一种改进的GLP-1受体激动剂的融合蛋白和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域，具体地，本发明涉及一种改进的GLP-1受体激动剂、包含所述改进的GLP-1受体激动剂的融合蛋白、编码所述融合蛋白的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、细胞及其应用。

背景技术

[0002] 胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1，GLP-1)也称肠促胰素，是由小肠L细胞分泌，具有多器官靶向调控作用，包括促进胰岛激素分泌，抑制胰高血糖素释放，减缓胃排空，降低食欲，对营养摄取和促进营养吸收具有重要的调控作用。GLP-1的生物作用主要通过激活GLP-1受体(GLP-1R)。GLP-1R是一种G蛋白偶联的膜蛋白，主要在胰腺β细胞中表达，在其他组织和细胞(肺、心、肾、胃肠道和脑)中也有一定程度的表达。GLP-1与受体结合后激活腺苷酸环化酶(AC)，从而刺激第二信使环磷酸腺苷(cAMP)生成，并与蛋白激酶A(PKA)和cAMP调节的鸟嘌呤核苷酸交换因子(camp GEFs)Epac家族相结合[1]。

[0003] 天然GLP-1在人体内半衰期仅1-2分钟，主要是由于包括二肽基肽酶IV(DPP-IV)在内的快速酶失活[2]和/或肾清除率[3]所致。因此，科学家们研发了多种长效抗降解GLP-1类似物，例如，人源GLP-1类似物经过氨基酸替换[4,5]和/或N-末端修饰，包括脂肪酰化[6]N-乙酰化修饰[7]延长循环半衰期。白蛋白缀合的GLP-1(阿必鲁肽)也具有延长的半衰期[8]。近年来，多种GLP-1受体激动剂及其类似物已被广泛用于治疗糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病，尤其是2型糖尿病(T2DM)和肥胖症。GLP-1受体激动剂在糖尿病治疗中发挥着重要的作用，而且对心血管疾病[9]和神经系统疾病[10,11]也起到了预防和治疗作用。此外，GLP-1还可与肾脏、皮肤等的GLP-1受体结合，影响组织代谢及相关疾病[12]。

[0004] 美国专利US8658174公开了GLP-1融合蛋白，其包含与IgG/Fc结构域融合的GLP-1多肽，可用于治疗糖尿病。

[0005] 研究表明，GLP1-Fc融合蛋白中存在翻译后修饰。Hou等人2019年报道，细胞培养过程中增加烟酰胺和半胱氨酸有助于降低一种GLP类似物与IgG4/Fc融合蛋白(度拉鲁肽)的羟基化水平[13]。

[0006] 运用基因工程重组蛋白技术制作治疗用途的融合蛋白旨在表达具有天然多肽的属性，过程涉及转录、翻译和翻译后修饰的细胞工程步骤，其工艺直接影响药物的理化特征、构象、在体内半衰期、生物活性以及生产制作的产量等。因此，目前仍然需要改进的GLP-1受体激动剂及其融合蛋白，例如适合大规模生产，具有更高的产量和活性以及更长的半衰期等特征以用于临床治疗。

[0007] 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种具有更高的活性和产量的改进的GLP-1受体激动剂及其融合蛋白，该融合蛋白可以通过多种途径或方式来获得，例如在蛋白序列的特定位置替换氨基酸，或进行羟基化、氧化等修饰，如通过在GLP-1多肽的K34上羟基化和/或减少GLP-1多肽的氧化。此外，本发明的GLP-1融合蛋白的特定位置氨基酸替换或修饰，使改进的融合蛋白半衰期显著延长，同时在人类疾病、动物疾病模型中具有良好的预防和治疗效果。

[0009] 因此，本发明的优势之一在于提供了一种改进的GLP-1融合蛋白，具有产量和活性提高、或半衰期延长的特性。另外，本发明提供的改进的GLP-1融合蛋白在降血糖，例如，降低糖化血红蛋白(HbA1c)水平、降低空腹血浆葡萄糖(FPG)水平等方面具有突出的优势，而且不良反应(例如，低血糖、恶心、腹泻、便秘等)的发生率较低。

[0010] 在一个方面，本发明提供了一种融合蛋白，其包含GLP-1多肽和免疫球蛋白Fc结构域，其中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域共价连接，其中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且所述GLP-1多肽包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G；所述免疫球蛋白Fc结构域包含或为IgG2-Fc结构域，所述IgG2-Fc结构域包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。

[0011] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第34位赖氨酸(K34)上具有一定的羟基化水平。在一个实施方式中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第31位色氨酸(W31)上基本上未被氧化。

[0012] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽与如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列相比具有至少90％的序列同一性，并且包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G。

[0013] 在一个实施方式中，所述IgG2-Fc结构域为来自人IgG2的Fc结构域。在一个实施方式中，所述IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的第253位蛋氨酸(M253)上具有一定的氧化水平。

[0014] 在一个实施方式中，所述IgG2-Fc结构域与如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有至少90％的序列同一性，并且包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。

[0015] 在一个实施方式中，本发明所述的融合蛋白包括如SEQ ID NO:3所示的GLP-1多肽，并且包括如SEQ ID NO:6所示的免疫球蛋白Fc结构域。

[0016] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域通过连接子共价连接。在一个实施方式中，本发明所述的GLP-1融合蛋白包括如SEQ ID NO:3所示的GLP-1多肽、如SEQ ID NO:9所示的连接子，并且还包括如SEQ ID NO:6所示的免疫球蛋白Fc结构域。

