

人胰岛素类似物、其融合蛋白及医药用途

本申请要求2022年03月16日提交的中国专利申请202210259967.6的优先权。

5 技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体涉及一类人胰岛素类似物及其融合蛋白，以及应用该类融合蛋白治疗代谢类疾病(如，糖尿病)的用途。

背景技术

10 糖尿病是由于体内分泌的胰岛素不足进而引发的人体葡萄糖、蛋白质和脂质代谢失调的慢性、代谢性疾病，主要划分为胰岛素依赖性糖尿病（I型糖尿病）和非胰岛素依赖性糖尿病（II型糖尿病）。全球范围内90-95%的糖尿病患者为II型糖尿病，其由胰岛β细胞功能受损和长期胰岛素抗性导致，最主要特征是体内胰岛素水平的缺乏、胰岛素敏感性降低和血浆中的高血糖浓度。研究表明，II型糖尿病与
15 多种高危险性并发症相关，会导致心血管疾病、肾脏衰竭、失明、截肢以及其它多种并发症。

已经批准上市的糖尿病药物主要包括化学合成小分子口服降糖药物，例如双胍类、磺酰类、胰岛素增敏剂、α-糖苷类以及胰高血糖素样肽-1（GLP-1）类似物等注射肽类降糖药物。对于所有I型糖尿病及部分末期II型糖尿病而言，只有胰岛
20 素注射液相关药物可以较好的控制血糖水平。

目前，已经被批准上市的胰岛素类似物产品主要分为速效胰岛素和长效基础胰岛素这两大类。已经上市的速效胰岛素包括赖脯胰岛素和门冬胰岛素等。速效胰岛素主要在患者餐前进行皮下注射给药，其通过对胰岛素分子结构上进行改造，抑制天然胰岛素六聚体的形成，从而具有皮下注射给药后快速起效和快速清除的
25 药代动力学特征。其中，赖脯胰岛素在天然胰岛素B-链末端通过对28、29位点氨基酸位置的交替以实现抑制胰岛素六聚体形成的功效，而门冬胰岛素通过在胰岛素B-链28位将脯氨酸替换为天门冬氨酸，通过电荷互斥相互作用以抑制六聚体的形成。已经批准上市的长效基础胰岛素包括甘精胰岛素、地特胰岛素和德谷胰岛素。其中，甘精胰岛素通过对胰岛素分子骨架引入正电荷精氨酸提升分子等电点
30 至中性，使得该胰岛素类似物皮下注射后在给药部位形成沉淀，缓释溶解后得到显著延长的体内药代动力学特性。地特胰岛素和德谷胰岛素通过在B-链末端赖氨酸侧链引入长链脂肪酸修饰，通过在给药部位形成超分子高聚体，以及在血浆中与人类血清白蛋白可逆结合延长体内药代动力学特性。目前，甘精胰岛素和德谷胰岛素的给药频率为一天一次，而地特胰岛素的给药频率为每天一到两次。

35 然而，速效胰岛素产品可能导致低血糖和严重的低血糖症状等不良反应，且患者需要每天一次甚至多次注射胰岛素类药物，造成患者使用不便、治疗负担大

且生活质量下降。而已有的长效基础胰岛素产品也需要一天一次的皮下注射给药，注射频率仍然较高。因此，具有更低注射频率、更高安全性的超长效基础胰岛素产品是临床患者的需求，这能显著提高患者的依从性和便利性，本公开提供了这样的超长效基础胰岛素产品。

5

发明内容

本公开提供人胰岛素类似物和 IgG Fc 区的融合蛋白，其制备方法，及将所述融合蛋白用于治疗代谢类疾病（如 I 型糖尿病或 II 型糖尿病）的用途。

胰岛素类似物

10 本公开提供了胰岛素类似物，其含有胰岛素 B 链类似物和胰岛素 A 链类似物，其中，胰岛素 B 链类似物包含如下的氨基酸序列：

FVX₁QHL₂CGX₂HLVEALX₃X₄VCGERGFX₅X₆X₇X₈X₉ (SEQ ID NO: 43)，其中，X₁ 选自 N、G 或 K；X₂ 选自 S 或 E；X₃ 选自 Y、H 或 E；X₄ 选自 H、R、L 或 E；X₅ 选自 F 或 H；X₆ 选自 G、T、S、H、V、Y 或不存在；X₇ 选自 G、E、P、K、D、S、H 或不存在；X₈ 选自 G、E、K、P、Q、D、H 或不存在；X₉ 选自 G、T、S、E、K、A 或不存在；

15 胰岛素 A 链类似物包含如下的氨基酸序列：

GIVEQCCZ₁SICSLZ₂QLENYCZ₃Z₄ (SEQ ID NO:44)，其中，Z₁ 选自 T、H 或 E，Z₂ 选自 Y、D、S 或 E，Z₃ 选自 G 或 N；Z₄ 是任意天然氨基酸或不存在，当 Z₃ 为 N，Z₄ 不为 G 或 N。

20 本公开提供了胰岛素类似物，其含有胰岛素 B 链类似物和胰岛素 A 链类似物，其中，胰岛素 B 链类似物包含如下的氨基酸序列：

FVX₁QHL₂CGX₂HLVEALX₃X₄VCGERGFX₅Y (SEQ ID NO: 1)，其中，X₁ 选自 N、G 或 K；X₂ 选自 S 或 E；X₃ 选自 Y、H 或 E；X₄ 选自 H、R、L 或 E；X₅ 选自 F 或 H；

25 胰岛素 A 链类似物包含如下的氨基酸序列：

GIVEQCCZ₁SICSLZ₂QLENYCZ₃ (SEQ ID NO:2)，其中，Z₁ 选自 T、H 或 E，Z₂ 选自 Y、D、S 或 E，Z₃ 选自 G 或 N。

一些实施方案中，胰岛素 B 链类似物包含(或为)SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，其在 X₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 具有至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、或 5 个的氨基酸修饰。一些具体实施方案中，X₁ 选自 N 或 K，X₂ 选自 S 或 E，X₃ 选自 Y 或 H，X₄ 选自 L，和/或 X₅ 选自 H。一些具体实施方案中，X₂ 为 E，X₅ 为 H。一些具体实施方案中，X₅ 为 H。一些具体实施方案中，X₃ 为 H，X₅ 为 H。一些具体实施方案中，X₁ 为 K，X₂ 为 E，X₅ 为 H。

35 一些实施方案中，胰岛素 A 链类似物包含(或为)SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，其在 Z₁、Z₂、Z₃ 具有至少 1 个、至少 2 个、或 3 个的氨

基酸修饰。一些具体实施方案中，Z₁选自T、H或E，Z₂选自E，Z₃选自G或N。
一些具体实施方案中，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，Z₁为H，
Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，Z₂为E。一些具体实施方案中，Z₁为E，
Z₂为E。

5 一些实施方案中，胰岛素类似物中的胰岛素B链类似物包含(或为)SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO:1 的序列，和胰岛素A链类似物包含(或为)SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。其中，一些具体实施方案中，X₁选自N或K，X₂选自S或E，X₃选自Y或H，X₄选自L，X₅选自H；和Z₁选自T、H或E，Z₂选自E，Z₃选自G或N。一些具体实施方案中，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，
10 Z₃为G。一些具体实施方案中，X₅为H，Z₁为H，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，X₃为H，X₅为H，Z₂为E。一些具体实施方案中，X₁为K，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E。

15 一些具体实施方案中：

X₁为N或K，X₂为E，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G；

X₁为N，X₂为E，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为N；

X₁为N，X₂为S，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为H，Z₂为E，Z₃为G；

X₁为N，X₂为S，X₃为H，X₄为L，X₅为H，Z₁为T，Z₂为E，Z₃为G；或

20 X₁为N，X₂为E，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。

以上实施方案中，X₆-X₉或X₇-X₉可以各自为G；或，X₆-X₉或X₇-X₉可以不存在。

以上实施方案中，Z₄可以不存在；或，当Z₃为N时，Z₄是除了G、N、S、V、L或P以外的氨基酸。

25 一些实施方案中，胰岛素类似物中的胰岛素B链类似物包含(或为)以下任一：

FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHY (SEQ ID NO:31)；

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFHY (SEQ ID NO:32)；

FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHY (SEQ ID NO:33)；

FVKQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHY (SEQ ID NO:34)；

30 FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHY (SEQ ID NO:35)；

FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHY (SEQ ID NO:36)。

一些实施方案中，胰岛素类似物中的胰岛素A链类似物包含(或为)以下任一：

GIVEQCCESICSLEQLENYCG (SEQ ID NO:37)；

GIVEQCCHSICSLEQLENYCG (SEQ ID NO:38)；

35 GIVEQCCTSICSLEQLENYCN (SEQ ID NO:39)；

GIVEQCCESICSLEQLENYCG (SEQ ID NO:40)；

GIVEQCCESICSLEQLENYCG (SEQ ID NO:41);

