胱胺酸的半胱胺保護在醫藥測試期間被保留。

【0265】 FGF21 類似物係如以上描述的製備。提供該等化合物藉由 LCMS (使用 LCMS 方法 1) 測定完整的質量。

表 1A. FGF21 類似物 1 至 10。

化合物	化合物名稱	蛋白質 骨架之 SEQ ID NO	分子量	LCMS 質 量 完整 (平 均) (Da)
1	MetFGF21	2	19540.0	19540.5
2	Ala[Gln121,Leu168]FGF21	3	19475.9	19476.4
3	S{ 貝他-176}-2-胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys176]FGF21	4	19567.1	19567.0
4	Ala[Gln121,Leu168,Cys177]FGF21	5	19481.9	19481.6
5	S{ 貝他-178}-2-胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	6	19567.1	19568.0
6	S{ 貝他-179}-2-胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	7	19491.0	19492.0
7	S{ 貝他-180}-2-胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	8	19583.1	19583.96
8	S{ 貝他-180}-2-胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	9	19496.0	19496.1
9	S{ 貝他-181}-2-胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	10	19567.1	19567.8
10	S{ 貝他-181}-2-胺基乙基氫硫基 -Met[Cys181]FGF21	11	19631.0	19630.6

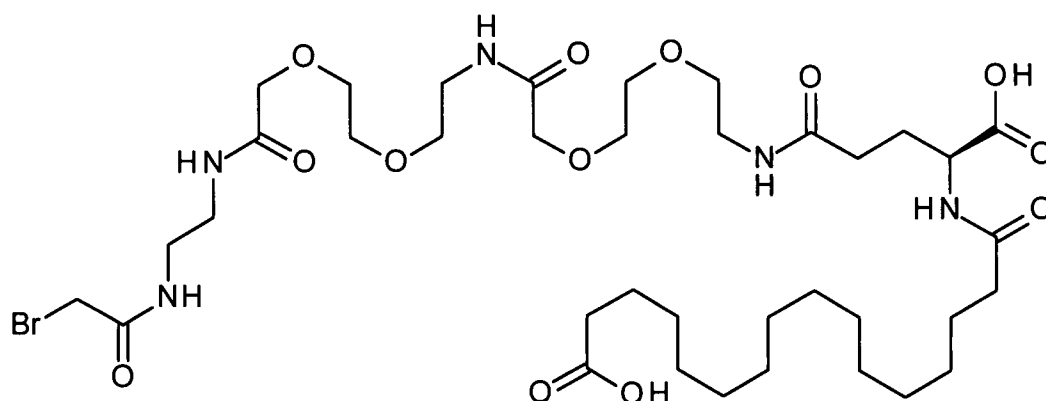
表 1B. FGF21 類似物 25 至 32

化合物	化合物名稱	蛋白質 骨架之 SEQ ID NO	分子量	LCMS 質 量 完整 (平 均) (Da)
25	-1A, 121Q, 167C, 168L	12	19491,9	19491,7
26	-1A, 121Q, 168C	13	19465,9	19466,2
27	-1A, 121Q, 168L, 169C	14	19479,9	19479,7
28	-1A, 121Q, 168L, 170C	15	19522,0	19521,9
29	-1A, 121Q, 168L, 172C	17	19491,9	19492,0
30	-1A, 121Q, 168L, 173C	18	19450,9	19450,5
31	-1A, 121Q, 168L, 174C	19	19522,0	19522,1
32	-1A, 121Q, 168L, 175C	20	19422,8	19422,4

實施例 4：用於 FGF21 類似物之衍生化的試劑之製備

【0266】 用於衍生化的代表性試劑之製備係於實施例 4.1 中給出。實施例 4.2-4.4 之試劑係藉由於實施例 4.1 中提供的方法製備。實施例 4.5-4.17 之試劑係藉由如以下描述的類似的方法製備。

實施例 4.1：15-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基]-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基]-乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基}十五烷酸之製備



固相合成方法：

【0267】 將 N-(苯甲基氧基羰基氧基)琥珀醯亞胺 (ZOSu, 100 g, 401 mmol) 在二氯甲烷 (500 mL) 中的溶液在 2 個小時的期間逐滴加至乙二胺 (1,189 mL, 2.81 mol) 於二氯甲烷 (750 mL) 中的溶液。在 30 分鐘後，過濾懸浮液並以二氯甲烷洗滌固體。將濾液蒸發至乾並以甲苯 (1.00 L) 與水 (0.50 L) 稀釋殘留物。過濾所得的混合物並分離濾液以提供兩個相。水相含有產物；因此將其以二氯甲烷 (2 x 250 mL) 萃取。將所有的有機相結合，以無水硫酸鈉乾燥，過濾並在真空內濃縮。將殘餘物以甲苯 (750 mL) 稀釋並以 2 M 氫氯酸水溶液 (500 mL) 與 1 M 氫氯酸水溶液 (100 mL) 萃取。將酸性的水相結合並以氫氧化鈉 (60.0 g, 1.50 mol) 於水 (90 mL) 中的溶液鹼化。將所得的混合物以二氯甲烷 (4 x 200 mL) 萃取，以無水硫酸鈉乾燥，過濾，在真空內濃縮並以己烷 (200 mL) 稀釋。將在乙醚中的氯化氫之 4 M 溶液 (100 mL, 400 mmol) 加至該溶液，將所得的懸浮液在真空內濃縮並以己烷 (1.00 L) 稀釋。過濾沉澱出的固體，以己烷洗滌之並在真空

內乾燥之以得到呈白色粉末的(2-胺基-乙基)-胺甲酸苯甲基酯氫氯化物。

【0268】 產率：62.62 g (68%)。

【0269】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 4:1): 0.25 (自由鹼)。

【0270】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, AcOD-d₄, 80 °C, dH): 7.42-7.26 (m, 5 H); 5.16 (s, 2 H); 3.60 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 3.32 (t, J=5.7 Hz, 2 H)。

【0271】 將 2-氯三苯甲基樹脂 100-200 篩目 1.7 mmol/g (3, 40.1 g, 68.1 mmol) 放在乾燥二氯甲烷 (250 mL) 中 20 分鐘以使之膨脹。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-Ado-OH, 17.5 g, 45.4 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (30.1 mL, 173 mmol) 在乾二氯甲烷 (50 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 5 個小時。將樹脂過濾並以 N,N-二異丙基乙基胺 (15.8 mL, 90.8 mmol) 在甲醇/二氯甲烷混合物 (4:1, 250 mL, 2 x 5 min) 中的溶液處理。接著將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 250 mL)、二氯甲烷 (2 x 250 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 250 mL) 洗滌。藉由以於二甲基甲醯胺中的 20% 吡啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 mL) 來移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 250 mL)、2-丙醇 (2 x 250 mL) 與二氯甲烷 (300 mL, 2 x 250 mL) 洗滌樹脂。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-Ado-OH, 26.3 g, 68.1 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗四氟硼酸酯 (TCTU, 24.2 g, 68.1 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (21.4 mL, 123 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (140 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。將樹脂過濾並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 250 mL)、二氯甲烷 (2 x 250 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (250 mL) 洗滌。藉由以於二甲基甲醯胺中的 20% 吡啶處理 (1 x 5

min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 mL) 來移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 250 mL)、2-丙醇 (2 x 250 mL) 與二氯甲烷 (300 mL, 2 x 250 mL) 洗滌樹脂。將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-Glu-OtBu, 29.0 g, 68.1 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 24.2 g, 68.1 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (21.4 mL, 123 mmol) 於 N,N-二甲基甲醯胺 (140 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。將樹脂過濾並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 250 mL)、二氯甲烷 (2 x 250 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (250 mL) 洗滌。藉由以於二甲基甲醯胺中的 20% 吡啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 mL) 來移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 250 mL)、2-丙醇 (2 x 250 mL) 與二氯甲烷 (300 mL, 2 x 250 mL) 洗滌樹脂。將 16-(第三丁氧基)-16-側氧基十六烷酸 (23.3 g, 68.1 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 24.2 g, 68.1 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (21.4 mL, 123 mmol) 於 N,N-二甲基甲醯胺/二氯甲烷混合物 (4:1, 200 mL) 中的溶液加至樹脂。將樹脂搖晃 1 個小時, 過濾並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 250 mL)、二氯甲烷 (2 x 250 mL)、甲醇 (2 x 250 mL) 與二氯甲烷 (350, 6 x 250 mL) 洗滌。藉由以 2,2,2-三氟乙醇 (250 mL) 處理 18 個小時來將產物自樹脂分離。濾出樹脂並以二氯甲烷 (2 x 250 mL)、2-丙醇/二氯甲烷混合物 (1:1, 2 x 250 mL)、2-丙醇 (250 mL) 與二氯甲烷 (3 x 250 mL) 洗滌。將溶液結合; 將溶劑蒸發並將粗產物藉由快速管柱色層分析法 (Silicagel 60, 0.040-0.060 mm; 溶析液: 二氯甲烷/甲醇 1:0-9:1) 純化。純的(S)-22-(第三丁氧基羰基)-41,41-二甲基-10,19,24,39-四側氧基-3,6,12,15,40-五氧基-9,18,23-

三疊氨基四十烷酸係在真空內乾燥並以淺黃色濃稠黃色油之形式獲得。

【0272】 產率：30.88 g (83%)。

【0273】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 4:1) : 0.30。

【0274】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, dH) : 7.36 (t, J=5.7 Hz, 1 H); 7.02 (t, J=5.4 Hz, 1 H); 6.55 (d, J=7.7 Hz, 1 H); 4.46 (m, 1 H); 4.18 (s, 2 H); 4.02 (s, 2 H); 3.83-3.36 (m, 16 H); 2.44-2.12 (m, 7 H); 2.02-1.86 (m, 1 H); 1.60 (m, 4 H); 1.47 (s, 9 H); 1.45 (s, 9 H); 1.36-1.21 (m, 20 H)。

【0275】 LC-MS 方法 4 :

【0276】 純度：100%

【0277】 Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 3.60 min。

【0278】 測定值 m/z, z=1 : 818.7 (M+H)⁺

【0279】 將 2-(7-氮-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘六氟磷酸鹽 (HATU, 11.4 g, 30.1 mmol) 與三乙基胺 (8.77 mL, 62.9 mmol) 依序加至 (S)-22-(第三丁氧基羰基)-41,41-二甲基-10,19,24,39-四側氧基-3,6,12,15,40-五氧基-9,18,23-三疊氨基四十烷酸 (22.4 g, 27.4 mmol) 於乾二氯甲烷 (110 mL) 中的溶液。將三乙基胺 (5.72 mL, 41.0 mmol) 加至(2-胺基-乙基)-胺甲酸苯甲基酯氫氯化物 (6.94 g, 30.1 mmol) 在乾二氯甲烷 (165 mL) 中的懸浮液並將所得的混合物加至以上的溶液。將混合物於室溫攪拌過夜，並接著將其蒸發至乾。將殘餘物再溶解於乙酸乙酯 (500 mL) 中；以 1 M 氫氯酸水溶液 (2 x 200 mL)、5%碳酸鈉水溶液 (2 x 200 mL, 相分離程度非常低)、1

M 氫氨酸水溶液 (8 x 200 mL) 與滷水洗滌；以無水硫酸鈉乾燥並在真空內蒸發至乾。將殘餘物藉由快速管柱色層分析法 (Silicagel 60, 0.040-0.060 mm；溶析液：二氯甲烷 / 甲醇 95:5) 純化以提供呈淺黃色濃稠油的 15-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(2-苯甲基氧基羰基胺基)-乙基胺甲醯基]-甲氧基]-乙氧基}-乙基胺甲醯基)-甲氧基]-乙氧基}-乙基胺甲醯基)-1-第三丁氧基羰基-丙基胺甲醯基]-十五烷酸第三丁基酯。

【0280】 產率：23.84 g (88%)

【0281】 RF (SiO₂, 二氯甲烷 / 甲醇 9:1) : 0.35

【0282】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, dH) : 7.39-7.26 (m, 6 H); 7.19 (t, J=6.3 Hz, 1 H); 6.91 (t, J=5.7 Hz, 1 H); 6.52 (d, J=7.5 Hz, 1 H); 5.83 (t, J=5.5 Hz, 1 H); 5.09 (s, 2 H); 4.41 (ddd, J=12.3, 4.6 與 4.3 Hz, 1 H); 3.99 (s, 2 H); 3.97 (s, 2 H); 3.71-3.30 (m, 20 H); 2.33-2.08 (m, 7 H); 1.97-1.83 (m, 1 H); 1.67-1.51 (m, 4 H); 1.45 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.35-1.20 (m, 20 H)。

【0283】 LCMS 方法 4

【0284】 純度：100%

【0285】 Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈 / 水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 4.18 min

【0286】 測定值 m/z, z=1 : 994.9 (M+H)⁺

【0287】 將在碳上的鈀 (10%, 1.27 g, 1.20 mmol) 加至以上化合物 (23.8 g, 24.0 mmol) 在甲醇 (350 mL) 中的溶液並將所得的混合物在正常壓力下氫化 4 個小時。濾出催化劑並將濾液蒸發至乾。將殘餘物自二氯甲

烷蒸發數次以移除殘餘的甲醇並在真空內乾燥以得到呈濃稠無色油的第三丁基(S)-1-胺基-25-(第三丁氧基羰基)-4,13,22,27-四側氧基-6,9,15,18-四氧基-3,12,21,26-四疊氨基四十烷-42-酸。

【0288】 產率：20.50 g (99%)。

【0289】 RF (SiO₂，二氯甲烷/甲醇 9:1)：0.05。

【0290】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, dH)：7.54 (t, J=5.7 Hz, 1 H); 7.41 (t, J=5.6 Hz, 1 H); 7.14 (t, J=5.5 Hz, 1 H); 6.68 (d, J=7.5 Hz, 1 H); 5.25 (bs, 2 H); 4.39 (td, J=8.3 與 4.2 Hz, 1 H); 4.01 (s, 4 H); 3.74-3.39 (m, 18 H); 2.96 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 2.34-2.06 (m, 7 H); 1.97-1.83 (m, 1 H); 1.68-1.50 (m, 4 H); 1.45 (s, 9 H); 1.43 (s, 9 H); 1.37-1.19 (m, 20 H)。

【0291】 LCMS 方法 4

【0292】 純度：100%

【0293】 Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA)：1.43 min

【0294】 測定值 m/z, z=1：860.8 (M+H)⁺

【0295】 於-30 °C 在氬下將 N,N-二異丙基乙基胺(4.98 mL, 28.6 mmol) 加至以上的胺 (6, 20.5 g, 23.8 mmol) 於乾二氯甲烷 (290 mL) 的溶液。逐滴加入溴乙醯溴 (2.48 mL, 28.6 mmol) 並在-30 °C 將所得的溶液攪拌 3 個小時。移除冷卻浴，於室溫將混合物攪拌 1 個小時，並接著在真空內移除溶劑。將殘餘物再溶解於乙酸乙酯 (450 mL) 中並以 5%檸檬酸水溶液 (300 mL) 洗滌。各相在 1 個小時內分離。以水 (300 mL) 洗滌有機層並靜置所

得的乳化液過夜以分離得到 3 個相。移除清澈的水層並將飽和的溴化鉀水溶液 (100 mL) 加入剩下的 2 個相與搖晃之。靜置各相過夜以分離，接著移除水層並以無水硫酸鈉乾燥有機層。在真空內移除溶劑並將藉由快速管柱色層分析法 (Silicagel 60, 0.040-0.060 mm; 溶析液: 二氯甲烷/甲醇 95:5) 純化殘餘物以提供呈無色固體的第三丁基(S)-1-溴-28-(第三丁氧基羰基)-2,7,16,25,30-五側氧基-9,12,18,21-四氧基-3,6,15,24,29-五氮四十五烷-45-酸。

【0296】 產率: 19.46 g (83%)。

【0297】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 9:1): 0.25

【0298】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.46 (m, 1 H); 7.33 (t, J=5.9 Hz, 1 H); 7.21 (t, J=5.1 Hz, 1 H); 6.92 (t, J=5.2 Hz, 1 H); 6.50 (d, J=7.5 Hz, 1 H); 4.41 (ddd, J=12.2, 4.5 與 4.2 Hz, 1 H); 4.01 (s, 4 H), 3.85 (s, 2 H); 3.75-3.40 (m, 20 H), 2.36-2.08 (m, 7 H); 1.99-1.84 (m, 1 H); 1.68-1.51 (m, 4 H), 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.38-1.19 (m, 20 H)

【0299】 LCMS 方法 4

【0300】 純度: 100%

【0301】 Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA): 3.51 min。

【0302】 測定值: m/z, z=1: 980.9, 982.9 (M+H)⁺

【0303】 將以上化合物(19.5 g, 19.8 mmol)溶解於三氟乙酸(120 mL)中並於室溫將所得的溶液攪拌 1.5 個小時。在真空內移除三氟乙酸並將殘餘

物自二氯甲烷 (6 x 200 mL) 蒸發。將二乙醚 (200 mL) 加至油狀殘餘物並將混合物攪拌過夜以得到懸浮液。過濾固體產物，以二乙醚與己烷洗滌之並在真空內乾燥之以提供呈白色粉末的標題產物 15-((S)-1-羧基-3-[2-(2-([2-(2-([2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基)-乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基)十五烷酸。

【0304】 產率：16.74 g (97%)。

【0305】 $^1\text{H NMR}$ 光譜 (300 MHz, AcOD-d_4 , dH) : 4.61 (dd, $J=8.8$ 與 4.8 Hz, 1 H); 4.12 (s, 2 H), 4.10 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.77 -3.39 (m, 20 H), 2.49-2.18 (m, 7 H); 2.16-1.04 (m, 1 H); 1.71-1.56 (m, 4 H), 1.30 (bs, 20 H)

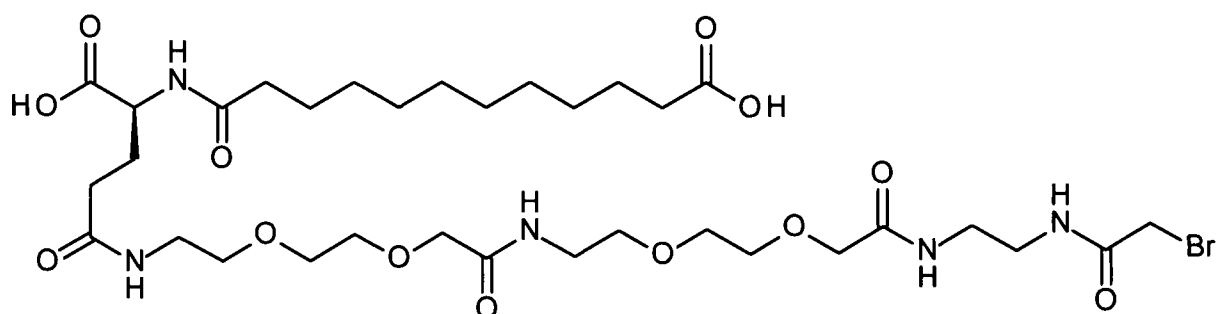
【0306】 LCMS 方法 4 :

【0307】 純度：100%

【0308】 R_t (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 3.51 min

【0309】 理論值 m/z , $z=1$: 869,8, 測定值 : m/z , $z=1$: 868.7, 870.7

實施例 4.2 : 11-((S)-1-羧基-3-[2-(2-([2-(2-([2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基)-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基)乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基)十一烷酸之製備



【0310】 11-{(S)-1-羧基-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基}-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基}十一烷酸係藉由與實施例 4.1 中描述者相同的方法製備，而所得者為濃稠的橙色油。

【0311】 $^1\text{H NMR}$ 光譜 (300 MHz, AcOD- d_4 , $d\text{H}$): 4.61 (dd, $J=8.9$ 與 4.9 Hz, 1 H); 4.13 (s, 2 H); 4.10 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.79-3.38 (m, 20 H); 2.50-2.16 (m, 7 H); 2.16-2.00 (m, 1 H); 1.72-1.56 (m, 4 H); 1.42-1.24 (m, 12 H)

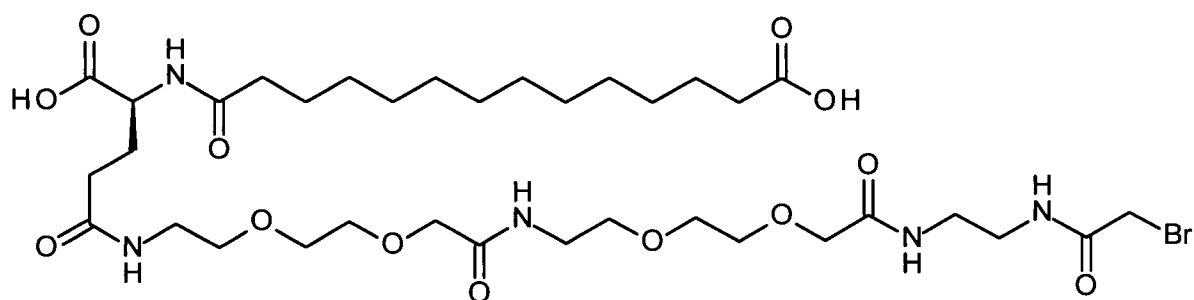
【0312】 LCMS 方法 4 :

【0313】 純度 : 100% (ELSD)

【0314】 R_t (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA) : 2.74 min

【0315】 理論值, m/z , $z=1$: 813.8, 實際值 m/z , $z=1$: 812.0, 814.0

實施例 4.3 : 13-{(S)-1-羧基-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基}-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基}十三烷酸之製備



【0316】 13-{(S)-1-羧基-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基}-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基}十三烷酸係藉由與實施例 4.1 中描述者相同的方法製備，而所得者為濃稠的黃色油。

【0317】 $^1\text{H NMR}$ 光譜 (300 MHz, AcOD- d_4 , dH): 4.61 (dd, $J=8.9$ 與 4.9 Hz, 1 H); 4.13 (s, 2 H); 4.11 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.77-3.40 (m, 20 H); 2.49-2.18 (m, 7 H); 2.16-2.07 (m, 1 H); 1.70-1.56 (m, 4 H); 1.31 (bs, 16 H)。

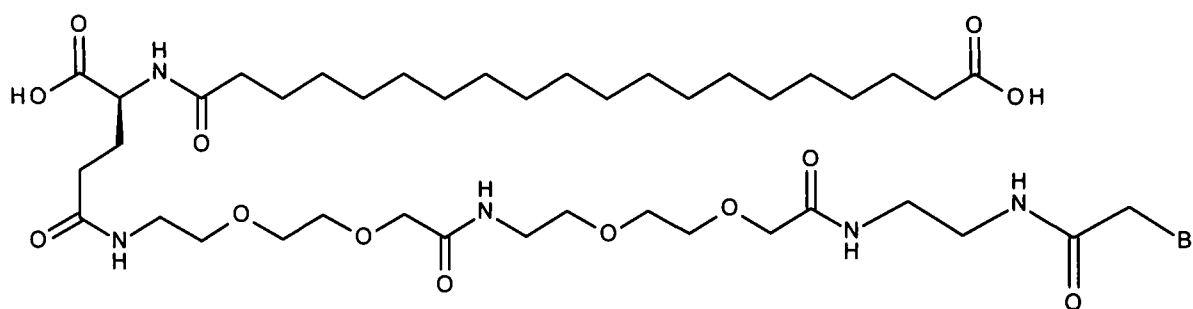
【0318】 LCMS 方法 4:

【0319】 純度: 100% (ELSD)

【0320】 Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA): 2.94 min

【0321】 理論值 m/z , $z=1$: 841.9, 實際值: m/z , $z=1$: 841.7, 843.7

實施例 4.4: 19-{(S)-1-羧基-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-溴乙醯基-胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)-乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基}十九烷酸之製備



【0322】 19-{(S)-1-羧基-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲

醯基]甲氧基)-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基)乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基]十九烷酸係藉由與實施例 4.1 中描述者相同的方法製備，而所得者為淺褐色粉末。

【0323】 ^1H NMR 光譜 (300 MHz, AcOD- d_4 , dH): 4.65-4.57 (m, 1 H); 4.13 (s, 2 H); 4.10 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.77-3.43 (m, 20 H); 2.49-2.40 (t, $J=7.3$ Hz, 2 H); 2.39-2.23 (m, 5 H); 2.17-2.07 (m, 1 H); 1.68-1.57 (m, 4 H); 1.30 (bs, 28 H)

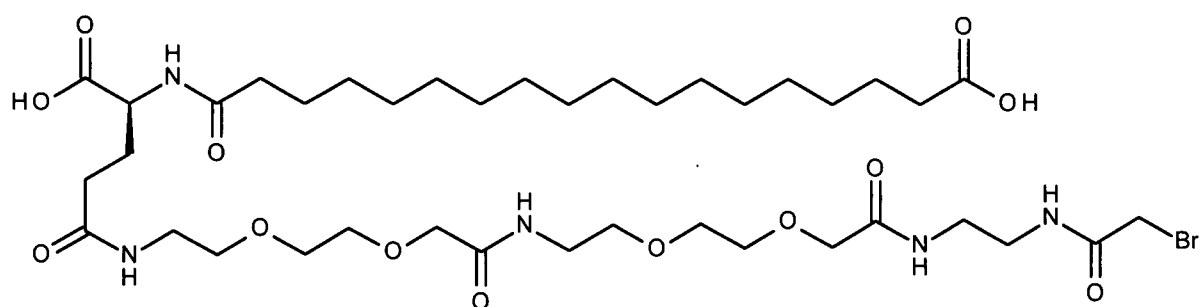
【0324】 LCMS 方法 4 :

【0325】 純度 : 100% (ELSD)

【0326】 Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 2.17 min

【0327】 理論值質量 : 926.0, 測定值 m/z : 926 (M+H) $^+$

實施例 4.5 : 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸之製備



溶液相合成方法 :

步驟 1 : 苯甲基 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-胺基乙基胺基)-2-側氧基-乙氧

基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-苯甲基氧基羰基-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸酯

【0328】 在 75 min 的期間將苯甲基 18-[[[(1S)-1-苯甲基氧基羰基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸酯 (26 g) 之溶液 (如於 WO10029159 中描述的製備, 於 DCM (320 ml) 中) 逐滴加至乙二胺 (8.5 ml ml) 在 DCM (80 ml) 與三乙基胺 (5.2 ml) 之 0 °C 溶液。在攪拌 2 h 後, 將沉澱物濾出。將水 (200 ml) 與異丙醇 (50 ml) 加至濾液。萃取混合物。將有機層使用 MgSO₄ 乾燥。將 MgSO₄ 藉由過濾移除並在真空內乾燥濾液以得到標題化合物 20,07 g (81%) LCMS : 理論值質量 : 956.2 ; 測定值 m/z , z=1 : 957.0

步驟 2: 苯甲基 18-[[[(1S)-1-苯甲基氧基羰基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-氯乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸酯

【0329】 將氯乙酸 (0,19 g) 溶解於 DCM (15 ml) 中。加入 N-羥基琥珀醯亞胺 (0.22 g) 與 EDAC HCl (0.42 g)。在攪拌 2.5h 後, 加入在 DCM (5 ml) 中的苯甲基 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-胺基乙基胺基)-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-苯甲基氧基羰基-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸酯 (1.5 g)。於 RT 攪拌過夜後, 將混合物以 1M HCl (2x20 ml) 及水/鹵水 2:1 (30 ml) 萃取。將有機層乾燥 (MgSO₄), 過濾並在真空內濃縮以得到清澈的油, 1.37 g (84 %)

【0330】 LCMS：理論值質量：1032.7；測定值 m/z ， $z=1$ ：1033.1

步驟 3：18-[[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-氯乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸

【0331】 在充氮氣後，將 10% PD/C (1.0 g) 加至苯甲基 18-[[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-氯乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸酯 (10,5 g) 在丙酮 (140 ml) 中的溶液。在氫化 6h 後，在過濾前將混合物加熱至 40-50°C。將在冷濾液中的沉澱物分離並以丙酮洗滌以及乾燥以得到標題化合物，7.42 g (85%)。

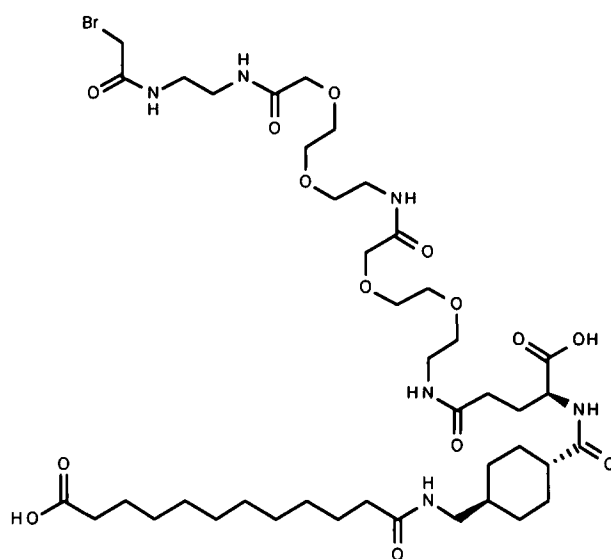
步驟 4：8-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸。

【0332】 將溴化鈉 (5 eq, 1.21 g) 加至 18-[[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-氯乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸在丙酮 (60 ml) 中的懸浮液。於 RT 在黑暗中攪拌混合物。在 2h 後，添加更多溴化鈉 (10 eq, 2.41 g)。在 2 天後，添加更多溴化鈉 (5 eq, 1.21 g)。在 5 天後，濃縮混合物。將 DCM (30 ml)、10% 抗壞血酸 (20 ml) 與水 30 ml 加至殘餘物之一半。將異丙醇 (50 ml) 與水 (30 ml) 加至所得

的乳化液。將有機相分離並以 10% 抗壞血酸 (20 ml) 與異丙醇 (10 ml) 之混合物洗滌兩次。將有機層乾燥 (MgSO₄)，過濾並濃縮以提供固體油，將其於丙酮中結晶化並藉由過濾分離以提供混有起始材料，0.80 g 的標題化合物 (72%)。

【0333】 LCMS：理論值質量：896.9。測定值 m/z ， $z=1$ ：898.9 (M+1)

實施例 4.6：12-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-12-側氧基-十二烷酸之製備



固相合成方法：

【0334】 將 2-氯三苯甲基樹脂 100-200 篩目 1.8 mmol/g (1, 11.9 g, 21.4 mmol) 放置在乾二氯甲烷 (80 mL) 中 20 分鐘以使之膨脹。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 5.50 g, 14.3 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (9.44 mL, 54.2 mmol) 在乾二氯甲烷 (70 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 4 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二異丙基

乙基胺 (4.97 mL, 28.5 mmol) 在甲醇/二氯甲烷混合物 (4:1, 2 x 5 min, 2 x 57 mL) 中的溶液處理之。接著將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL)、二氯甲烷 (2 x 80 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (100 mL, 2 x 80 mL) 洗滌樹脂。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 11.0 g, 28.5 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 10.1 g, 28.5 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (9.93 mL, 57.0 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (80 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 2 小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL)、二氯甲烷 (2 x 80 mL) 與 N,N,N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL) 洗滌之。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL) 移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (100 mL, 2 x 80 mL) 洗滌。將 (S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 9.11 g, 21.4 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 7.60 g, 21.4 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (6.71 mL, 38.5 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (80 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL)、二氯甲烷 (2 x 80 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL) 洗滌之。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL) 移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (100 mL, 2 x 80

mL)洗滌。將 4-[(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)甲基]環己烷羧酸(Fmoc-Trx-OH, 9.11 g, 21.4 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯(TCTU, 7.60 g, 21.4 mmol)與 N,N-二異丙基乙基胺(6.71 mL, 38.5 mmol)在 N,N-二甲基甲醯胺(80 mL)中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺(2 x 80 mL)、二氯甲烷(2 x 80 mL)與 N,N-二甲基甲醯胺(2 x 80 mL)洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理(1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL)移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺(3 x 80 mL)、2-丙醇(2 x 80 mL)與二氯甲烷(100 mL, 2 x 80 mL)洗滌。將十二烷二酸單第三丁基酯(C12(OtBu)-OH, 6.13 g, 21.4 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯(TCTU, 7.61 g, 21.4 mmol)與 N,N-二異丙基乙基胺(6.71 mL, 38.5 mmol)在二氯甲烷/N,N-二甲基甲醯胺混合物(4:1, 80 mL)中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺(6 x 80 mL)、二氯甲烷(4 x 80 mL)、甲醇(4 x 80 mL)與二氯甲烷(7 x 80 mL)洗滌。藉由以 2,2,2-三氟乙醇(80 mL)處理 18 個小時來將產物自樹脂分離。濾出樹脂並以二氯甲烷(4 x 80 mL)、二氯甲烷/2-丙醇混合物(1:1, 4 x 80 mL)、2-丙醇(2 x 80 mL)與二氯甲烷(6 x 80 mL)洗滌。結合溶液；蒸發溶劑並將粗產物藉由管柱色層分析法(Silicagel 60, 0.040-0-063 mm；溶析液：二氯甲烷/甲醇 1:0-9:1)純化。純產物(2)係在真空內乾燥且係以油的形式獲得。