[0017] 在一个实施方式中，所述的融合蛋白还包含信号肽。

[0018] 在另一个方面，本发明提供了一种二聚体，其包含由二硫键连接的两条相同的肽链，其中，每条肽链均包括本文所述的融合蛋白。

[0019] 在另一个方面，本发明提供了一种多核苷酸，其包含编码本文所述的融合蛋白的多核苷酸。

[0020] 在另一个方面，本发明提供了一种载体，其包含本文所述的多核苷酸。

[0021] 在另一个方面，本发明提供了一种细胞，其包含本文所述的多核苷酸或载体。

[0022] 在另一个方面，本发明提供了一种组合物，其包含本文所述的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体或细胞。

[0023] 在另一个方面，本发明提供了本文所述的细胞的构建方法，包括：

[0024] a)将编码所述融合蛋白的多核苷酸引入载体中以构建表达载体；

[0025] b)将所述表达载体导入重组表达或天然表达赖氨酰羟化酶的细胞以得到重组细胞；

[0026] 优选地，所述重组表达或天然表达赖氨酰羟化酶的细胞表达的赖氨酸羟化酶水平或活性高于COS-7细胞表达的赖氨酸羟化酶水平或活性，

[0027] 更优选地，所述细胞为CHO细胞，特别是CHO-K1细胞，

[0028] 还更优选地，所述载体是pKN012载体。

[0029] 在另一个方面，本发明提供了一种重组细胞的构建方法，包括：

[0030] c)将SEQ ID NO:26所示的多核苷酸序列插入pKN012载体的NcoI和HindIII位点，生成pKN012-GLP1-IgG2/Fc表达载体；

[0031] d)将pKN012-GLP1-IgG2/Fc表达载体导入CHO-K1细胞中得到重组细胞。

[0032] 在另一个方面，本发明提供了一种生产融合蛋白的方法，包括使用本文所述的细胞或构建方法制备的细胞得到融合蛋白的步骤。

[0033] 在另一个方面，本发明提供了一种检测融合蛋白质量的方法，其中，所述融合蛋白包含GLP-1多肽和免疫球蛋白IgG2-Fc结构域，所述方法包括以下步骤：检测所述融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平。

[0034] 在另一个方面，本发明提供了一种本文所述的融合蛋白、或二聚体、或多核苷酸、或载体、或细胞、或组合物在药物中的用途，和/或在制备用于治疗或预防疾病的药物中的用途。

[0035] 本发明的其它特征和优点将在下文如实施方式中的详细描述中显而易见。详细描述和具体示例在本发明的优选实施方式的同时仅以说明的方式给出，在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

附图说明

[0036] 图1是载体pKN012-GLP1-IgG2/Fc的示意图。

[0037] 图2是GLP-1融合蛋白YN-011样品经Lys-C消化后的酶切肽段27-34：EFIAWLVK(+16Da)修饰的肽段质谱图。其中，A：EFIAWLVK一级质谱

图；B：EFIAWLVK(+16Da)修饰一级质谱图；C：EFIAWLVK二级质谱；D：EFIAWLVK(+16Da)修饰二级质谱图。

[0038] 图3A是经Lys-C消化后的修饰肽27-34(图中的aa21-28)：EFIAWLVK(+16Da)修饰肽(图中的aa21-28(+16Da))、不含+16Da的未修饰的肽54-79(图中的aa48-73)、和不含+16Da的未修饰的肽224-240(图中的aa218-234)的紫外检测的羟基化数据；图3B是图3A中小图的放大图。

[0039] 图4是T2DM受试者单次和多次皮下注射1mg、2mg、3mg和4mg的YN-011后的平均血浆浓度-时间曲线。图4A和图4B为单次皮下给药的平均血浆浓度-时间曲线；图4C和图4D为多次皮下给药的平均血浆浓度-时间曲线。

[0040] 图5是显示在T2DM受试者中的IIa期双盲、安慰剂对照研究的设计图表，该研究评估YN-011以1mg、2mg、3mg、4mg的剂量水平皮下给药的药效和安全性。其中，实心三角代表YN-011正式剂量给药，实心圆点代表葡萄糖耐量试验(OGTT)检测，空心三角代表适应性给药，五角星代表安全性评价检测。

[0041] 图6是显示多剂量YN-011对T2DM受试者空腹血糖影响的图。(在每个测试时间点，YN-011与安慰剂相比，在剂量水平3mg和4mg时P<0.05。)

[0042] 图7是显示多剂量YN-011对T2DM受试者中HbA1c的影响的图。(在每个测试时间点，YN-011与安慰剂相比，在剂量水平1mg、3mg和4mg时P<0.05。)

[0043] 图8是显示YN-011反复皮下注射给药肥胖恒河猴的体重(BW)变化率的图。

[0044] 图9是不同浓度的TNF-α刺激神经元细胞SH-SY5Y 48小时后的结果图(*P<0.05 TNF-α(20ng/ml)vs对照；**P<0.01 TNF-α(40、60、80、100ng/ml)vs对照)。

[0045] 图10显示了YN-011和GABA抑制TNF-α降低SH-SY5Y细胞活力的作用(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 YN-011(10nM或100nM)or GABA(100μM)+TNF-α vs TNF-α；##P<0.01 YN-011(500nM)+TNF-α vs TNF-α；n＝6)。

[0046] 图11显示了联合使用YN-011和GABA显著增加SH-SY5Y细胞活力(**P<0.01 TNF-α vs对照,#P<0.05 TNF-α+GABA+YN-011 vs TNF-α+YN-011；n＝6)。

[0047] 图12显示了YN-011减少TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡(**P<0.01TNF-α vs对照；#P<0.05 10nM YN-011+TNF-α vs TNF-α；##P<0.01 100nM or 500nM YN-011+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0048] 图13显示了GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡(**P<0.01TNF-α vs对照,#P<0.05 10μM或 100μM GABA+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0049] 图14显示了联合使用YN-011和GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡(**P<0.01 TNF-α vs对照,#P<0.05 GABA或YN-011+TNF-α vs GABA+YN-011+TNF-α；n＝3)。