GIVEQCCESICSLEQLENYCN (SEQ ID NO:42)。

一些实施方案中，胰岛素类似物中的胰岛素 B 链类似物和胰岛素 A 链类似物包含(或为)以下任意一组所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:31 和 37；SEQ ID NO:32 和 38；SEQ ID NO:33 和 39；SEQ ID NO:34 和 40；SEQ ID NO:35 和 41；SEQ ID NO:36 和 42。

一些实施方案中，以上胰岛素类似物中存在二硫键。一些具体实施方案中，在 CysA7-CysB7 和 CysA20-CysB19 处接合胰岛素 A 链类似物和胰岛素 B 链类似物的两个二硫键；和/或在胰岛素 A 链的类似物中 CysA6-CysA11 处的链内二硫键。

示例性地，“CysA7-CysB7”表示由胰岛素 A 链类似物中从 N 端起第 7 位的 Cys，与胰岛素 B 链类似物中从 N 端起第 7 位的 Cys 之间形成链间二硫键。“CysA20-CysB19”表示由胰岛素 A 链类似物中从 N 端起第 20 位的 Cys，与胰岛素 B 链类似物中从 N 端起第 19 位的 Cys 之间形成链间二硫键。

一些实施方案中，以上任一种的胰岛素类似物具有胰岛素受体激动活性。

一些实施方案中，以上胰岛素类似物在胰岛素 A 链类似物和胰岛素 B 链类似物中的任意一个或任意多个(2、3、4、5、6、7、8 等)位置处具有氨基酸修饰。一些实施方案中，所述修饰为化学基团修饰，以改善胰岛素类似物的化学和/或物理的稳定性，调节胰岛素类似物的功效和/或提高表达。

一些实施方案中，经修饰的胰岛素类似物为葡萄糖反应性胰岛素。

一些实施方案中，以上胰岛素类似物经脂肪酸链修饰。

融合蛋白

本公开提供人胰岛素类似物的融合蛋白。

一些实施方案中，融合蛋白包含胰岛素类似物，

所述胰岛素类似物具有通式：B₁-L₁-A₁；

其中，B₁为胰岛素 B 链类似物，其包含如下的氨基酸序列：

FVX₁QHLX₂HLVEALX₃X₄VCGERGFX₅X₆X₇X₈X₉(SEQ ID NO: 43)，其中，X₁选自 N、G 或 K；X₂选自 S 或 E；X₃选自 Y、H 或 E；X₄选自 H、R、L 或 E；X₅选自 F 或 H；X₆选自 G、T、S、H、V、Y 或不存在；X₇选自 G、E、P、K、D、S、H 或不存在；X₈选自 G、E、K、P、Q、D、H 或不存在；X₉选自 G、T、S、E、K、A 或不存在；

A₁为胰岛素 A 链类似物，其包含如下的氨基酸序列：

GIVEQCCZ₁SICSLZ₂QLENYCZ₃Z₄(SEQ ID NO:44)，其中，Z₁选自 T、H 或 E，Z₂选自 Y、D、S 或 E，Z₃选自 G 或 N；Z₄是任意天然氨基酸或不存在，当 Z₃为 N，Z₄不为 G 或 N。

L₁为连接子。

一些实施方案中，融合蛋白包含胰岛素类似物，

所述胰岛素类似物具有通式：B₁-L₁-A₁；

其中，B₁为胰岛素B链类似物，其包含如下的氨基酸序列：

FVX₁QHLX₂HLVEALX₃X₄VCGERGFX₅Y (SEQ ID NO: 1)，其中，X₁选自N、G或K，X₂选自S或E，X₃选自Y、H或E，X₄选自H、R、L或E，X₅选自F或H；

A₁为胰岛素A链类似物，其包含如下的氨基酸序列：

GIVEQCCZ₁SICSLZ₂QLENYCZ₃ (SEQ ID NO:2)，其中，Z₁选自T、H或E，Z₂选自Y、D、S或E，Z₃选自G或N；

L₁为连接子。

一些实施方案中，B₁包含(或为)SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，其在X₁、X₂、X₃、X₄、X₅具有至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、或5个的氨基酸修饰。一些具体实施方案中，X₁选自N或K，X₂选自S或E，X₃选自Y或H，X₄选自L，和/或X₅选自H。一些具体实施方案中，X₂为E，X₅为H。一些具体实施方案中，X₅为H。一些具体实施方案中，X₃为H，X₅为H。一些具体实施方案中，X₁为K，X₂为E，X₅为H。

一些实施方案中，A₁包含(或为)SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，其在Z₁、Z₂、Z₃具有至少1个、至少2个、或3个的氨基酸修饰。一些具体实施方案中，Z₁选自T、H或E，Z₂选自E，Z₃选自G或N。一些具体实施方案中，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，Z₁为H，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，Z₂为E。一些具体实施方案中，Z₁为E，Z₂为E。

一些实施方案中，胰岛素类似物中的B₁包含(或为)SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO:1 的序列，和，A₁包含(或为)SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。其中，一些具体实施方案中，X₁选自N或K，X₂选自S或E，X₃选自Y或H，X₄选自L，X₅选自H；和Z₁选自T、H或E，Z₂选自E，Z₃选自G或N。一些具体实施方案中，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，X₅为H，Z₁为H，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，X₃为H，X₅为H，Z₂为E。一些具体实施方案中，X₁为K，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。一些具体实施方案中，X₂为E，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E。

一些具体实施方案中，X₁为N或K，X₂为E，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G；

X₁为N，X₂为E，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为N；

X₁为N，X₂为S，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为H，Z₂为E，Z₃为G；

X₁为N，X₂为S，X₃为H，X₄为L，X₅为H，Z₁为T，Z₂为E，Z₃为G；或

X₁为N，X₂为E，X₃为Y，X₄为L，X₅为H，Z₁为E，Z₂为E，Z₃为G。

以上实施方案中，X₆-X₉或X₇-X₉可以各自为G；或，X₆-X₉或X₇-X₉可以不存

在。

以上实施方案中，Z₄可以不存在；或，当Z₃为N时，Z₄是除了G、N、S、V、L或P以外的氨基酸。

一些实施方案中，胰岛素类似物中的B₁包含(或为)SEQ ID NO:31-36中任一
5 氨基酸序列。

一些实施方案中，胰岛素类似物中的A₁包含(或为)SEQ ID NO:37-42中任一
氨基酸序列。

一些实施方案中，胰岛素类似物中的B₁和A₁包含(或为)以下任意一组所示的
氨基酸序列：SEQ ID NO:31和37；SEQ ID NO:32和38；SEQ ID NO:33和39；
10 SEQ ID NO:34和40；SEQ ID NO:35和41；SEQ ID NO:36和42。

一些实施方案中，L₁所示连接子为能够实现连接功能的多肽，例如为柔性多
肽。一些具体实施方案中，L₁所示连接子包含(或为)以下序列：包括但不限于
G₄S(SEQ ID NO: 53)、GS、GAP、ASGS(SEQ ID NO: 54)、多聚鸟嘌呤(poly G)。
一些具体实施方案中，L₁所示连接子包括(或为) (G_mS_p)_n，其中，m各自独立的选
15 自1-10(例如，1、2、3、4、5、6)的整数，n各自独立的选自1-10(例如，1、2、3、
4、5、6)的整数，p各自独立的选自0-4。一些具体实施方案中，GS或poly G连
接子中至少具有5个G。

在本公开中，GS连接子涵盖连接子中包含氨基酸G和S的任意类型的连接子。

一些具体实施方案中，L₁所示连接子包含(或为)GGSGGGG(SEQ ID NO:45)、
20 GSGGGG(SEQ ID NO:46)、GGGGG(SEQ ID NO:47)、GGGGGSGGGG (SEQ ID
NO:3)或GGGGGSGGGG (SEQ ID NO:52)。

一些实施方案中，融合蛋白中还含有C₁结构域，所述C₁结构域能够延长胰岛
素类似物的半衰期。

一些实施方案中，融合蛋白中还含有C₁结构域，所述C₁选自例如免疫球蛋白
25 (例如IgG(例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM)
的Fc区、HSA蛋白或多肽、HSA结合结构域(例如抗HSA抗体或其抗原结合片段)、
XTEN、肽富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、
CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。

一些具体实施方案中，XTEN肽是非结构化亲水性长肽，其包含不同百分比的
30 六种氨基酸：Ala、Glu、Gly、Ser和Thr，例如为XTEN™肽(Amunix Operating Inc.)。
一些具体实施方案中，PAS多肽是由Pro、Ala和Ser残基组成的亲水性不带电多
肽，长度为至少约100、200、300、400、500或600个氨基酸。