【0335】 產率：5.40 g (42%)。

【0336】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 9:1)：0.30。

【0337】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz; CDCl₃, dH)：7.45-7.31 (m, 1 H);

7.10-6.97 (m, 1 H); 6.71-6.60 (m, 1 H); 5.70-5.58 (m, 1 H); 4.43-4.31 (m, 1 H); 4.15 (s, 2 H); 4.01 (s, 2 H); 3.79-3.31 (m, 16 H); 3.13-3.08 (m, 2 H); 2.28-1.79 (m, 11 H); 1.71-1.51 (m, 4 H); 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.25 (bs, 12 H); 1.05-0.88 (m, 2 H)。

【0338】 LC-MS 純度：100%。

【0339】 LC-MS Rt (Sunfire 4.6 mm x 100 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 2.16 min。

【0340】 LC-MS m/z : 903.0 (M+H)+。

【0341】 依序將 2-(7-氮-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎘六氟磷酸鹽 (HATU, 2.46 g, 6.48 mmol) 與三乙基胺 (1.89 mL, 13.6 mmol) 加至以上油 (2, 5.31 g, 5.89 mmol) 在乾二氯甲烷 (23 mL) 中的溶液。將三乙基胺 (1.36 mL, 9.72 mmol) 加至(2-胺基-乙基)-胺甲酸苯甲基酯氫氯化物 (3, 1.49 g, 6.48 mmol) 在乾二氯甲烷 (35 mL) 中的懸浮液並將所得的混合物加至以上溶液。於室溫將混合物攪拌過夜，並接著將其在乾燥中蒸發。將殘餘物再溶解於乙酸乙酯 (70 mL) 中；以 1 M 氫氯酸水溶液 (1 x 70 mL)、5%碳酸鈉水溶液 (2 x 70 mL)、1 M 氫氯酸水溶液 (4 x 70 mL) 與滷水 (70 mL) 洗滌；以無水硫酸鈉乾燥與蒸發。將殘餘物藉由快速管柱色層分析法 (Silicagel 60, 0.040-0-063 mm; 溶析液：二氯甲烷/甲醇 95:5 至 92:8) 純化以提供濃稠的黃色油。

【0342】 產率：2.81 g (44%)。

【0343】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 9:1) : 0.25。

【0344】 ^1H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl_3 , dH) : 7.41-7.29 (m, 6 H); 7.22-7.13 (m, 1 H); 6.93-6.81 (m, 1 H); 6.62-6.58 (m, 1 H); 5.90-5.81 (m, 1 H); 5.68-5.55 (m, 1 H); 5.09 (s, 2 H); 4.42-4.33 (m, 1 H); 4.01-3.95 (m, 4 H); 3.75-3.30 (m, 20 H); 3.14-3.06 (m, 2 H); 2.31-2.01 (m, 11 H); 1.97-1.76 (m, 1 H); 1.65-1.52 (m, 4 H); 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.27 (bs, 12 H); 1.04-0.87 (m, 2 H)。

【0345】 將在碳上的鈀 (10%, 0.15 g, 0.13 mmol) 加至以上化合物 (2.81 g, 2.60 mmol) 在甲醇 (43 mL) 中的溶液並在正常壓力下將所得的混合物氫化 2.5 個小時。濾出催化劑並將濾液蒸發至乾。將殘餘物以甲苯共蒸發四次並在真空內乾燥以獲得化合物 5。

【0346】 產率 : 2.01 g (81%)。

【0347】 ^1H NMR 光譜 (300 MHz; CDCl_3 , dH) : 7.51-7.36 (m, 2 H); 7.04-6.96 (m, 1 H); 6.76-6.66 (m, 1 H); 5.93-5.85 (m, 1 H); 4.41-4.29 (m, 1 H); 4.03-3.99 (m, 4 H); 3.73-3.25 (m, 18 H); 3.13-2.97 (m, 4 H); 2.34-1.78 (m, 11 H); 1.67-1.51 (m, 4 H); 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.30 (m, 12 H); 1.04-0.88 (m, 2 H)。

【0348】 LC-MS 純度 : 100% (ELSD)。

【0349】 LC-MS Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 70:30 至 100:0 + 0.1% TFA) : 0.67 min。

【0350】 LC-MS m/z : 945.0 (M+H)+。

【0351】 於 -30°C 在氬下將 N,N-二異丙基乙基胺 (0.40 mL, 2.28 mmol) 加至以上胺 (5, 1.79 g, 1.90 mmol) 在乾二氯甲烷 (30 mL) 中的溶液。逐

滴添加溴乙醯溴 (0.20 mL, 2.28 mmol) 並將所得的溶液於 -30 °C 攪拌 3 個小時。移除冷卻浴，將混合物於室溫攪拌另外 1 個小時，並接著將其蒸發至乾。將殘餘物再溶解於乙酸乙酯 (50 mL) 中，以 5% 檸檬酸水溶液 (3 x 50 mL, 相分離非常緩慢)、1 M 氫氟酸水溶液 (4 x 50 mL) 與鹵水 (50 mL) 洗滌。將有機層以無水硫酸鈉乾燥，過濾及蒸發。將殘餘物藉由快速管柱色層分析法 (Silicagel 60, 0.040-0-063 mm; 溶析液：二氯甲烷/甲醇 95:5 至 93:7) 純化以提供黃色油。

【0352】 產率：1.63 g (80%)。

【0353】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 95:5) : 0.25。

【0354】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, dH) : 7.56-7.48 (m, 1 H); 7.43-7.34 (m, 1 H); 7.04-6.95 (m, 1 H); 6.62 (d, J=7.9 Hz, 1 H); 5.74-5.63 (m, 1 H); 4.43-4.33 (m, 1 H); 4.02 (s, 4 H); 3.85 (s, 2 H); 3.73-3.40 (m, 20 H); 3.14-3.09 (m, 2 H); 2.34-2.04 (m, 9 H); 1.97-1.76 (m, 4 H); 1.68-1.51 (m, 7 H); 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.27 (m, 12 H); 1.07-0.90 (m, 2 H).

【0355】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0356】 LC-MS Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 2.16 min。

【0357】 LC-MS m/z : 1066.0 (M+H)⁺。

【0358】 將以上化合物 (1.53 g, 1.44 mmol) 溶解於三氟乙酸 (25 mL) 中並放置 1.5 個小時。在真空內移除三氟乙酸並將殘餘物以甲苯共蒸發三次以及以二氯甲烷共蒸發十次以提供黃色油狀固體。

【0359】 產率：810 mg (59%)。

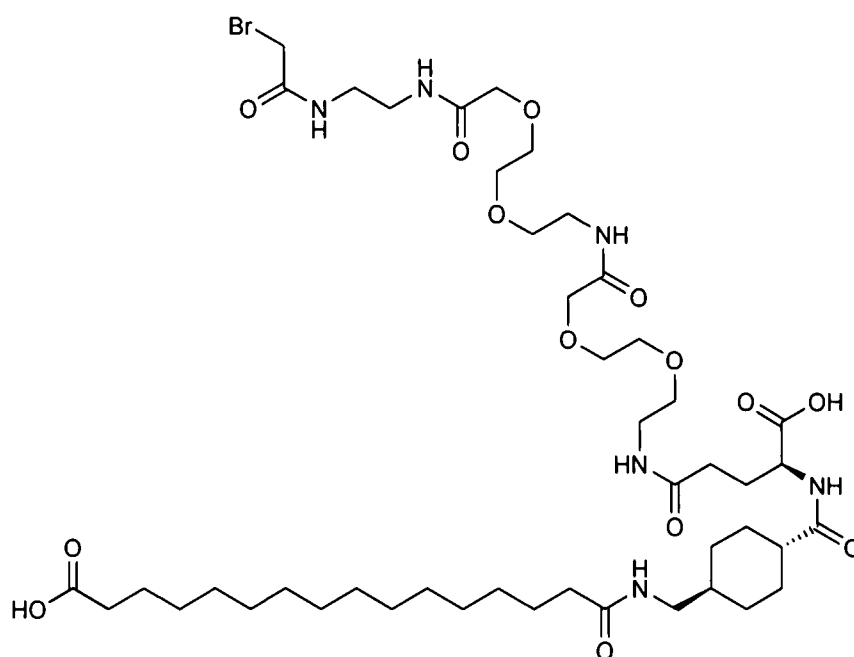
【0360】 $^1\text{H NMR}$ 光譜 (300 MHz, AcOD- d_4 , dH): 4.64-4.54 (m, 1 H); 4.13 (s, 2 H); 4.11 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.78-3.40 (m, 20 H); 3.13-3.10 (d, $J=6.6$ Hz, 2 H); 2.51-2.19 (m, 9 H); 1.94-1.77 (m, 4 H); 1.68-1.41 (m, 7 H); 1.31 (bs, 12 H); 1.10-0.92 (m, 2 H)。

【0361】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0362】 LC-MS Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA) : 2.82 min。

【0363】 LC-MS m/z : 952.0 (M+H) $^+$ 。

實施例 4.7 : 16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-16-側氧基-十六烷酸之製備



固相合成方法：

【0364】 將 2-氯三苯甲基樹脂 100-200 篩目 1.8 mmol/g (1, 11.9 g, 21.4 mmol) 放置於乾二氯甲烷 (80 mL) 中 20 分鐘以使之膨脹。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 5.50 g, 14.3 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (9.44 mL, 54.2 mmol) 在乾二氯甲烷 (70 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 4 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二異丙基乙基胺 (4.97 mL, 28.5 mmol) 在甲醇/二氯甲烷混合物 (4:1, 2 x 5 min, 2 x 57 mL) 中的溶液處理。接著將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL)、二氯甲烷 (2 x 80 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL) 移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (100 mL, 2 x 80 mL) 洗滌。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 11.0 g, 28.5 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 10.1 g, 28.5 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (9.93 mL, 57.0 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (80 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 2 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL)、二氯甲烷 (2 x 80 mL) 與 N,N,N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL) 移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (100 mL, 2 x 80 mL) 洗滌。將 (S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 9.11 g, 21.4 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU,

7.60 g, 21.4 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (6.71 mL, 38.5 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺中的溶液 (80 mL) 加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL)、二氯甲烷 (2 x 80 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL) 移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (100 mL, 2 x 80 mL) 洗滌。將 Fmoc-傳明酸(Fmoc-Trx-OH, 9.11 g, 21.4 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 7.60 g, 21.4 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺(6.71 mL, 38.5 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺(80 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL)、二氯甲烷 (2 x 80 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理(1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 80 mL) 移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (100 mL, 2 x 80 mL) 洗滌。將十六烷二酸單第三丁基酯 (C16(OtBu)-OH, 7.33 g, 21.4 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 7.61 g, 21.4 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (6.71 mL, 38.5 mmol) 在二氯甲烷/N,N-二甲基甲醯胺混合物 (4:1, 80 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (6 x 80 mL)、二氯甲烷 (4 x 80 mL)、甲醇 (4 x 80 mL) 與二氯甲烷 (7 x 80 mL) 洗滌。藉由以 2,2,2-三氟乙醇 (80 mL) 處理 18 個小時來將產物自樹脂分離。濾出樹脂並以二氯甲烷 (4 x 80 mL)、二氯甲烷/2-丙醇混合物 (1:1, 4 x 80 mL)、2-丙醇 (2 x 80 mL) 與二氯甲烷 (6

x 80 mL) 洗滌。結合溶液；蒸發溶劑並將粗產物藉由管柱色層分析法 (Silicagel 60, 0.040-0-063 mm; 溶析液：二氯甲烷/甲醇 1:0-9:1) 純化。中間物(2)係在真空內乾燥且係以油之形式獲得。

【0365】 產率：8.20 g (80%)。

【0366】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 9:1) : 0.20。

【0367】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, dH) : 7.44-7.33 (m, 1 H); 7.07-6.97 (m, 1 H); 6.72-6.63 (m, 1 H); 5.70-5.59 (m, 1 H); 4.44-4.33 (m, 1 H); 4.15 (s, 2 H); 4.01 (s, 2 H); 3.76-3.32 (m, 16 H); 3.14-3.07 (m, 2 H); 2.38-1.77 (m, 11 H); 1.71-1.50 (m, 4 H); 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.25 (bs, 20 H); 1.05-0.87 (m, 2 H)。

【0368】 LC-MS 純度：100%。

【0369】 LC-MS Rt (Sunfire 4.6 mm x 100 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 3.56 min。

【0370】 LC-MS m/z : 959.0 (M+H)⁺。

【0371】 依序將 2-(7-氮-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎊六氟磷酸鹽 (HATU, 3.55 g, 9.34 mmol) 與三乙基胺 (2.72 mL, 19.5 mmol) 加至中間物 2 (8.13 g, 8.49 mmol) 在乾二氯甲烷 (34 mL) 中的溶液。將三乙基胺 (1.78 mL, 12.7 mmol) 加至(2-胺基-乙基)-胺甲酸苯甲基酯氫氯化物 (2.15 g, 9.34 mmol) 在乾二氯甲烷 (51 mL) 中的懸浮液並將所得的混合物加至以上溶液。將混合物於室溫攪拌過夜，並接著在乾燥中蒸發之。將殘餘物再溶解於乙酸乙酯 (150 mL) 中；以 1 M 氫氨酸水溶液 (1 x 100 mL)、5%

碳酸鈉水溶液 (2 x 100 mL)、1 M 氫氨酸水溶液 (4 x 100 mL) 與滷水洗滌；以無水硫酸鈉乾燥並蒸發。將殘餘物藉由快速管柱色層分析法 (Silicagel 60, 0.040-0-063 mm；溶析液：二氯甲烷／甲醇 95:5 至 92:8) 純化以提供呈濃稠的黃色油的化合物 4。

【0372】 產率：5.59 g (58%)。

【0373】 RF (SiO₂, 二氯甲烷／甲醇 9:1)：0.20。

【0374】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz；CDCl₃, dH)：7.41-7.31 (m, 6 H)；7.21-7.12 (m, 1 H)；6.92-6.83 (m, 1 H)；6.58-6.52 (m, 1 H)；5.89-5.79 (m, 1 H)；5.62-5.51 (m, 1 H)；5.10 (s, 2 H)；4.43-4.32 (m, 1 H)；4.05-3.92 (m, 4 H)；3.75-3.30 (m, 20 H)；3.15-3.07 (m, 2 H)；2.33-2.03 (m, 11 H)；1.97-1.68 (m, 1 H)；1.67-1.51 (m, 4 H)；1.45 (s, 9 H)；1.44 (s, 9 H)；1.26 (bs, 20 H)；1.05-0.87 (m, 2 H)。

【0375】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0376】 LC-MS Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈／水 70:30 至 100:0 + 0.1% TFA)：1.41 min。

【0377】 LC-MS m/z：1136.0 (M+H)⁺。

【0378】 將在碳上的鈀 (10%, 0.27 g, 0.24 mmol) 加至以上化合物 (4, 5.59 g, 4.93 mmol) 在甲醇 (85 mL) 中的溶液並將所得的混合物在正常壓力下氫化 2.5 個小時。濾出催化劑並將濾液蒸發至乾。將殘餘物以甲苯共蒸發四次並在真空內乾燥以產生化合物 5。

【0379】 產率：3.45 g (70%)。

【0380】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz；CDCl₃, dH)：7.43-7.33 (m, 2 H)；

7.05-6.94 (m, 1 H); 6.72-6.65 (m, 1 H); 5.69-5.59 (m, 1 H); 4.44-4.33 (m, 1 H);
4.03-3.98 (m, 4 H); 3.72-3.39 (m, 18 H); 3.15-3.07 (m, 2 H); 2.96-2.90 (m, 2 H);
2.34-1.78 (m, 13 H); 1.71-1.51 (m, 7 H); 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.25 (m, 20 H);
1.07-0.93 (m, 1 H)。

【0381】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0382】 LC-MS Rt (Kinetex , 4.6 mm x 50 mm , 乙腈 / 水 70:30 至 100:0
+ 0.1% TFA) : 0.76 min 。

【0383】 LC-MS m/z : 1001.0 (M+H)⁺ 。

【0384】 於 -30 °C 在氬下將 N,N-二異丙基乙基胺 (0.73 mL, 4.14 mmol)
加至以上胺 (5, 3.45 g, 3.45 mmol) 在乾二氯甲烷 (55 mL) 中的溶液。逐
滴加入溴乙醯溴 (0.36 mL, 4.14 mmol) 並將所得的溶液於 -30 °C 攪拌 3 個
小時。移除冷卻浴，將混合物於室溫攪拌另外 1 個小時並接著將其蒸發至
乾。將殘餘物再溶解於乙酸乙酯 (100 mL) 中，以 5% 檸檬酸水溶液 (3 x 100
mL, 相分離非常緩慢)、1 M 氫氯酸水溶液 (4 x 100 mL) 與鹵水洗滌。將
有機層以無水硫酸鈉乾燥、過濾並蒸發。將殘餘物藉由快速管柱色層分析
法 (Silicagel 60, 0.040-0-063 mm; 溶析液：二氯甲烷 / 甲醇 95:5 至 93:7)
純化以提供呈黃色油的化合物 6。

【0385】 產率：1.63 g (44%)。

【0386】 RF (SiO₂, 二氯甲烷 / 甲醇 95:5) : 0.15 。

【0387】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, dH) : 7.55-7.46 (m, 1 H);
7.43-7.33 (m, 1 H); 6.99-6.89 (m, 1 H); 6.58 (d, J=7.5 Hz, 1 H); 5.72-5.59 (m, 1 H);

4.44-4.32 (m, 1 H); 4.02 (s, 4 H); 3.85 (s, 2 H); 3.74-3.40 (m, 20 H); 3.14-3.09 (m, 2 H); 2.33-2.05 (m, 9 H); 2.01-1.76 (m, 4 H); 1.67-1.53 (m, 7 H); 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.25 (m, 20 H); 1.07-0.89 (m, 2 H)。

【0388】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0389】 LC-MS Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0 + 0.1% FA) : 3.47 min。

【0390】 LC-MS m/z : 1122.0 (M+H)+。

【0391】 將以上化合物(6, 1.63 g, 1.53 mmol)溶解於三氟乙酸(25 mL)中並靜置 1.5 個小時。在真空內移除三氟乙酸並將殘餘物以甲苯共蒸發三次。將二乙醚 (120 mL) 加至油狀殘餘物並將混合物攪拌 1 個小時。接著濾出沉澱物並在真空內乾燥殘餘物以提供白色粉末。

【0392】 產率：1.55 g (90%)。

【0393】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, AcOD-d₄, dH) : 4.65-4.56 (m, 1 H); 4.14 (s, 2 H); 4.12 (s, 2 H); 3.98 (s, 2 H); 3.78-3.44 (m, 20 H); 3.14-3.10 (d, J=6.8 Hz, 2 H); 2.48-2.21 (m, 8 H); 2.18-2.10 (m, 1 H); 1.97-1.79 (m, 4 H); 1.70-1.46 (m, 7 H); 1.32 (bs, 20 H); 1.11-0.93 (m, 2 H)。

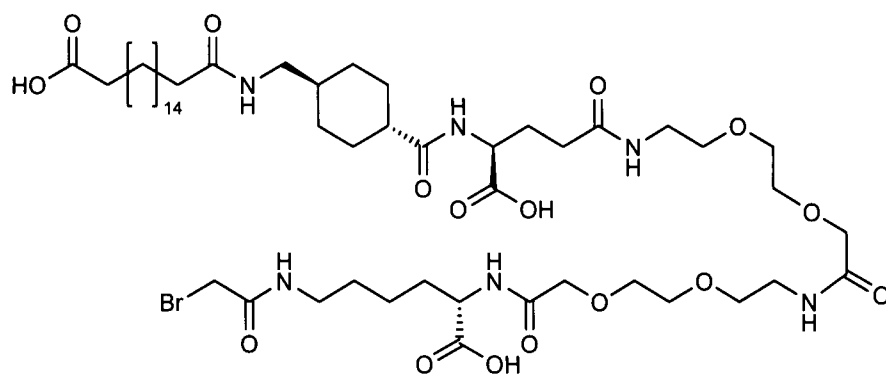
【0394】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0395】 LC-MS Rt (Kinetex, 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA) : 3.32 min。

【0396】 LC-MS m/z : 1008.0 (M+H)+。

實施例 4.8 : 18-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基

-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-18-側氧基-十八烷酸之製備



合成方法：

【0397】 將 Wang Fmoc-Lys(Mtt)樹脂 0.26 mmol/g (1, 11.7 g, 3.05 mmol) 放置在二氯甲烷 (100 mL) 中 45 分鐘以使之膨脹。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 mL) 移除 Fmoc 基團。將樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 2.35 g, 6.09 mmol)、O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 2.17 g, 6.09 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (2.12 mL, 12.2 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗滌之。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將 {2-[2-(9H-芴-9-

基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 2.35 g, 6.09 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 2.17 g, 6.09 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (2.12 mL, 12.2 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗滌之以獲得中間物 1。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 1.94 g, 4.57 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 1.62 g, 4.57 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (1.43 mL, 8.23 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗滌之。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 90 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將 4-[(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)甲基]環己烷羧酸 (Fmoc-Trx-OH, 1.73 g, 4.57 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 1.62 g, 4.57 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (1.43 mL, 8.23 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3

x 90 mL) 洗滌之以獲得中間物 2。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 50 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 50 mL)、2-丙醇 (3 x 50 mL) 與二氯甲烷 (3 x 30 mL) 洗滌樹脂。將十八烷二酸單第三丁基酯 (C18(OtBu)-OH, 0.85 g, 2.28 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 0.81 g, 2.28 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (0.72 mL, 4.11 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (50 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 50 mL)、二氯甲烷 (3 x 50 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 50 mL) 洗滌之。藉由以在二氯甲烷中的 80% 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇處理 (2 x 10 min, 2 x 30 min, 4 x 50 mL) 移除 Mtt 基團。以二氯甲烷 (6 x 50 mL) 洗滌樹脂。將溴乙酸 (4.24 g, 30.5 mmol) 與 N,N'-二異丙基碳二醯亞胺 (DIC, 4.01 mL, 25.9 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (50 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 45 分鐘。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (5 x 50 mL) 與二氯甲烷 (10 x 50 mL) 洗滌之。藉由以三氟乙酸 (50 mL) 處理 1 個小時來將產物自樹脂分離。濾出樹脂並以三氟乙酸 (1 x 25 mL) 與二氯甲烷 (2 x 30 mL) 洗滌。結合溶液並蒸發溶劑至乾以獲得呈濃稠的褐色油的化合物。

【0398】 產率：2.18 mg (64%)。

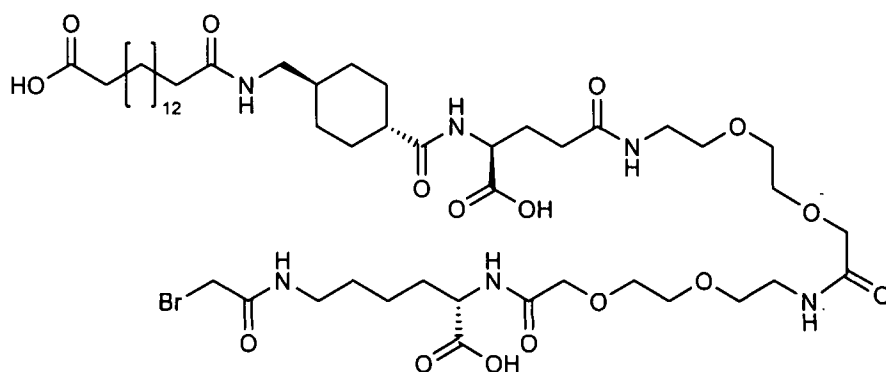
【0399】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz; AcOD-d₄, 80°C, dH): 4.72-4.55 (m, 2 H); 4.16 (s, 2 H); 4.12 (s, 2 H); 3.80-3.62 (m, 12 H); 3.58-3.44 (m, 4 H); 3.32 (t, J=6.8 Hz, 2 H); 3.15 (d, J=6.8 Hz, 2 H); 2.51-2.07 (m, 8 H); 2.01-1.77 (m, 6 H); 1.72-1.44 (m, 11 H); 1.33 (bs, 24 H); 1.13-0.95 (m, 2 H)。

【0400】 LC-MS 純度：96%。

【0401】 LC-MS Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm , 乙腈 / 水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA) : 3.68 min 。

【0402】 LC-MS m/z : 1124.1 (M+H)⁺ 。

實施例 4.9：16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-16-側氧基-十六烷酸之製備



【0403】 合成程序類似於實施例 4.8，除了在合成步驟中在中間物 2 之後使用十六烷二酸單第三丁基酯 (C16(OtBu)-OH) 而不是十八烷二酸單第三丁基酯 (C18(OtBu)-OH)。獲得呈濃稠的褐色油的產物。

【0404】 產率：2.05 mg (62%)。

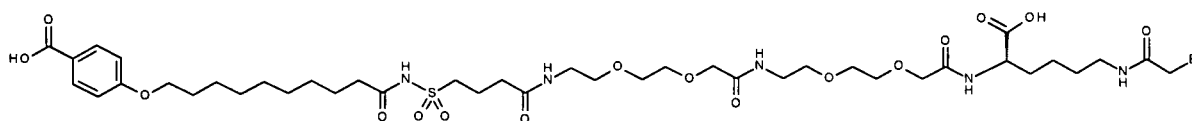
【0405】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz ; AcOD-d₄, 80°C , dH) : 4.71-4.55 (m, 2 H); 4.16 (s, 2 H); 4.12 (s, 2 H); 3.79-3.62 (m, 12 H); 3.58-3.44 (m, 4 H); 3.32 (t, J=6.7 Hz, 2 H); 3.15 (d, J=6.6 Hz, 2 H); 2.49-2.07 (m, 8 H); 2.01-1.77 (m, 6 H); 1.72-1.44 (m, 11 H); 1.33 (bs, 20 H); 1.13-0.97 (m, 2 H) 。

【0406】 LC-MS 純度：92%。

【0407】 LC-MS Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm , 乙腈 / 水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA) : 3.38 min 。

【0408】 LC-MS m/z : 1096.0 (M+H)⁺ 。

實施例 4.10 : 4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]磺醯基胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸之製備

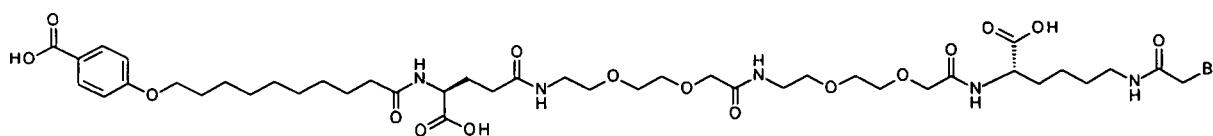


【0409】 合成程序類似於實施例 4.8，除了在合成步驟中在中間物 1 之後使用標準 Fmoc 保護 / 去保護合成程序首先將 3-羧基丙烷磺醯胺偶合至樹脂且接著將 10-(4-第三丁氧基羰基苯氧基)癸酸偶合至樹脂。在合成步驟之後，如實施例 4.8 中例示地切裂與處理得到白色固體。

【0410】 LC-MS m/z : 998.54 (M1⁺) 。

【0411】 UPLC5 : 方法 09_B4_1 , Rt=8.3004 min (pH 2.3) ; 98%純度 。

實施例 4.11 : 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸之製備

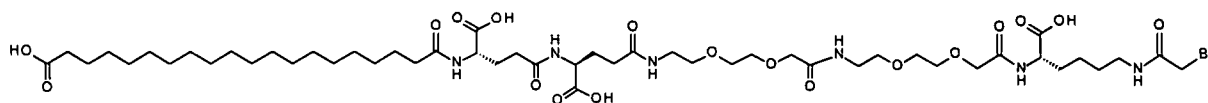


【0412】 合成程序類似於實施例 4.8，除了在合成步驟中在中間物 1 之後使用標準 Fmoc 保護／去保護合成程序首先將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu) 偶合至樹脂且接著將 10-(4-第三丁氧基羰基苯氧基)癸酸偶合至樹脂。在合成步驟之後，如實施例 4.8 中例示地切裂與處理得到白色固體。

【0413】 LC-MS m/z : 978,55(M1+)。

【0414】 UPLC5 : 方法 09_B4_1 , Rt=7.573 min (pH 2.3) ; 99%純度。

實施例 4.12: 20-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-20-側氧基-花生酸之製備

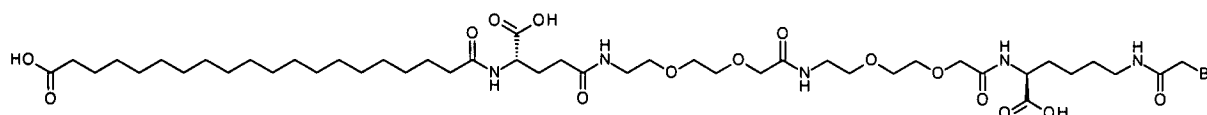


【0415】 合成程序類似於實施例 4.8，除了在合成步驟中在中間物 1 之後使用標準 Fmoc 保護／去保護合成程序首先將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu) 偶合至樹脂兩次，接著

將 20-第三丁氧基-20-側氧基-花生酸 (C20(OtBu)-OH) 偶合至樹脂。在合成步驟之後，如實施例 4.8 中例示地切裂與處理得到白色固體。

【0416】 LC-MS m/z : 1141.2 (M+H)⁺。

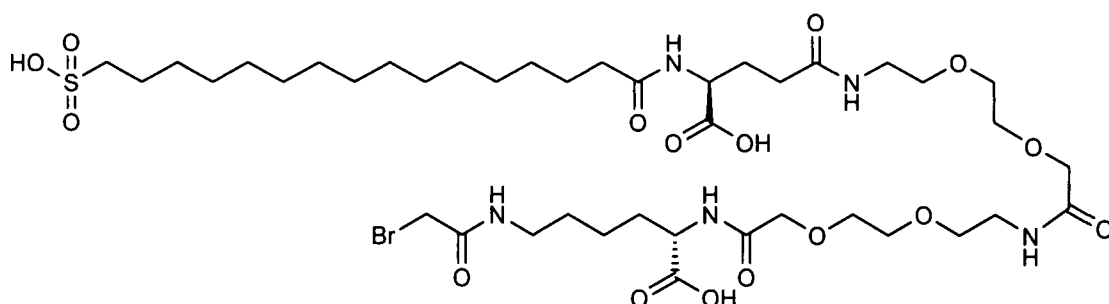
實施例 4.13 : 20-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-20-側氧基-花生酸之製備



【0417】 合成程序類似於實施例 4.8，除了在合成步驟中在中間物 1 之後使用標準 Fmoc 保護／去保護合成程序首先將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu) 偶合至樹脂，接著將 20-第三丁氧基-20-側氧基-花生酸 (C20(OtBu)-OH) 偶合至樹脂。在合成步驟之後，如實施例 4.8 中例示地切裂與處理得到白色固體。