[0050] 图15是活细胞染色图，其显示TNF-α促进神经元细胞SH-SY5Y的损伤(**：显著；***：极显著)。

[0051] 图16是活细胞染色图，其显示YN-011对TNF-α损伤的神经元细胞具有保护作用(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 10nM YN-011+TNF-α vs TNF-α；##P<0.01 100nM或500nM YN-011+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0052] 图17是活细胞染色图，其显示GABA对TNF-α损伤的神经元细胞具有保护作用(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 10μM GABA+TNF-α vs TNF-α；##P<0.01 100μM GABA+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0053] 图18是活细胞染色图，其显示联合使用YN-011和GABA对TNF-α损伤的神经元细胞具有保护作用(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 GABA或YN-011+TNF-α vs GABA+YN-011+TNF-α；n＝3)。

[0054] 图19显示了YN-011减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 100nM或 500nM YN-011+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0055] 图20显示了GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 100μM GABA+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0056] 图21显示了联合使用YN-011和GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 100nM YN-011+TNF-α vs 100μM GABA+100nM YN-011+TNF-α；##P<0.01 100μM GABA+TNF-α vs 100μM GABA+100nM YN-011+TNF-α；n＝3)。

[0057] 图22显示了YN-011减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 10nM、100nM或500nM YN-011+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0058] 图23显示了GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 100μM GABA+TNF-α vs TNF-α；n＝3)。

[0059] 图24显示了联合使用YN-011和GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡(**P<0.01 TNF-α vs对照；#P<0.05 TNF-α+100μM GABA+100nM YN-011vs TNF-α+100μM GABA；##P<0.05 TNF-α+100μM GABA+100nM YN-011vs TNF-α+100nM YN-011；n=3)。

[0060] 图25显示了GABA降低HMC3小胶质细胞中Aβ$_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子mRNA表达(*P<0.05,**P<0.01Aβ$_{1-42}$寡聚体vs对照；#P<0.05 GABA+Aβ$_{1-42}$寡聚体vs Aβ$_{1-42}$寡聚体；n=3)。

[0061] 图26显示了YN-011降低HMC3小胶质细胞中Aβ$_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子mRNA表达(*P<0.05,**P<0.01Aβ$_{1-42}$寡聚体vs对照；#P<0.05,##P<0.01YN-011+Aβ$_{1-42}$寡聚体vs Aβ$_{1-42}$寡聚体；n=3)。

[0062] 图27显示了联合使用YN-011和GABA降低HMC3小胶质细胞中Aβ$_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子mRNA表达(*P<0.05,**P<0.01Aβ$_{1-42}$寡聚体vs对照；#P<0.05,GABA+YN-011+Aβ$_{1-42}$寡聚体vs GABA+Aβ$_{1-42}$寡聚体or YN-011+Aβ$_{1-42}$寡聚体；n=3)。

[0063] 图28显示了GABA降低HMC3小胶质细胞中Aβ$_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子表达(**P<0.01Aβ$_{1-42}$寡聚体vs对照；#P<0.05 GABA+Aβ$_{1-42}$寡聚体vs Aβ$_{1-42}$寡聚体；n=3)。

[0064] 图29显示了YN-011降低HMC3小胶质细胞中Aβ$_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子表达(**P<0.01Aβ$_{1-42}$寡聚体vs对照；#P<0.05YN-011+Aβ$_{1-42}$寡聚体vs Aβ$_{1-42}$寡聚体；n=3)。

[0065] 图30显示了联合使用YN-011和GABA降低HMC3小胶质细胞中Aβ$_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子表达(**P<0.01Aβ$_{1-42}$寡聚体vs对照；#P<0.05，GABA+YN-011+Aβ$_{1-42}$寡聚体vs GABA+Aβ$_{1-42}$寡聚体或者YN-011+Aβ$_{1-42}$寡聚体；n=3)。

具体实施方式

[0066] 以下是帮助本领域技术人员实践本发明的详细描述。除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员普遍理解的含义相同。本发明使用的术语仅用于描述特定实施方式，并不旨在限制本发

明。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、附图和其他参考文献均以全文引用的方式并入本发明。

[0067] I.定义或术语

[0068] 除非另有说明，本文中定义的术语和使用的术语应理解为字典定义、或被并入的文件中的定义，和/或所定义的术语的公知含义。

[0069] 本文涉及的所有参考文献、专利和专利申请均通过引用的方式并入各自所引用的主题，在某些情况下，可涵盖文件的全部内容。

[0070] 本说明书中公开的所有特征可以以任何方式组合。本说明书中公开的每个特征可以被用于相同、等效或类似目的的替换特征替换。因此，除非另有明确说明，否则所公开的每个特征仅是一系列等效或类似特征的示例。

[0071] 如本文所使用的术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”是指两个或多个天然或非天然氨基酸残基连接形成的氨基酸链，不论是否存在翻译后修饰(例如，糖基化或磷酸化)。本发明中的多肽可以包括例如3至3500个天然或非天然氨基酸残基。所述的蛋白质可以是单一肽链或多亚基蛋白质(例如，可以由2个或2个以上的多肽组成)。本文所述的“肽”、“多肽”和“蛋白质”可以互换使用，可以含有天然的氨基酸，也可以含有非天然的氨基酸，或氨基酸的类似物、模拟物。本申请所述的肽、多肽或蛋白质可以通过本领域公知的任何方法获得，例如但不限于，通过天然分离、重组表达、化学合成等。

[0072] 如本文所使用的术语“氨基酸”是指含有氨基(-NH_2)和羧基(-COOH)官能团以及每个氨基酸特有的侧链的有机化合物。氨基酸名称在本申请中也以标准的单字母或三字母代码表示，总结如下：