一些实施方案中，一个融合蛋白中含有1个或多个(例如2、3、4个)胰岛素类
似物，和一个C₁。

一些具体实施方案中，C₁选自人IgG1、IgG2、IgG4的Fc区。一些具体实施
35 方案中，Fc区含有突变，所述Fc区的突变选自：IgG1上的L234A/L235A，IgG2

上的 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, IgG4 上的 F234A/L235A, IgG4 上的 S228P 或 S228P/F234A/L235A, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 上的 N297A, IgG2 上的 V234A/G237A, IgG1 上的 K214T/E233P/L234V/L235A/G236 缺失/A327G/P331A/D365E/L358MV309L/A330S/P331S, IgG1 上的 L234F/L235E/D265A, 5 IgG1 上的 L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, IgG4 上的 S228P/F234A/L235A/G237A/P238S, 以及 IgG4 上的 S228P/F234A/L235A/G236 缺失/G237A/P238S。还可使用杂合 IgG2/4Fc 域, 例如具有来自 IgG2 的残基 117-260 和来自 IgG4 的残基 261-447 的 Fc。一些具体的实施方案中, 所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。一些具体的实施方案中, 所述人 10 IgG1 的 Fc 区具有 L234A/L235A 或 L234A/L235A/P329G 突变。一些实施方案中, 上述 Fc 区的突变位点根据 EU 编号规则编号。

一些具体实施方案中, C₁ 选自包含(或如)SEQ ID NO:17、18、48-51 任一所示的氨基酸序列, 或与之具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的序列。

15 >人 IgG1 Fc 区 1

EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
20 EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:48);

>人 IgG1 Fc 区 2

EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
25 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:49);

>人 IgG4 Fc 区 1

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
30 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:50);

>人 IgG4 Fc 区 2

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV
35 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:51)。

一些实施方案中，融合蛋白中还含有 L_2 ， L_2 所示连接子为能够实现连接功能的多肽(例如为柔性多肽)， C_1 通过 L_2 与 $B_1-L_1-A_1$ 形成融合蛋白。一些具体实施方案中， L_2 所示连接子包含(或为)以下序列：包括但不限于 G_4S 、 GS 、 GAP 、 $ASGS$ 、多聚鸟嘌呤(poly G)、 $(G_mQ)_n$ 、 $(G_mA)_n$ 、 $(G_mQ_i)_n$ 、 $(G_mA_i)_n$ 或 $(PGPQ)_s$ (SEQ ID NO: 55)，其中， m 各自独立的选自 1-10 的整数(例如 1、2、3、4、5、6)， n 各自独立的选自 1-10 的整数(例如 1、2、3、4、5、6)， i 各自独立的选自 0-4(例如 0、1、2、3、4)， s 选自 1-10 的整数(例如 1、2、3、4、5、6)。一些具体实施方案中， L_2 包含(或为)SEQ ID NO:10-16 任一所示的氨基酸序列。

一些实施方案中，融合蛋白中 C_1 位于胰岛素类似物的 N 端。另一些实施方案中，融合蛋白中 C_1 位于胰岛素类似物的 C 端。一些具体实施方案中，融合蛋白中从 N 端到 C 端为 $B_1-L_1-A_1-L_2-C_1$ ， $C_1-L_2-B_1-L_1-A_1$ ， $A_1-L_1-B_1-L_2-C_1$ 或 $C_1-L_2-A_1-L_1-B_1$ 。

一些实施方案中，所述胰岛素类似物为具有胰岛素受体激动活性的胰岛素受体激动剂。

一些实施方案中，融合蛋白为单体、二聚体或多聚体。一些具体实施方案中，二聚体是同型二聚体，其中构成二聚体的两个融合蛋白的氨基酸序列是相同或基本相同的。在另一些具体实施方案中，二聚体是异型二聚体，其中构成二聚体的两个融合蛋白的氨基酸序列是不同的。

一些实施方案中，融合蛋白包含(或为)SEQ ID NO:19-27 任一所示的氨基酸序列，或与之具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的序列。

一些实施方案中，本公开的融合蛋白(例如 SEQ ID NO:19-27 任一的序列，更例如 SEQ ID NO:19、20、21 或 27)具有降低的促细胞增殖的能力，从而具有降低的诱导肿瘤发生和/或肿瘤发展的风险。所述细胞例如是表面表达 IGF-1R 的细胞。一些实施方案中，所述降低是融合蛋白较之天然人胰岛素促细胞(例如 MCF-7)增殖的 EC_{50} 值提高 1 至 10 倍、1 至 100 倍、1 至 1000 倍、1 至 10000 倍、100 至 500 倍、200 至 400 倍；例如， EC_{50} 提高约 100 倍、约 200 倍、约 300 倍、约 400 倍、约 500 倍、约 600 倍、约 700 倍、约 800 倍、约 900 倍、约 1000 倍。一些具体实施方案中，SEQ ID NO:19 所示的融合蛋白 1 具有较之天然人胰岛素降低约 200 倍的促细胞增殖能力。可使用本公开实施例 5 的方法检测细胞(例如 MCF-7)增殖的 EC_{50} 。

一些实施方案中，本公开的融合蛋白(例如 SEQ ID NO:19-27 任一的序列，更例如 SEQ ID NO:19 或 20)具有 1 天至 10 天、2 天至 9 天、2 天至 8 天、3 天至 7 天的半衰期，例如约 1、约 2、约 2.5、约 3、约 3.5、约 4、约 4.5、约 5、约 5.5、约 6、约 6.5、约 7、约 7.5、约 8、约 8.5、约 9、约 9.5、约 10 天的半衰期。一些具体实施方案中，SEQ ID NO:19 所示的融合蛋白 1 具有约 4.5 天的半衰期。可使用本公开实施例 6 的方法检测蛋白的半衰期。

35 多核苷酸

本公开提供编码本公开的融合蛋白、胰岛素类似物的多核苷酸。本公开的多核

苷酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本公开的一些实施方案，本公开的核酸是基本上分离的核酸。

“基本上分离的”是指脱离其天然存在的状态或经纯化处理的状态，并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子或其他材料（例如细胞碎片或培养基）。“基本上分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐，除非它们以显著干扰治疗用途的量存在。

本公开的核酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供融合蛋白、胰岛素类似物在体外和/或体内（即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中）表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件（例如启动子、增强子、终止子等）。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的融合蛋白、胰岛素类似物表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的核酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式（例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术）制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达一种或多种本公开的融合蛋白、胰岛素类似物或含有本公开的多核苷酸或载体的重组宿主细胞。一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株（例如大肠杆菌（*Escherichia coli*）菌株、变形杆菌属（*Proteus*）菌株及假单胞菌属（*Pseudomonas*）菌株）及革兰氏阳性细菌菌株（例如芽孢杆菌属（*Bacillus*）菌株、链霉菌属（*Streptomyces*）菌株、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）菌株及乳球菌属（*Lactococcus*）菌株）的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属（*Trichoderma*）、脉孢菌属（*Neurospora*）及曲菌属（*Aspergillus*）的物种的细胞；或者包括酵母属（*Saccharomyces*）（例如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*））、裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*）（例如粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*））、毕赤酵母属（*Pichia*）（例如巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）及嗜甲醇毕赤酵母（*Pichia methanolica*））及汉森酵母属（*Hansenula*）的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

本公开的细胞不能发育成完成的植株或动物个体。

生产或制备方法

本公开提供制备本公开的融合蛋白、胰岛素类似物的方法，所述方法通常包含以下步骤：

- 在允许表达本公开的融合蛋白、胰岛素类似物条件下，培养本公开的宿主细胞；及
- 从培养物中回收由所述宿主细胞表达的目的融合蛋白、胰岛素类似物；及
- 任选的，包括进一步纯化和/或修饰本公开的目的融合蛋白、胰岛素类似物。

本公开的融合蛋白、胰岛素类似物可在如上所述细胞中以细胞内方式（例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中）产生，接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化；或其可以细胞外方式（例如在培养宿主细胞的培养基中）产生，接着自培养基分离且任选进一步纯化。

用于重组产生多肽的方法及试剂，例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本公开的蛋白的方法中的蛋白分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。作为一个示例，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

然而，本公开的融合蛋白、胰岛素类似物也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

药物组合物

本公开提供药物组合物，其含有预防或治疗有效量的选自以下的任一项或其组合：如上所述的融合蛋白、胰岛素类似物或其编码多核苷酸，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

一些具体实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的融合蛋白或胰岛素类似物。另一些具体实施方案中，药物组合物单位剂量中含融合蛋白或胰岛素类似物的量为 0.1-2000 mg；一些具体实施方案中为 1-1000 mg。