【0418】 LC-MS m/z : 1012.0 (M+H)⁺。

實施例 4.14 : (2S,25S)-2-(4-(2-溴乙醯胺基)丁基)-4,13,22-三側氧基-25-(15-磺酸基十五烷醯胺基)-6,9,15,18-四氧基-3,12,21-三氮二十六烷二酸之製備



合成方法：

【0419】 將 Wang Fmoc-Lys(Mtt)樹脂 0.26 mmol/g (1, 36.7 g, 9.55 mmol) 放置在二氯甲烷 (200 mL) 中 45 分鐘以使之膨脹。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 7.36 g, 19.1 mmol)、O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 6.79 g, 19.1 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (6.66 mL, 38.2 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、二氯甲烷 (2 x 150 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 7.36 g, 19.1 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 6.79 g, 19.1 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (6.66 mL, 38.2 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並

以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、二氯甲烷 (2 x 150 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。將 (S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 6.10 g, 14.3 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 5.09 g, 14.3 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (4.49 mL, 25.8 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、二氯甲烷 (2 x 150 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。將樹脂分成三個部分，將 16-磺酸基-十六烷酸鈉 (3, 2.28 g, 6.37 mmol)、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯啶基鎘六氟磷酸鹽 (PyBOP, 3.31 g, 6.37 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (2.22 mL, 12.8 mmol) 在二甲基亞砷 (80 mL) 中的溶液加至一類以上樹脂並將混合物搖晃 2 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺：水混合物 (3:1, 3 x 80 mL)、N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 80 mL)、二氯甲烷 (3 x 80 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 80 mL) 洗滌。藉由以在二氯甲烷中的 80% 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇處理 (3 x 10 min, 2 x 30 min, 5 x 80 mL) 移除 Mtt 基團。以二氯甲烷 (6 x 80 mL) 洗滌樹脂。將溴乙酸 (6.64 g, 47.8 mmol) 與 N,N'-二異丙基碳二醯亞胺 (DIC, 5.26 mL, 34.0 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (80 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 45 分鐘。過

濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (4 x 80 mL) 與二氯甲烷 (10 x 80 mL) 洗滌。藉由以三氟乙酸 (100 mL) 處理 1 個小時來將產物自樹脂分離。濾出樹脂並以三氟乙酸 (1 x 40 mL) 與二氯甲烷 (3 x 50 mL) 洗滌。結合溶液並將溶劑蒸發至乾以得到濃稠的褐色油。將該油溶解於水：乙腈混合物 (4:1, 25 mL) 中並使溶液通過呈 H⁺形式的 Dowex 50WX4 (50-100 篩目；溶析液：水) 之管柱 (7 x 10 cm)。結合具有酸性 pH 的部分並冷凍乾燥以獲得白色粉末。

【0420】 產率：2.17 g (68%)。

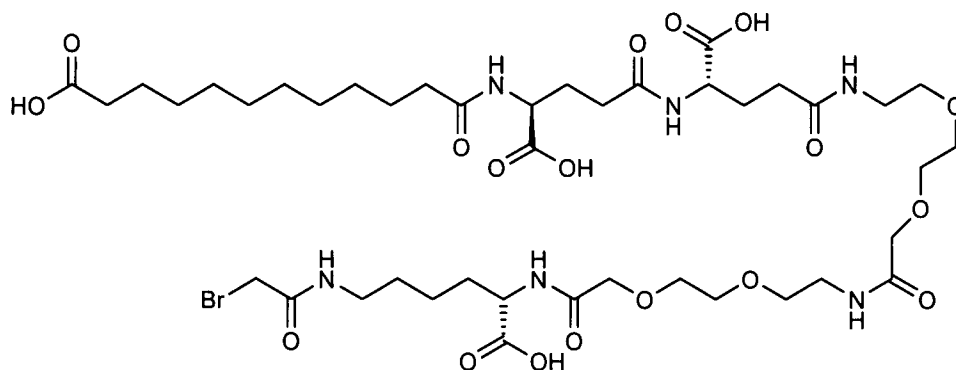
【0421】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz; AcOD-d₄ 80 °C, dH): 4.74-4.56 (m, 2 H); 4.16 (d, J=5.3 Hz, 4 H); 3.95 (s, 2 H); 3.82-3.64 (m, 12 H); 3.61-3.47 (m, 4 H); 3.33 (t, J=6.9 Hz, 2 H); 3.17-3.07 (m, 2 H); 2.54 (t, J=7.3 Hz, 2 H); 2.38 (t, J=7.5 Hz, 2 H); 2.34-2.09 (m, 2 H); 2.01-1.93 (m, 1 H); 1.93-1.78 (m, 3 H); 1.74-1.57 (m, 4 H); 1.57-1.29 (m, 24 H)。

【0422】 LC-MS 純度：100%。

【0423】 LC-MS Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA) : 2.86 min。

【0424】 LC-MS m/z : 1003.9 (M+H)⁺。

實施例 4.15: 12-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-12-側氧基-十二烷酸之製備



合成方法：

【0425】 將 Wang Fmoc-Lys(Mtt)樹脂 0.26 mmol/g (1, 36.7 g, 9.55 mmol) 放置於二氯甲烷 (200 mL) 中 45 分鐘以使之膨脹。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 7.36 g, 19.1 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 6.79 g, 19.1 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (6.66 mL, 38.2 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、二氯甲烷 (2 x 150 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 7.36 g, 19.1 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 6.79 g, 19.1 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (6.66 mL, 38.2 mmol) 在 N,N-二甲基甲

醯胺 (150 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、二氯甲烷 (2 x 150 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。將 (S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 6.10 g, 14.3 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 5.09 g, 14.3 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (4.49 mL, 25.8 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 150 mL)、二氯甲烷 (2 x 150 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (150 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 150 mL)、2-丙醇 (2 x 150 mL) 與二氯甲烷 (2 x 150 mL) 洗滌樹脂。將樹脂分成三個部分，將 (S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 2.03 g, 4.78 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 1.70 g, 4.78 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (1.50 mL, 8.60 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (70 mL) 中的溶液加至一類以上樹脂(2)並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (2 x 70 mL)、二氯甲烷 (2 x 70 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (70 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 70 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 70 mL)、2-丙醇 (2 x 70 mL) 與二氯甲烷 (2 x 70 mL) 洗滌樹脂。將十二烷二酸單第三

丁基酯(C12(OtBu)-OH, 1.37 g, 4.78 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯(TCTU, 1.70 g, 4.78 mmol)與N,N-二異丙基乙基胺(1.50 mL, 8.60 mmol)在二氯甲烷/N,N-二甲基甲醯胺混合物(4:1, 70 mL)中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 hr。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺(3 x 150 mL)、二氯甲烷(3 x 150 mL)與 N,N-二甲基甲醯胺(3 x 150 mL)洗滌。藉由以在二氯甲烷中的 80% 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇處理(3 x 10 min, 2 x 30 min, 4 x 70 mL)移除 Mtt 基團。以二氯甲烷(6 x 70 mL)洗滌樹脂。將溴乙酸(6.60 g, 47.8 mmol)與 N,N'-二異丙基碳二醯亞胺(DIC, 5.30 mL, 34.0 mmol)在 N,N-二甲基甲醯胺(90 mL)中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 30 分鐘。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺(4 x 70 mL)與二氯甲烷(10 x 70 mL)洗滌。藉由以三氟乙酸(100 mL)處理 1 個小時來將產物自樹脂分離。濾出樹脂並以三氟乙酸(1 x 40 mL)與二氯甲烷(2 x 40 mL)洗滌。結合溶液並將溶劑蒸發至乾以得到濃稠的褐色油。

【0426】 產率：2.94 mg (90%)。

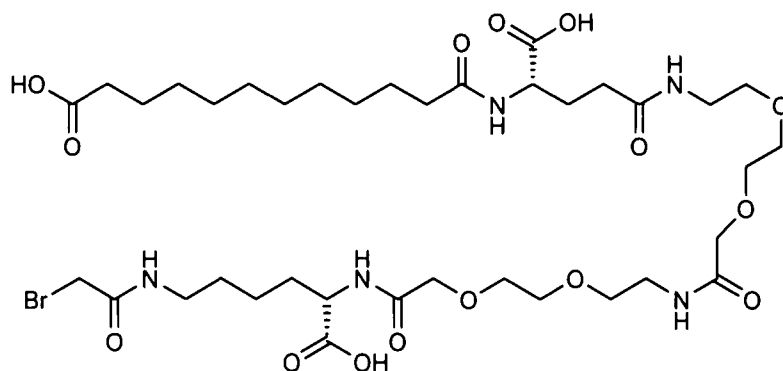
【0427】 $^1\text{H NMR}$ 光譜 (300 MHz; AcOD- d_4 , dH): 4.74-4.53 (m, 3 H); 4.17 (s, 2 H); 4.12 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.81-3.40 (m, 16 H); 3.31 (t, $J=6.8$ Hz, 2 H); 2.57-2.20 (m, 10 H); 2.16-2.04 (m, 3 H); 1.89-1.75 (m, 1 H); 1.72-1.54 (m, 6 H); 1.52-1.41 (m, 2 H); 1.32 (bs, 12 H)。

【0428】 LC-MS 純度：100%。

【0429】 LC-MS Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA): 2.64 min。

【0430】 LC-MS m/z : 1028.0 (M+H) $^+$ 。

實施例 4.16：12-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-12-側氧基-十二烷酸之製備



【0431】 合成程序與實施例 4.8 相同，除了在合成步驟中在以下的中間物 1 之後使用標準 Fmoc 保護／去保護合成程序首先將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu) 偶合至樹脂且接著將 12-第三丁氧基-12-側氧基-十二烷酸偶合至樹脂。在合成步驟之後，如實施例 4.8 中例示地切裂與處理得到呈濃稠的褐色油的化合物。

【0432】 產率：97%

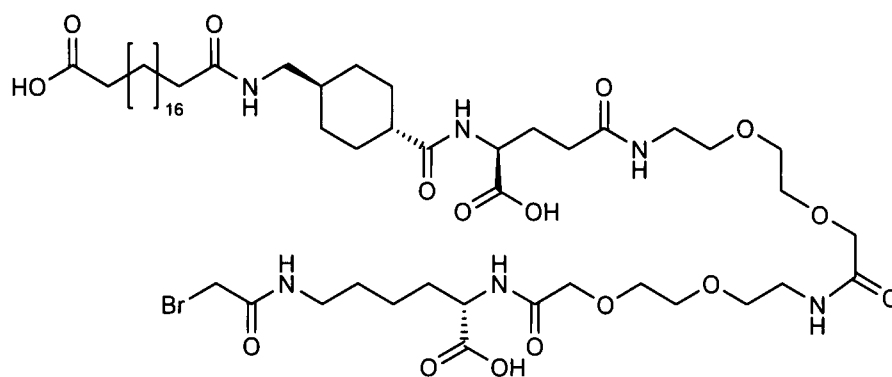
【0433】 $^1\text{H NMR}$ 光譜 (300 MHz; AcOD- d_4 , dH): 4.73-4.55 (m, 2 H); 4.17 (s, 2 H); 4.12 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.80-3.42 (m, 16 H); 3.31 (t, $J=6.78$ Hz, 2 H); 2.49-2.17 (m, 7 H); 2.01-1.92 (m, 2 H); 1.87-1.76 (m, 1 H); 1.70-1.54 (m, 6 H); 1.52-1.41 (m, 2 H); 1.32 (bs, 12 H)。

【0434】 LC-MS 純度：100%。

【0435】 LC-MS Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, 乙腈／水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA)：2.72 min。

【0436】 LC-MS m/z : 900.0 (M+H)⁺。

實施例 4.17 : 20-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-20-側氧基-花生酸之製備



合成方法：

【0437】 將 Wang Fmoc-Lys(Mtt)樹脂 0.26 mmol/g (1, 11.2 g, 2.90 mmol) 放置在二氯甲烷 (100 mL) 中 45 分鐘以使之膨脹。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將 {2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 2.23 g, 5.80 mmol)、O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 2.06 g, 5.80 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (2.02 mL, 11.6 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗

滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20%哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 2.23 g, 5.80 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 2.06 g, 5.80 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (2.02 mL, 11.6 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20%哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁基酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 1.85 g, 4.35 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 1.55 g, 4.35 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (1.36 mL, 7.82 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 1.5 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20%哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將 4-[(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)甲基]環己烷羧酸 (Fmoc-Trx-OH, 1.65 g, 4.35 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 1.55 g, 4.35 mmol) 與 N,N-

二異丙基乙基胺 (1.36 mL, 7.82 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 2 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗滌。藉由以在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20% 哌啶處理 (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 100 mL) 移除 Fmoc 基團。以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、2-丙醇 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將二十烷二酸單第三丁基酯 (C20(OtBu)-OH, 1.73 g, 4.35 mmol)、O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎘四氟硼酸酯 (TCTU, 1.55 g, 4.35 mmol) 與 N,N-二異丙基乙基胺 (1.36 mL, 7.82 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 2 個小時。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL)、二氯甲烷 (3 x 90 mL)、N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 與二氯甲烷 (3 x 90 mL) 洗滌。藉由以在二氯甲烷中的 80% 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇處理 (2 x 10 min, 2 x 30 min, 4 x 100 mL) 移除 Mtt 基團。以二氯甲烷 (6 x 90 mL) 與 N,N-二甲基甲醯胺 (3 x 90 mL) 洗滌樹脂。將將溴乙酸 (8.06 g, 58.0 mmol) 與 N,N'-二異丙基碳二醯亞胺 (DIC, 7.60 mL, 49.3 mmol) 在 N,N-二甲基甲醯胺 (100 mL) 中的溶液加至樹脂並將混合物搖晃 40 分鐘。過濾樹脂並以 N,N-二甲基甲醯胺 (5 x 90 mL) 與二氯甲烷 (12 x 90 mL) 洗滌。藉由以三氟乙酸 (100 mL) 處理 1 個小時來將產物自樹脂分離。濾出樹脂並以三氟乙酸 (1 x 50 mL) 與二氯甲烷 (7 x 70 mL) 洗滌。結合溶液並將溶劑蒸發至乾以得到濃稠的褐色油。

【0438】 產率：3.28 g (98%)。

【0439】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz; AcOD-d₄, 80 °C, dH): 4.68 (dd, J=8.0

and 5.4 Hz, 1 H); 4.60 (dd, J=7.9 and 5.3 Hz, 1 H); 4.16 (s, 2 H); 4.12 (s, 2 H); 3.94 (s, 2 H); 3.81-3.61 (m, 12 H); 3.59-3.44 (m, 4 H); 3.32 (t, J=6.8 Hz, 2 H); 3.14 (d, J=6.8 Hz, 2 H); 2.49-1.79 (m, 15 H); 1.73-1.43 (m, 11 H); 1.33 (s, 28 H); 1.11-0.96 (m, 2 H)。

【0440】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0441】 LC-MS Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm , 乙腈/水 20:80 至 100:0 + 0.1% FA) : 4.04 min 。

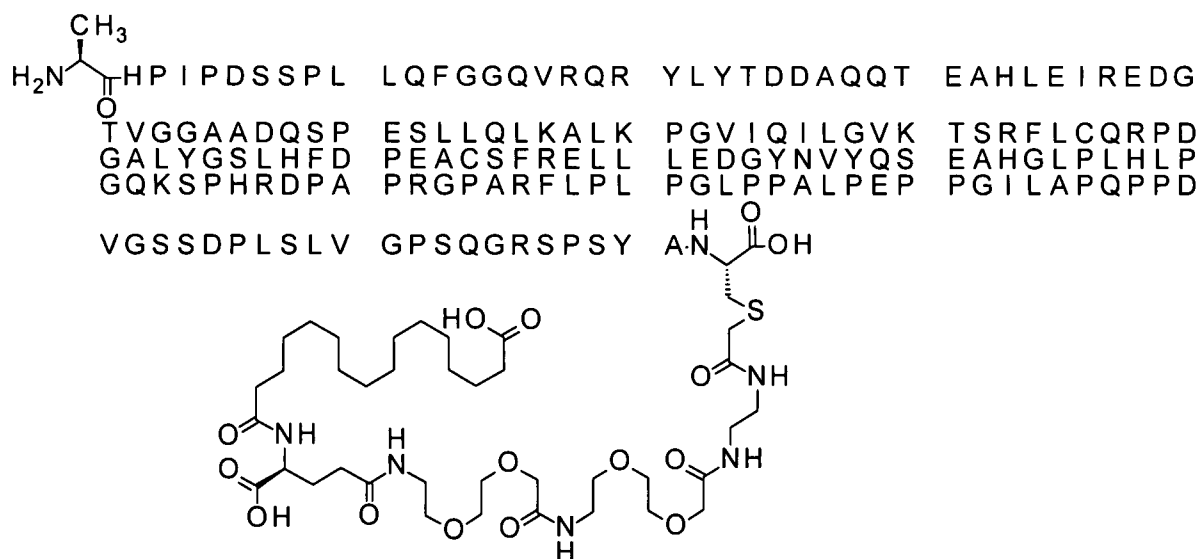
【0442】 LC-MS m/z : 1151.3 (M+H)+ 。

實施例 5：FGF21 衍生物之製備

【0443】 代表性 FGF21 衍生物之製備係於實施例 5.1 中給出(化合物 21)。實施例 5.2-5.14 之 FGF21 衍生物(化合物 11-20 與 22-14)係藉由實施例 5.1 中提供的方法製備。實施例 5.15-5.37 之 FGF21 衍生物係藉由實施例 5.1 中提供的方法製備或如以下所描述地製備。

實施例 5.1：化合物 21

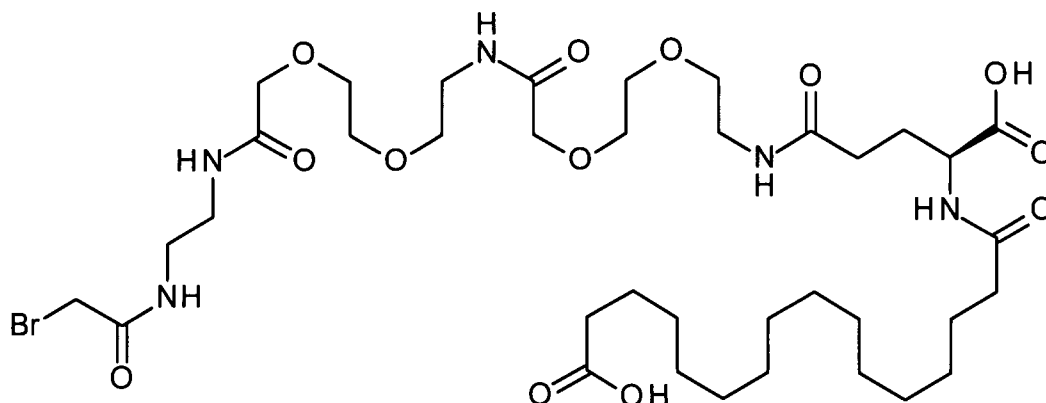
S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



【0444】 此化合物係 SEQ ID NO: 10 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物。

【0445】 化合物 21 係如下製備：

【0446】 SEQ ID NO: 10 之 S{貝他-181}-2-胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 類似物(如實施例 1-3 中一般地描述的製備)中位於位置 181C 的 Cys 殘基係以實施例 4.1 中製備的試劑在位於位置 181C 的 Cys 殘基之巯基基團修改：



【0447】 將在水中的 Tris 加至半胱胺經保護的

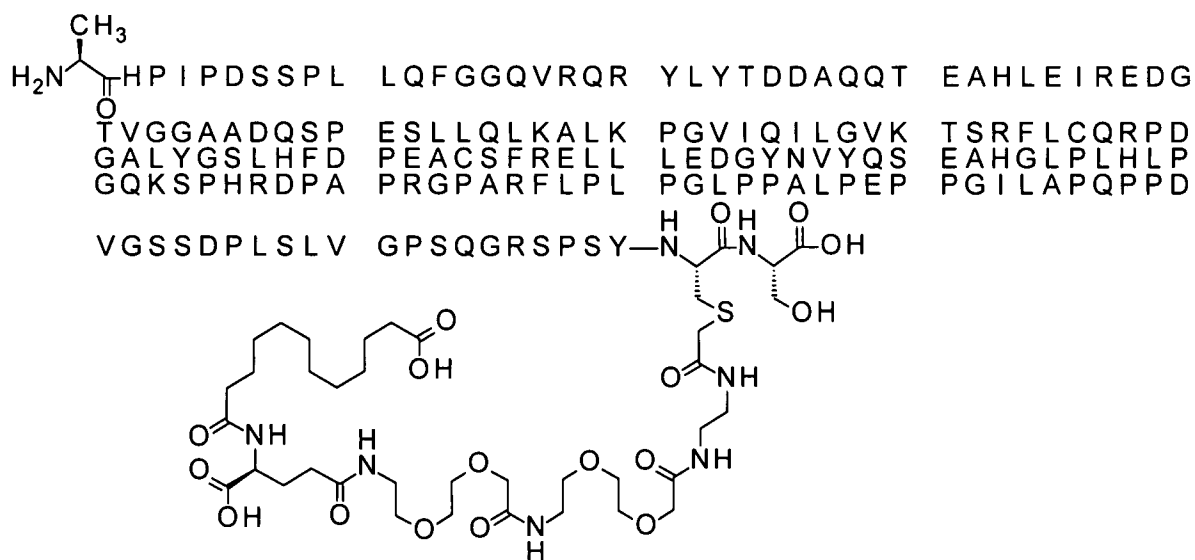
Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (70 mg, 0.0036 mmol) (於 Tris 與 NaCl-緩衝劑 (1.35 mg/ml) 中) 以將 pH 調整至 8.0。添加溶解於水中的 BSPP (雙(對-磺酸根基苯基)苯基膦二水合物二鉀鹽, 12 mg) 並於室溫輕輕地攪拌 4 個小時。添加於乙醇 (0.5 mL) 中的 15-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基)乙基胺甲醯基]甲氧基]乙氧基)乙基胺甲醯基]-甲氧基]乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基]十五烷酸 (19 mg, 0.022 mmol)。在輕輕地攪拌過夜後, 添加 MiliQ 水 (150 mL) 以將傳導度降低至 2.5 mS/cm。將混合物使用陰離子交換在 MonoQ 10/100 GL 管柱上使用以下者純化: A-緩衝劑: 20 mM Tris, pH 8.0; B-緩衝劑: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.0, 流 6 mL 與跨過 60 CV 的 0-80%B 之梯度。產率: 37 mg, 51%。

【0448】 LCMS 方法 2:

【0449】 理論值質量: 20279.9; 測定值: 20280.4

實施例 5.2: 化合物 11

S{貝他-178}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[2-(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21



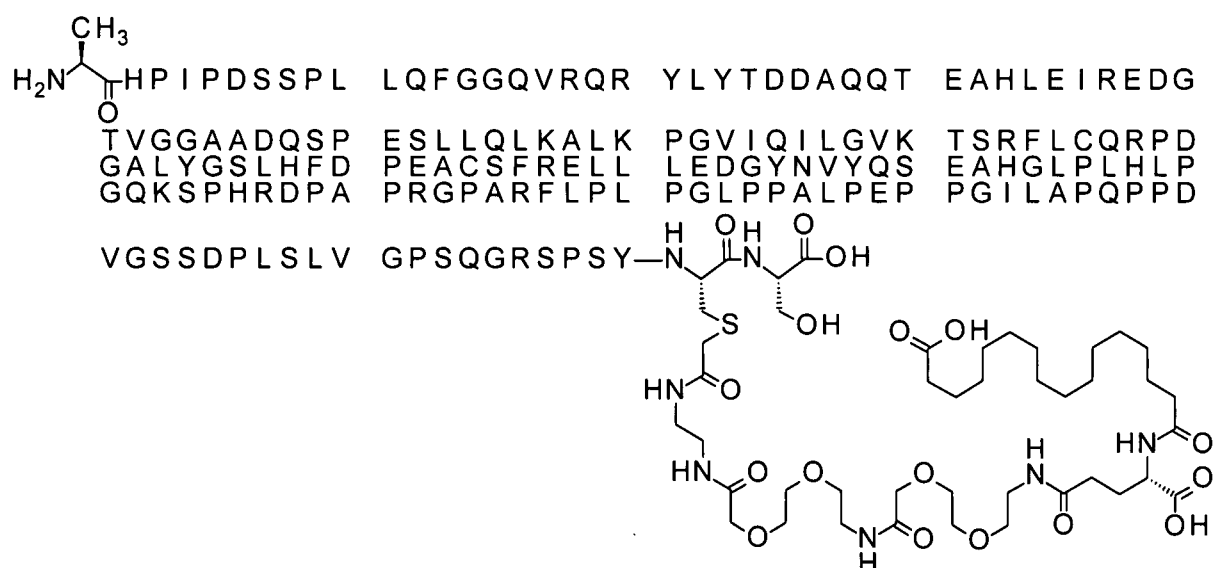
【0456】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物（參見實施例 3）之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.2 之試劑 11-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)-乙基胺甲醯基]甲氧基)-乙氧基]乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基}十一烷酸製備。

【0457】 LCMS 方法 2

【0458】 理論值質量：20239.8；測定值：20240.1

實施例 5.5：化合物 14

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[2-(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



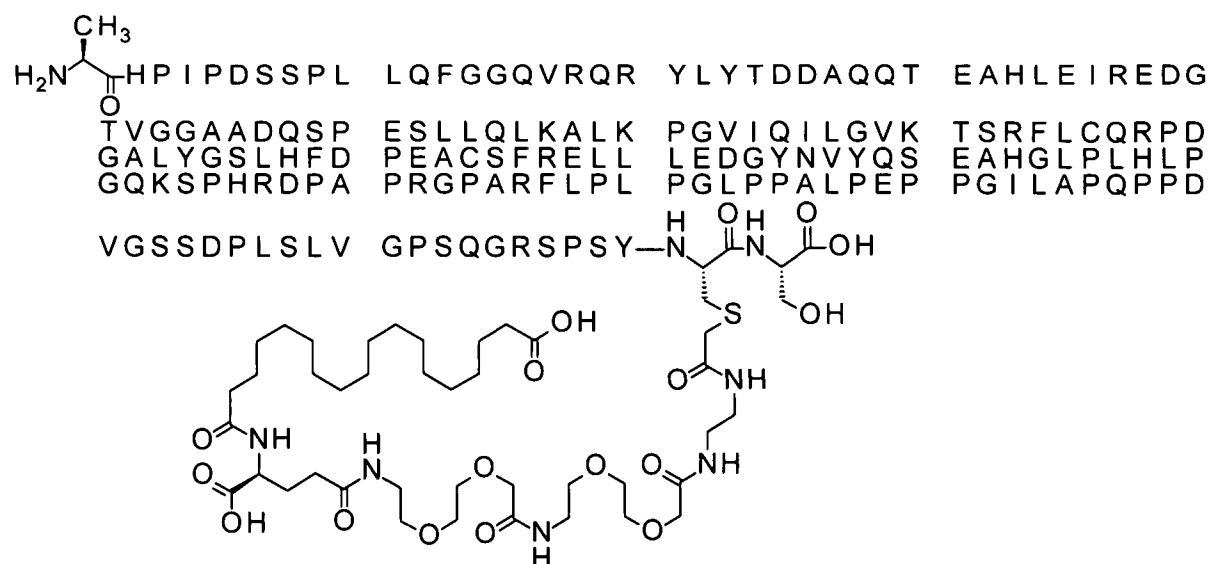
【0462】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物（參見實施例 3）之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.1 之試劑 15-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)-乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基}十五烷酸製備。

【0463】 LCMS 方法 2：

【0464】 理論值質量：20295.9；測定值：20296.2

實施例 5.7：化合物 16

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[2-(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



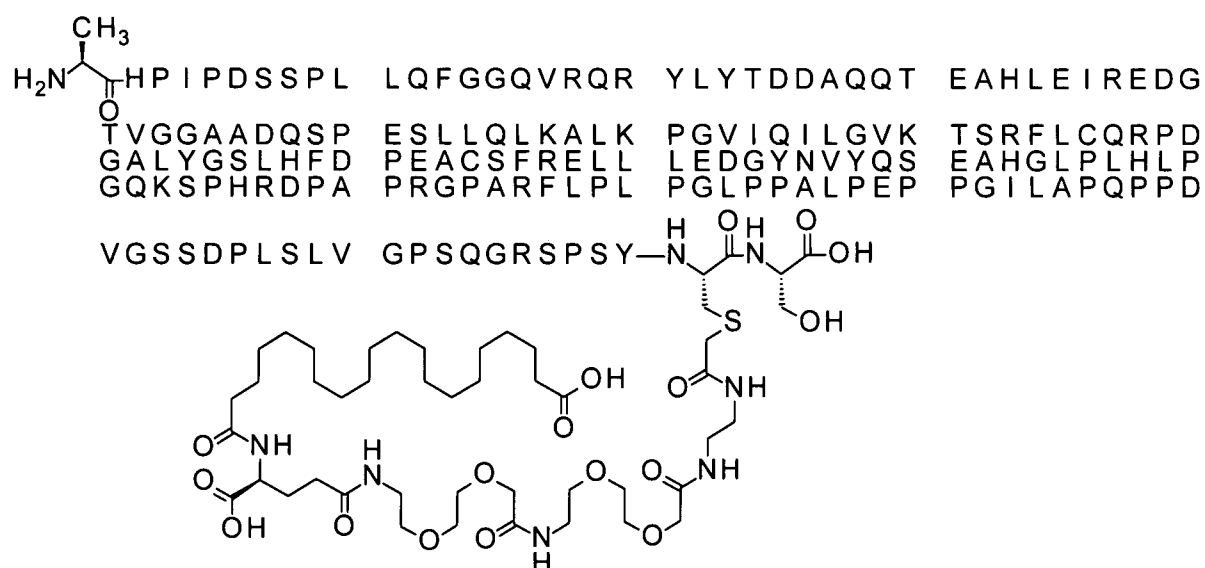
【0465】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物（參見實施例 3）之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.5 之試劑 17-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基)乙氧基)-乙基胺甲醯基]甲氧基)乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基}十七烷酸製備。

【0466】 LCMS 方法 3

【0467】 理論值質量：20323.9；測定值：20324.5

實施例 5.8：化合物 17

S{貝他-180}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



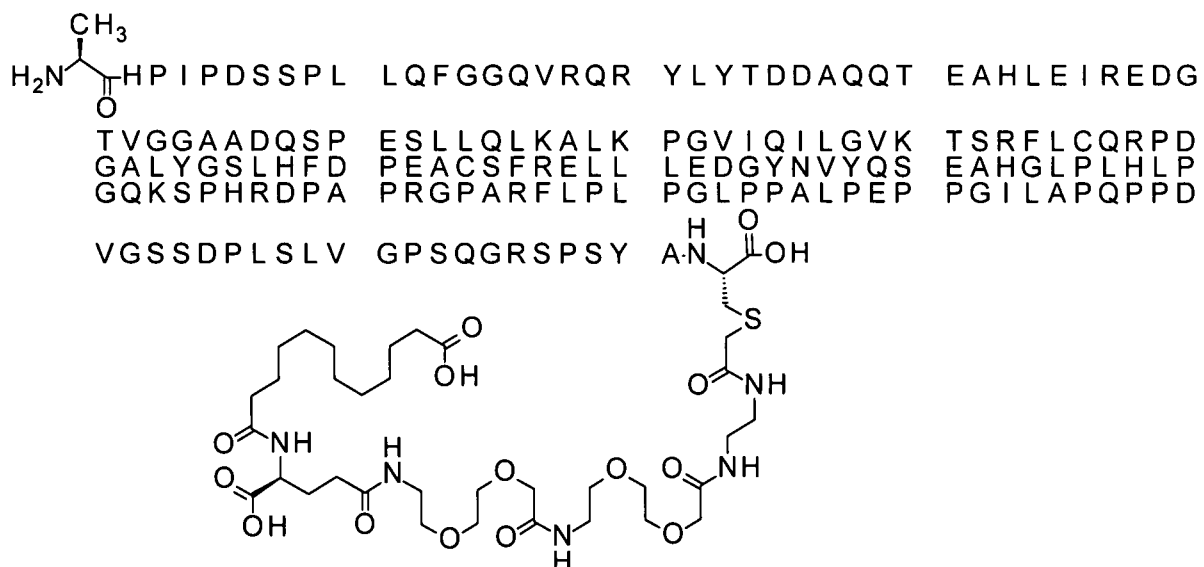
【0468】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.4 之試劑 19-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)-乙基胺甲醯基]甲氧基)-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基]乙氧基)乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基}十九烷酸製備。