名称	三字母代码	单字母代码
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
蛋氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

[0073] 如本文所使用的术语“GLP-1多肽”包括在氨基酸残基第34位或对应于氨基酸残基第34位为赖氨酸的GLP-1受体激动剂多肽，例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的多肽。具体地，包括但不限于GLP-1(7-37)、GLP-1(7-36-NH_2)(在本文中也可互换地称为GLP-1(7-36)氨基)、DPP-IV抗性GLP-1和在氨基酸残基34位点处具有赖氨酸或对应于氨基酸残基34位点处具有赖氨酸的其他GLP-1类似物。例如，GLP-1多肽可以包含来自利拉鲁肽(Liraglutide，来自诺和诺德的VICTOZA®)、索玛鲁肽(Semaglutide，来自诺和诺德的OZEMPIC®)、阿必鲁肽(Albiglutide，来自葛兰素史克的SYNCRIA®)、他泊鲁肽(罗氏)、度拉鲁肽(Dulaglutide，来自礼来公司的TRULICITY®)或者LY2428757(礼来公司)的GLP-1多肽，还可以包括WO2021163972A1、CN111217915A、WO2011056713A2和WO2000034332A1中公开的 GLP-1多肽，上述参考文献各自以引用的方式并入本文。例如，上述多肽可以是包含“KG”氨基酸motif序列的GLP-1类似物。

[0074] 如本文中的术语“多核苷酸”或“寡核苷酸”是指两个或多个共价连接的核苷酸。除非上下文另有明确说明，否则该术语通常包括但不限于脱氧核糖多核苷酸(DNA)和核糖多核苷酸(RNA)，它们可以是单链(ss)或双链(ds)。例如，本发明的多核苷酸分子或多核苷酸可以由单链和双链DNA、作为单链和双链区域的混合物的DNA、单链和双链RNA以及RNA组成。单链和双链区域的混合物，包含DNA和RNA的杂合分子，其可以是单链或更典型地是双链或单链和双链区域的混合物。此外，多核苷酸分子可以由包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区组成。如本文所使用的术语“寡核苷酸”通常是指长度不超过200个碱基对的多核苷酸，并且可以是单链或双链的。本文提供的序列可以是DNA序列或RNA序列，然而应理解，所提供的序列包括DNA和RNA，以及互补的RNA和DNA序列，除非上下文另有明确说明。例如，序列5’-GAATCC-3’应理解为包括5’-GAAUCC-3’、5’-GGATTC-3’和5’-GGAUUC-3’。

[0075] 如本文所使用的术语“序列相同性”或“序列同一性”是指两个多肽序列或两个多核苷酸序列之间序列相同性的百分比。为了确定两个氨基酸序列或两个多核苷酸序列的百分比相同性，为了最佳比较目的比对序列(例如，可以在第一个氨基酸或多核苷酸序列的序列中引入空位与第二个氨基酸或多核苷酸序列进行最佳比对氨基酸或多核苷酸序列)，然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。换言之，可以通过用与其比较的参比序列相同的氨基酸残基(或碱基)数除以候选序列或参比序列(以较短者为准)中的氨基酸残基(或碱基)总数来计算氨基酸序列(或核酸序列)的百分比(%)序列同一性。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在该位置是相同的。两个序列之间的相同性百分比是序列共享的相同位置数量的函数(即相同性百分比＝相同重叠位置的数量/位置总数×100%)。在一个实施方式中，两个序列的长度相同。还可以使用数学算法来确定两个序列之间的相同性百分比。用于比较两个序列的数学算法的一个优选的、非限制性的例子是Karlin-Altschul的算法[14]，后来修改为Karlin-Altschul的算法[15]。这种算法被纳入NBLAST和XBLAST程序中[16]，可以使用NBLAST核苷酸程序参数集进行BLAST核苷酸搜索，例如分数＝100，字长＝12，以获得与特定多核苷酸分子同

源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以使用XBLAST程序参数集进行，例如得分为50，字长为3，以获得与本文所述蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的间隙比对，可以使用Gapped BLAST[17]。或者，PSI-BLAST可用于执行迭代搜索，以检测分子之间的远距离关系 (Id.)。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI-Blast程序时，可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如NCBI网站)。用于序列比较的数学算法的另一个优选的非限制性例子是Myers和Miller提出的算法[18]，这种算法被纳入ALIGN程序(2.0版)中，该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时，可以使用PAM120重量残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。两个序列之间的相同性百分比可以使用与上述技术类似的技术来确定，有或没有允许缺口。在计算相同性百分比时，通常只计算完全匹配。

[0076] 在本发明中，“保守氨基酸替换”是其中一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基替换而不消除蛋白质所需特性的替换。合适的保守氨基酸替换可以通过将具有相似疏水性、极性和R-链长度的氨基酸彼此替换来进行。保守替换的例子包括用一个非极性(疏水)残基替换另一个非极性残基(例如，丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸)，用一个极性(亲水)残基替换另一个极性残基(例如在精氨酸和赖氨酸之间)，在谷氨酰胺和天冬酰胺之间，在甘氨酸和丝氨酸之间，用一个碱性残基替换另一个碱性残基(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)，或用一个酸性残基替换另一个酸性残基(例如天冬氨酸或谷氨酸)。短语“保守替换”还包括使用化学衍生的残基或非天然氨基酸代替非衍生的残基，条件是这种多肽表现出必要的活性。

[0077] 在本发明中，术语“融合蛋白”是指包含形成不同功能域的两个或更多个多肽的蛋白质。例如本文所述的GLP-1融合蛋白包含GLP-1多肽和免疫球蛋白Fc结构域。