试剂盒（或药盒）

本公开提供试剂盒或药盒，包含一个或多个容器，其各自独立地包含选自以下的任一项或其组合：本公开的融合蛋白、胰岛素类似物或其编码多核苷酸。

一些实施方案中，所述装置包含注射器和针。在一些具体实施方案中，所述装置是预充针。

预防、治疗疾病的方法和制药用途

本公开提供了包含本公开的融合蛋白或胰岛素类似物的组合物、多核苷酸、药物组合物在预防、治疗、缓解疾病或症状中用途和方法。

一些实施方案中，包括向有需要的受试者施用有效量的本公开的融合蛋白或胰岛素类似物的方法，用于预防、治疗、缓解疾病或症状。

5 一些实施方案中，所述疾病或症状选自非胰岛素依赖性糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病或其它代谢类疾病。所述有需要的受试者未经治疗，或用口服药物(诸如，磺酰脲、二甲双胍、噻唑烷二酮诸如吡格列酮、 α -葡萄糖苷酶抑制剂诸如阿卡波糖)和/或非胰岛素可注射剂(包括基于肠降血糖素的疗法，诸如 DPP-4 抑制剂和 GLP-1R 激动剂)治疗。

10 一些实施方案中，所述疾病或症状选自糖尿病、肥胖症、异常血脂症和/或代谢综合症。

一些实施方案中，所述疾病或症状为糖尿病并发症，或糖尿病相关的心脏病、中风、肾病变、视网膜病、神经性病变或肾病。

15 一些实施方案中，所述疾病或症状选自高血糖症、II 型糖尿病、葡萄糖耐量削弱、I 型糖尿病、肥胖症、X 综合征或血脂异常。

一些实施方案中，提供向有需要的受试者施用有效量的本公开的融合蛋白或胰岛素类似物的方法，用于降低血糖。

本公开还提供本公开的融合蛋白、胰岛素类似物用于制备预防、治疗、缓解上述疾病或症状的药物的制药用途。

20 定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学。除非在本公开中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J. Biol. Chem, 243, p3558(1968)中所述。

25 “胰岛素”包括天然存在的胰岛素(例如人胰岛素)，人胰岛素由两个多肽链组成，所述两个多肽链被称为 A 和 B 链，其分别包含 21 个和 30 个氨基酸残基且其通过两个半胱氨酸二硫键连接。A 链示例性如本公开 SEQ ID NO:29 所示，B 链示例性如本公开 SEQ ID NO:30 所示。

30 “胰岛素类似物”包括多肽，其通过去除和/或取代(置换)天然胰岛素中存在的一个或多个氨基酸残基和/或通过添加一个或多个氨基酸残基，具有形式上可以源自于天然存在胰岛素(例如人胰岛素结构)的分子结构。添加和/或取代的氨基酸残基可以是可编码的氨基酸残基或其它天然存在的氨基酸残基或纯粹合成的氨基酸残基。

35 “胰岛素 A 链类似物”是指，相对于人胰岛素的 A 链，其具有 A 链的一个或多个氨基酸取代、缺失和/或延长(添加)。

“胰岛素 B 链类似物”是指，相对于人胰岛素的 B 链，其具有 B 链的一个或

多个氨基酸取代、缺失和/或延长(添加)。

“葡萄糖反应性胰岛素”(GRI, glucose-responsive insulin)可以根据血糖水平调节胰岛素的释放和作用,从而达到降低低血糖发生率,使血糖控制更平稳。

术语“胰岛素受体激动剂”是指结合至并且活化胰岛素受体、导致血糖水平下降和/或肝葡萄糖排出抑制的蛋白,其特征在于其可使用已知技术(诸如在本公开实施例描述的研究中显示的那些)进行测试和测量。在一些实施方案中,胰岛素受体激动剂由胰岛素 A 链类似物与胰岛素 B 链类似物直接或间接连接(例如,通过连接子连接)形成。

“序列”一般应理解为既包括相关氨基酸序列,又包括编码所述序列的核酸序列或核苷酸序列,除非本公开需要进一步限定的解释。

“同源性”或“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时,那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100\%$ 的函数。例如,在序列最佳比对时,如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源,那么两个序列为 60%同源。一般而言,当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“核酸分子”与“多核苷酸”可互换使用,其是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的,优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

“载体”意指能够在宿主细胞中递送并且表达一种或多种目的基因或序列的构建体。载体的例子包括但不限于病毒载体、裸露 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂结合的 DNA 或 RNA 表达载体、封装在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体。

“宿主细胞”包括细胞或细胞培养物,其可为或已是载体的接受者。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代,并且由于天然、偶然或有意的突变,子代可不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这类名称都包括其后代(不考虑传代次数);例如,包括与最初转化细胞中筛选的亲本细胞具有相同功能或生物学活性的突变后代。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述活性成分或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

“药学可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括当与活性成分组合时,允许该

成分保留生物学活性并且不具有预期治疗目的的任何材料。例子包括但不限于任何标准药物载体，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。在一些实施例中，用于气雾剂或肠胃外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水（PBS）或生理（0.9%）盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法配制（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A.Gennaro, 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 以及 R Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing, 2000）。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触，例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者治疗剂，诸如包含本公开的任一种融合蛋白或胰岛素类似物为治疗剂，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种糖尿病或高血糖相关疾病或其症状，而己知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，是通过以预防或延迟症状或并发症的发作，减轻症状或并发症，或者消除疾病、病况或病症到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。待治疗的患者是哺乳动物，并且优选地为人类。

“预防”是指降低一种或多种病况、症状、并发症或病症的风险或发病率，或者消除或减缓一种或多种病况、症状、并发症或病症的进展。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

“约”、“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内，所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如，“约”

可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者，“约”或“基本上包含”可意味着至多 20% 的范围，例如 1% 至 15% 之间、在 1% 至 10% 之间、在 1% 至 5% 之间、在 0.5% 至 5% 之间、在 0.5% 至 1% 之间变化，本公开中，数字或数值范围之前有术语“约”的每种情况也包括给定数的实施方案。除非另外说明，否则当具体值在本申请和
5 权利要求中出现时，“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

10

附图说明

图 1 为 STZ 诱导获得的 I 型糖尿病大鼠模型中，单次皮下注射融合蛋白 1 后的降糖效果图。

图 2 为 STZ 诱导获得的 I 型糖尿病大鼠模型中，单次皮下注射 LY3209590、
15 融合蛋白 2、融合蛋白 9 后的降糖效果图。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

20

本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience，NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

25

实施例 1. 人胰岛素类似物及其与 Fc 融合蛋白的设计

本实施例提供人胰岛素类似物，从 N 端到 C 端的通式为：B₁-L₁-A₁。

其中，B₁ 为人胰岛素 B 链类似物，序列为：

FVX₁QHLCGX₂HLVEALX₃X₄VCGERGFX₅Y (SEQ ID NO: 1)，其中，X₁ 选自 Asn, Gly 或 Lys 的氨基酸残基，X₂ 选自 Ser 或 Glu 的氨基酸残基，X₃ 选自 Tyr, His 或 Glu 的氨基酸残基，X₄ 选自 His, Arg, Leu 或 Glu 的氨基酸残基，X₅ 选自
30 Phe 或 His 的氨基酸残基；

A₁ 为胰岛素 A 链类似物，序列为：GIVEQCCZ₁SICSLZ₂QLENYCZ₃ (SEQ ID NO:2)，其中，Z₁ 选自 Thr, His 或 Glu 的氨基酸残基，Z₂ 选自 Tyr, Asp, Ser 或 Glu 的氨基酸残基，Z₃ 选自 Gly 或 Asn 的氨基酸残基；

35

L₁ 为 GGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 3) 或 GGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 52)。

示例性人胰岛素类似物的序列如下：

- >人胰岛素类似物 1
- FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCG (SEQ ID NO:4)
- >人胰岛素类似物 2
- 5 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCHSICSLEQLE
NYCG (SEQ ID NO:5)
- >人胰岛素类似物 3
- FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLEQLE
NYCN (SEQ ID NO:6)
- 10 >人胰岛素类似物 4
- FVKQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCG (SEQ ID NO:7)
- >人胰岛素类似物 5
- FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLEN
15 YCG (SEQ ID NO:8)
- >人胰岛素类似物 6
- FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCN (SEQ ID NO:9)。

进一步地，提供上述人胰岛素类似物与 Fc 的融合蛋白，两者的融合通过如表 20 1 的连接子实现。

表 1. 人胰岛素类似物与 Fc 融合的连接子序列

氨基酸序列	序列编号
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGG	SEQ ID NO:10
HGGGQGGGGQGGGGQGGGGG	SEQ ID NO:11
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ	SEQ ID NO:12
PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ	SEQ ID NO:13
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGG	SEQ ID NO:14
GGGGAGGGGAGGGGAGGGGG	SEQ ID NO:15
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGPCPPCPAPEAAG	SEQ ID NO:16