【0469】 LCMS 方法 3

【0470】 理論值質量：20352.0；測定值：20352.0

實施例 5.9：化合物 18

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21



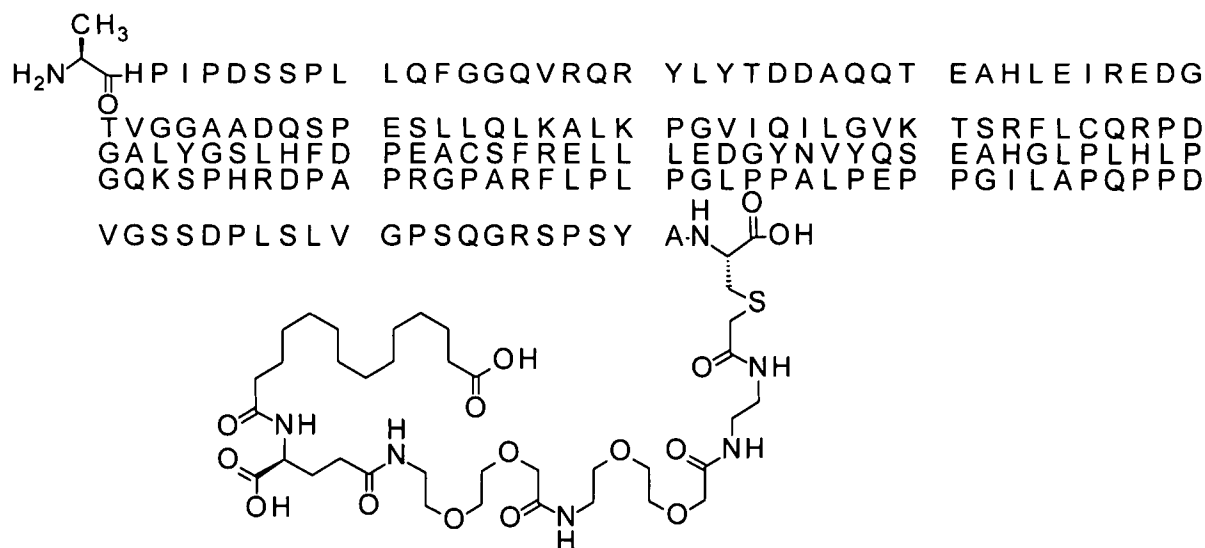
【0474】 此化合物係 SEQ ID NO: 1 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.2 之試劑 11-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基)-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基]乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基)十一烷酸製備。

【0475】 LCMS 方法 2：

【0476】 理論值質量：20223.8；測定值：20224.4。

實施例 5.11：化合物 20

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[[2-[2-[2-[[[2-(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



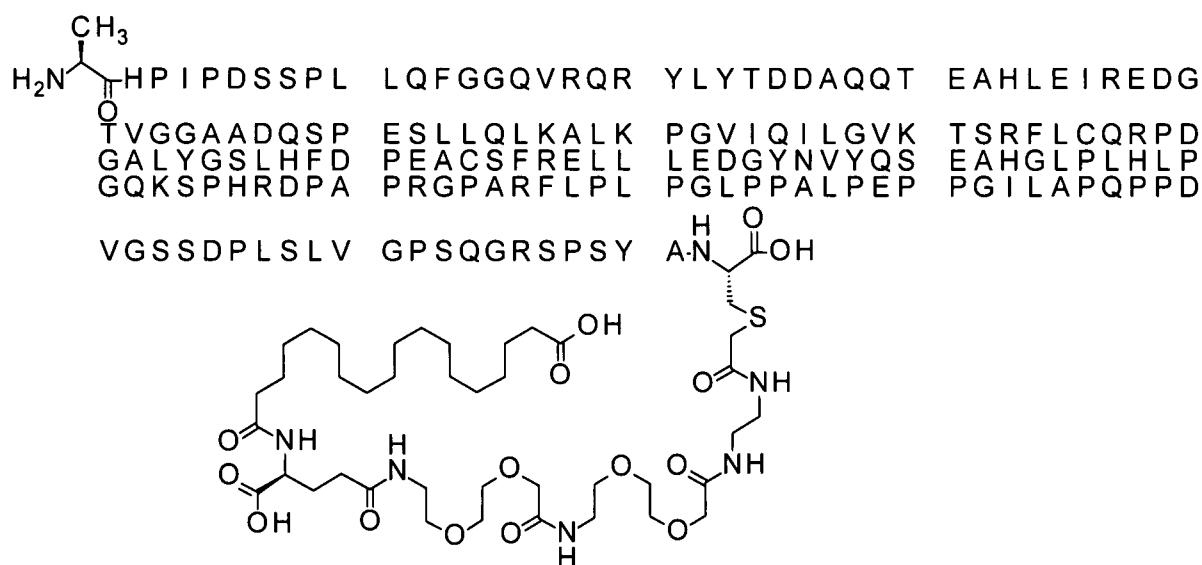
【0477】 此化合物係 SEQ ID NO: 10 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.3 之試劑 13-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基-胺甲醯基]甲氧基)-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基]乙氧基)乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基)十三烷酸製備。

【0478】 LCMS 方法 2：

【0479】 理論值質量：20251.8；測定值：20252.2

實施例 5.12：化合物 22

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



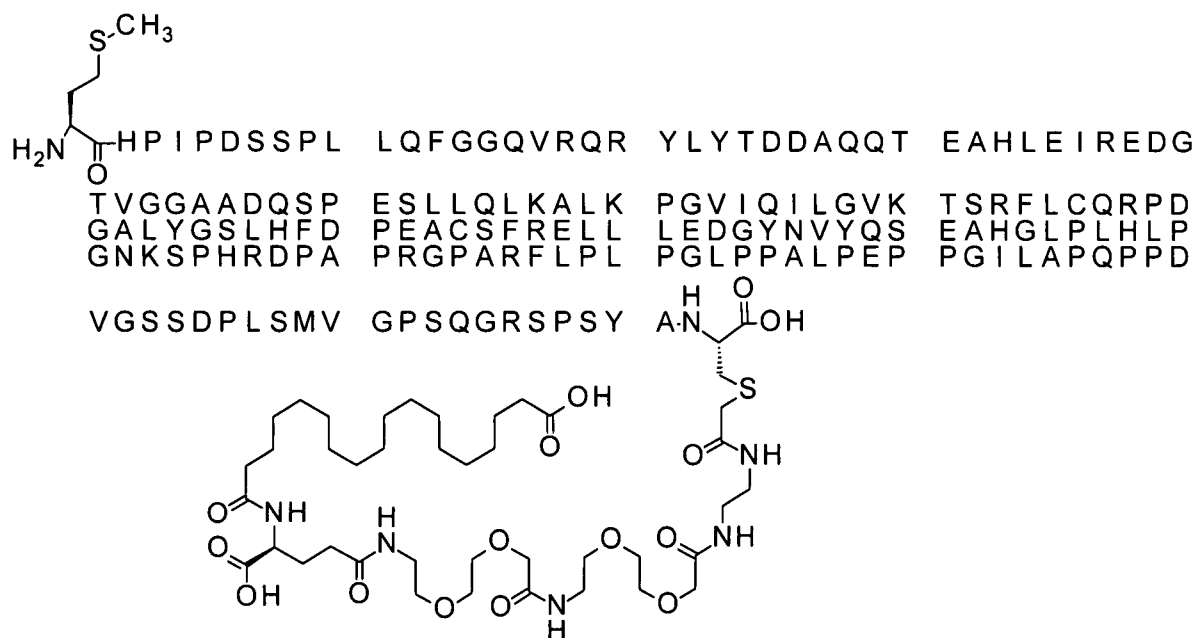
【0480】 此化合物係 SEQ ID NO: 10 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.5 之試劑 17-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基)-乙氧基)乙基胺甲醯基]甲氧基]乙氧基)乙基胺甲醯基]丙基胺甲醯基)十七烷酸 製備。

【0481】 LCMS 方法 2：

【0482】 理論值質量：20307.9；測定值：20308.6。

實施例 5.13：化合物 23

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[2-(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基) 丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙 基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



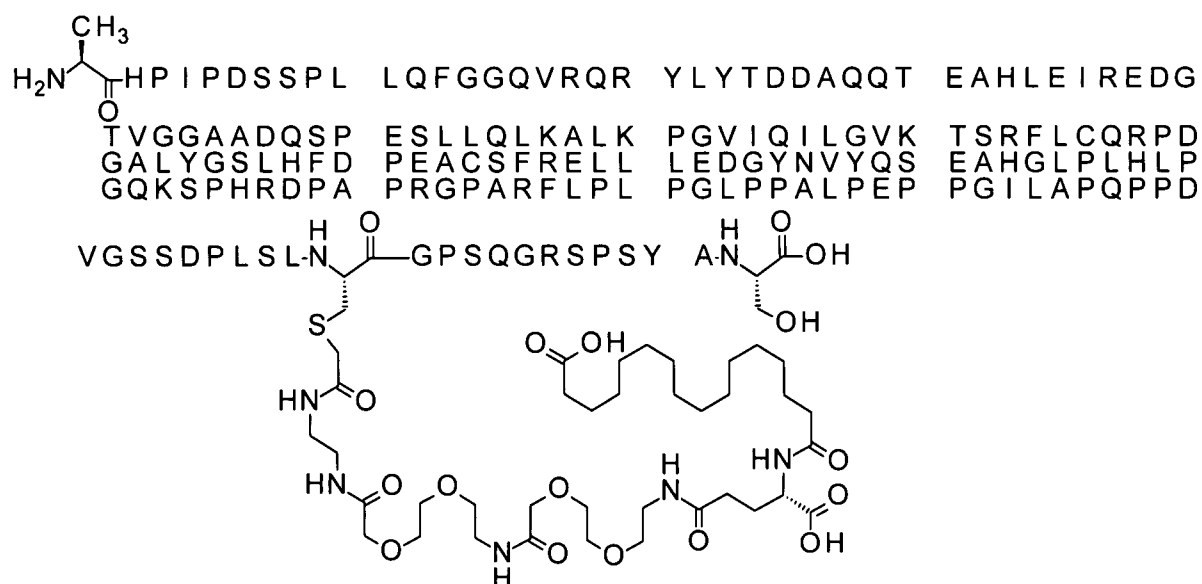
【0486】 此化合物係 SEQ ID NO: 11 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.5 之試劑 17-((S)-1-羧基-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-溴乙醯基胺基)-乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)-乙基胺甲醯基]甲氧基}乙氧基)乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基)十七烷酸製備。

【0487】 LCMS 方法 3：

【0488】 理論值質量：20372.2；測定值：20372.2。

實施例 5.15：化合物 34

S{貝他-168}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Cys168]FGF21



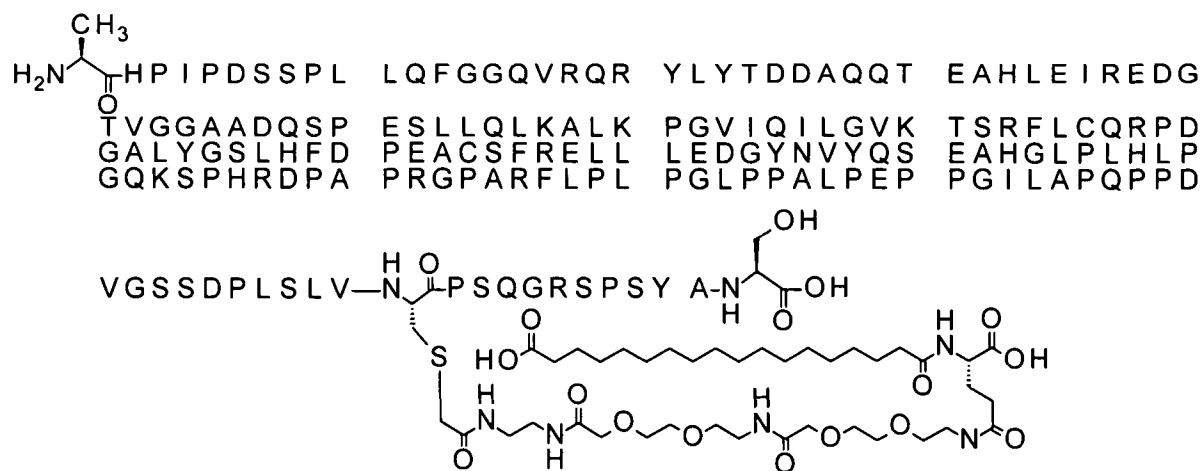
【0492】 此化合物係 SEQ ID NO: 14 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.1 之試劑 15-((S)-1-羧基-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基]甲氧基)乙氧基]-乙基胺甲醯基]甲氧基)乙氧基)乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基}十五烷酸製備。

【0493】 LCMS 方法 3

【0494】 理論值質量：20267.8；測定值：20268.2

實施例 5.17：化合物 36

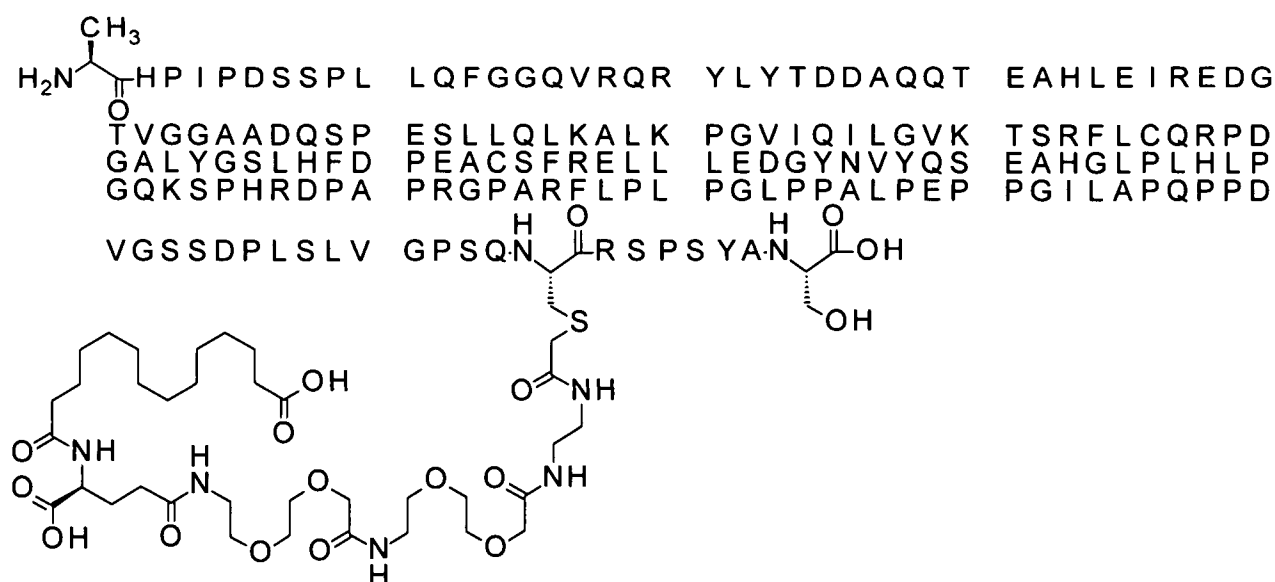
18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-乙醯胺基乙基胺基)-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys170]FGF21



【0495】 此化合物係 SEQ ID NO: 15 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.5 之試劑 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸製備。

實施例 5.18： 化合物 37

S{貝他-173}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基) 丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys173]FGF21



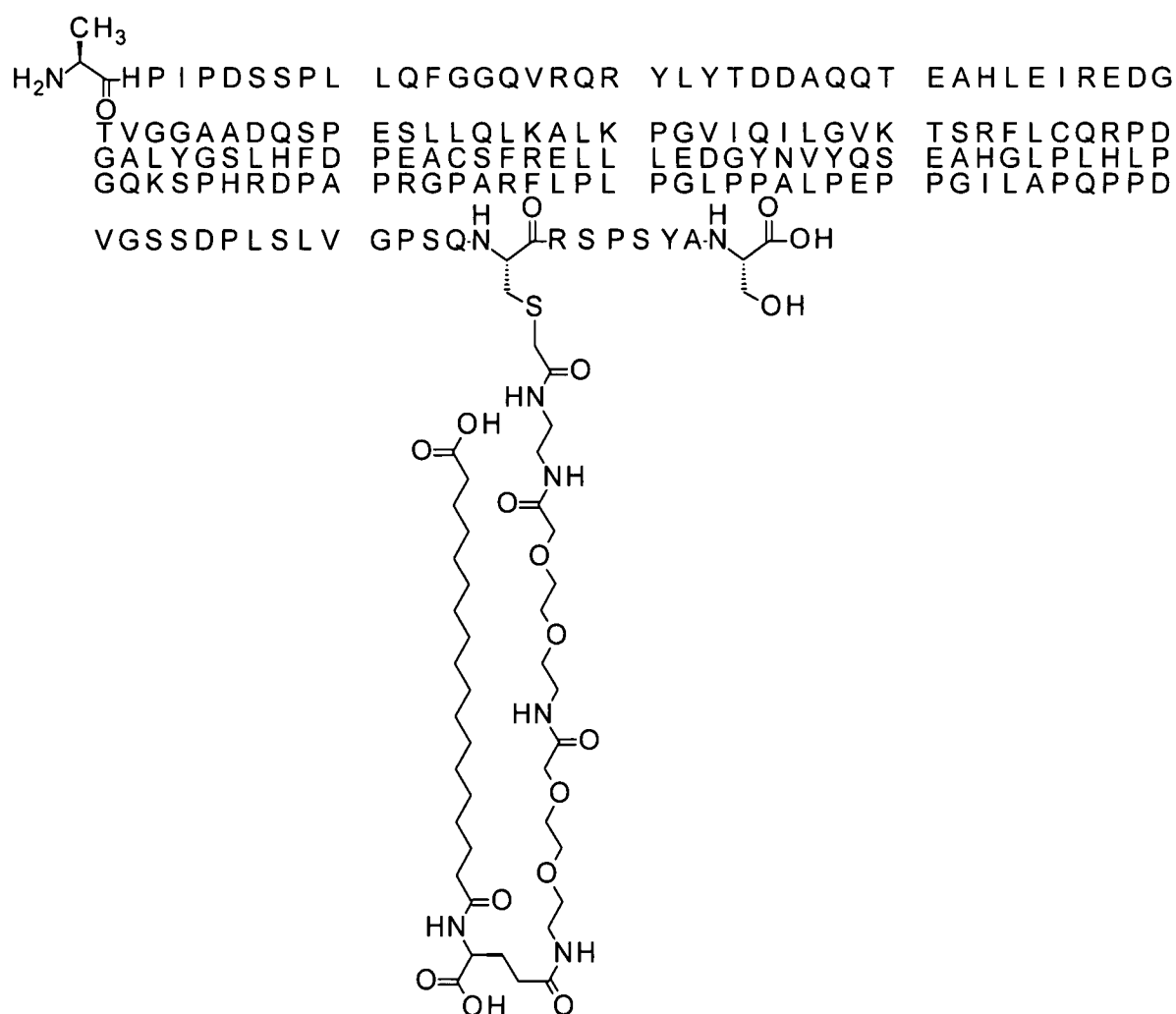
【0499】 此化合物係 SEQ ID NO: 19 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.3 之試劑 13-((S)-1-羧基-3-[2-(2-{{2-(2-{{2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基}甲氧基)乙氧基)-乙基胺甲醯基}甲氧基)乙氧基)乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基}十三烷酸製備。

【0500】 LCMS 方法 1

【0501】 理論值質量：20281.9；測定值：20281.9

實施例 5.20：化合物 39

18-(((1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-乙醯胺基乙基胺基)-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基)-18-側氧基-十八烷酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21

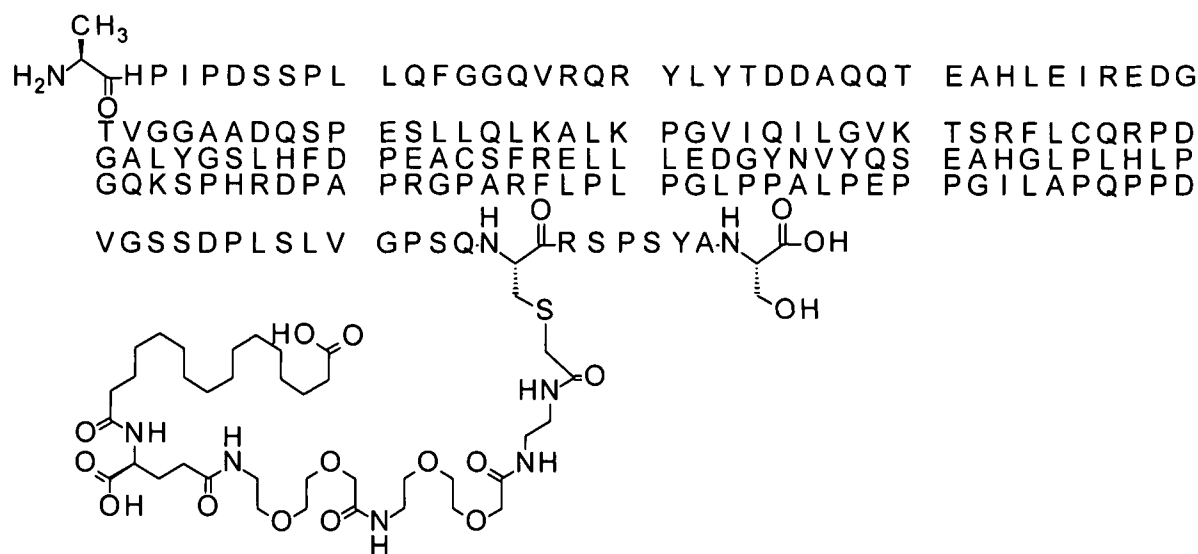


【0502】 此化合物係SEQ ID NO: 19之FGF21類似物(參見實施例3)之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.5 之試劑 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-18-側氧基-十八烷酸製備。

實施例 5.21：化合物 40

16-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-乙醯胺基乙基胺基)-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺

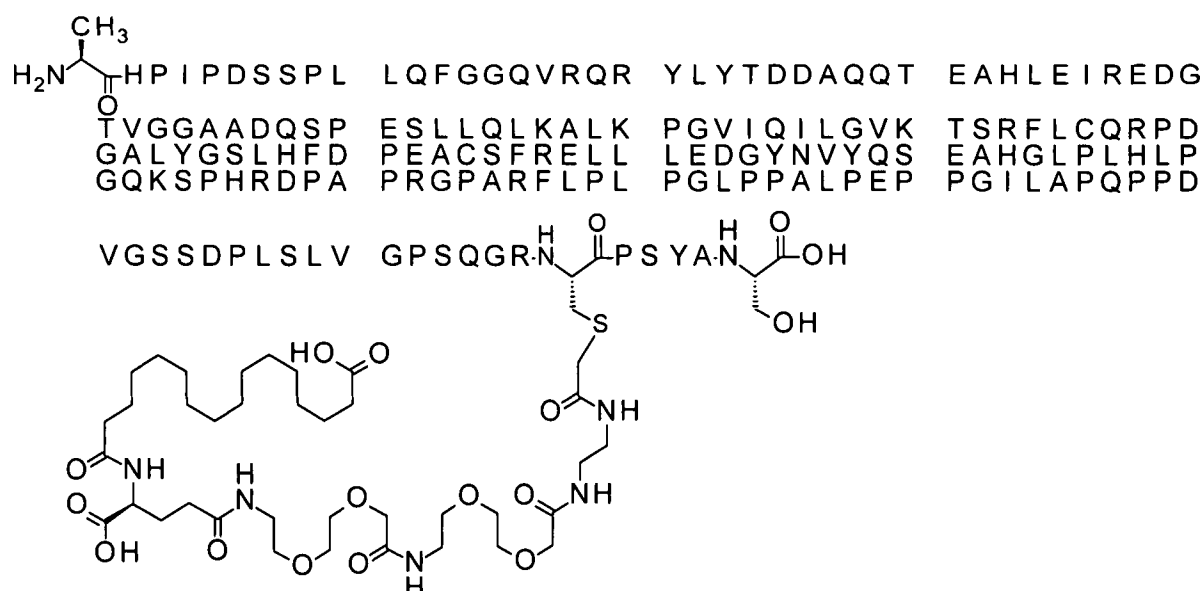
基]-16-側氧基-十六烷酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21



【0503】 此化合物係 SEQ ID NO: 19 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.1 之試劑 16-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-16-側氧基-十六烷酸製備。

實施例 5.22：化合物 41

S{貝他-175}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys175]FGF21



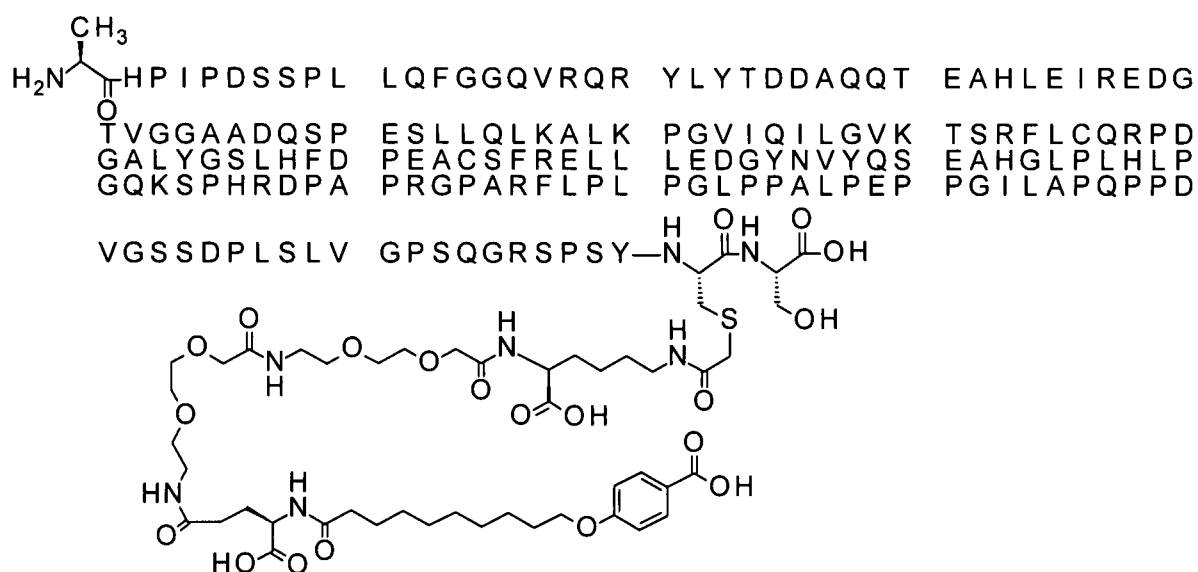
【0507】 此化合物係 SEQ ID NO: 4 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 衍生物, 其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.1 之試劑 15-((S)-1-羧基-3-[2-(2-{{2-(2-{{2-(2-溴乙醯基胺基)乙基胺甲醯基}甲氧基)乙氧基)-乙基胺甲醯基}甲氧基)乙氧基)乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基)十五烷酸製備。

【0508】 LCMS 方法 3

【0509】 理論值質量：20279.9；測定值：20280.4

實施例 5.24：化合物 43

4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-乙醯胺基-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

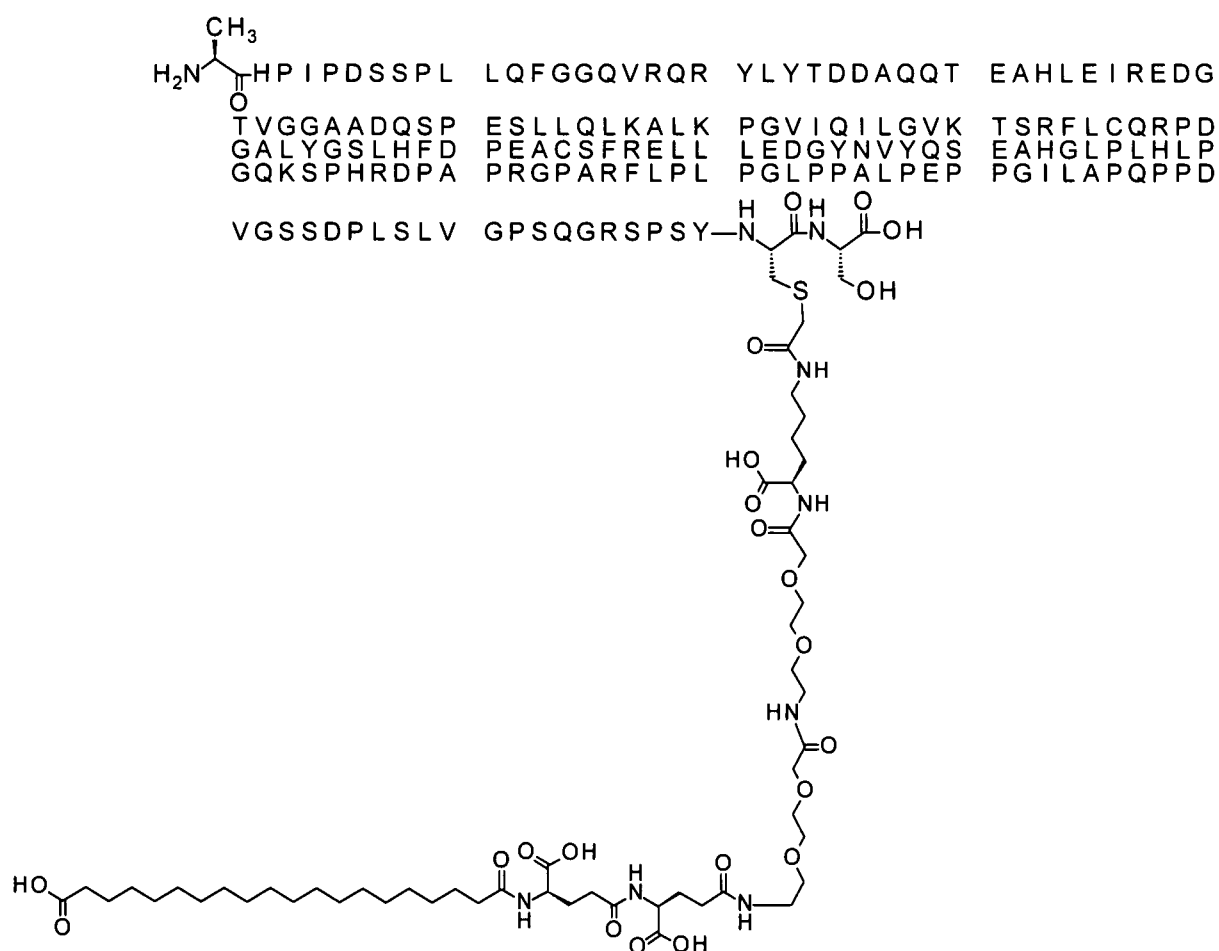


【0510】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.11 之試劑 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸製備。

實施例 5.25： 化合物 44

4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-乙醯胺基-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]磺醯基胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