[0078] 在本发明中，术语“连接子”是指能够将一个部分与另一个部分共价连接的任何化学部分。例如，“连接子”可以是具有1、2、3、4或5个氨基酸残基，或长度介于5和15、20、30、50或更多个氨基酸残基之间的人工氨基酸序列，通过肽键连接，并用于连接一个或多个多肽。连接子可

能有也可能没有二级结构。连接子序列在本领域是已知的，例如，参见Holliger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)；Poljak et al.,Structure 2:1121-1123(1994)。

[0079] 在本发明中，术语“CH2”是指恒定重链2，其是免疫球蛋白重链的结构域之一。类似地，术语“CH3”是指恒定重链3，它是免疫球蛋白重链的另一个结构域。

[0080] 在本发明中，术语“铰链”在用于免疫球蛋白(例如，IgG)的上下文中时，是指抗原结合片段(Fab)和可结晶片段(Fc)之间的柔性区域。

[0081] 如本文所使用的术语“载体”是指可将遗传元件操作性地插入其中并使该遗传元件获得表达的一种运载工具，例如生产由该遗传元件编码的蛋白质、RNA或DNA，或者复制所述遗传元件。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传元件在宿 主细胞内得以表达。举例来说，载体包括：质粒、噬菌粒、柯斯质粒(cosmid)、人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC)、噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体，以及动物病毒等。载体可含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还可包括协助其进入细胞的成分，包括但不限于，病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳。载体可以是表达载体或克隆载体。

[0082] 术语“DPPIV”和“DPP-IV”是指二肽基肽酶IV，它是一种可以使天然GLP-1失活的酶。

[0083] 术语“羟基化水平”是指多肽样品中氨基酸位置处的残基通过羟基化修饰的百分比。例如，20％的羟基化水平意味着20％(按分子数的占比计)的多肽分子在特定氨基酸位置羟基化，可以使用调节剂增加或降低表达的蛋白质的羟基化水平。例如，当存在于表达系统中时，米诺地尔和Zn^{2+}(例如来自$ZnSO_4$)可以抑制羟基化并降低羟基化水平。羟基化水平可以使用本实施方式中的方法或者如Hou等人所述的质谱法来测量[13]，或如本文进一步所述。

[0084] 术语“氧化水平”是指多肽样品中氨基酸位置处的残基通过氧化修饰的百分比。例如，2％的氧化水平意味着2％(按分子数的占比计)的多肽分子在

特定氨基酸位置氧化。氧化水平可以使用本实施方式中的方法或者通过WO2002046227A2中所述的质谱方法或根据Bettinger等人[19]的蛋白氧化测定方法，或如本文所述。

[0085] 在本发明中，术语“药品级”是指药物、生物大分子或者试剂的化学纯度或比例符合药物生产要求。

[0086] 在本发明中，术语“治疗”是指向受试者施用有效量的化合物或组合物或制剂，可以由单次施用组成，或可选地包括一系列程序。如本领域所熟知的，“治疗”是用于获得有益或期望结果，包括临床结果的方法。有益或期望的临床结果可以包括但不限于减轻或改善一种或多种症状或病症、减轻疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、防止疾病传播、逆转疾病、改善或减轻疾病以及疾病状态的缓解(无论是部分的还是全部的，或是暂时的)。有益的或期望的临床结果包括改善的空腹血糖水平和/或HbA1c水平、体重减轻、改善的肝脏脂质含量，以及改善的认知功能、运动协调等。

[0087] 在本发明中，术语“受试者”也称为患者，如本文所使用的包括哺乳动物在内的所有动物，并且优选地指人类。“受试者”也可以是家畜动物，例如牛、猪、羊、家禽和马；或啮齿类动物，例如大鼠、小鼠；或灵长类动物，例如猿(ape)、猴子、黑猩猩 (chimpanzee)、大猩猩(gorilla)、猩猩(orangutan)、狒狒(baboon)；或家养动物，例如狗和猫。

[0088] 在本发明中，术语“药学上可接受的载体”是指任何在生物学或其它方面是可接受的任何载体、试剂、赋形剂。除非载体、试剂、赋形剂与活性成分不相容，否则其在治疗制剂中的用途都是可以接受的。这种药学上可接受的载体的使用在本领域是众所周知的，例如，在药物制剂中可以包含的各种成分在参考文献20中进行了描述[20]。

[0089] 在本发明中，术语“治疗有效量”是指在受试者中引起期望效果的任何剂量，期望效果指减轻症状、减缓疾病进展、预防疾病发作等。该量可以多次给药有效和/或一段时间内达到预期效果。如本文所使用的该术语可以指引起受试者血糖降低的量。

[0090] 在本发明中，“联合施用”等表示例如关于两种或更多种物质(例如两种或更多种化合物、两种或更多种组合物等)，这两种或更多种物质被施用给受试者，它们同时都具有生物活性。给药的确切情况将取决于两种或更多种物质在彼此存在下的药代动力学。

[0091] 在理解本发明的范围时，如本文所使用的术语“包括”及其派生词是开放式术语，其指定所述特征、元素、组分、基团、整数和/或步骤，但不排除存在其他未说明的特征、元素、组件、组、整数和/或步骤。上述内容也适用于具有类似含义的词语，例如术语“包含”、“具有”及其派生词。

[0092] 本文所使用术语“组成为”、“由…组成”及其派生词为封闭式术语，其指定所述特征、元素、组件、组、整数和/或步骤的存在，并且还排除存在其他未说明的特征、元素、组件、组、整数和/或步骤。

[0093] 本文通过端点列举的数值范围包括包含在该范围内的所有数字和分数(例如，1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.90、4和5)。还应理解的是，所有数字及其分数都假定由术语“约”修饰。

[0094] 此外，如本文所使用的诸如“基本上”、“大约”和“大致”之类的程度术语表示修改术语的合理偏差量，使得最终结果不会显著改变。如果这种偏差不会否定其修饰词的含义，则这些程度术语应解释为包括至少±5％的修饰词的偏差。更具体地，术语“约”是指±0.1-25％、±1-20％、±1-15％、±1-10％，例如最多10％、最多5％的参考数字。