所述 Fc 为人 IgG2 的 Fc，氨基酸序列如下：

- > IgG2 Fc1
- 25 ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:17)
- > IgG2 Fc2
- 30 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:18)。

5 示例性融合蛋白的氨基酸序列如下：

>融合蛋白 1（胰岛素类似物 1+L2+IgG2 Fc1）

FVNQHLCGHEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT
10 VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:19)

>融合蛋白 2（胰岛素类似物 2+L2+IgG2 Fc1）

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCHSICSLEQLE
15 NYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT
VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:20)

20 >融合蛋白 3（胰岛素类似物 3+L2+IgG2 Fc1）

FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCTSICSLEQLE
NYCNGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT
VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
25 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:21)

>融合蛋白 4（胰岛素类似物 4+L2+IgG2 Fc1）

FVKQHLCGHEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
30 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT
VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:22)

>融合蛋白 5（胰岛素类似物 1+L2+IgG2 Fc1）

FVNQHLCGHEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSFLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSK
40 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:23)

>融合蛋白 6 (胰岛素类似物 5+L2+IgG2 Fc1)

FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLEN
YCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
5 VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:24)

>融合蛋白 7 (胰岛素类似物 1+L2+IgG2 Fc1)

FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
10 NYCGPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQECPPCPAPPVAGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:25)

15 >融合蛋白 8 (胰岛素类似物 1+L2+IgG2 Fc1)

FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
20 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:26)

>融合蛋白 9 (胰岛素类似物 6+L2+IgG2 Fc1)

FVNQHLCGEHLVEALYLVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCESICSLEQLE
NYCNHGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
25 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:27)。

此外, LY3209590 为美国礼来公司开发的一周给药一次的超长效胰岛素类似
30 物, 目前处于临床三期研究阶段, 其氨基酸序列为:

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYGGGGGSGGGGGIVEQCCTSTCSLDQL
ENYCGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGGECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
35 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:28)

下划线均为连接子序列。

野生型人胰岛素序列如下:

>A 链

GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO:29)

>B 链

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO:30)。

5 实施例 2. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白的制备、表征和鉴定

1. 制备

1) HEK-293 细胞表达

使用去除内毒素的中提试剂盒 (Promega, A2495) 抽提克隆正确的质粒, 经测序正确后, 准备细胞转染生产蛋白。HEK293 悬浮细胞使用 Freestyle 293 培养基 (invitrogen, cat No.12338026) 规律传代, 在转染前一天传代至密度 6×10^5 细胞/mL, 转染当天测定细胞活性与密度, 保证细胞活性 >90%, 并调整细胞密度至 1.1×10^6 细胞/mL, 按照 $1 \mu\text{g}$ DNA/mL 细胞的量准备质粒 DNA, 使用 opti-MEM (invitrogen, cat No. 51985-034) 分别稀释所用 DNA 及对应的 293-fectin (Invitrogen, cat No. 12347019), 轻摇混匀, 室温放置 5 min, 将稀释好的 DNA 和脂质体轻摇混合, 室温放置 20 min 后缓慢加入待转染的 HEK293 细胞中, 轻轻旋转细胞培养瓶。之后细胞放置在 37°C 摇床中悬浮震荡培养 ($5\% \text{CO}_2$, 135 rpm, 75% 湿度), 转染后 5 天收取细胞培养液上清, 4000 转/min 离心 20 min, 取上清液并使用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器进行过滤。

2) ExpiCHO 细胞表达

ExpiCHO 悬浮细胞使用 ExpiCHO 表达培养基 (Invitrogen, Cat No. A2910002) 规律传代, 按照 $1 \mu\text{g}$ DNA/mL 转染细胞的量比使用 ExpiCHO 表达系统 (Cat. no. A29133) 进行转染。采用说明书中 “High protocol”, 转染后将细胞放置于 32°C 摇床悬浮震荡培养 ($5\% \text{CO}_2$, 110 rpm, 75% 湿度), 转染后第 10-12 天收取细胞培养液上清, 4000 转/min 离心 20 min, 取上清并使用 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤器过滤。

25 3) 表达量检测

将人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白采用紫外吸收法测试纯化后蛋白的 OD280 并以此为依据推算各融合蛋白在不同表达体系中的表达量。结果显示, 融合蛋白 1 至 9 在 HEK293 表达体系中均可表达, 部分融合蛋白产量优异。例如, 融合蛋白 1 为 119 mg/L, 融合蛋白 4 为 116 mg/L, 融合蛋白 6 为 132 mg/L, 融合蛋白 7 为 110 mg/L, 融合蛋白 8 为 119 mg/L。在 ExpiCHO 瞬转表达体系中, 融合蛋白 1 的表达量超过 400 mg/L。

4) 纯化

Protein-A 亲和层析:

将表达 Fc 融合蛋白的细胞培养上清进行高速离心收取上清后使用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。Protein-A (GE, Cat:17-5474-99) 亲和柱利用 5 倍柱体积的 0.1M NaOH 水溶液 (Sigma: Cat: 71687-500g) 再生, 然后用 5 倍柱体积的 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液 (pH 7.4)

(Sangon Biotech (Shanghai) co., Ltd.: Cat.E607016-0500) 清洗平衡。将上清低流速进行上样, 以便结合, 控制流速使保留时间约至少 1min, 结合完毕后利用 5-10 倍柱体积的 1×PBS 缓冲液 (pH 7.4) 冲洗层析柱至紫外吸收回落至基线。之后, 利用 0.1 M 甘氨酸 (pH 3.0) (Sigma: Cat. 410225-250G) 缓冲液进行样品洗脱, 根据紫外检测收集洗脱峰, 洗脱产物利用 1M Tris-HCl(pH7.5)(Vetec, Cat. V900483) 快速调节 pH 至 7-8, 暂存。对于洗脱产物, 可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换, 如利用超滤管进行超滤浓缩, 及溶液置换至所需的缓冲体系, 或者利用分子排阻 (如 G-25 脱盐) 替换成所需的缓冲体系。人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白最终的保存体系为 1×PBS 缓冲液, pH 7.4。

10 阴离子层析:

第一步, 使用平衡缓冲液 20 mM Tris pH 8.0 (Vetec, Cat. V900483) 稀释样品, 使其电导率低于 3 ms/cm, Q HP (GE, Cat:17-1014-01) 阴离子层析柱用 5 倍柱体积的 0.5 M NaOH 水溶液 (Sigma Cat: 71687-500g) 再生后用 15 倍柱体积的 20 mM Tris 缓冲液 pH 8.0 (Vetec, Cat. V900483) 清洗平衡。将上清低流速进行上样, 以便结合, 控制流速使保留时间至少 2min, 结合完毕后利用 10 倍柱体积的 20 mM Tris 缓冲液 pH 8.0 (Vetec, Cat. V900483) 冲洗层析柱至紫外吸收回落至基线。用洗脱缓冲液 20 mM Tris pH 8.0 (Vetec, Cat. V900483) 0.5 M NaCl (Vetec, Cat. V900058) 进行 0-100%的梯度洗脱; 根据 SEC-HPLC (Column: TSKgel G3000SW_{XL}, 5μm, Cat. 008541) 纯度, 检测收集洗脱峰。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换, 如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系, 或者利用分子排阻 (如 G-25 脱盐) 替换成所需的缓冲体系。人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白最终的保存缓冲体系为 1×PBS 缓冲液, pH 7.4。

2. 表征和鉴定

体积排阻色谱(SEC-HPLC): 使用安捷伦 1260 infinity 高效液相色谱系统, 色谱柱使用 Tosoh (TSGel-G3000SWXL, 色谱柱尺寸为 7.8 mm×300 mm)。进样前, 使用含 5%异丙醇的 2×PBS 缓冲液平衡色谱柱及系统, 接着进样 15 μg 后使用相同缓冲液洗脱, 方法持续时间为 20 min, 方法流速为 1 mL/min。

超高效液相色谱-质谱联用: 使用安捷伦 1290-6530 超高效液相色谱-质谱联用系统进行表征, 色谱柱使用赛分-C4(粒径 3 μm, 色谱柱尺寸为: 2.1 mm×50 mm), 流动相 A 为含 0.1%甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1%甲酸的乙腈, 流速为 1 mL/min, 色谱柱温度维持在 60℃, 所使用的色谱梯度如表 2 所示。质谱仪相关检测参数设置模式: 1 GHz, 毛细管电压: 5000 V, 去溶剂气体温度: 350℃, 气体流速: 12 L/min, Fragmentor 电压: 380V, MS 采集范围: 100 m/z-4000 m/z。