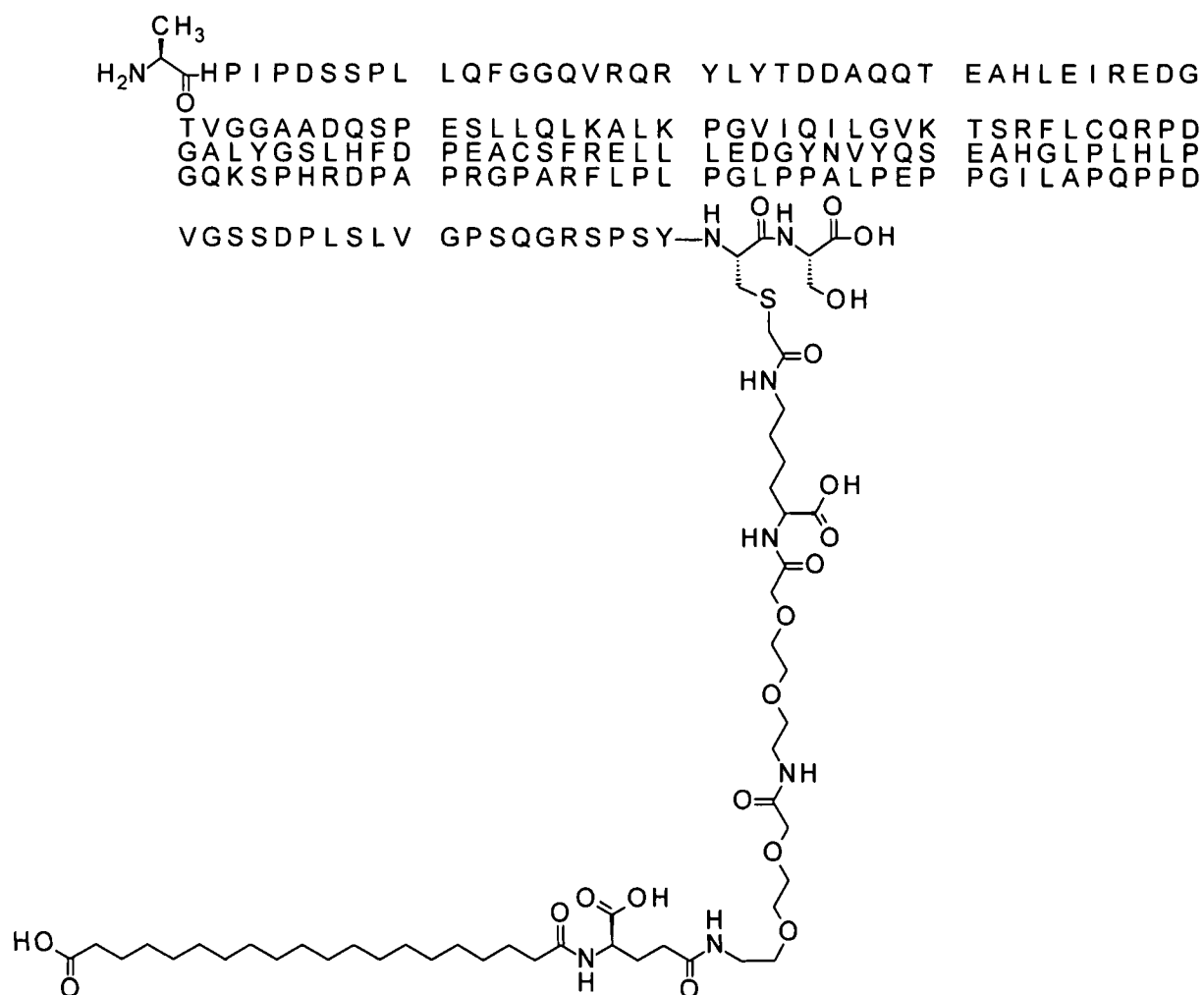


【0512】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物（參見實施例 3）之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.12 之試劑 20-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-20-側氧基-花生酸製備。

實施例 5.27： 化合物 46

20-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-乙醯胺基-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙

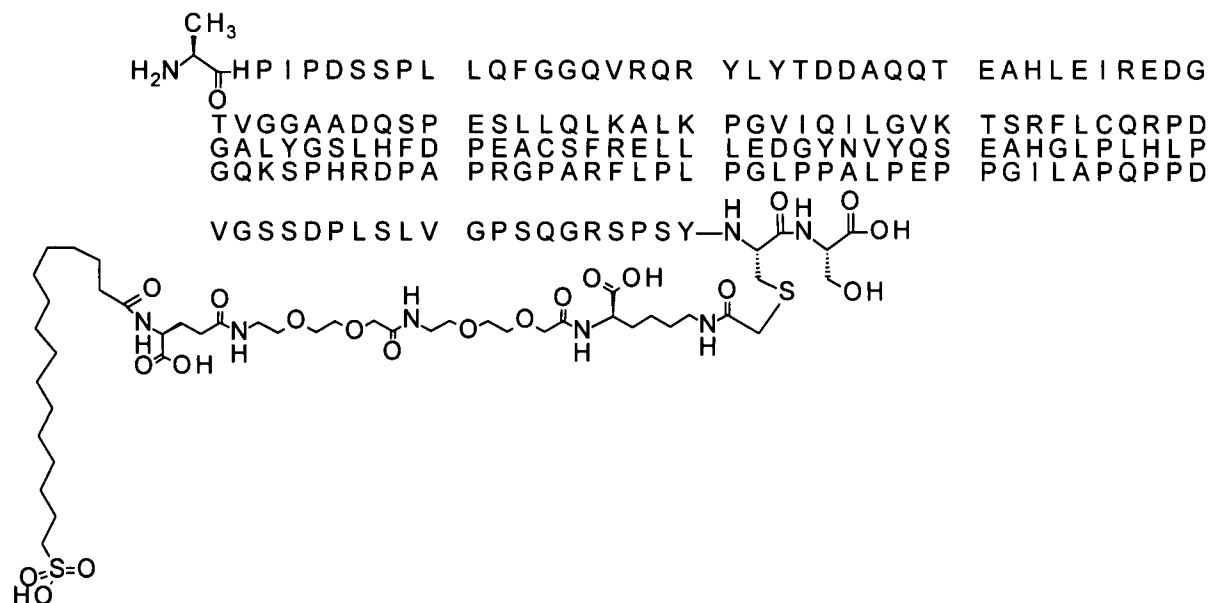
氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-20-側氧基-花生酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



【0513】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物（參見實施例 3）之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.13 之試劑 20-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-20-側氧基-花生酸製備。

實施例 5.28：化合物 47

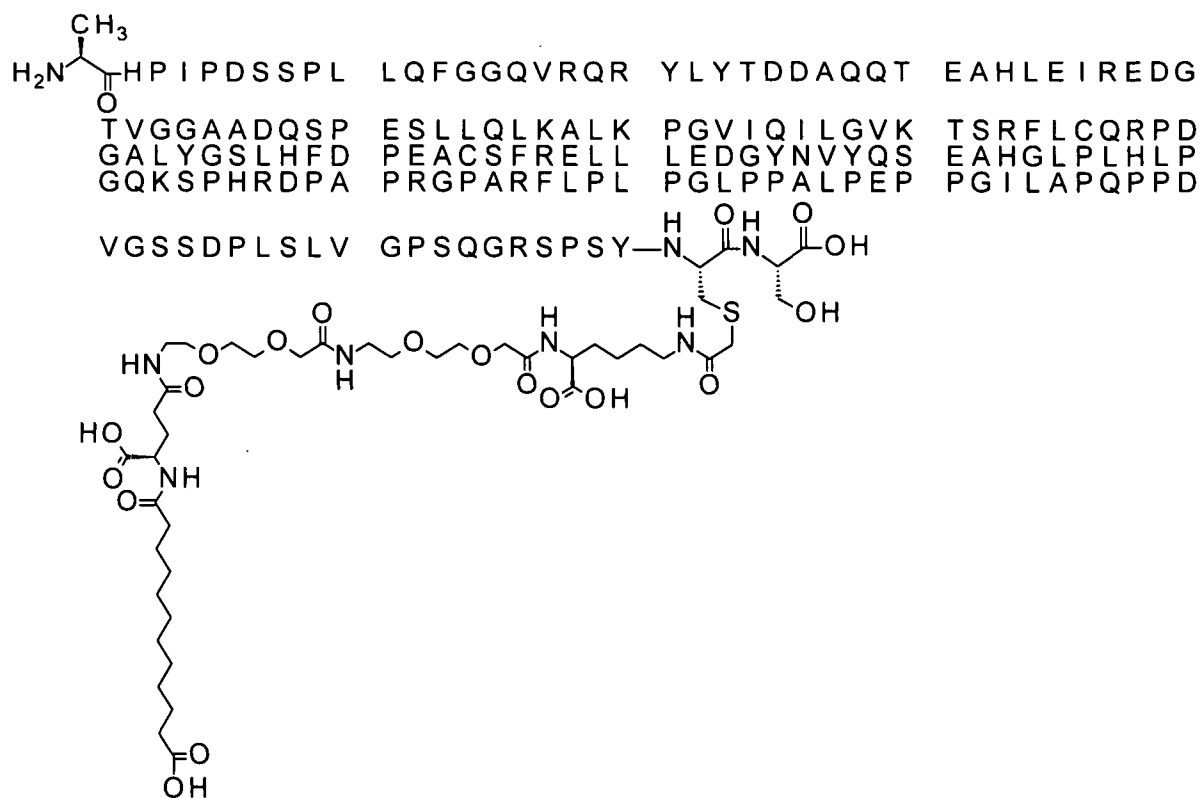
(2S)-6-乙醯胺基-2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(16-磺酸基十六烷醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]十六烷酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



【0514】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.14 之試劑 (2S)-6-[(2-溴乙醯基)胺基]-2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(16-磺酸基十六烷醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]己酸製備。

實施例 5.29：化合物 48

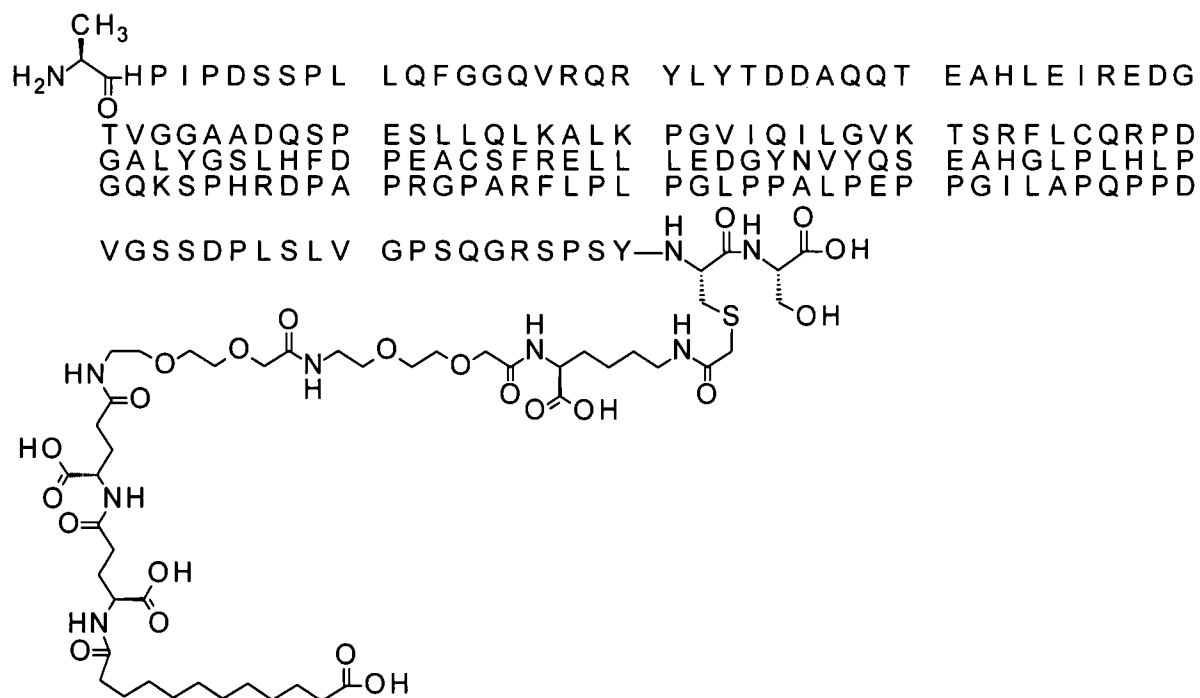
12-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-乙醯胺基-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-12-側氧基-十二烷酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



【0515】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物（參見實施例 3）之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.16 之試劑 12-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-12-側氧基-十二烷酸製備。

實施例 5.30：化合物 49

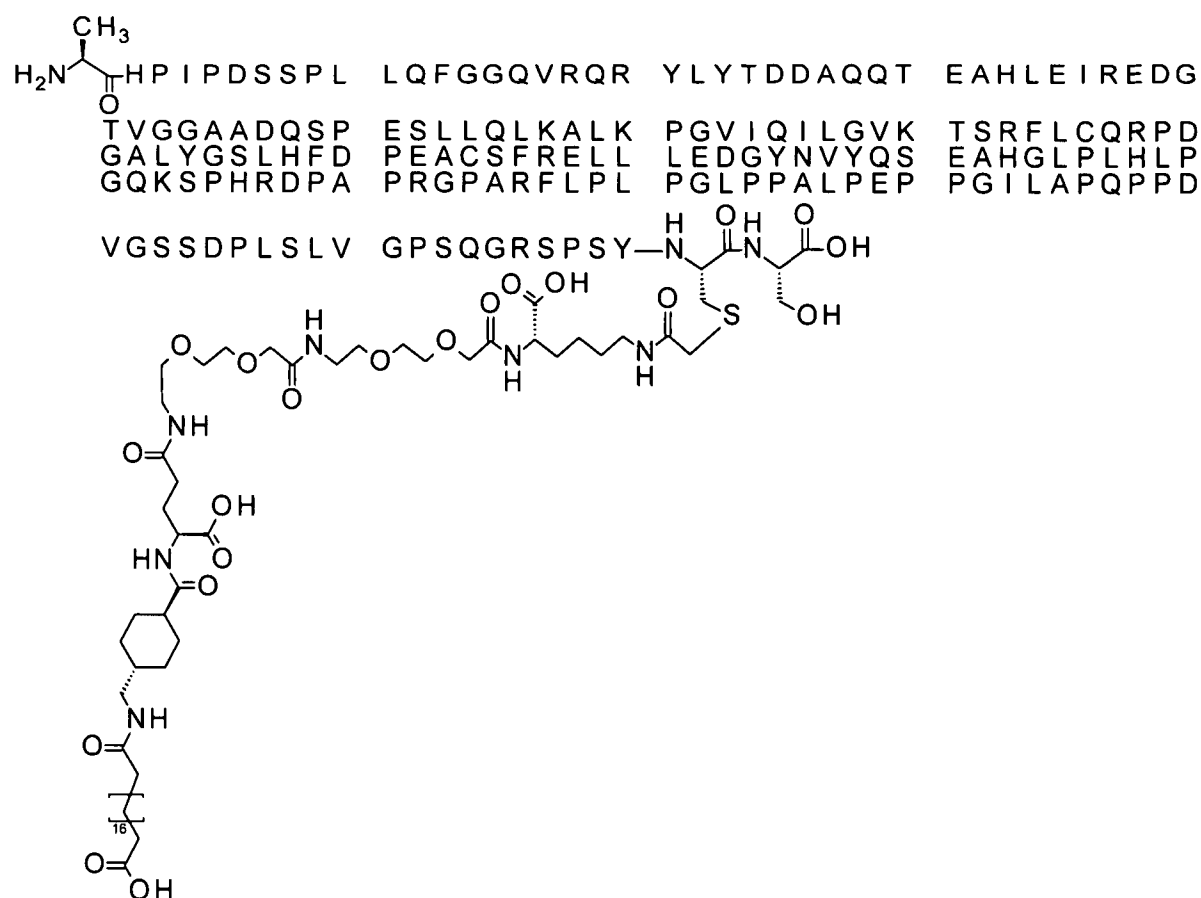
12-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-乙醯胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-12-側氧基-十二烷酸
 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



【0516】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物（參見實施例 3）之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.15 之試劑 12-[[[(1S)-4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-12-側氧基-十二烷酸製備。

實施例 5.31：化合物 50

20-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-乙醯胺基)-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-20-側氧基-花生酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

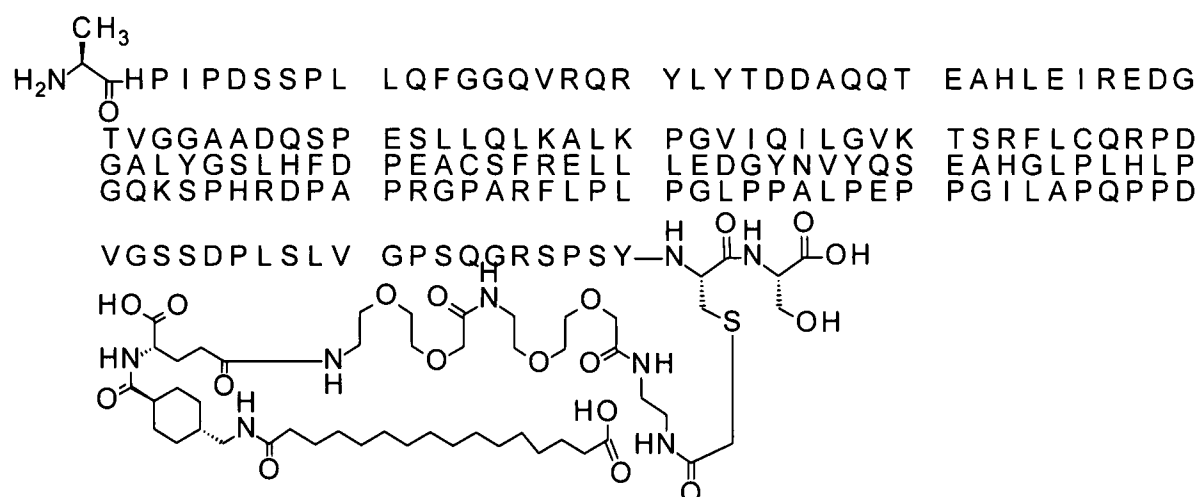


【0517】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.17 之試劑 20-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-20-側氧基-花生酸製備。

實施例 5.32：化合物 51

16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2-乙醯胺基乙基胺基)-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺

甲醯基]環己基]甲基胺基]-16-側氧基-十六烷酸
-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

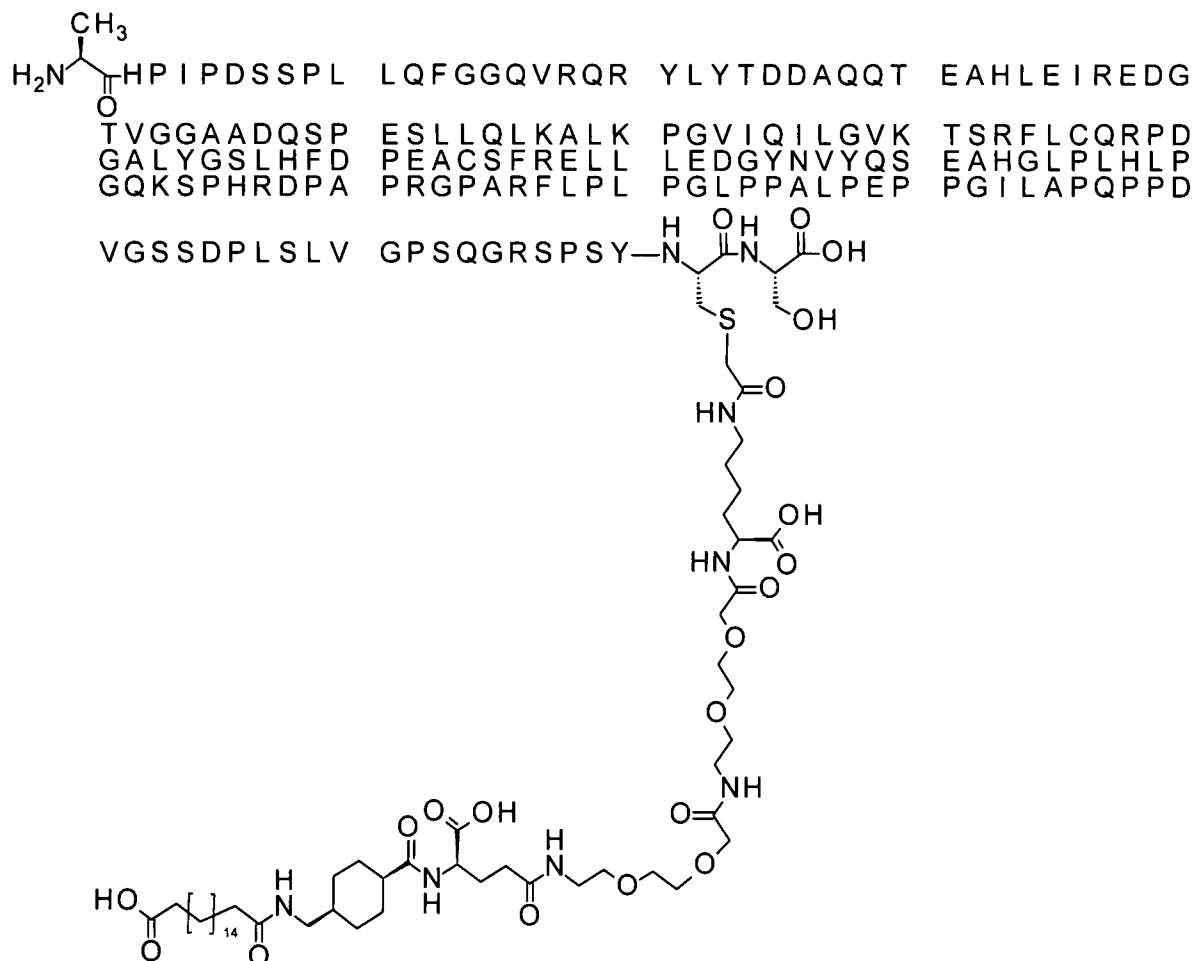


【0518】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.7 之試劑 16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-16-側氧基-十六烷酸製備。

實施例 5.33：化合物 52

16-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-乙醯胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-16-側氧基-十六烷酸
-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-18-側氧基-十八烷酸
-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21

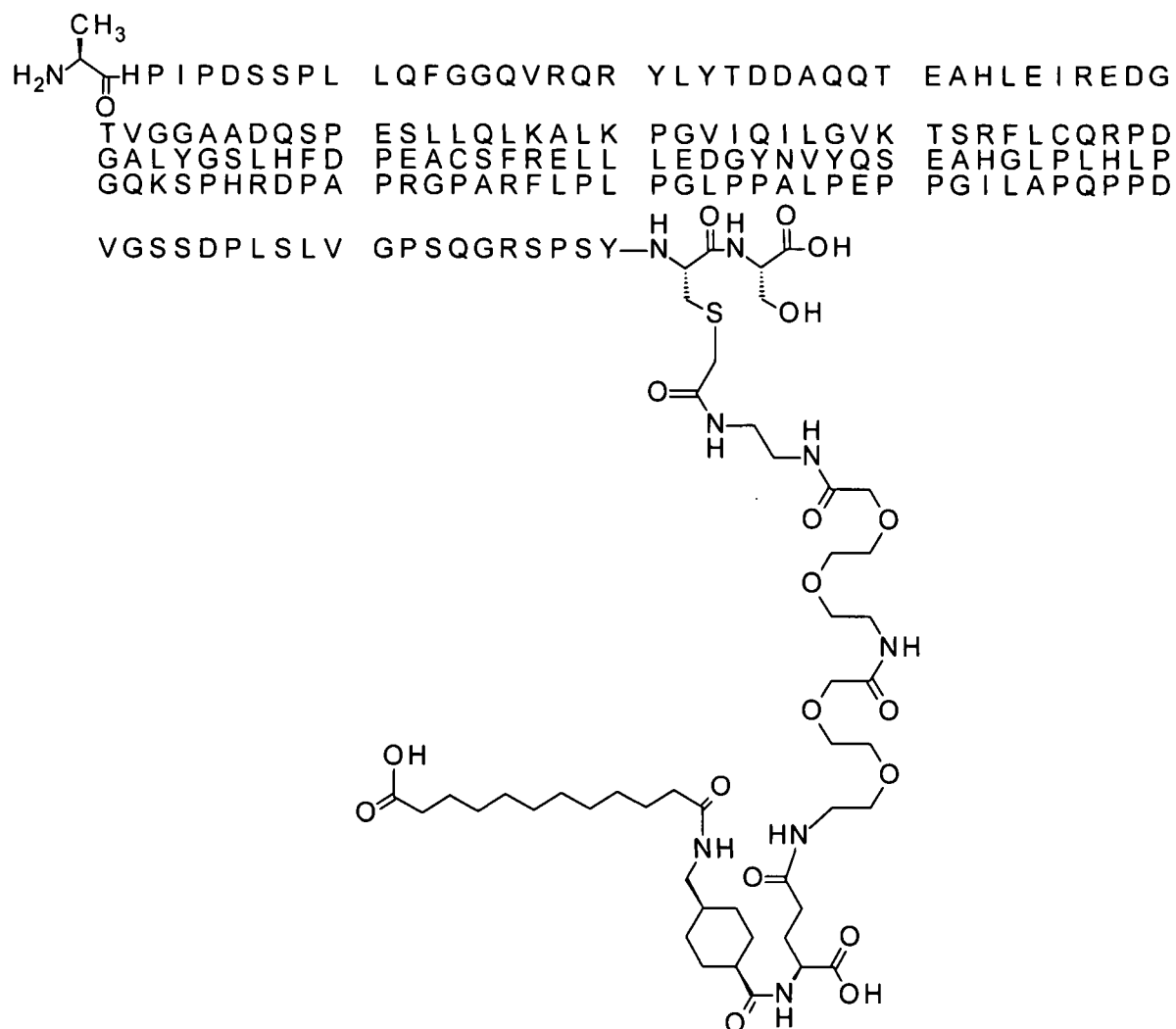


【0520】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.8 之試劑 18-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-18-側氧基-十八烷酸製備。

實施例 5.35： 化合物 54

12-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-乙醯胺基乙基胺基)-2-側氧基-乙氧基]乙氧

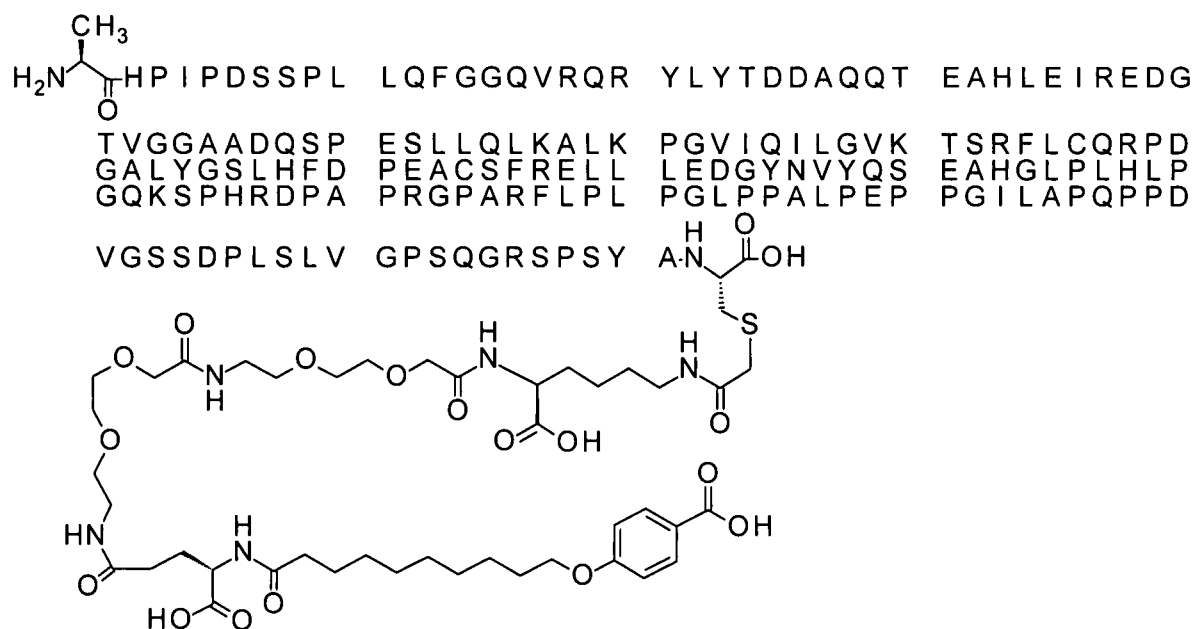
基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺
 甲醯基]環己基]甲基胺基]-12-側氧基-十二烷酸
 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21



【0521】 此化合物係 SEQ ID NO: 8 之 FGF21 類似物 (參見實施例 3) 之衍生物, 其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.6 之試劑 12-[[4-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-溴乙醯基)胺基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺甲醯基]環己基]甲基胺基]-12-側氧基-十二烷酸製備。

實施例 5.36 : 化合物 55

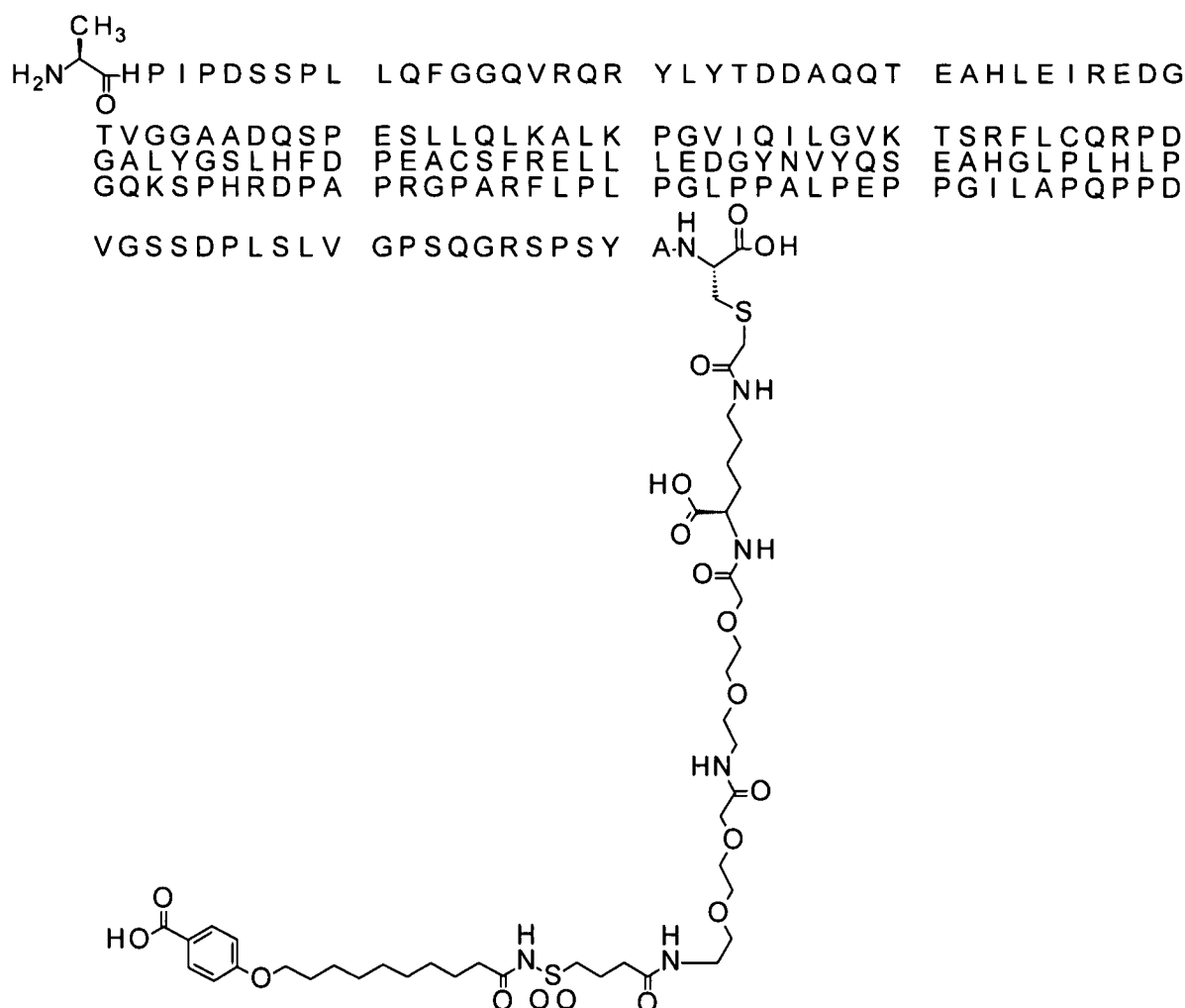
4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-乙醯胺基-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