[0095] 如在本说明书和所附权利要求中使用的，单数形式“一种”、“一个”包括复数引用，除非内容另有明确规定。因此，例如包含“一种化合物”的组合物包括两种或更多种化合物的混合物。还应注意，除非内容另有明确规定，否则术语“或”通常以其包括“和/或”的含义使用。

[0096] 此外，在特定部分中描述的定义和实施方式旨在适用于本文所述的其它实施方式，本领域技术人员能够理解。例如，在以下段落中，更详细地定义了本发明的不同方面。如此定义的每个方面可以与任何其他方面或多个方面组合，除非明确指出不能组合。特别地，被指示为优选或有利的任何特征可以与任何被指示为优选或有利的任何其他一个或多个特征组合。

[0097] 尽管与本文描述的那些相似或等效的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试，在本实施方式中也描述了具体的方法和材料。

[0098] II.蛋白质和融合蛋白

[0099] 本发明提供稳定的GLP-1多肽和包含所述GLP-1多肽融合例如IgG/Fc结构域的融合蛋白。

[0100] 本发明的一个方面，提供了一种GLP-1融合蛋白，所述融合蛋白包含GLP-1多肽和免疫球蛋白Fc结构域，其中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域共价连接，其中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且所述GLP-1多肽包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G；所述免疫球蛋白Fc结构域包含或为IgG2-Fc结构域，所述IgG2-Fc结构域包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。

[0101] GLP-1多肽

[0102] 令人惊讶的是，本发明的GLP-1融合蛋白的产量和活性可以通过增加GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第34位赖氨酸(K34)处的羟基化水平、或减少相对于天然人GLP-1的第31位色氨酸(W31)处的氧化和/或引入一个或多个GLP-1多肽的位点突变(例如，A8G、G22E、R36G中的一个或多个突变)或IgG2-Fc结构域的位点突变(例如，C222S、A330S、P331S中的一个或多个突变)来提高。

[0103] 未经加工形式的天然人GLP-1多肽具有37个氨基酸，其氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示，通常也被称为“GLP-1(1-37)”。未经加工形式的天然人GLP-1多肽在胰腺和小肠中进行加工，形成GLP-1(7-37)或者GLP-1(7-36)氨基。除特殊说明外，本申请所提到的GLP-1多肽的氨基酸位点即为对应于SEQ ID NO:43的氨基酸位点。例如，本申请所提到的GLP-1多肽的K34处对应于SEQ ID NO:43的第34个位点。又例如，GLP-1(7-36)氨基指的是SEQ ID NO:43的第7位至第36位之间的氨基酸形成的GLP-1多肽片段；GLP-1(7-37)指的是SEQ ID NO:43的第7位至第37位之间的氨基酸形成的GLP- 1多肽片段。在某些实施方式中，GLP-1(7-36)氨基的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。在某些实施方式中，GLP-1(7-37)的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0104] 除特殊说明外，本申请所提到的氨基酸突变的命名规则为：突变前的氨基酸名称－发生突变的氨基酸位点－突变后的氨基酸名称。例如，GLP-1多肽中的A8G突变指的是对应于SEQ ID NO:43的第8位的丙氨酸(A)突变为甘氨酸(G)。

[0105] 可以通过现有技术中已知的多种方法来测定本发明的GLP-1融合蛋白的羟基化水平。例如Hou等人所述的质谱法来测量[13]。除特殊说明外，本申请所述的羟基化水平是按照分子数的占比计。例如，100g本发明所述的GLP-1融合蛋白中，如果其中有10g GLP-1融合蛋白在GLP-1多肽的K34处有羟基化，剩余的90g GLP-1融合蛋白在GLP-1多肽的K34处没有羟基化，则认为所述GLP-1融合蛋白的羟基化水平为10％。

[0106] 本发明的GLP-1融合蛋白，在一些实施方式中重组生产时提高了体内半衰期和/或产量。因此，所述GLP-1融合蛋白以及用于制备GLP-1融合蛋白的试剂等可用于制备药物。

[0107] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第34位赖氨酸(K34)上具有一定的羟基化水平。K34指天然人GLP-1多肽第34位的赖氨酸残基。本领域技术人员知晓相同赖氨酸可以对应其它GLP-1多肽序列中的不同位置。

[0108] GLP-1融合蛋白可指代多个分子，所述分子可在K34上羟基化，或未经羟基化，所述分子羟基化水平可以不同。

[0109] 本发明还提供了包含GLP-1融合蛋白的成分。在一个实施方式中，所述GLP-1融合蛋白在K34处的羟基化水平约为10％至100％，例如至少约20％，至少约26％，至少约30％、至少约40％或至少约50％。考虑在10％和100％之间的任何百分比或范围。

[0110] 在一个实施方式中，所述羟基化水平在10％和100％之间，例如大于等于10％、或大于等于15％、或大于等于20％、或大于等于26％、或大于等于30％、或大于等于35％、或大于等于40％、或大于等于45％、或大于等于50％、或大于等于55％、或大于等于60％、或大于等于65％、或大于等于70％、或大于等于75％、或大于等于80％、或大于等于85％、或大于等于90％、或大于等于95％。

[0111] 如本申请的实施例中所示，羟基化GLP-1融合蛋白的产量比在GLP-1的K34处未检测到羟基化的GLP-1融合蛋白高约100倍至约500倍。

[0112] 本发明还发现，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第31位色氨酸(W31)上具有较低的氧化水平，并且较低的氧化水平可能有利于GLP-1融合蛋白的稳定性和/或活性。在某些实施方式中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第31位色氨酸(W31)上基本上未被氧化。在某些实施方式中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的W31 上的氧化水平低于0.5%(例如，低于0.4%、低于0.3%、低于0.2%、或低于0.1%)或无法检测。W31指天然人GLP-1多肽第31位的色氨酸残基。本领域技术人员知晓，相同色氨酸可以对应其它GLP-1多肽的不同位置。