表 2. 色谱梯度

RT(min)	0	2	7	7.1	8	8.5	9	9.5	10	10.5	12
B%	10	10	50	90	90	10	90	10	90	10	10

表 3 数据显示，融合蛋白 1 至 9 经纯化后皆具有良好的纯度和符合预期的分子量。

表 3. SEC-HPLC 纯度及分子量

融合蛋白	SEC-HPLC 纯度	实测分子量
LY3209590	100.0%	66980.00 Da
融合蛋白 1	100.0%	67241.36 Da
融合蛋白 2	100.0%	67172.00 Da
融合蛋白 3	98.7%	67164.00 Da
融合蛋白 4	99.1%	67269.00 Da
融合蛋白 5	98.8%	68095.00 Da
融合蛋白 6	99.3%	67126.00 Da
融合蛋白 7	99.6%	70602.00 Da
融合蛋白 8	99.5%	66899.00 Da
融合蛋白 9	99.5%	67515.00 Da

5

以下实施例对本公开融合蛋白的生物学活性进行测试。

实施例 3. B 型人胰岛素受体（hIR-B）自磷酸化检测实验

在过表达人胰岛素受体 B 亚型的 CHO-K1 细胞中考察不同人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白促进人胰岛素受体 B 亚型自磷酸化的活性，并进行对比。通过计算在该
10 测试体系中得到的 EC₅₀ 值对各融合蛋白促进人胰岛素受体 B 亚型自磷酸化活性进行评估，更低的 EC₅₀ 值意味着更高的体外活性。

实验方法：实验开始前 18 个小时，用 CHO-K1-hIRB 细胞（上海辉源，CHO-K1-hIRB-M-20170706）铺 96 孔板，10⁴/孔，加入 100 μL 生长培养基（F-12K
15 培养基，含 10% FBS，4 μg/mL 杀稻瘟菌素的 1×青霉素-链霉素），37℃，5% CO₂ 培养过夜；实验当天早上，按照需求稀释人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白于 50μL 饥饿培养基（F-12K 培养基，含 0.1% BSA，4 ug/mL 杀稻瘟菌素的 1×青霉素-链霉素），舍弃旧培养基后，用含人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白的饥饿培养基孵育细胞，37℃，5% CO₂ 孵育 20 分钟；之后舍弃培养基，用试剂盒（IR-beta
20 phospho-Y1150/1151 试剂盒，Cisbio，批号：63ADK016PEG）中的细胞裂解液裂解细胞，37℃孵育 30 min；之后吸取 16 μL 裂解液到 96 孔板中，加入 4 μL 配好的抗体混合液（含 Phospho InsuLin Receptor beta Cryptate antibody 及 Phospho InsuLin Receptor beta d2 antibody），室温下孵育 4h。

数据处理方法：使用 Tecan 酶标仪进行信号读取，激发波长为 320 nm，发射
25 波长为 620 nm 和 665 nm。计算信号比值（665 nm/620 nm×10,000），并在 GraphPad Prism 6 中将信号比值与样品浓度使用四参数方程进行非线性拟合，得出 EC₅₀ 值，见表 4。本实施例及在后实施例中作为对照的人胰岛素购自 Sigma-Aldrich。

表 4. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白的 B 型胰岛素受体自磷酸化活性

蛋白	人胰岛素受体亚型 B 活 (EC ₅₀)
人胰岛素	0.43 nM
LY3209590	115.50 nM
融合蛋白 1	421.60 nM
融合蛋白 2	2.68 nM
融合蛋白 3	4.57 nM
融合蛋白 4	288.00 nM
融合蛋白 5	181.80 nM
融合蛋白 6	328.50 nM
融合蛋白 7	275.00 nM
融合蛋白 8	326.30 nM
融合蛋白 9	119.70 nM

表 4 结果显示，本公开的融合蛋白均具有一定激活胰岛素受体 B 亚型自磷酸化的活性，EC₅₀ 值显示所有融合蛋白的活性显著弱于天然人胰岛素，部分融合蛋白激活胰岛素受体 B 亚型自磷酸化的活性与 LY3209590 相当或略强。这说明所公开的融合蛋白均为人胰岛素受体激动剂，但相比天然人胰岛素而言，活性减弱，在临床上具有更安全的给药窗口，能降低患者的低血糖等相关副作用。

实施例 4. C2C12 小鼠成肌细胞 AKT 磷酸化活性检测实验

胰岛素类似物结合胰岛素受体后会激活下游的一系列信号通路，其中刺激 AKT 磷酸化是胰岛素及其类似物产生降血糖效果的一条主要信号通路。因此，在 C2C12 小鼠成肌细胞中考察不同人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白刺激 AKT 磷酸化的活性，并进行对比。通过计算各融合蛋白在该测试体系中的 EC₅₀ 值对各融合蛋白刺激小鼠成肌细胞 AKT 磷酸化活性进行评估，更低的 EC₅₀ 值意味着更高的活性。

实验方法：实验开始前 18 个小时，用 C2C12 细胞（Procell，CL-0044）铺 96 孔板，10⁴/孔，加入 100 μL 生长培养基（DMEM 培养基，含 10% FBS 的 1×青霉素-链霉素），37℃，5% CO₂ 培养过夜；实验当天早上，按照需求稀释人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白于 50 μL 饥饿培养基（DMEM 培养基，不含 FBS 的 1×青霉素-链霉素），舍弃旧培养基后，用含人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白的饥饿培养基孵育细胞，在 37℃，含 5% CO₂ 培养箱内孵育 20 分钟；之后舍弃培养基，用试剂盒（AKT phospho-S473 kit, Cisbio, 64AKSPEG）中的细胞裂解液裂解细胞，37℃条件下孵育 30min；之后吸取 16 μL 裂解液于 96 孔板中，并加入 4 μL 配好的抗体混合液（含 Phospho-AKT Eu Cryptate antibody 和 Phospho-AKT d2 antibody），室温下孵育 4h。使用实施例 3 中的数据处理方法，得出 EC₅₀ 值，见表 5。

表 5. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白 C2C12 小鼠成肌细胞刺激 AKT 磷酸化活性

蛋白	AKT 磷酸化活性 (EC ₅₀)
----	-------------------------------

人胰岛素	5.44 nM
LY3209590	193.80 nM
融合蛋白 1	489.90 nM
融合蛋白 2	90.49 nM
融合蛋白 3	28.56 nM
融合蛋白 4	565.10 nM
融合蛋白 5	320.00 nM
融合蛋白 6	455.70 nM
融合蛋白 7	280.00 nM
融合蛋白 8	543.80 nM
融合蛋白 9	132.90 nM

结果显示,本公开的融合蛋白均具有一定激活胰岛素受体 AKT 磷酸化的活性, EC₅₀ 值显示所有融合蛋白的活性显著弱于天然人胰岛素, 部分融合蛋白的活性与 LY3209590 相当。这说明, 融合蛋白皆具有显著刺激小鼠成肌细胞 AKT 磷酸化的活性, 但其活性弱于天然人胰岛素。

实施例 5. 促人 MCF-7（人乳腺癌细胞）增殖实验

在人 MCF-7 乳腺癌细胞中考察本公开部分人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白激活下游信号通路促进细胞增殖的能力。对于胰岛素及胰岛素类似物, 有许多的研究表明除了其诱导的降血糖等一系列代谢活性, 胰岛素及胰岛素类似物也有激活下游其它信号通路进而促进细胞增殖的活性。促进细胞增殖的活性与胰岛素及其类似物诱导肿瘤生成的现象密切相关。其中, 诺和诺德公司研发的速效胰岛素类似物 B10 Asp 胰岛素的后期开发被该化合物在大鼠模型中观察到显著的肿瘤生成所终止。因此, 本实验的目的在于使用 MCF-7 人类乳腺癌细胞对本公开中的融合蛋白诱导细胞增殖的能力进行评估, 大幅降低的促细胞增殖能力意味着后期更低的诱导肿瘤生成的风险。有研究显示, 胰岛素或其类似物的这种促细胞增殖的能力与部分细胞表面表达 IGF-1R 有关, 胰岛素或其类似物与 IGF-1R 反应, 会促进细胞的增殖, 从而诱导肿瘤发生发展的可能性。

实验方法: 实验开始前将 MCF-7 细胞 (Procell, CL-147) 在含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基中重悬并计数, 在 96 孔透明底黑色细胞培养板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 密度为 5×10³ 细胞/孔, 37℃, 5% CO₂ 培养过夜; 实验当天早上, 按照需求稀释人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白于 50 μL 饥饿培养基 (DMEM 培养基, 含 0.5% FBS), 舍弃旧培养基后, 用含人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白的饥饿培养基孵育细胞, 37℃, 5% CO₂, 孵育 3 天; 孵育结束后, 在 96 孔板中加入 CellTiter-Glo 检测液 (50 μL) 室温摇晃混匀 2min, 避光放置 10min 后, 使用 Tecan 酶标仪, 读取荧光值并计算 EC₅₀ 值, 见表 6。