【0522】 此化合物係 SEQ ID NO: 10 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.11 之試劑 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-1-羧基-4-側氧基-丁基]胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸製備。

實施例 5.37：化合物 56

4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-乙醯胺基-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]磺醯基胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21



【0523】 此化合物係 SEQ ID NO: 10 之 FGF21 類似物(參見實施例 3) 之衍生物，其係藉由實施例 5.1 中描述的方法使用實施例 4.10 之試劑 4-[10-[[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(1S)-5-[(2-溴乙醯基)胺基]-1-羧基-戊基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-4-側氧基-丁基]磺醯基胺基]-10-側氧基-癸氧基]苯甲酸製備。

醫藥方法

【0524】 本發明之 FGF21 類似物或其衍生物作為在哺乳類動物（諸如人類）中減少增重及治療肥胖與糖尿病的醫藥活性劑的實用性可藉由該 FGF21 促效劑於以下描述的習用分析及試管內與活體內分析中的活性展

示。

【0525】 此等分析亦提供一種方法，藉其本發明之 FGF21 化合物之活性可與已知化合物之活性相比較。

實施例 6：在過度表現人類 BKL 的 HEK293 中於 Erk 磷酸化分析中的 FGF 受體效力

【0526】 此實施例之目的係為試管內測試 FGF21 衍生物之活性（或效力）。試管內效力係在全細胞分析中 FGF 受體活化之度量。

【0527】 實施例 5 之 FGF21 衍生物之效力係如以下進一步描述地於過度表現人類貝他-klotho（BKL）的 HEK（人類胚胎腎臟細胞，Human Embryonic Kidney cells）中測定。

【0528】 為了測試 FGF21 衍生物與白蛋白之結合，該分析係在缺乏血清白蛋白下以及在人類血清白蛋白（human serum albumin，HSA）（0.1% 最終分析濃度）的存在下進行。對 FGF21 衍生物而言，在血清白蛋白的存在下 EC50 值增加（效力減低）會象徵與血清白蛋白結合且表示一種在動物模型中預測測試物質之延長的藥物動力學輪廓的方法。

【0529】 對 FGF21 類似物的結果係於表 2 顯示且對 FGF21 衍生物的結果係於表 3 顯示。將 MetFGF21（SEQ ID NO: 2）包含在內作為參考。

分析原理

【0530】 HEK293 細胞內源地表現數種 FGF 受體，包含 FGFR1c、FGFR3c 與 FGFR4。在以共受體貝他-klotho（BKL）轉染前，此等細胞對 FGF21

係非反應性的。FGF 受體/BKL 複合物之活化導致 MAPK/ERK 傳訊途徑之活化與 ERK 之磷酸化。在給定時間點經磷酸化的 ERK (pERK) 之水平隨著 FGF21 之濃度增加而增加。如以下描述的，pERK 之水平係於以某範圍的 FGF21 類似物濃度刺激 12 分鐘後測量。

分析描述

【0531】 將 HEK293/貝他-klotho 細胞以 30,000 個細胞/槽孔接種在 96 槽孔盤，其係在 DMEM (BioWhittaker #BE12-604F/U1) 中，而 DMEM 係以 10% FCS (Gibco #16140-071)、1% 青黴素/鏈黴素 (Gibco #15140)、100 µg/ml 濕黴素 B (Calbiochem, # 400052) 補充。兩天後，且在加入化合物前 2 個小時前，將細胞培養基換成 100 µl 基礎培養基 (DMEM (BioWhittaker #BE12-604F/U1))。將 FGF21 類似物以分析培養基 (DMEM (BioWhittaker #BE12-604F/U1)，以 0.02% Tween20 補充) 稀釋，加熱至 37 °C，加至細胞 (100 µl) 並於 37 °C 培養 12 分鐘。亦在 0.1% HSA (Sigma - A1887) 的存在下測試 FGF21 衍生物。將所有的培養基快速地移除並對每槽孔加入 50 µl 溶胞緩衝劑。將盤搖晃 5 分鐘而溶胞產物就準備好用於測量 pERK。pERK 係於 384 槽孔盤中以 AlphaScreen SureFire 套組 (PerkinElmer #TGRES10K) 測量。此套組係基於偶合至供體與接受體珠粒的 ERK 與 pERK 專一性抗體。pERK 之存在會使接受體與供體珠粒彼此靠近且產生被 EnVision 讀取的訊號。數據係使用 GraphPad Prism 分析且 FGF21 蛋白質之效力係以絕對 EC₅₀ 值的形式描述。

表 2A.於 HEK293/BKL 細胞中 FGF21 類似物之效力

化合物	化合物名稱	EC50 (nM)
1	MetFGF21	1.8
2	Ala[Gln121,Leu168]FGF21	2.0
3	S{ 貝他 -176}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys176]FGF21	227
4	Ala[Gln121,Leu168,Cys177]FGF21	416
5	S{ 貝他 -178}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	105
6	S{ 貝他 -179}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	69
7	S{ 貝他 -180}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	2.3
8	S{ 貝他 -180}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	20
9	S{ 貝他 -181}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	27

【0532】 如可自表 2 中的結果看到的，相較於 MetFGF21，在位置 176、177、178 或 179 導入半胱胺酸顯著地使效力減低。然而，令人意外地，相較於 MetFGF21，在位置 180 或在位置 181 導入半胱胺酸並未導致效力減低（180C）或適度地使效力減低（181C）。化合物 7（其在位置 180 具有半胱胺酸）顯示 MetFGF21 與化合物 2（其除了在位置 180 的半胱胺酸外與化合

物 8 具有相同的胺基酸改變) 兩者皆類似的效力。

【0533】 相較於 MetFGF21 以及化合物 2 (其除了在位置 181 的半胱胺酸外與化合物 9 具有相同的胺基酸改變), 在位置 181 具有半胱胺酸的化合物 9 之效力僅稍微減低。

表 2B. 於 HEK293/BKL 細胞中其他 FGF21 類似物之效力

化合物	化合物名稱	EC50 (nM)
25	Ala[Gln121,Cys167,Leu168,]FGF21	4
26	Ala[Gln121,Cys168]FGF21	492
27	Ala[Gln121,Leu168,Cys169]FGF21	22
28	Ala[Gln121,Leu168,Cys170]FGF21	7
29	Ala[Gln121,Leu168,Cys171]FGF21	8
30	Ala[Gln121,Leu168,Cys172]FGF21	5
31	Ala[Gln121,Leu168,Cys173]FGF21	4
32	Ala[Gln121,Leu168,Cys174]FGF21	5
33	Ala[Gln121,Leu168,Cys175]FGF21	11

【0534】 可以看到具有 C168 胺基酸取代的化合物#26 效力減低, 而在位置 167、169、170、171、172、173、174 與 175 具有半胱胺酸的類似物令人意外地效力類似於 MetFGF21。

表 3A. 在缺乏 0.1 % HSA 下或在 0.1 % HSA 的存在下於 HEK293/BKL 細胞中 FGF21 衍生物之效力。

化合物	蛋白質骨架	延伸子元件	EC50 (nM)	EC50 (0.1% HSA) (nM)
11	Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	C16 二酸	167	137
12	Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	C16 二酸	107	134
13	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C12 二酸	7	4
14	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C14 二酸	6	6
15	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C16 二酸	4	6
16	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C18 二酸	5	48
17	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C20 二酸	5	133
18	Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21	C18 二酸	8	20
19	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C12 二酸	154	137
20	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C14 二酸	58	41
21	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C16 二酸	55	72
22	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C18 二酸	42	170
23	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C20 二酸	58	434
24	Met[Cys181]FGF21	C18 二酸	16	71

【0535】 如可自表 3A 中的結果看到的，令人意外地發現相較於不具側鏈的化合物（參見表 2），將本發明之側鏈接附至在位置 178-181 之任一者的半胱胺酸不會導致效力減低。化合物 11、12、15 與 21 皆包含相同的側鏈，其中延伸子元件係 C16 二酸（Chem. 1a）（連接子元件係一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3a 元件、與一個 Chem. 4a 元件）。當與相對應 FGF21 類似物（化合物 5、6、7、與 9，參見表 2）之效力比較時，可以看到此等 FGF21 衍生物之效力與相對應 FGF 類似物（即不具有側鏈）類似。

【0536】 已探究對具有不同脂肪酸鏈長度的延伸子元件的化合物之

效力的功效。在缺乏 HSA 下，在位置 180 具有半胱胺酸的 FGF 衍生物之效力與具有 C12 二酸、C14 二酸、C16 二酸或 C18 二酸作為延伸子元件的 FGF21 衍生物之效力類似。在缺乏 HSA 下，在位置 181 具有半胱胺酸的 FGF 衍生物之效力與具有 C14 二酸、C16 二酸、C18 二酸或 C20 二酸作為延伸子元件的 FGF21 衍生物類似。

【0537】 增加 HSA 濃度對包含 C12、C14 或 C16 側鏈的衍生物之效力無功效或僅有適度的功效，而在 0.1% HSA 的存在下具有 C18 或 C20 側鏈的化合物之效力減低。

【0538】 如可自表 3A 看到的，對 FGF21 衍生物而言，相較於沒有血清白蛋白的 EC50 值，在 0.1% 血清白蛋白的存在下 EC50 值之增加與延伸子之長度之增加一致。此與此等 FGF21 衍生物之半生期之增加對應良好（參見實施例 8）。

表 3B. 在缺乏 0.1 % HSA 下或在 0.1 % HSA 的存在下於 HEK293/BKL 細胞中其他 FGF21 衍生物之效力。

化合物	蛋白質骨架	延伸子元件	EC50 (nM)	EC50 (0.1% HSA) (nM)
34	-1A, 121Q, 168C	C14 二酸	667	4264
35	-1A, 121Q, 168L, 169C	C16 二酸	25	20
36	-1A, 121Q, 168L, 170C	C18 二酸	1	20
37	-1A, 121Q, 168L, 173C	C16 二酸	3	4
38	-1A, 121Q, 168L, 174C	C14 二酸	4	4
39	-1A, 121Q, 168L, 174C	C18 二酸	1	1
40	-1A, 121Q, 168L, 174C	C16 二酸	2	4
41	-1A, 121Q, 168L, 175C	C16 二酸	1	1
42	-1A, 121Q, 168L, 176C	C16 二酸	214	373

【0539】 具有如以上所描述的不同 FGF21 骨架的 FGF21 衍生物之效力被進一步測試，且發現在位置 169、170、171、172、173、174 與 175 具有半胱氨酸的衍生物當以脂肪酸延伸子衍生化時皆維持了效力。注意到在 Cys 169 的衍生化稍微減低效力。

表 3C. 在缺乏 0.1 % HSA 下或在 0.1 % HSA 的存在下於 HEK293/BKL 細胞中其他 FGF21 衍生物之效力。

化合物	蛋白質骨架	延伸子元件	EC50 (nM)	EC50 (0.1% HSA) (nM)
43	-1A, 121Q, 168L, 180C	4-COOH-PhO-C10	5,0	3
44	-1A, 121Q, 168L, 180C	4-COOH-PhO-C10	3,2	4
45	-1A, 121Q, 168L, 180C	C20 二酸	10,3	65,5
46	-1A, 121Q, 168L, 180C	C20 二酸	6,1	52,5
47	-1A, 121Q, 168L, 180C	磺酸-C16	4,2	7,1
48	-1A, 121Q, 168L, 180C	C12 二酸	8,4	3,4
50	-1A, 121Q, 168L, 180C	C12 二酸	7,9	6,1
50	-1A, 121Q, 168L, 180C	C20 二酸	4.0	35,5
51	-1A, 121Q, 168L, 180C	C16 二酸	3,5	3,2
52	-1A, 121Q, 168L, 180C	C16 二酸	4.0	2,1
53	-1A, 121Q, 168L, 180C	C18 二酸	4,0	14.0
54	-1A, 121Q, 168L, 180C	C12 二酸	4.0	4,7
55	-1A, 121Q, 168L, 181C	4-COOH-PhO-C10	26.4	138
56	-1A, 121Q, 168L, 181C	4-COOH-PhO-C10	24.7	132

【0540】 為比較其他保護性元件，測試了不同的延伸子與連接子之組合。所有皆被共軛至 Cys 180 或 Cys 181，且觀察到所獲得的 FGF21 衍生物之功能性頗類似，證明當共軛至 FGF21 Cys（諸如 Cys 180 或 Cys 181）時可使用各種各樣的保護子元件。

實施例 7：於 3T3-L1 脂肪細胞中的葡萄糖吸收

【0541】 對 C 端經修改的類似物測試其等於 3T3-L1 小鼠脂肪細胞中增加葡萄糖吸收的能力。使用以下的分析以測定本發明之 FGF21 類似物與衍生物之生物活性（或效力）。

分析原理

【0542】 試管內效力亦可藉由對 FGF21 類似物與衍生物測試其等增加葡萄糖被吸收至脂肪細胞中的量的能力在使用小鼠 3T3-L1 脂肪細胞的分析中測定。經分化的 3T3-L1 脂肪細胞內源地表現 FGFR1c 與 BKL。3T3-L1 細胞對 FGF21 係非反應性的，直到其分化後，而此係因為分化會導致共受體 BKL 之表現。FGFR1 受體/BKL 複合物之活化會增加葡萄糖轉運子 1（GLUT1）之表現且因此 FGF21 促效劑會導致葡萄糖被攝入脂肪細胞中的量以劑量反應性的方式增加。

分析描述

【0543】 將小鼠 3T3-L1 纖維母細胞（例如可自 ATCC 獲得，目錄編

號 CL-173) 維持在基礎培養基 (DMEM (4500 mg/l 葡萄糖), 具有 10%胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 與 1%青黴素/鏈黴素) 中。不讓細胞達到匯合且應在細胞達到大約 60%的匯合度 (藉由目視檢查) 之前將細胞繼代 (移至新的小瓶)。

【0544】 對於葡萄糖吸收分析, 細胞係以 15,000 個細胞/槽孔種在 96 槽孔盤 (BIO 塗覆) 中, 且當細胞達到匯合 (高密度, 看到有經分化的脂肪細胞) 時, 將培養基自基礎培養基換成含有曲格列酮 (Troglitazone)、IBMX、地塞米松 (可自 (例如) Sigma 商業上購得) 與人類胰島素 (可自 (例如) 諾和諾德公司 (Novo Nordisk A/S) 商業上購得) 的基礎培養基。細胞係於開始分化後 7-9 日後使用。將細胞在基礎培養基中以漸增濃度 (0-300 nM) 的本發明之 FGF21 類似物或衍生物刺激 20 個小時。在加入 3H-去氧-葡萄糖 (以下稱為示跡劑) 之前, 將細胞在溫暖的 (大約 37 °C) 分析緩衝劑 (PBS, 其具有 1 mM MgCl₂ 與 2 mM CaCl₂)、HEPES 與 0.1%人類血清白蛋白) 中洗滌並將細胞以示跡劑培養 1 個小時。此培養係藉由在冰冷的分析緩衝劑中洗滌兩次來終止。將細胞以 Triton X-100 溶胞並將溶胞產物轉移至 96 槽孔盤, 添加 microscint-40 (可自 (例如) 珀金埃爾默 (Perkin Elmer) 商業上購得) 且在 TOP-計數器 (例如來自珀金埃爾默的 Packard top-計數器) 中計數示跡劑之量。計算所關注的 FGF21 化合物之 EC₅₀ 與 E_{max}。以下表 4-5 中顯示的結果分別象徵 FGF21 類似物與衍生物之 EC₅₀ (效力) 與 E_{max} (效力)。

表 4：FGF21 類似物之在 3T3-L1 脂肪細胞中的葡萄糖吸收

化合物	化合物名稱	葡萄糖吸收 EC50 (nM)	葡萄糖吸收 Emax (%)
1	MetFGF21	1.2	100
2	Ala[Gln121,Leu168]FGF21	3.1	85
3	S{ 貝他 -176}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys176]FGF21	73	84
4	Ala[Gln121,Leu168,Cys177]FGF21	ND	ND
5	S{ 貝他 -178}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	50	69
6	S{ 貝他 -179}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	25	77
7	S{ 貝他 -180}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	2.6	102
8	S{ 貝他 -180}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	73	72
9	S{ 貝他 -181}-2- 胺基乙基氫硫基 -Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	5.0	74

表 5.FGF21 衍生物之在 3T3-L1 脂肪細胞中的葡萄糖吸收

化合物	蛋白質骨架	延伸子 元件	葡萄糖 吸收 EC50 (nM)	葡萄糖 吸收 Emax (%)
11	Ala[Gln121,Leu168,Cys178]FGF21	C16 二酸	186	59
12	Ala[Gln121,Leu168,Cys179]FGF21	C16 二酸	107	54
13	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C12 二酸	2.7	87
14	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C14 二酸	6.7	106
15	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C16 二酸	9.1	98
16	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C18 二酸	32	109
17	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C20 二酸	24	53
18	Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	C18 二酸	8	71
19	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C12 二酸	ND	ND
20	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C14 二酸	7.2	55
21	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C16 二酸	31	61
22	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C18 二酸	56	73
23	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C20 二酸	410	57
24	Met[Cys181]FGF21	C18 二酸	37	-

【0545】 由於 FGF21 衍生物之側鏈結合至白蛋白，且由於在基礎分析培養基中存在血清而因此存在白蛋白，FGF21 衍生物（表 5）相較於相對應 FGF21 類似物（表 4）具有較低的效力。效力之減低與延伸子元件之長度相互關連。

實施例 8：在迷你豬與小鼠中的藥物動力學研究

【0546】 此研究之目的係去測定 FGF21 衍生物在 i.v. 投予至迷你豬與小鼠後的活體內延長，即其等在體內的時間之延長與藉此其等之作用時間之延長。此係在藥物動力學 (PK) 研究中完成，其中測定了所關注的類似物之最終半生期。最終半生期意指在最終清除相中某個血漿濃度減半所需的時間。

在迷你豬中的研究

【0547】 將年齡大約 7-14 個月且重量大約 16-35 kg 的獲自 Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmose, 丹麥) 的雌性哥丁根 (Göttingen) 迷你豬用於研究。使迷你豬獨居 (具有永久性導管的豬) 或群居並以 SDS 迷你豬膳食 (Special Diets Services, 艾色克斯 (Essex), UK) 限制性地每日餵食一次或兩次。

【0548】 在馴化至少 2 週後，將兩個永久性中樞靜脈導管植入各動物之尾側腔靜脈或頭側腔靜脈中。手術後，給予動物 1 週以恢復，接著將動物反復地用於藥物動力學研究，在成功地給藥間有適合的洗除期。

【0549】 透過一個導管或透過插管 (venflon) 靜脈內注射 (體積對應於例如 0.050-0.125 mL/kg) 化合物，並在預定的時間點採取血液樣本直到給藥後 11 天 (較佳係透過另外的導管或藉由靜脈穿刺)。

【0550】 以經 EDTA (8mM) 塗覆的管子收集血液樣本 (例如 0.8 mL) 並接著於 4°C 與 1942G 將其離心 10 分鐘。血液樣本被適當地收集以覆蓋 API 之整個血漿濃度-時間輪廓。在實施例中，血液樣本係於 t= 給藥前、給藥後 0.0833、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、10、24、30、48、72、96、

120、144、168、192、216、240、264 個小時收集。

【0551】 將血漿以移液管移至在乾冰上的 Micronic 管，並將其保存於 -20°C 直到使用 ELISA 分析個別 FGF-1 類似物之血漿濃度。個別的血漿濃度-時間輪廓係藉由 Phoenix v. 6.3 (Pharsight Inc, Mountain View, CA, USA)、或其他用於 PK 分析的相關軟體中的非腔室 (non-compartmental) 藥物動力學方法分析，並測定所得的最終的半生期 (調和平均)。FGF21 衍生物之最終半生期係兩個使用不同劑量的測量之算術平均數，如以上所解釋的。

在小鼠中的研究

【0552】 FGF21 類似物之藥物動力學輪廓係於正常的瘦的 57bl 小鼠， $n = 2-3$ (大約 30 公克) 中測試。FGF21 化合物係以 20 mg/kg (大約 5 mL/kg) 的單一靜脈內劑的形式給藥。

【0553】 FGF21 化合物之血漿水平係使用纖維母細胞生長因子-21 人類 ELISA (可自 BioVendor 獲得，目錄編號 RD191108200R) 測定。使用基於 PC 的軟體 (得自 Pharsight Corporation, Cary N.C. 的 WinNonLin 第 6.3 版) 以用於藥物動力學計算。結果於表 6 中提供。

表 6：FGF21 類似物之藥物動力學特徵。

化合物	蛋白質骨架	延伸子元件	半生期 小鼠 (小時)	半生期 迷你豬 (小時)
1	MetFGF21	-	1	2
13	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C12 二酸	1	ND
14	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C14 二酸	1	3
15	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C16 二酸	3	23
16	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C18 二酸	12	70
17	Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21	C20 二酸	ND	ND
18	Ala[Gln121,Leu168,Cys180, des181]FGF21	C18 二酸	ND	ND
19	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C12 二酸	1	
20	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C14 二酸	3	2
21	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C16 二酸	4	25
22	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C18 二酸	14	85
23	Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21	C20 二酸	19	ND
24	Met[Cys181]FGF21	C18 二酸	12	ND

【0554】 如可自表 6 看到的，在迷你豬與小鼠兩者中，血漿半生期皆隨著延伸子元件之脂肪酸鏈之長度增加。

實施例 9：瘦的小鼠中的體重減少

【0555】 為了測定 FGF21 衍生物之活體內效力，對體重的功效係在瘦的 C57BL 小鼠中於皮下 (s.c.) 投予後研究。先前已有人顯示由 FGF21 誘發的在瘦的小鼠中的重量喪失對在肥胖小鼠中的功效有預測性且因此瘦的

小鼠被認為是良好的篩選模型。

【0556】 將化合物以 1 mg/kg 每日 s.c.投予一次 (QD) 或兩次 (BID) 共 7 天 (n=7-8), 其係在 10mM 磷酸鹽、2% (w/vol) 甘油、500ppm (=0.05%) 聚山梨醇酯 80, pH=8.15, (2 mL/kg)。各自的媒劑處理組 (對照組) 係以 10mM 磷酸鹽、2% (w/vol) 甘油、500ppm (=0.05%) 聚山梨醇酯 80, pH=8.15, (2 mL/kg) s.c.每天處理兩次共 7 天 (n=6-8)。體重係在給藥前測量並在處理 7 天後再次測量。結果可於表 7 中看到。

表 7: 自第 1 天至第 7 天體重自基線的改變 (版分比)

化合物	給藥	n/組	平均 Δ體重 (%)	SD Δ體重 (%)
媒劑	BID	8	2.84	2.65
1	BID	8	-1,88**	2.52
2	BID	8	-1,98**	3.33
14	QD	8	1.85	3.33
15	QD	8	-4,48***	2.41
16	QD	8	-10,59***	3.39
21	QD	8	0.18	2.12
媒劑	BID	6	0.44	3.27
13	BID	8	-2.04	1.30
14	BID	8	-3.09*	1.61
19	BID	7	0.04	1.11
20	BID	8	-0.94	2.94

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 單因子 ANOVA 事後 Dunnet 氏測試 (One-way ANOVA post hoc Dunnet's test), 比較化合物對個別的媒劑, n=6-8

【0557】 以體重之喪失之形式測量的在位置 180 具有側鏈的 FGF21 衍生物之活體內效力比在位置 181 具有相同的側鏈的衍生物之活體內效力高。因此，活體內效力與試管內效力相互有關。對體重減低的功效係取決於血漿半生期。若血漿半生期短則每日給藥兩次會增加效力。

【0558】 雖然本發明之某些特徵已於本文舉例說明與描述，所屬技術領域中具有通常知識者現可想到許多修飾、取代、改變、與等同物。因此，應瞭解所附申請專利範圍意欲涵蓋所有落入本發明之真正精神的如此修飾與改變。

【符號說明】

無

53662.seq.txt

序列表

<110> 諾佛·儂迪克股份有限公司

<120> FGF21衍生物及其用途

<130> 140109TW01

<160> 20

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

53662.seq.txt

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

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

Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 2
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro

53662.seq.txt

130

135

140

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 3
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

53662.seq.txt

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 4
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

53662.seq.txt

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

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

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

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

Cys Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 5
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 5

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

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

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

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

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

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

53662.seq.txt

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

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

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

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

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

Ser Cys Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 6
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 6

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

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

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

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

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

Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe

53662.seq.txt

85

90

95

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

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

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

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

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

Ser Pro Cys Tyr Ala Ser
 180

<210> 7
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 7

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

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

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

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

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

53662.seq.txt

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Cys Ala Ser
180

<210> 8
<211> 182
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 8

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

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

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

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

53662.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Cys Ser
180

<210> 9
<211> 181
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 9

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

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

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

53662.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Cys
 180

<210> 10
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 10

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

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

His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln

53662.seq.txt

35

40

45

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Cys
 180

<210> 11
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 11

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

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

53662.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Cys
 180

<210> 12
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 12

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

53662.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 13
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 13

53662.seq.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 14
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

53662.seq.txt

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 15

<211> 182

<212> PRT

<213> 人工的

53662.seq.txt

<220>

<223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 16

53662.seq.txt

<211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

53662.seq.txt

<210> 17
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

53662.seq.txt

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 18
<211> 182
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

53662.seq.txt

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Cys Gly Arg
 165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 19
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp

53662.seq.txt

145 150 155 160

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Cys Arg
165 170 175Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 20
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 基於成熟的人類FGF21的人工蛋白質

<400> 20

Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln
1 5 10 15Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala
20 25 30His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln
35 40 45Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
50 55 60Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp
65 70 75 80Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe
85 90 95Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala
100 105 110His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Gln Lys Ser Pro His Arg Asp
115 120 125Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro
130 135 140

53662.seq.txt

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

Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Leu Val Gly Pro Ser Gln Gly Cys
165 170 175

Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
180

申請專利範圍

1. 一種 FGF21 蛋白質之衍生物，

其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子 (protractor)；其中該延伸子係選自以下者之群組：

Chem. 1A : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

Chem. 1B : $\text{HOOC}-\text{苯}-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 與

Chem. 1C : $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

其中 x 係範圍在 8-18 的整數；且

其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者的至少一者；

其中 Chem. 2 係選自：

$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 、

$*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 與

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{環己烷}-\text{CO}-*$ 、

其中 m 係範圍在 1-5 的整數，

其中 Chem. 3 係 $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數且 n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ 與

$*-\text{NH}-\text{C}(\text{OOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$

其中 m 係範圍在 1-5 的整數；且

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

2.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中 Chem. 1 係選自以下者之群組：

Chem. 1a : HOOC-(CH₂)₁₆-CO-*、

Chem. 1b : HOOC-苯-O-(CH₂)₉-CO-*與

Chem. 1c ; HO-S(=O)₂-(CH₂)₁₅-CO-*。

3.根據申請專利範圍第 1 項或第 2 項的衍生物，其中 Chem. 2 係選自以下者之群組：

Chem. 2a : *-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-*、

Chem. 2b : *-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-*與

Chem. 2c : *-NH-CH₂-環己烷-CO-*。

4.根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中 Chem. 4 係選自：

Chem. 4a : *-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*與

Chem. 4b : *-NH-C(OOH)-(CH₂)₄-NH-CO-CH₂-*。

5.根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、170、171、172、173、174、175、180 或 181，諸如成熟的人類 FGF21 之位置 180 的位置包含 Cys 殘基。

6.根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該蛋白質在一或多個

對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 121 或 168 之一或多者的位置包含胺基酸改變。

7. 根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該等胺基酸改變之一係在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之 N 端的位置加入 Ala 殘基。

8. 根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該蛋白質包含 121Q 與 168L 之一或多者，諸如 121Q 或 168L 或兩者。

9. 根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該蛋白質與成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80% 的一致性。

10. 根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該延伸子包含 Chem. 1a: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-*$ 。

11. 根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該連接子包含以下者之一、二或三者：

Chem. 2a: $*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-*$ 、

Chem. 3a: $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-*$ 與

Chem. 4a: $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ 。

12. 根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該連接子係由一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3 元件與一個 Chem. 4 元件所組成。

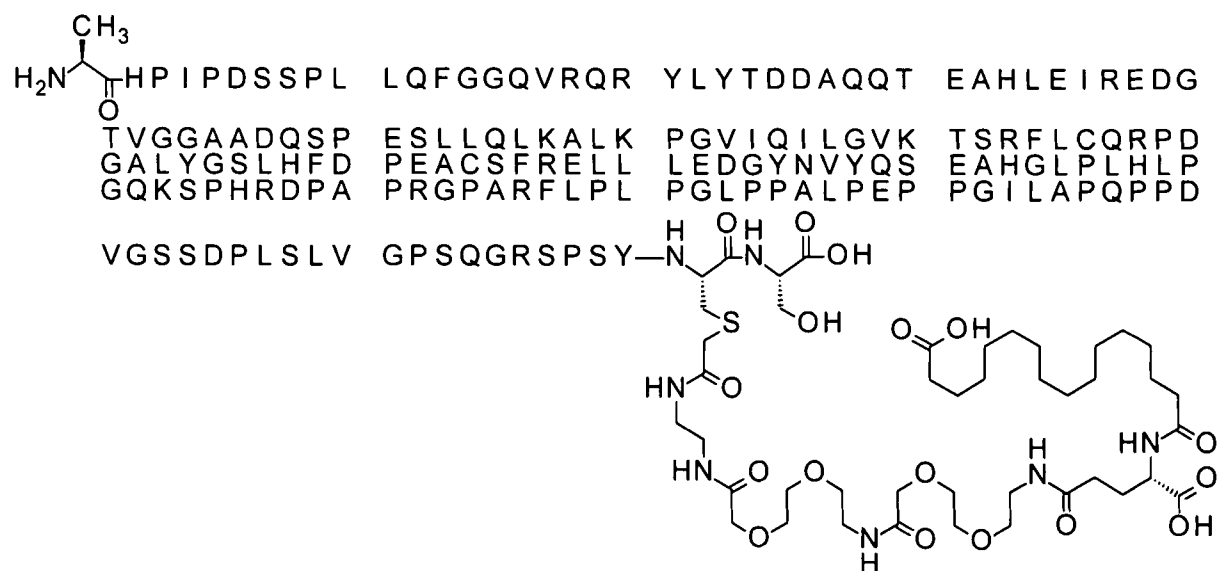
13. 根據前述申請專利範圍中任一項的衍生物，其中該衍生物係選自以下者之群組：

a. 化合物 13-24、

b. 化合物 35-41 及／或

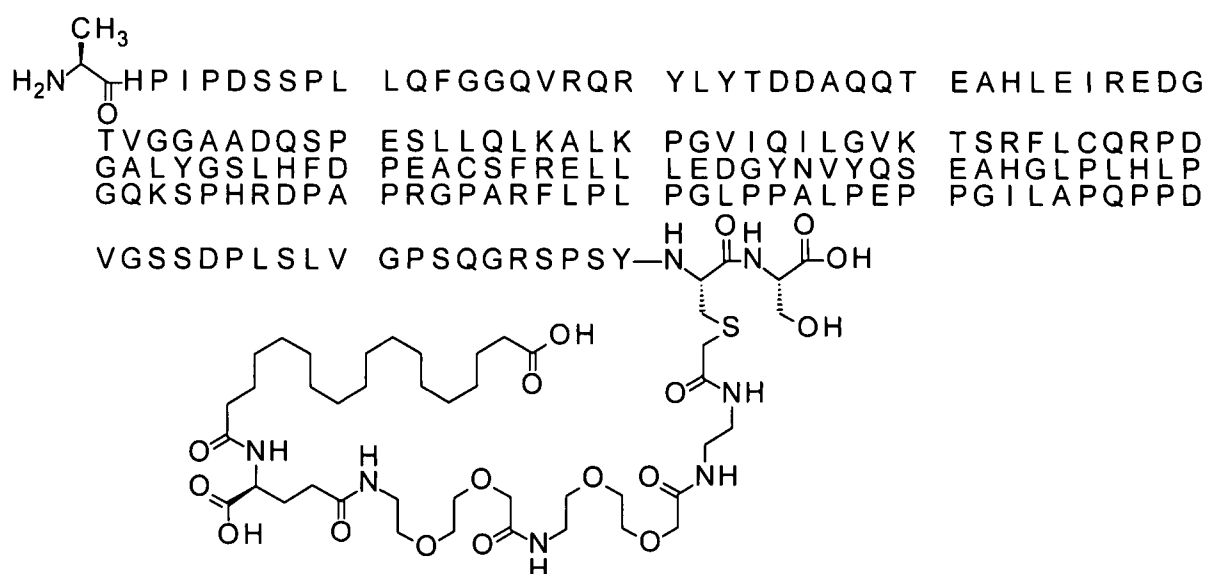
c. 化合物 43-56。

S{貝他-180)-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 15)