[0113] 可以通过本申请的实施例中或现有技术中已知的方法(例如，WO2002046227A2中所述的质谱方法或Bettinger等人[19]蛋白氧化测定方法)进行检测。除特殊说明外，本申请所述的氧化水平是按照分子数的占比计。例如，100g本发明所述的GLP-1融合蛋白中，如果其中有10g GLP-1融合蛋白在GLP-1的W31处有氧化，剩余的90g GLP-1融合蛋白在GLP-1的W31处没有氧化，则认为所述GLP-1融合蛋白的氧化水平为10%。

[0114] 本文公开的融合蛋白的GLP-1多肽可以是人源GLP-1。在某些实施方式中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且包含相对于天然人GLP-1的A8G和G22E替换。

[0115] 在某些实施方式中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且包含相对于天然人GLP-1的A8G、G22E和R36G替换。

[0116] 在一些实施方式中，GLP-1多肽是GLP-1(7-37)。在一些实施方式中，GLP-1多肽是GLP-1(7-36)氨基。在一些实施方式中，GLP-1多肽是DPP-IV抗性GLP-1。在一些实施方式中，GLP-1多肽可以包含氨基酸替换，例如A8G、G22E、R36G中的一种、两种或三种突变。

[0117] 在某些实施方式中，本申请所述的GLP-1多肽与如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列相比具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性，并且包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G。在某些

实施方式中，本申请所述的GLP-1多肽与如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列相比具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性，并以葡萄糖依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。在某些实施方式中，本申请所述的GLP-1多肽与如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列相比具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性，并且包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G，并以葡萄糖依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
GLP-1 (1-37)	HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	43
GLP-1 (7-36-NH_2)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR	1
GLP-1 (7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	2
GLP-1 突变 (A8G、G22E、R36G三位点突变)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG	3

[0118] 在某些实施方式中，所述GLP-1多肽为人GLP-1(7-37)，并且包含相对于天然人GLP-1的A8G、G22E和R36G替换。

[0119] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0120] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽是DPP-IV抗性人GLP-1。

[0121] 天然GLP-1具有短的循环半衰期(t1/2<2分钟)，这主要是由于包括二肽基肽酶IV(DPP-IV)在内的快速酶失活和/或肾清除率所致。因此当使用天然GLP-1时，必须通过泵持续皮下输注以维持GLP-1在体内的作用[21]。因此已经开发出药用长效抗降解GLP-1模拟肽。例如，度拉鲁肽是一种DPP-IV保护的GLP-1类似物，与IgG4/Fc片段融合，半衰期为4.7-5.5天[22]。

[0122] Fc结构域

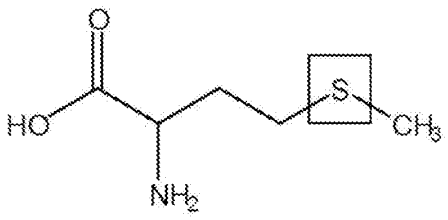
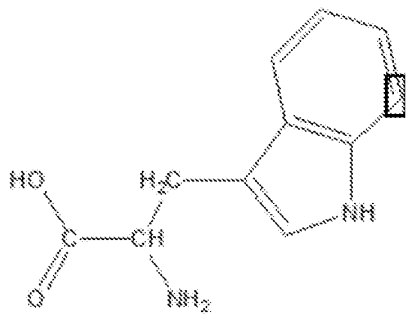
[0123] 在某些实施方式中，本申请所述的IgG2-Fc结构域为来自人IgG2的Fc结构域。

[0124] 在本申请中，“IgG2-Fc”和“IgG2/Fc”可以互换使用，均指的是免疫球蛋白IgG2的Fc结构域。

[0125] 在某些实施方式中，本申请所述的IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的第253位蛋氨酸(M253)上具有一定的氧化水平。在某些实施方式中，本申请所述的IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的第253位蛋氨酸(M253)上的氧化水平降低。在某些实施方式中，本申请所述的IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的第253位蛋氨酸(M253)上未发生氧化。在本申请中，M253指的是对应于SEQ ID NO:7的第253位IgG2处的蛋氨酸残基。本领域技术人员将知晓，相同蛋氨酸可以对应其它IgG多肽中的不同位置。

[0126] 在某些实施方式中，所述IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的M253上的氧化水平小于等于约15%、小于等于约10%、小于等于约9%、小于等于约8%、小于等于约7%、小于等于约6%、小于等于约5%、小于等于约4%、小于等于约3%、小于等于约2%、小于等于约1%、小于等于约0.5%或无法检测。

[0127] 如前所述，GLP-1融合蛋白可以指多个分子，所述分子可以在IgG2-Fc结构域的M253和/或GLP-1多肽的W31中的一个或两个位置上氧化或未被氧化，所述分子的氧化水平可以不同。所述氧化发生在以下氨基酸结构式中矩形框处：

IgG2-Fc 结构域的 M253 位置	GLP-1 多肽的 W31 位置
	

[0128] 在某些实施方式中，本发明所述的GLP-1融合蛋白在GLP-1多肽相对于天然人GLP-1的W31上没有检测到氧化，在IgG2-Fc结构域的M253处约有2％的氧化水平。其它GLP-1类似物融合蛋白在W31(对于GLP-1多肽)和/或M253(对于IgG2-Fc结构域)上的氧化水平均为2-8％。