表 6. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白促 MCF-7 增殖活性

蛋白	促 MCF-7 增殖活性 (EC ₅₀)
人胰岛素	1.32 nM
LY3209590	31.24 nM
融合蛋白 1	280.30 nM

结果显示,在多次平行实验中(表 6 为其中一次),融合蛋白 1 均相对于天然人胰岛素皆具有较弱的刺激 MCF-7 细胞增殖的活性。令人意料不到的是,相对于 LY3209590,融合蛋白 1 有显著降低的刺激 MCF-7 人类乳腺癌细胞增殖的活性,提示该融合蛋白具有潜在更低的诱导肿瘤生成的风险。同时,本公开的其他融合蛋白 2 至 9 也显示对 MCF-7 较之人胰岛素更低的促细胞增殖活性。例如,融合蛋白 2 的促 MCF-7 增殖活性的 EC₅₀ 为 LY3209590 的 EC₅₀ 值的约 2 倍。

实施例 6. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白药代动力学特性检测

本实施例以 SD 大鼠为动物模型,研究融合蛋白 1 在正常雄性 SD 大鼠体内单次皮下或静脉注射给药后的药代动力学特性。

实验方法:选取体重 170-200 克、周龄 5-7 周的雄性 SD 大鼠(购自维通利华)。用 1×PBS 缓冲液配制融合蛋白 1,按照 30 nmol/kg 的剂量通过尾静脉或背部皮下注射进入大鼠体内,给药后不禁食,分别于给药后 15min、1h、2h、4h、第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 8 天、第 11 天、第 14 天、第 21 天和第 25 天眼眶取血,EDTA 抗凝,离心后得到血浆,用于体内药代动力学特性的分析。药代动力学特性分析采用酶联免疫吸附法进行,使用捕获抗体抗人 IgG-Fc (I2136, sigma) 包被多孔板,加入胰岛素多克隆抗体 (337E2A20, invitrogen), 其与待测分子发生特异性结合,然后用检测抗体抗兔 IgG 过氧化物酶 (A0545, sigma) 去定量血浆中待测分子的浓度。测试中所实验的标准曲线和样品均使用采用含 1%大鼠血浆(EDTA)配制。结果参见表 7、表 8。

表 7. 融合蛋白 1 在 SD 大鼠中的血药浓度-时间变化关系

时间	血浆药物浓度 (nM)	
	静脉注射	皮下注射
15min	1455±73.0	2.58±0.80
1h	1123±11.5	9.71±2.12
2h	988±108	23.8±6.83
4h	925±42.0	54.7±16.0
1 天	462±14.7	348±21.1
3 天	294±11.9	292±10.2
5 天	213±12.5	262±13.9
8 天	136±19.0	190±11.1
11 天	96.5±7.08	123±17.5
14 天	81.5±14.2	95.1±14.5
21 天	22.1±4.69	29.1±2.77

25 天	15.6±3.29	17.5±1.62
------	-----------	-----------

表 8. 融合蛋白 1 在 SD 大鼠中的药代动力学特性

药代参数	静脉注射	皮下注射
剂量 (nmol/kg)	30	30
t1/2 (天)	4.49	4.45
T _{max} (天)	0.0104	1
C _{max} (nmol/L)	1455	348
AUC _{0-inf obs} (nmol/L*d)	3700	3481
MRT _{0-inf obs} (d)	6.44	8.21
V _{z obs} (mL/kg)	52.6	55.3
Cl _{obs} (mL/kg/d)	8.10	8.62
%F	NA	94.1

结果显示，融合蛋白 1 在正常大鼠体内单次静脉/皮下注射给药后均具有超长的
5 的体内药代动力学特性，半衰期在 4.5 天左右，意味着该融合蛋白可能具有临床上
更低的给药频率及更长的给药间隔。

实施例 7. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白在 I 型糖尿病大鼠模型的药效学研究

本实施例采用链脲佐菌素（STZ）诱导大鼠作为 I 型糖尿病动物模型，考察部
10 分人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白单次皮下注射给药后的降糖效果及持续时间，以综
合评估降糖活性和体内药代动力学特性。

实验方法：选取 8 周龄的雄性 SD 大鼠（购自维通利华），体重 350 克左右，
适应性喂养一周。配制 pH 范围在 4.2-4.5 之间的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液，使用该
缓冲液溶解 STZ 至 1%（w/v）浓度后根据大鼠实际空腹体重腹腔注射 STZ，剂量
15 为每只大鼠 60 mg/kg。STZ 注射后第三天测试大鼠的空腹血糖，当血糖实测值高
于 15 mM 即判定为造模成功。

使用 1×PBS 缓冲液，pH 7.4，配制人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白至相应的浓
度。给药前，测试各 I 型糖尿病大鼠的血糖，选取血糖值在 20-30 mM 之间的大鼠
进行随机分组，确保每组（3 只或 6 只）大鼠的平均血糖和标准差相当。分组完成
20 后，对于每组大鼠基于其体重分别采用皮下注射的方式给予相应的人胰岛素类似
物-Fc 融合蛋白，给药后允许大鼠正常进食及饮水，并在给药后 1h、2h、4h、24h、
48h 等持续监测动物的血糖值，直到血糖恢复到给药前血糖水平，并绘制相应的血
糖值随时间变化的曲线图。

在 STZ 诱导 I 型糖尿病大鼠模型中，融合蛋白 1（给药剂量：90 nmol/kg）单
25 次皮下注射给药后的血糖浓度随时间变化关系如图 1 所示；LY3209590、融合蛋白
2 和融合蛋白 9（给药剂量：均为 30 nmol/kg）的血糖浓度随时间变化关系如图 2
所示。结果显示，融合蛋白 1、融合蛋白 2、融合蛋白 9 均具有时间较长的降糖效

果, 其中, 融合蛋白 1 单次皮下注射给药后的降糖效果至少可持续 300 小时。

实施例 8. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白在 db/db 二型糖尿病小鼠模型中的药效学研究

5 本实施例采用 db/db 二型糖尿病小鼠模型，考察部分人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白多次皮下注射给药后对糖化血红蛋白的改善，以综合评估降糖活性和体内药代动力学特性。

实验方法：购入 50 只 db/db 小鼠，适应环境 5 天，选择随机血糖水平高于 20 mmol/L 的动物继续分组试验。试验共分为 4 个组，分别为模型对照组(溶媒对照组，成分为：0.08M 组氨酸，70 g/L 蔗糖，0.4 g/L 聚山梨酯 80)、融合蛋白 1-低剂量组、融合蛋白 1-中剂量组和融合蛋白 1-高剂量组，每组 10 只动物，共 40 只。分组后第一天开始给药，每周给药一次，共给药 4 次，给药方式为皮下注射。试验终点对所有小鼠糖化血红蛋白进行检测，检测方法为动物经腹主动脉取血 0.4 mL，注入 EDTA 抗凝管，直接上机检测糖化血红蛋白。结果参见表 9。

15 表 9. 动物糖化血红蛋白结果 (%)

组别	给药方案	RWD%
模型对照组	溶媒	11.27±0.87
融合蛋白 1-低剂量组	融合蛋白 1, 20 nmol/kg	11.01±0.86
融合蛋白 1-中剂量组	融合蛋白 1, 40 nmol/kg	10.58±0.44*
融合蛋白 1-高剂量组	融合蛋白 1, 80 nmol/kg	10.41±0.45*

注:表中结果以均值 $\pm$ SD表示;“*”代表与模型对照组相比 $p\leq 0.05$ 。

根据试验结果,模型对照组的糖化血红蛋白含量为 $11.27 \pm 0.87\%$, 融合蛋白 1 的低中高剂量组的糖化血红蛋白含量分别为 $11.01 \pm 0.86\%$ 、 $10.58 \pm 0.44\%$ ($p=0.0481$) 和 $10.41 \pm 0.45\%$ ($p=0.0171$), 中剂量组和高剂量组与模型对照组相比有统计学差异, 三个剂量组间有一定的剂量效应关系。以上结果提示, 融合蛋白 1 的中、高剂量组可以显著降低 db/db 小鼠体内的糖化血红蛋白含量, 而低剂量组的作用不明显, 三个剂量组有一定的剂量效应关系。

25 实施例 9. 人胰岛素类似物-Fc 融合蛋白在巴马猪体内药代动力学特性测试

本实施例以巴马猪为动物模型，研究融合蛋白 1 和 LY3209590 在巴马猪体内单次皮下注射给药后的药代动力学特性。

实验方法：选取体重 13-18 千克、4-6 月龄的雄性巴马猪（宜宾横竖生物科技有限公司）。用溶媒（成分：80 mM 组氨酸，70 g/L 蔗糖，0.4 g/L 吐温 80）和 1 × PBS 缓冲液分别配制融合蛋白 1 和 LY3209590，分别按照 5 nmol/kg 和 2 nmol/kg 的剂量通过皮下注射进入动物体内，给药后的 1h、4h、8h、24h、48h、72h、96h、120h、144h、168h 采集静脉血约 1 mL，不抗凝。全血样品离心前冰盒中暂存，于