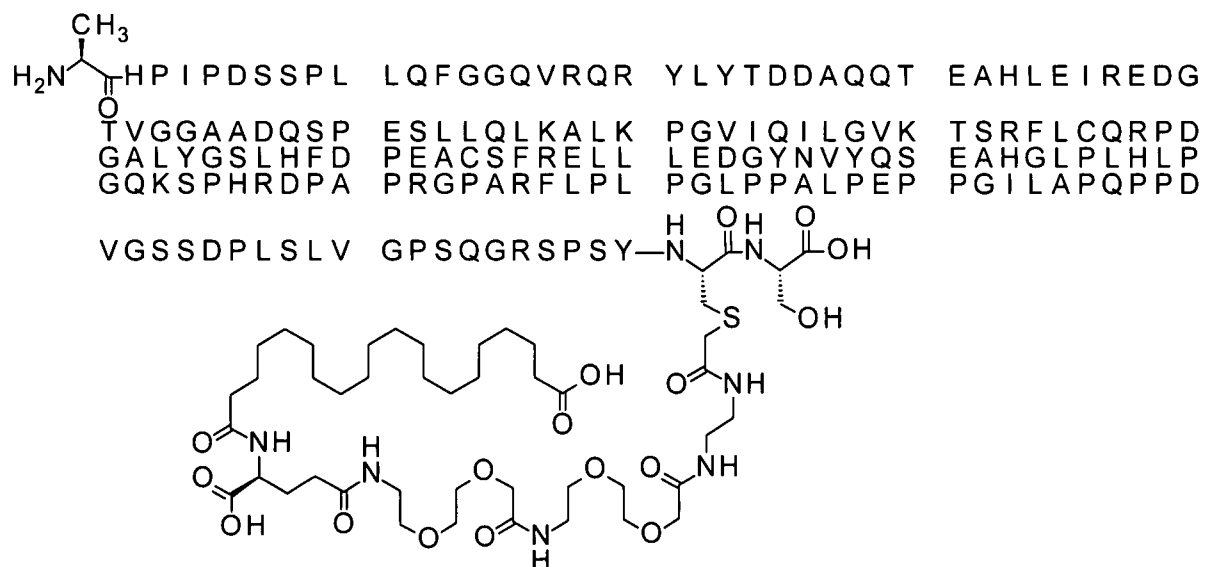
;

S{貝他-180)-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 16)



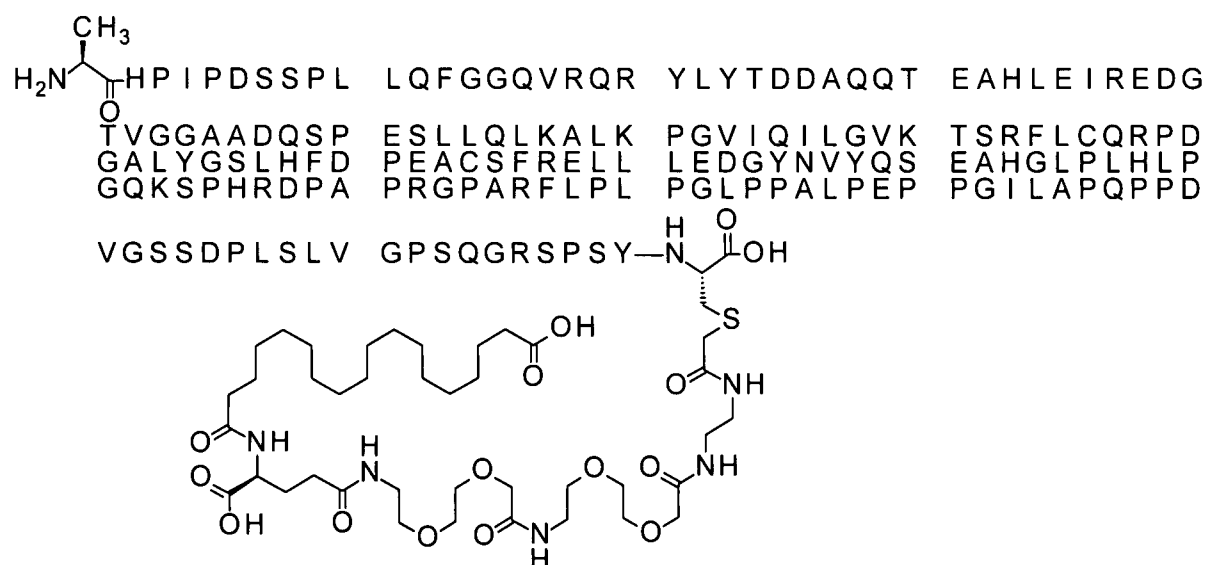
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 17)



;

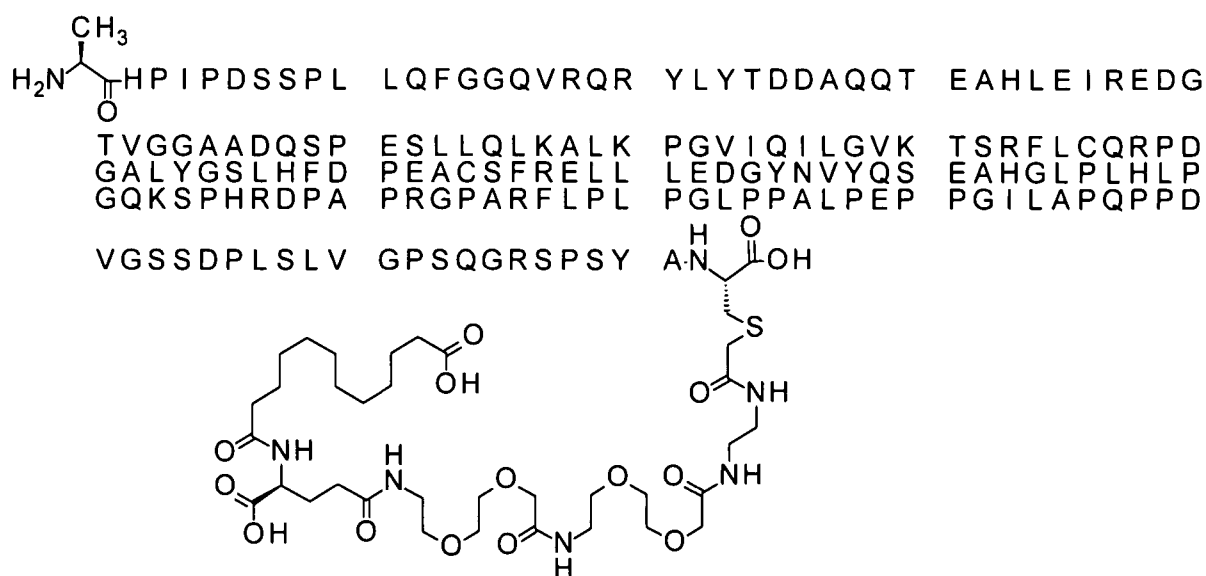
S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21 (化合物 18)



;

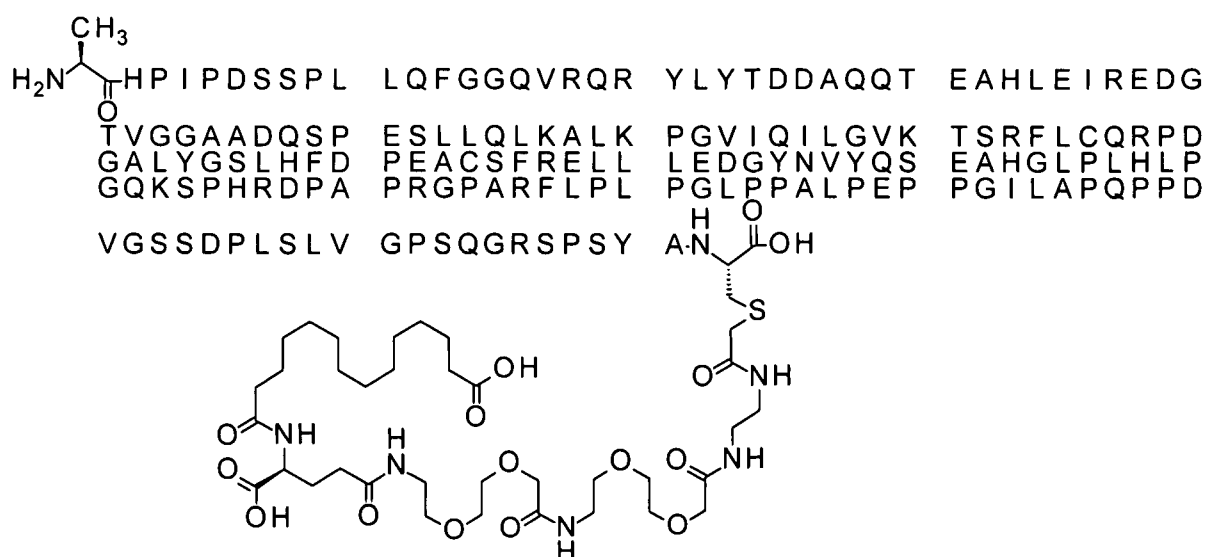
S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷醯基-胺基)

丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 19)



;

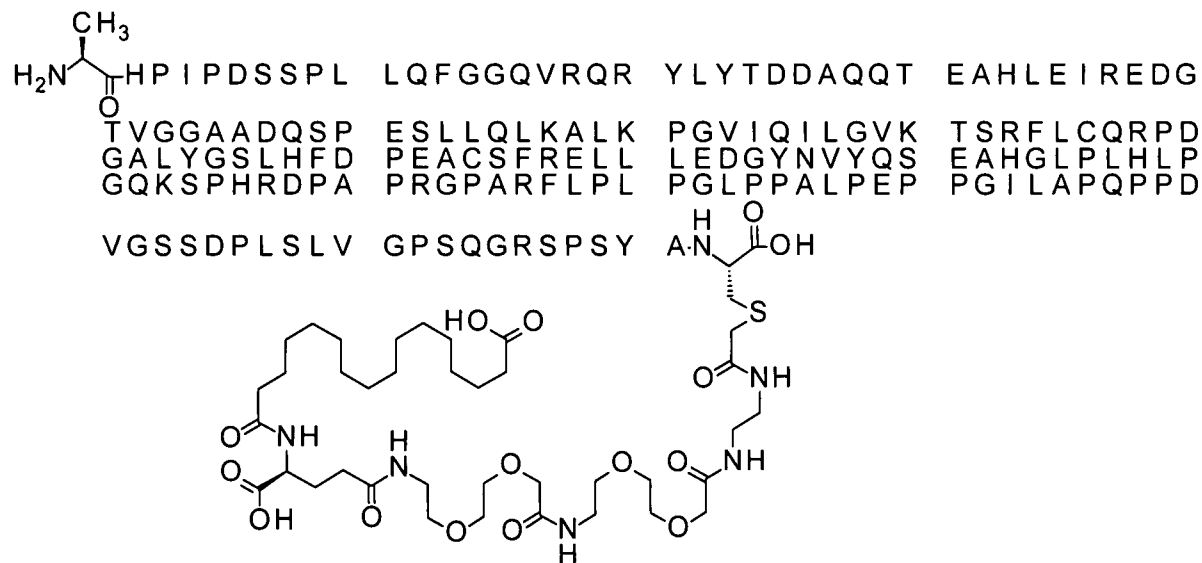
S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)
丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 20)



;

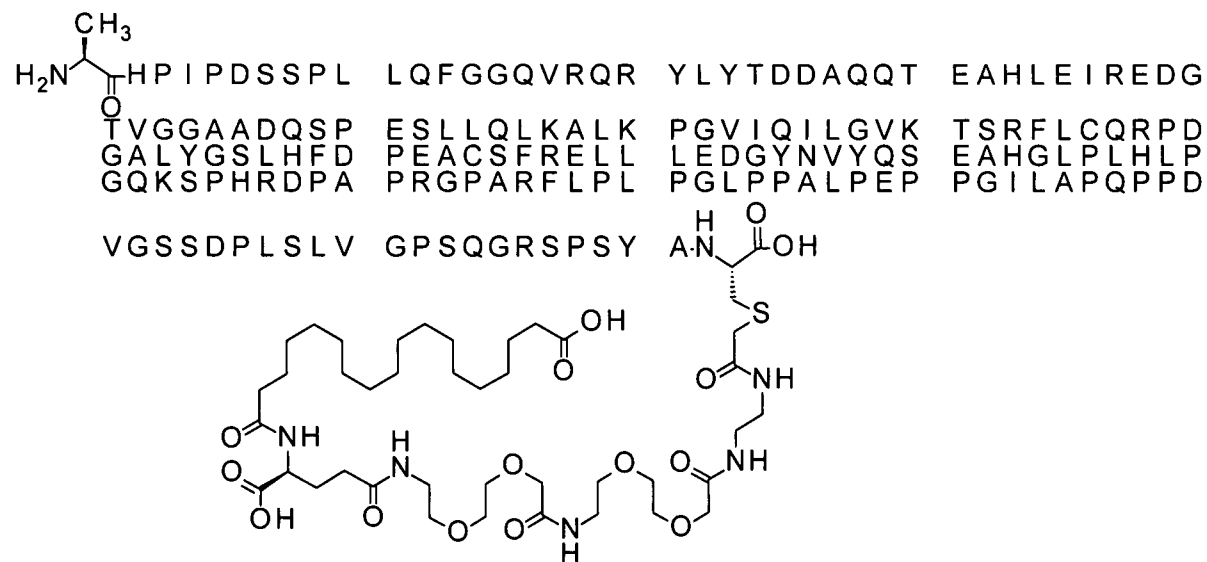
S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S]-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)

丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 21)



;

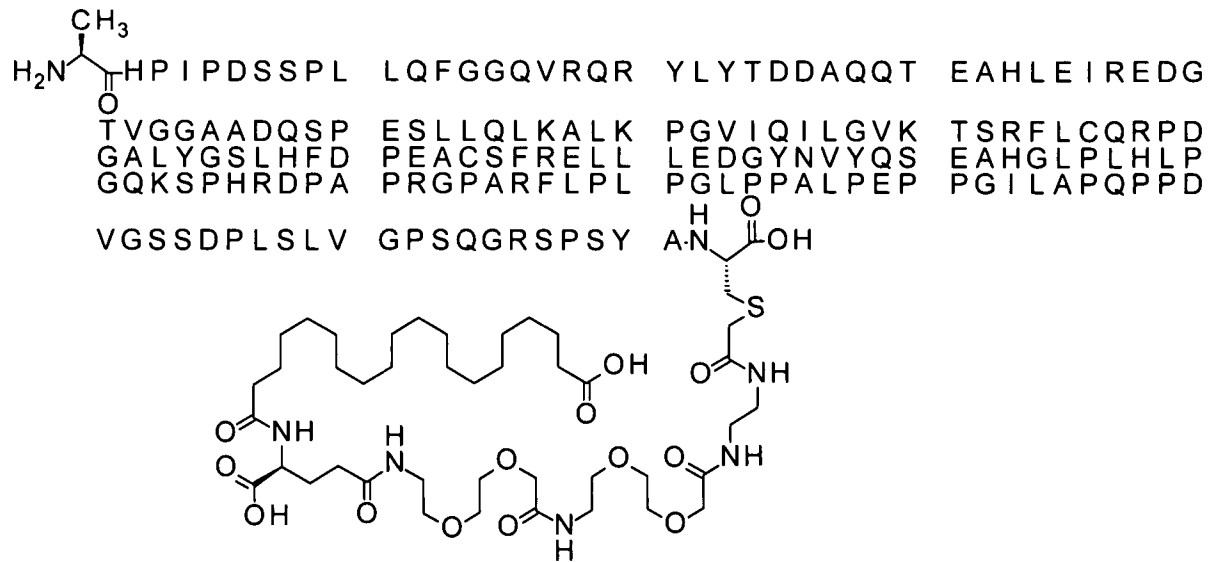
S{貝他-181}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)
丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙
基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 22)



;

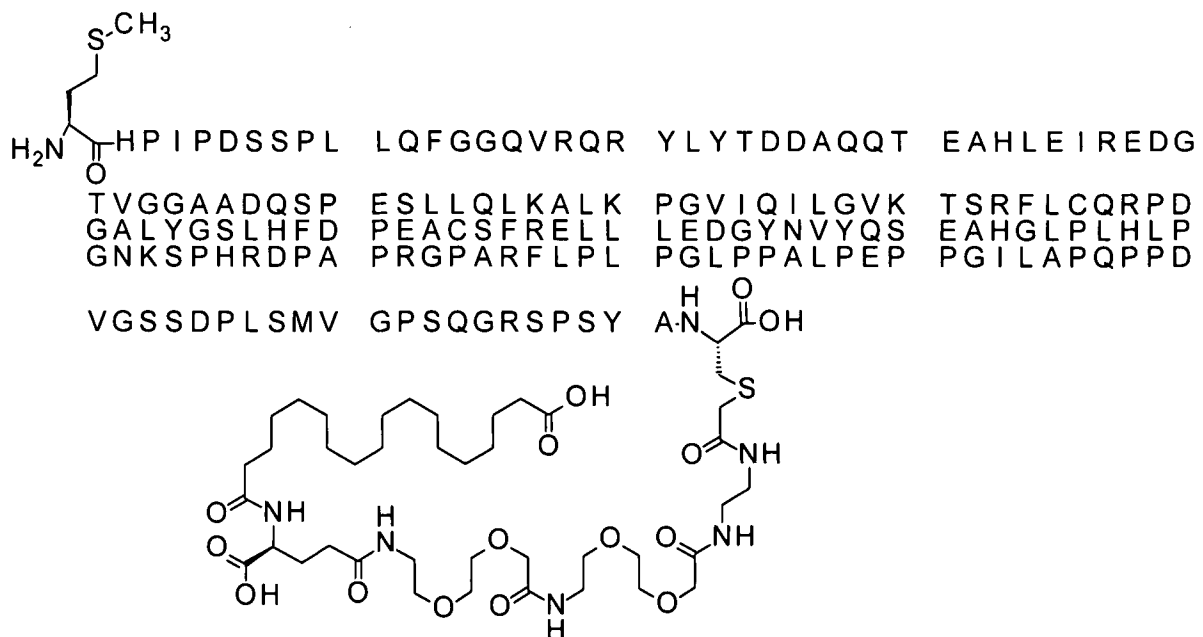
S{貝他-181}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)
丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙

基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 23)



;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Met[Cys181]FGF21 (化合物 24)



。

15. 一種根據申請專利範圍第 1-14 項中任一項的衍生物，其係用作為醫藥品。

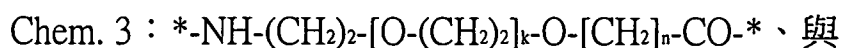
16. 一種根據申請專利範圍第 1-14 項中任一項的衍生物，其係用於治療及／或預防所有形式的糖尿病與相關的疾病之任一者，諸如飲食疾患、心血管疾病、糖尿病併發症；及／或用於改善脂質參數、改善 β 細胞功能；及／或用於延遲或預防糖尿病疾病進展；及／或用於治療及／或預防肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病（NAFLD）的方法中。



其中 m 係範圍在 1-5 的整數且

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係彼此相連，而該彼此相連係經由醯胺鍵且係以所指示的順序，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

● **【0014】** 更特別地，在第一方面，本發明係關於 FGF21 蛋白質之衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，且相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 包含最多 30 個胺基酸修飾；其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；其中該延伸子係 Chem. 1：HOOC-(CH₂)_x-CO-*，其中 x 係範圍在 10-18 的整數；且其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者之至少一者：



其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且 m 係範圍在 1-5 的整數。Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係彼此相連，而該彼此相連係經由醯胺鍵且係以所指示的順序，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子。

【0015】 被稱作化合物 13 至化合物 24 的較佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0016】 被稱作化合物 13 至化合物 18 的更佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0017】 被稱作化合物 35 至化合物 41 的更佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0018】 被稱作化合物 43 至化合物 56 的更佳的本發明之 FGF21 衍生物係於實驗章節中揭示。

【0019】 在一個進一步的方面，本發明係關於 FGF21 類似物，其在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或 181 的位置包含 Cys 殘基。較佳地，該類似物與人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有高程度的一致性。一致性之程度可藉由相較於人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 的胺基酸取代或修飾之數目來描述。

【0020】 在一個進一步的方面，本發明係關於 FGF21 類似物，其在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，且相較於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 包含最多個 30 個胺基酸修飾。

【0021】 在第三方面，本發明係關於本發明之 FGF21 衍生物與類似物之醫藥用途，例如用於治療及／或預防所有類型的糖尿病與相關的疾病，諸如飲食疾患、心血管疾病、糖尿病併發症；及／或用於改善脂質參數、改善 β -細胞功能；及／或用於延遲或預防糖尿病疾病進展；及／或用於治療及／或預防肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver

disease, NAFLD)。

【0022】 本發明之 FGF21 衍生物係生物活性的。例如其等係非常有效的，且（亦或是供選擇地）其等與 FGF 受體極佳地結合。此外（或供選擇地），其等具有延長的藥物動力學輪廓。例如，當 i.v.投予至小鼠及／或迷你豬時，其等具有極長的最終半生期。良好效力與長半生期之特殊組合可能是高度所欲的。

【0023】 在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含側鏈的 FGF21 衍生物皆保留效力是另人感興趣的。

【0024】 此外（或供選擇地），已注意到在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 180 與 181 之一者（且特別是位置 180）的位置包含側鏈的 FGF21 衍生物已保留高效力。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

【0025】 於隨後的部分，希臘字母可以其等之符號或相對應書面名稱（例如： α = 阿爾法； β = 貝他； ε = 艾普西龍； γ = 伽瑪； ω = 奧米伽；等等）來表示。此外，希臘字母 μ 可以「u」表示（例如於 $\mu\text{l}=\text{ul}$ ，或於 $\mu\text{M}=\text{uM}$ ）。

【0026】 化學式中的星號（*）指明接附點。

【0027】 在第一方面，本發明係關於 FGF21 蛋白質之衍生物，其中

該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；其中該延伸子係選自以下者之群組：

Chem. 1A : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

Chem. 1B : $\text{HOOC}-\text{苯}-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 與

Chem. 1C : $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

其中 x 係範圍在 8-18 的整數；且其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者之至少一者；

其中 Chem. 2 係選自：

$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 、

$*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 與

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{環己烷}-\text{CO}-*$ 、

其中 m 係獨立地選自範圍在 1-5 的整數，

其中 Chem. 3 係 $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自：

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ 與

$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ 、

其中 m 係範圍在 1-5 的整數。

【0028】 在進一步的具體態樣中，Chem. 2 係選自：

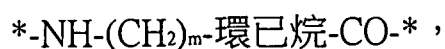
$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-*$ 、

中（其中 R 係如由各式所定義者），R-CO-* 意指 R-C(=O)-*。苯意指在 Chem. 1B 中於 C1 及 C4 分別被 O-(CH₂)_x-* 與 -COOH 取代的環結構。HO-S(=O)₂ 描述磺酸。

【0088】 本發明之衍生物之連接子包含至少一個以下的連接子元件 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4。元件 Chem. 2 與 chem3 皆具有-NH-與 CO-端，而該等端允許其等藉由醯胺鍵彼此連結以及與延伸子或 Chem. 4 之-CO-或-NH-連結。

● 【0089】 Chem. 4 具有-NH-端（其能夠與 Chem. 2 或 Chem. 3 形成醯胺鍵）以及-NH-CO-CH₂-端，其於未經反應的形式係能夠與 FGF21 類似物之半胱胺酸之巰基基團反應的鹵乙醯胺。

【0090】 本發明之衍生物之連接子包含以下的連接子元件 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之至少一者，其中 Chem. 2 係選自：



其中 m 係獨立地選自範圍在 1-5 的整數。

其中 Chem. 3 係：*-NH-(CH₂)₂-[O-(CH₂)₂]_k-O-[CH₂]_n-CO-*，其中 k 係範圍在 1-5 的整數，n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自：



其中 m 係獨立地選自範圍在 1-5 的整數。

【0091】 在一個具體態樣中，Chem. 2 係 $^*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$ ，其中 m 係 1、2 或 3。在一個具體態樣中， m 係 2 或 3。

【0092】 在其中 m 係 2 的具體態樣中，連接子元件 Chem. 2 可被稱為 Chem. 2a，即 $^*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-^*$ 。連接子元件 $^*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-^*$ 可被簡稱為 gGlu、伽瑪 Glu、或 γ -Glu。於 gGlu 中，用於與另一個連接子元件連接的是胺基酸麩胺酸之伽瑪羧基基團。在一個特殊的具體態樣中，(各) gGlu 連接子元件係 L-型。

【0093】 在一個具體態樣中，Chem. 2 係 $^*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$ ，其中 m 係 1、2 或 3。在一個具體態樣中， m 係 2 或 3。連接子元件 $^*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$ 係磺酸衍生物，其中羧基基團係用於與另一個連接子元件連接。在一個具體態樣中， m 係 3 且連接子元件 Chem. 2 可被稱為 Chem. 2b： $^*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-^*$ 。

【0094】 在一個具體態樣中，Chem. 2 係 $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{環已烷}-\text{CO}-^*$ ，其中 m 係 1、2 或 3。在一個具體態樣中， m 係 2 或 3。在 Chem. 2 結構中，環已烷環因此係於 C1 與 C4 分別以 $\text{NH}-\text{CH}_2$ 和 CO 取代。

【0095】 在一個具體態樣中， m 係 1 且連接子元件 Chem2 可被稱為 Chem. 2c： $^*-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{環已烷}-\text{CO}-^*$ 。此連接子元件可進一步被稱為 Trx。

【0096】 於 Chem. 3 之連接子元件中，「 k 」與「 n 」範圍皆可為 1 至 5。當 $k=n=1$ ，此連接子元件之結構對應於 Chem. 3a。

【0097】 在一個具體態樣中，Chem. 3 係 Chem. 3a： $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-^*$ 。由於其係其二基團，Chem. 3a 之連接子元

件可被簡稱為 Ado (8-胺基-3,6-二氧辛酸)。

【0098】 於 Chem. 4 連接子元件中，「m」範圍可在 1 至 5。在一個具體態樣中，Chem. 4 係 $^*\text{-NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$ ，其中 m 係 1、2、3 或 4。在一個具體態樣中，m 係 2 或 3。

【0099】 在一個具體態樣中，當 Chem. 4 係 $^*\text{-NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$ 且 m=2 時，此連接子元件之結構對應於 Chem. 4a：
 $^*\text{-NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$ 。

● 【0100】 在一個具體態樣中，Chem. 4 係 $^*\text{-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$ ，其中 m 係 1、2、3 或 4。在一個具體態樣中，m 係 2 或 3。在一個具體態樣中，m 係 4 或 5。

【0101】 當 Chem. 4 係 $^*\text{-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$ 且 m=4 時，此連接子元件之結構對應於 Chem. 4b：
 $^*\text{-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_4\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$ 。

● 【0102】 本發明之衍生物之連接子可包含一或多個此等三個不同類型的連接子元件，且其亦可包含一或多個各個單獨連接子元件。在一個具體態樣中，該連接子僅包含一個 Chem. 4 元件。在一個具體態樣中，該連接子包含一或多個 Chem. 2 與 Chem. 3 之各者和僅僅一個 Chem. 4 元件。

【0103】 作為一個非限制性實例，連接子可由一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3a 元件、與一個 Chem. 4 元件所組成，其等係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於 $^*\text{-NH}$ 端連接至延伸子之 CO-^* 端，且係於其 CO-^* 端連接至位於 FGF21 蛋白質之位置 180 或 181 之任一者的 Cys 殘基之硫原子。因此，Chem. 4 元件將 Chem. 2/Chem. 3 元件之 -CO-^* 端連結至 FGF21 半

胱胺酸類似物之硫原子。

【0104】 在一個進一步的實例中，連接子可由兩個 Chem. 2 元件（諸如兩個 Chem. 2a 元件）、兩個 Chem. 3a 元件、與一個 Chem. 4 元件所組成，其等係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連。Chem. 2 元件係於其等之 *-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且 Chem4 係於其 CH₂-*端連接至 FGF21 蛋白質之 Cys 殘基之硫原子。

【0105】 在一個具體態樣中，連接子係連接至位於 FGF21 蛋白質之位置 167、169、170、171、172、173、173、174、175、180 或 181 的 cys 之巯基基團。在進一步的具體態樣中，連接子係連接至位於位置 180 或 181 的 Cys 之硫原子。

【0106】 不用說，僅僅為了良好排列之理由：術語「以所指示的順序」意謂首先提及的連接子元件（在此為 Chem. 2）之 *-NH 端係連接至延伸子之 CO-*端，且最後提及的連接子元件（在此為 Chem. 4）之 CO-*端係連接至所討論的 FGF21 蛋白質之 Cys 殘基之巯基基團。

【0107】 在一個具體態樣中，本發明之衍生物係選自由以下者所組成的群組：

- a. 化合物 13-24
- b. 化合物 35-41 及／或
- c. 化合物 43-56。

【0108】 在一個進一步的具體態樣中，該衍生物係選自化合物 13-24。

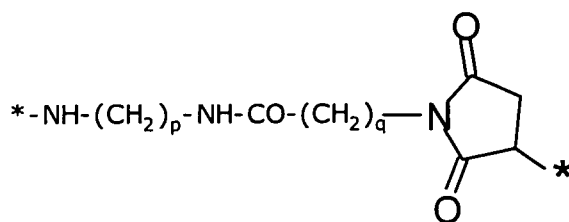
【0109】 在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 13-18。在一個

的具體態樣中，該衍生物係選自化合物 20-24。

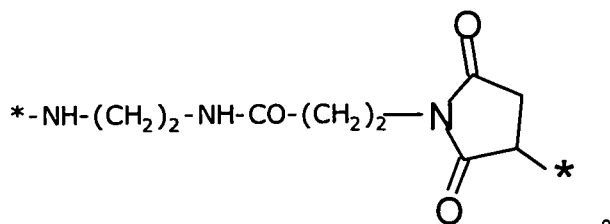
【0110】 在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 35-41。