2 至 8 °C、离心力约 1800×g 离心 10 分钟，分离 2 管血清（其中 1 管约 100 μL，
剩余血清存于另 1 管），-66 °C 以下保存用于体内药代动力学特性的分析。药代动
力学特性分析采用和实施例 6 类似的方法进行，具体药代动力学参数见表 10。

表 10. 融合蛋白 1 和 LY3209590 在巴马猪体内的药代动力学特性

化合物	融合蛋白 1	LY3209590
剂量 (nmol/kg)	5	2
t1/2 (小时)	120	84
T _{max} (小时)	19	25
C _{max} (ng/mL)	2900	1530
AUC _{0-inf obs} (h*ng/mL)	511000	201000
MRT _{0-inf obs} (小时)	180	130

5 结果显示，融合蛋白 1 在巴马猪体内单次皮下注射给药后具有超长的体内药
代动力学特性。在表 10 中给药剂量下，药物半衰期(t1/2)不会随给药剂量发生明显
变化。与 LY3209590 相比，融合蛋白 1 的半衰期显著延长，其半衰期在 120 小时
左右，意味着该融合蛋白具有临床上更低的给药频率及更长的给药间隔。

10 本公开提供新型人胰岛素类似物和IgG Fc区的融合蛋白，可用于治疗如I型糖
尿病或II型糖尿病等代谢类疾病。所述融合蛋白具有超长的体内药代动力学特性，
在STZ-诱导I型糖尿病大鼠模型和db/db二型糖尿病小鼠模型中显示良好且持久的
降糖效果，具有优异的物理/化学稳定性和较高的表达产量，相对于天然人胰岛素
具有显著更低的体外诱导细胞增殖活性，提示具有潜在良好的安全性和较低的用
15 药风险，可满足临床对超长效胰岛素产品的需求。

权利要求书

1. 融合蛋白，其包含：
胰岛素类似物，其从 N 端向 C 端具有通式：B₁-L₁-A₁；
5 其中，
B₁ 为胰岛素 B 链类似物，其包含如下的氨基酸序列：
FVX₁QHL CGX₂HLVEALX₃X₄VCGERGFX₅Y (SEQ ID NO: 1)，其中，
X₁ 选自 N、G 或 K，
X₂ 选自 S 或 E，
10 X₃ 选自 Y、H 或 E，
X₄ 选自 H、R、L 或 E，
X₅ 选自 F 或 H；
A₁ 为胰岛素 A 链类似物，其包含如下的氨基酸序列：
GIVEQCCZ₁SICSLZ₂QLENYCZ₃ (SEQ ID NO:2)，其中，
15 Z₁ 选自 T、H 或 E，
Z₂ 选自 Y、D、S 或 E，
Z₃ 选自 G 或 N；
L₁ 为连接子，优选为 GS 连接子和/或至少具有 5 个 G 的连接子，更优选为 SEQ
ID NO:3 或 52 所示氨基酸序列的连接子。
20
2. 如权利要求 1 所述的融合蛋白，其中：
X₁ 选自 N 或 K，X₂ 选自 S 或 E，X₃ 选自 Y 或 H，X₄ 选自 L，X₅ 选自 H；
Z₁ 选自 T、H 或 E，Z₂ 选自 E，Z₃ 选自 G 或 N。
- 25 3. 如权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白，其中：
所述胰岛素 B 链类似物包含或选自 SEQ ID NO:31-36 任一所示的氨基酸序列，
所述胰岛素 A 链类似物包含或选自 SEQ ID NO:37-42 任一所示的氨基酸序列；
优选地，所述融合蛋白包含如 SEQ ID NO:4-9 任一所示的氨基酸序列。
- 30 4. 如权利要求 1-3 任一项所述的融合蛋白，其还含有 C₁，所述 C₁ 选自如下至少一种：免疫球蛋白的 Fc 区、HSA、HSA 结合结构域；
优选地，所述 C₁ 选自 IgG 的 Fc 区；
更优选地，所述 C₁ 选自人 IgG1、IgG2、IgG4 的 Fc 区。
- 35 5. 如权利要求 4 所述的融合蛋白，其中，所述 C₁ 位于所述胰岛素类似物的 N 端或 C 端，优选位于所述胰岛素类似物的 C 端。

6. 如权利要求 4-5 任一项所述的融合蛋白，所述 C₁ 包含或为 SEQ ID NO:17、18、48-51 任一所示的氨基酸序列，或与之具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

7. 如权利要求 4-6 任一项所述的融合蛋白，其还含有连接子 L₂，C₁ 通过 L₂ 与 B₁-L₁-A₁ 形成融合蛋白；

优选地，所述 L₂ 选自以下任一项：(G_mQ_i)_n、(G_mA_i)_n、(G_mQ)_n、(G_mA)_n、(PGPQ)_s，其中，

m 各自独立的选自 1-10 的整数，

n 各自独立的选自 1-10 的整数，

10 i 各自独立的选自 0-4；

s 选自 1-10 的整数；

更优选地，所述 L₂ 包含或为 SEQ ID NO:10-16 任一所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求 4-7 任一项所述的融合蛋白，其包含或为 SEQ ID NO:19-27 任一所示的氨基酸序列，或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

9. 如权利要求 1-8 任一项所述的融合蛋白，其是二聚体，优选为同二聚体。

10. 如权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白，其中，所述胰岛素类似物为具有胰岛素受体激动活性的胰岛素受体激动剂。

11. 胰岛素类似物，其含有胰岛素 B 链类似物和胰岛素 A 链类似物，其中，胰岛素 B 链类似物包含如下的氨基酸序列：

FVX₁QHLXG₂HLVEALX₃X₄VCGERGFX₅Y (SEQ ID NO: 1)，其中，X₁ 选自 N、G 或 K，X₂ 选自 S 或 E，X₃ 选自 Y、H 或 E，X₄ 选自 H、R、L 或 E，X₅ 选自 F 或 H；

胰岛素 A 链类似物包含如下的氨基酸序列：

GIVEQCCZ₁SICSLZ₂QLENYCZ₃ (SEQ ID NO:2)，其中，Z₁ 选自 T、H 或 E，Z₂ 选自 Y、D、S 或 E，Z₃ 选自 G 或 N；

30 优选地，X₁ 选自 N 或 K，X₂ 选自 S 或 E，X₃ 选自 Y 或 H，X₄ 选自 L，X₅ 选自 H；Z₁ 选自 T、H 或 E，Z₂ 选自 E，Z₃ 选自 G 或 N。

12. 如权利要求 11 所述的胰岛素类似物，其中，

胰岛素 B 链类似物包含或选自 SEQ ID NO:31-36 任一所示的氨基酸序列，

35 胰岛素 A 链类似物包含或选自 SEQ ID NO:37-42 任一所示的氨基酸序列；

优选地，

胰岛素 B 链类似物和胰岛素 A 链类似物分别包含或选自如下任意一组：

- SEQ ID NO:31 和 37 所示氨基酸序列；
SEQ ID NO:32 和 38 所示氨基酸序列；
SEQ ID NO:33 和 39 所示氨基酸序列；
SEQ ID NO:34 和 40 所示氨基酸序列；
5 SEQ ID NO:36 和 42 所示氨基酸序列。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的胰岛素类似物，其中，所述胰岛素 A 链类似物和所述胰岛素 B 链类似物之间形成二硫键。

- 10 14. 葡萄糖反应性胰岛素，其包含权利要求 11-13 任一项所述的胰岛素类似物。

15. 多核苷酸，其编码权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白，或权利要求 11-13 任一项所述的胰岛素类似物，或权利要求 14 所述的葡萄糖反应性胰岛素。

- 15 16. 宿主细胞，其含有权利要求 15 所述的多核苷酸。

17. 制备融合蛋白或胰岛素类似物的方法，包括：

培养权利要求 16 所述的宿主细胞；

- 20 回收权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白，或权利要求 11-13 任一项所述的胰岛素类似物；

任选地，纯化和/或修饰所述融合蛋白、胰岛素类似物。

- 25 18. 药物组合物，其包含权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白，权利要求 11-13 任一项所述的胰岛素类似物，或权利要求 14 所述的葡萄糖反应性胰岛素；以及一种或多种药学可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

- 30 19. 治疗糖尿病及其并发症或降低血糖的方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白、权利要求 11-13 任一项所述的胰岛素类似物、权利要求 14 所述的葡萄糖反应性胰岛素或权利要求 18 所述的药物组合物；

优选地，所述糖尿病及其并发症选自：I 型糖尿病、II 型糖尿病及其并发症；

更优选地，所述并发症选自糖尿病相关的心脏病、中风、视网膜病、神经性病变或肾病。