【0111】 在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 43-56。在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 43-44 與 46-54。在一個具體態樣中，該衍生物係選自化合物 44、47 與 50-54。

【0112】 替代 Chem. 4，可使用衍生自順丁烯二醯亞胺的连接子元件，其中 p 與 q 範圍可在 1 與 5 之間：



當 $p=q=2$ 時，此连接子元件之結構對應於 N-(2-胺基乙基)-3-(2,5-二側氧基-吡咯啉-1-基)丙醯胺：



【0113】 本發明之衍生物可以不同的立體異構物的形式存在，其等具有相同的分子式與鍵結的原子之順序，但僅在其等之原子於空間中的三維方向不同。本發明之例示性衍生物之立體異構性係於實驗章節中使用標準命名法以其等之名稱以及結構指示。除非另加指出，本發明係關於所請衍生物之所有立體異構物形式。

功能性質

【0114】 本發明之 FGF21 衍生物係生物活性的。例如其等係非常有效的，且（亦或選擇性地）其等與 FGF 受體之結合性非常好。此外（或選擇性地），其等具有延長的藥物動力學輪廓。例如，當 i.v.投予至小鼠及／或迷你豬時，其等具有非常長的最終半生期。良好的效力與長半生期之特殊組合可是高度所欲的。

【0115】 此外（或選擇性地），令人意外地，在對應於成熟的人類 FGF21 之位置 167、169、170、171、172、173、173、174、175、180 與 181 之一者的位置包含本發明之側鏈的 FGF21 衍生物具有高效力。

【0116】 根據第一個方面，該 FGF21 衍生物具有 FGF21 活性。例如，本發明之 FGF21 衍生物對人類 FGF 受體具有令人意外地高的效力。

【0117】 在第一個特殊的具體態樣中，效力及／或活性意指試管內效力，即於功能性 FGF 受體分析中的表現，更特別係是意指活化人類 FGF 受體的能力。

【0118】 試管內效力可（例如）於使用表現人類 FGF 受體（FGFR1c、FGFR2c 或 FGFR3c）與 BKL 的完整的細胞的分析中測定。例如，人類 FGF 受體之反應可使用過度表現人類貝他-klotho（BKL）的 HEK（人類胚胎腎臟細胞，Human Embryonic Kidney cell）來測量。HEK293 細胞內源地表現數種 FGF 受體，包含 FGFR1c 與 FGFR3c。此等細胞對 FGF21 是非反應性的，直到其等被以共受體 BKL 轉染。FGF 受體／BKL 複合物之活化導致 MAPK／ERK 傳訊途徑之活化與 ERK 之磷酸化。於給定時間點的經磷酸化的 ERK（pERK）之水平隨著 FGF21 之濃度的增加而增加。一個如此分析之非限制性實例係於實施例 6 描述。

態樣中，本發明之化合物係用於治療肥胖。

特殊的具體態樣

【0152】 以下者為本發明之特殊的具體態樣。

【0153】 1.一種 FGF21 蛋白質之衍生物，

其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，

● 其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子；

其中該延伸子係選自由以下者所組成的群組：

Chem. 1A : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

Chem. 1B : $\text{HOOC}-\text{苯}-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 與

Chem. 1C : $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

其中 x 係範圍在 8-18 的整數；且

其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者的至少一者：

● 其中 Chem. 2 係選自：

$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 、

$*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 與

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{環己烷}-\text{CO}-*$ 、

其中 m 係範圍在 1-5 的整數，

其中 Chem. 3 係 $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數且 n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自：

*-NH-(CH₂)_m-NH-CO-CH₂-*與

-NH-CH(COOH)-(CH₂)_m-NH-CO-CH₂-，

其中 m 係範圍在 1-5 的整數；且

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

【0154】 2.根據具體態樣 1 的衍生物，其中該蛋白質包含在位置 170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的 Cys 殘基。

【0155】 3.根據具體態樣 1 的衍生物，其中該蛋白質包含在位置 170、173、174、175、180 或位置 181 的 Cys 殘基。

【0156】 4.根據前述具體態樣中任一項的衍生物，其中 Chem 2 係選自由以下者所組成的群組：

Chem. 2a：*-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-*、

Chem. 2b：*-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-*與

Chem. 2c：*-NH-CH₂-環己烷-CO-*。

【0157】 5.根據具體態樣 1 的衍生物，其中 Chem. 4 係選自：

Chem. 4a：*-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*與

Chem. 4b：*-NH-CH(COOH)-(CH₂)₄-NH-CO-CH₂-*。

【0158】 6.一種 FGF21 蛋白質之衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，

申請專利範圍

1. 一種 FGF21 蛋白質之衍生物，

其中該蛋白質在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置包含 Cys 殘基，其中該衍生物包含經由連接子接附至該 Cys 殘基的延伸子 (protractor)；其中該延伸子係選自以下者之群組：

Chem. 1A : $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 、

Chem. 1B : $\text{HOOC}-\text{苯}-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$ 與

Chem. 1C : $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-*$

其中 x 係範圍在 8-18 的整數；且

其中該連接子包含 Chem. 2、Chem. 3 與 Chem. 4 之各者的至少一者；

其中 Chem. 2 係選自：

$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 、

$*-\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ 與

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{環己烷}-\text{CO}-*$ ，

其中 m 係範圍在 1-5 的整數，

其中 Chem. 3 係 $*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-*$ ，其中 k 係範圍在 1-5 的整數且 n 係範圍在 1-5 的整數，且

其中 Chem. 4 係選自

$*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$ 與

$*-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-*$

其中 m 係範圍在 1-5 的整數；且

其中 Chem. 2、Chem. 3、與 Chem. 4 係經由醯胺鍵且以所指示的順序彼此相連，係於其*-NH 端連接至延伸子之 CO-*端，且係於其 CH₂-*端連接至在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、169、170、171、172、173、174、175、180 或位置 181 的位置的 Cys 殘基之硫原子，或其醫藥上可接受的鹽、醯胺或酯。

2.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中 Chem. 1 係選自以下者之群組：

Chem. 1a : HOOC-(CH₂)₁₆-CO-*、

Chem. 1b : HOOC-苯-O-(CH₂)₉-CO-*與

Chem. 1c ; HO-S(=O)₂-(CH₂)₁₅-CO-*。

3.根據申請專利範圍第 1 項或第 2 項的衍生物，其中 Chem. 2 係選自以下者之群組：

Chem. 2a : *-NH-CH(COOH)-(CH₂)₂-CO-*、

Chem. 2b : *-NH-S(=O)₂-(CH₂)₃-CO-*與

Chem. 2c : *-NH-CH₂-環己烷-CO-*。

4.根據申請專利範圍第 1 項或第 2 項的衍生物，其中 Chem. 4 係選自：

Chem. 4a : *-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*與

Chem. 4b : *-NH-CH(COOH)-(CH₂)₄-NH-CO-CH₂-*。

5.根據申請專利範圍第 3 項的衍生物，其中 Chem. 4 係選自：

Chem. 4a : *-NH-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-*與

Chem. 4b : *-NH-CH(COOH)-(CH₂)₄-NH-CO-CH₂-*。

6.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該蛋白質在對應於成熟的人

類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 167、170、171、172、173、174、175、180 或 181，諸如成熟的人類 FGF21 之位置 180 的位置包含 Cys 殘基。

7.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該蛋白質在一或多個對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之位置 121 或 168 之一或多者的位置包含胺基酸改變。

8.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該等胺基酸改變之一係在對應於成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 之 N 端的位置加入 Ala 殘基。

9.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該蛋白質包含 121Q 與 168L 之一或多者，諸如 121Q 或 168L 或兩者。

10.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該蛋白質與成熟的人類 FGF21 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80%的一致性。

11.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該延伸子包含 Chem. 1a：
 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}\text{-CO-*}$ 。

12.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該連接子包含以下者之一、二或三者：

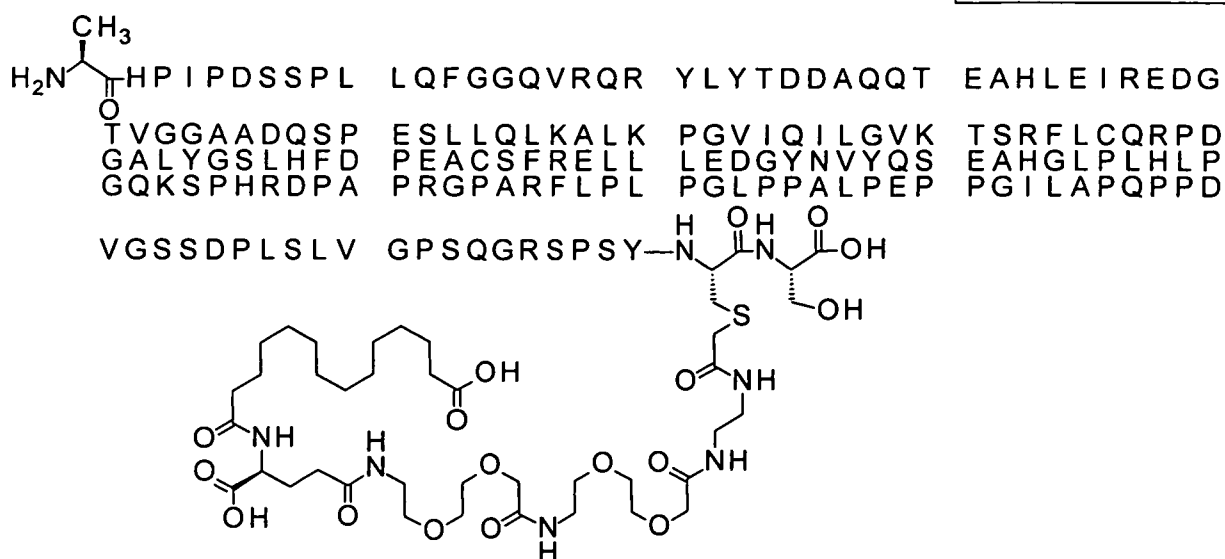
Chem. 2a： $*\text{-NH-CH}(\text{COOH})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO-*}$ 、

Chem. 3a： $*\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-*}$ 與

Chem. 4a： $*\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-*}$ 。

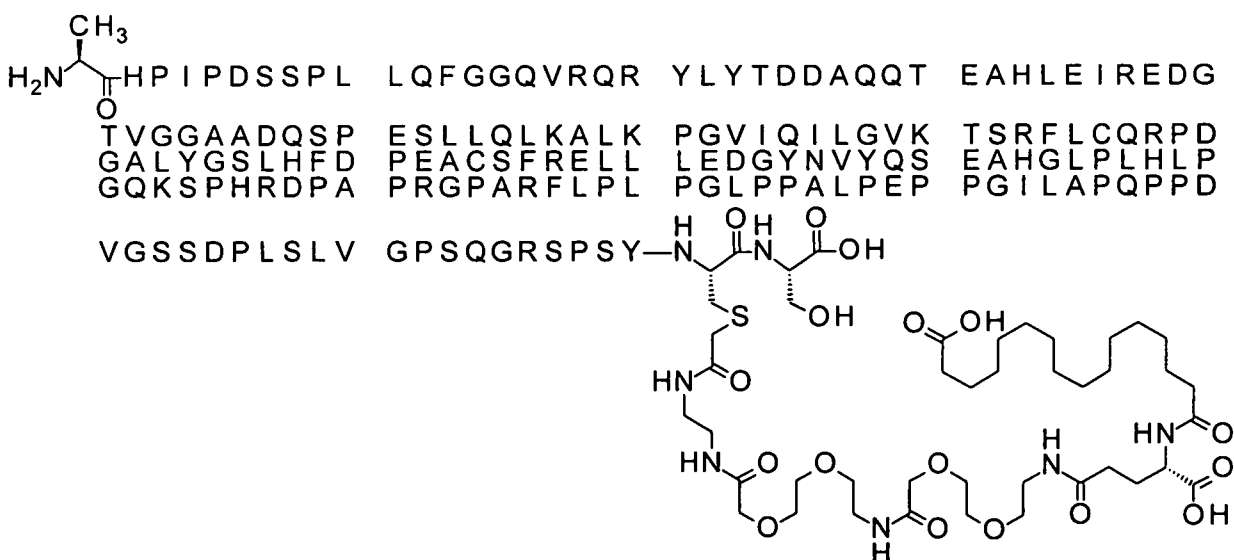
13.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該連接子係由一個 Chem. 2 元件、兩個 Chem. 3 元件與一個 Chem. 4 元件所組成。

14.根據申請專利範圍第 1 項的衍生物，其中該衍生物係選自以下者之群組：



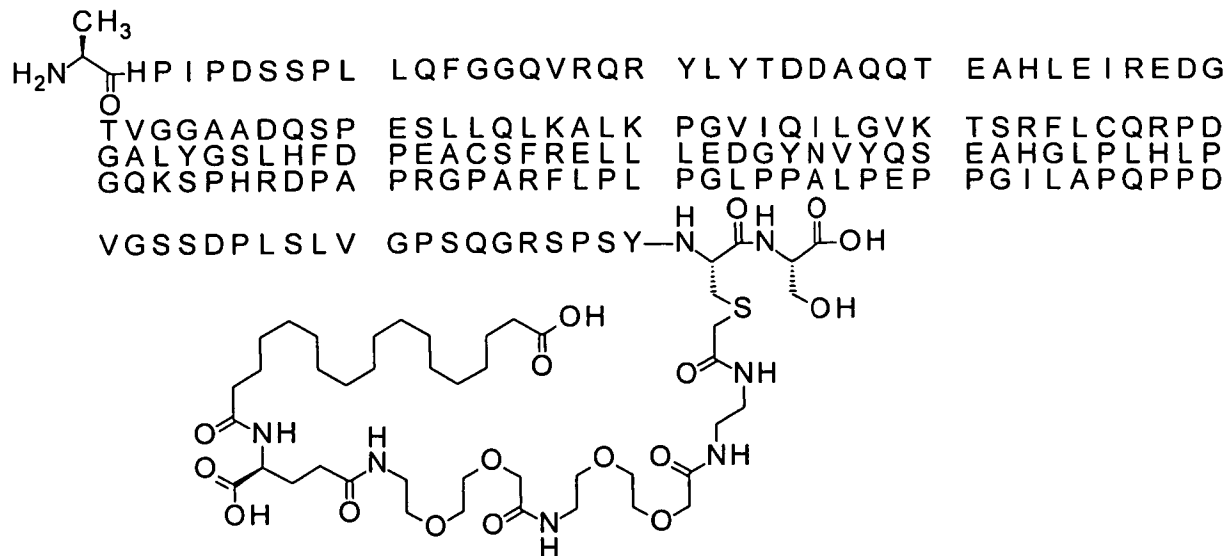
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 15)



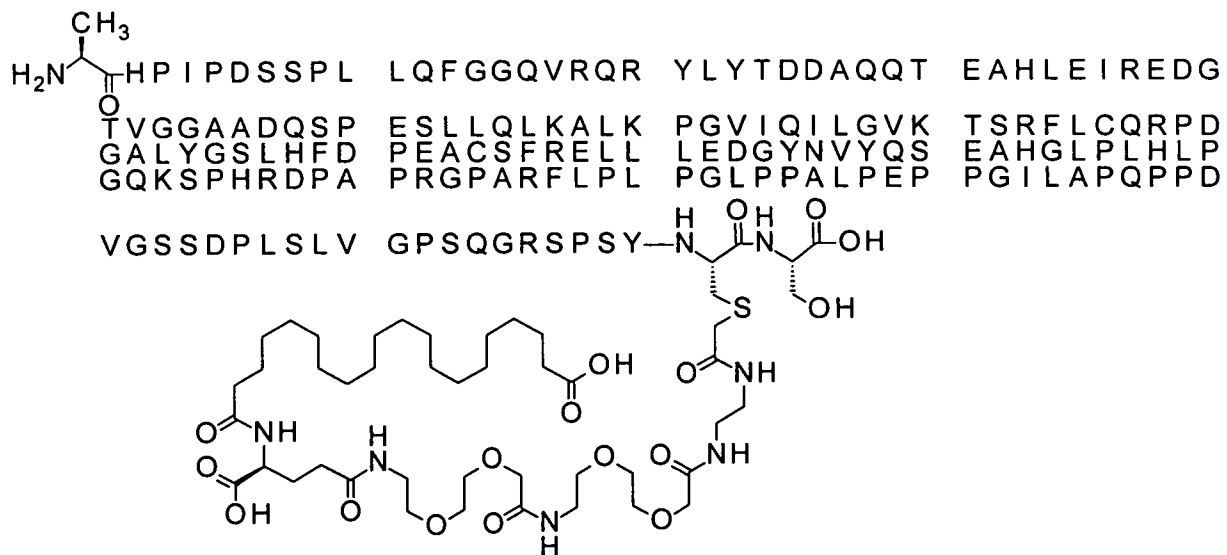
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 16)



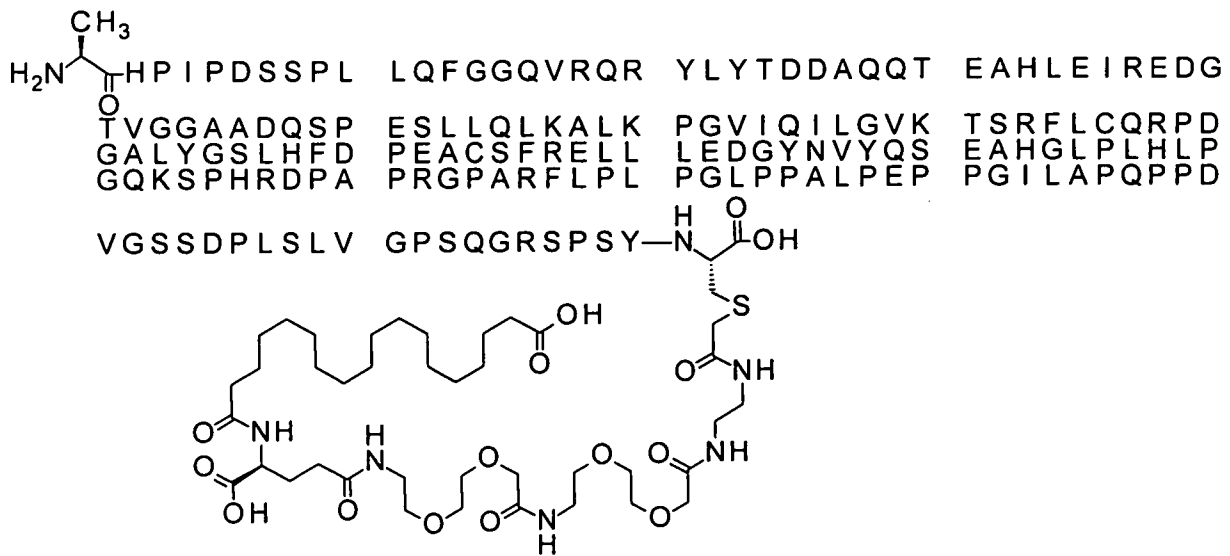
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180]FGF21 (化合物 17)



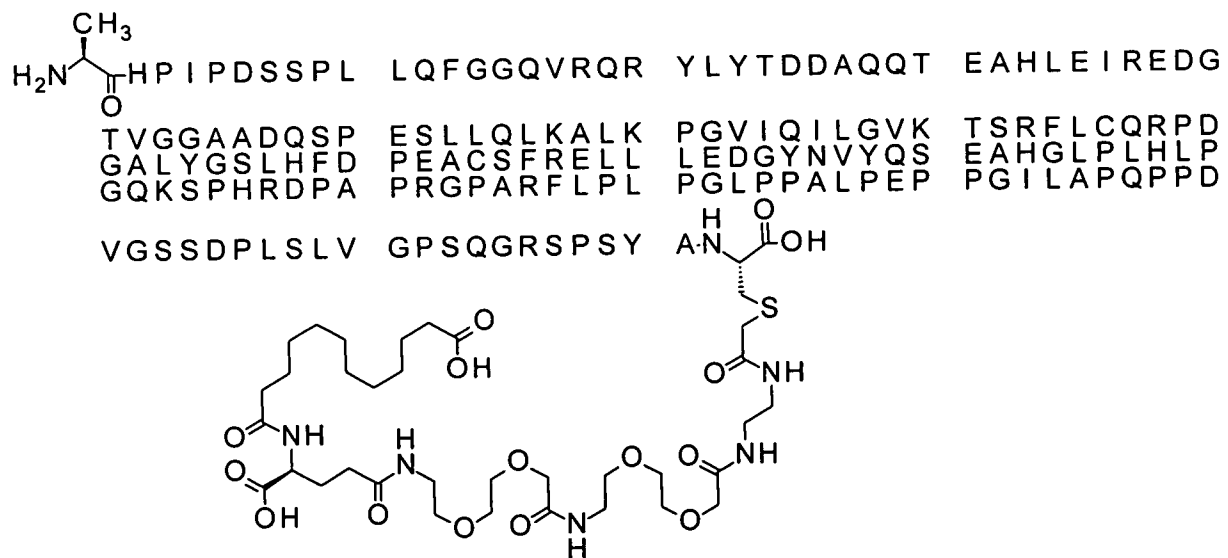
;

S{貝他-180}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys180,des181]FGF21 (化合物 18)



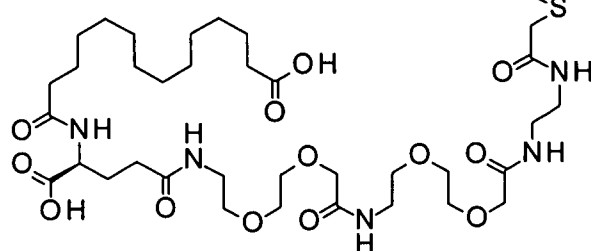
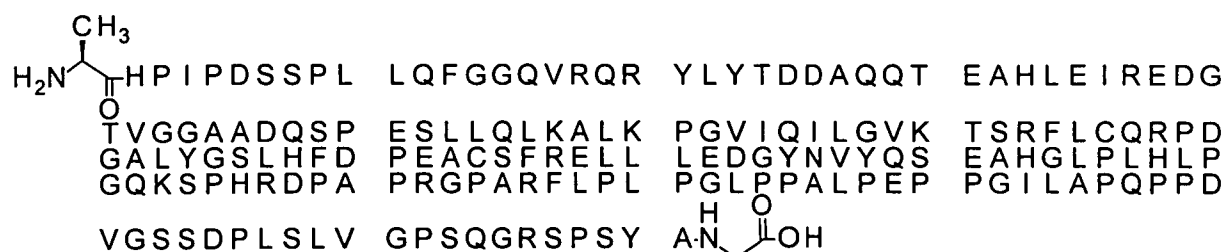
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(11-羧基十一烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 19)



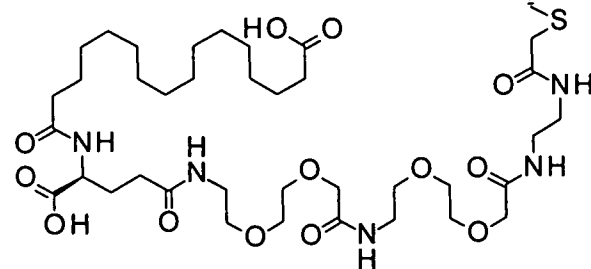
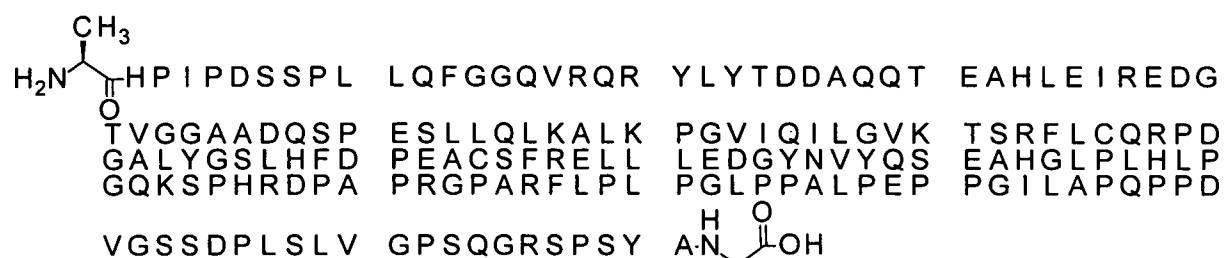
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 20)



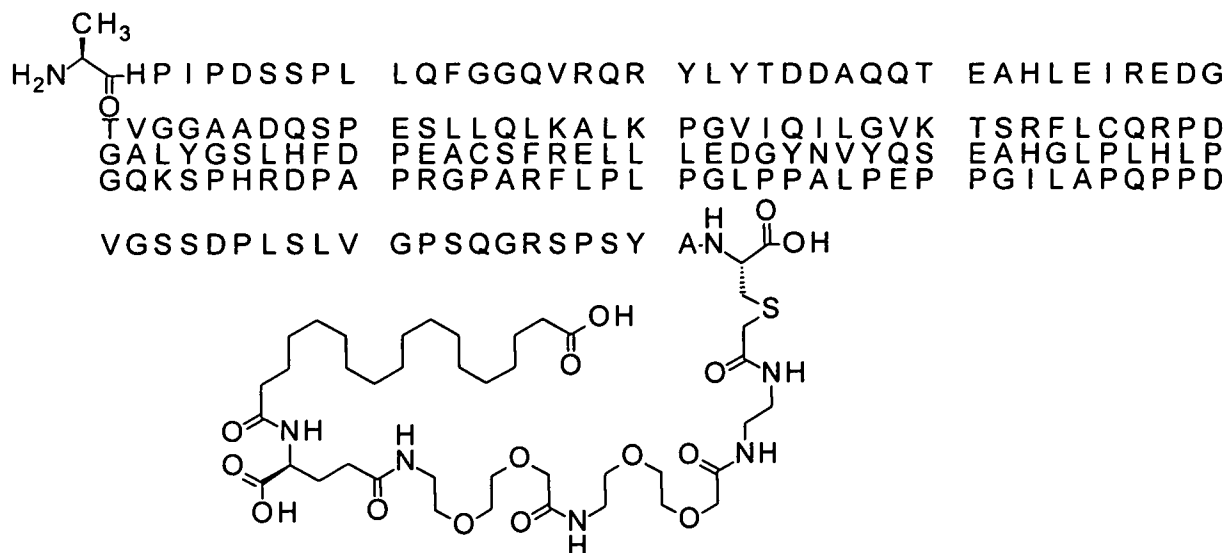
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 21)



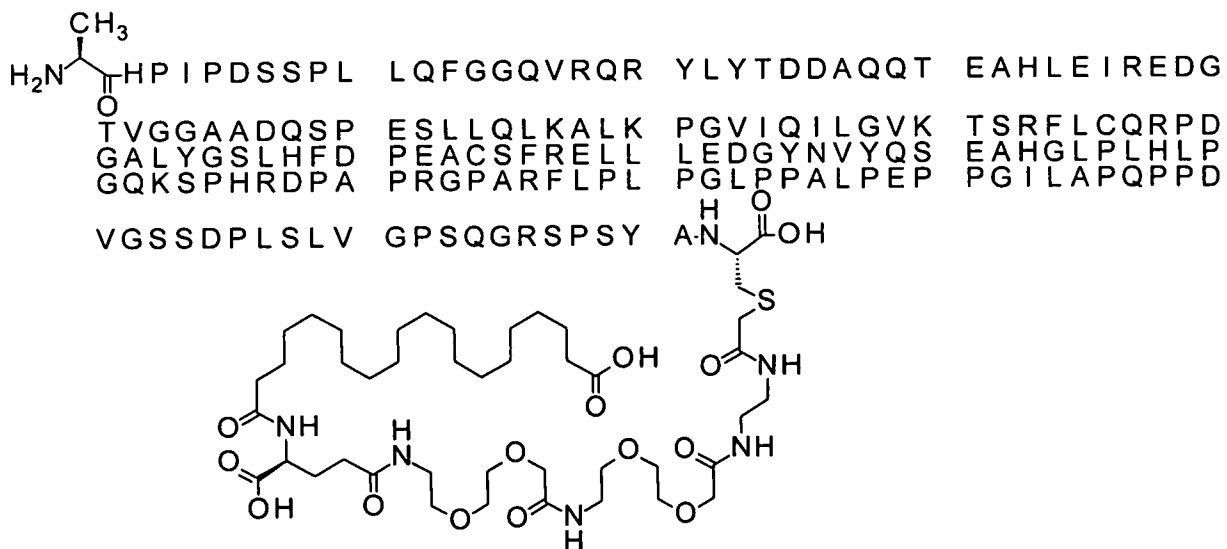
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 22)



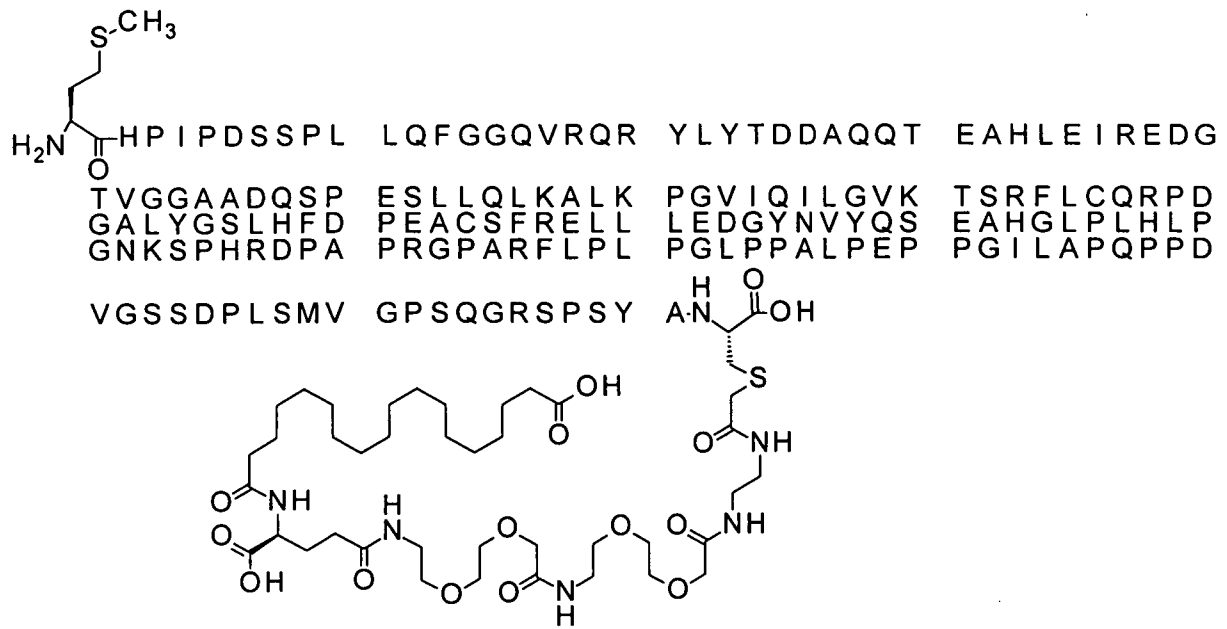
;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Ala[Gln121,Leu168,Cys181]FGF21 (化合物 23)



;

S{貝他-181}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七烷醯基-胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]-乙基胺基]-2-側氧基乙基]-Met[Cys181]FGF21 (化合物 24)



16. 一種根據申請專利範圍第 1-15 項中任一項的衍生物，其係用作為醫藥品。

17. 一種根據申請專利範圍第 1-15 項中任一項的衍生物，其係用於治療及／或預防所有形式的糖尿病與相關的疾病之任一者，諸如飲食疾患、心血管疾病、糖尿病併發症；及／或用於改善脂質參數、改善 β 細胞功能；及／或用於延遲或預防糖尿病疾病進展；及／或用於治療及／或預防肝臟脂肪變性與非酒精性脂肪肝病（NAFLD）的方法中。