[0129] 融合蛋白中的GLP-1多肽与免疫球蛋白的Fc部分共价连接(直接或通过连接肽)。在一个实施方式中，免疫球蛋白是IgG。本文公开的融合蛋白的IgG-Fc可以是IgG2-Fc。

[0130] 在一个实施方式中，IgG2-Fc结构域包含C222S替换。IgG2-Fc的C222S替换可以通过去除同二聚体的两个单体之间的二硫键来增加N-末端铰链区的灵活性。N-末端铰链区增加的灵活性可以降低Fcγ受体的结合亲和力，从而降低抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0131] 在另一个实施实施方式中，IgG2-Fc结构域包含A330S和P331S替换。A330S和P331S替换降低了对Fcγ受体和C1q补体蛋白的亲和力。

[0132] 在一个实施方式中，IgG2-Fc结构域包含C222S、A330S和P331S替换。

[0133] 除了M253的氨基酸位置是对应于SEQ ID NO:7的氨基酸位置之外，本申请中所述的IgG2-Fc结构域的其他氨基酸残基位置，包括例如A330、P331和C222，与人IgG2如Genbank登录号QRG33935.1所示的位置对应。所述IgG2-Fc部分可以为如SEQ ID NO:5所示的228个氨基酸，对应于例如Genbank登录号QRG33935.1所示的人类IgG2的第219至445位氨基酸。本领域技术人员将很容易识别氨基酸的残基位置，例如A330、P331和C222在参比序列SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中所示的或短或长的Fc片段中的残基位置。

[0134] 在一个实施方式中，本申请所述的IgG2-Fc结构域与如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％或至少约95％的序列同一性，并且包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。其中融合蛋白与没有IgG/Fc结构域融合的或与IgG4/Fc结构域融合的GLP-1多肽相比具有改善的半衰期。

[0135] 在一个实施方式中，所述IgG2-Fc结构域与如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、

至少约90%或至少约95%的序列同一性，并且包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。

[0136] 在一个实施方式中，所述IgG2-Fc结构域与如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有至少90%的序列同一性，并且包含A330S和P331S替换。优选地，所述IgG2-Fc结构域还包含C222S替换。更优选地，所述IgG2-Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0137] 在一个实施方式中，在本申请所述的GLP-1融合蛋白中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，并且所述免疫球蛋白Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
IgG2/Fc 结构域(人 IgG2 重链 Fc 区第 219-445 位)	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	5
IgG2/Fc 结构域突变(人 IgG2 重链 Fc 区第 219-445 位，含 C222S、A330S、P331S 位点突变)	ERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	6

[0138] 本申请中所提及的GLP-1多肽的A8G、G22E、R36G替换以及K34羟基化所发生的位点在SEQ ID NO:3中的位置与在SEQ ID NO:7中的位置对应关系如下表所示。另外，本申请中所提及的IgG2-Fc结构域上的C222S、A330S、P331S替换以及

M253氧化化所发生的位点相对于QRG33935.1中的位置与在SEQ ID NO:7中的位置对应关系也如下表所示。

修饰位点	在 SEQ ID NO: 3 中的位置	在 SEQ ID NO: 6 中的位置 IgG2 (219-445) 相对于 QRG33935.1 所示的序列	在 SEQ ID NO: 7 中的位置
A8G	AA2		AA2
G22E	AA16		AA16
R36G	AA30		AA30
K34 羟基化	AA28		AA28
相对于天然人 GLP-1 的 W31 上的氧化	AA25		AA25
第 253 位蛋氨酸氧化		AA427	AA253
C222S		AA222	AA48
A330S		AA330	AA155
P331S		AA331	AA156

[0139] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽位于所述免疫球蛋白Fc结构域的N末端。在一个实施方式中，所述GLP-1多肽位于所述免疫球蛋白Fc结构域的C末端。

[0140] 连接子

[0141] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域直接共价连接。

[0142] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域通过连接子共价连接。

[0143] 在一个实施方式中，所述连接子选自下组：可切割连接子、不可切割连接子、柔性连接子、刚性连接子、螺旋连接子和非螺旋连接子。

[0144] 在一个实施方式中，所述连接子包括连接肽。

[0145] 本文公开的融合蛋白的GLP-1多肽和IgG-Fc结构域，例如IgG2-Fc结构域可以通过连接肽连接。如本文所使用的术语“连接肽”是指将多肽的不同功能域连接在一起的任何部分。连接肽可以具有任何合适的长度和结构。

[0146] 在本发明中，术语“可切割连接子”是指对体内蛋白酶、PH或化学等因素敏感，并在上述因素的存在下容易裂解的连接子。

[0147] 在本发明中，术语“不可切割连接子”是指对体内蛋白酶、PH或化学等因素稳定，不容易裂解的连接子。

[0148] 在本发明中，术语“柔性连接子”是指当连接不同蛋白组成部分时，可以增加空间延展性，使得蛋白组成部分的空间折叠、构象尽量不受互相影响的连接子。

[0149] 在本发明中，术语“刚性连接子”是指当连接不同蛋白组成部分时，能够保持蛋白组成部分之间固定距离的连接子。

[0150] 在本发明中，术语“螺旋连接子”是指其中的刚性单元能自身内部或者与相同相邻序列之间形成螺旋(例如α-螺旋)，从而使得形成的融合蛋白具有相对稳定立体构象的连接子。

[0151] 在本发明中，术语“非螺旋连接子”是指不能够形成螺旋结构的连接子。

[0152] 在一个实施方式中，所述连接肽包括含有甘氨酸和丝氨酸的连接子。优选地，所述含有甘氨酸和丝氨酸的连接子包括如SEQ ID NO:39(GGGS)、SEQ ID NO:40(GGGGS)、SEQ ID NO:41(GGGGGS)或SEQ ID NO:42(GGGGGGGS)所示的一个、两个、三个、四个或更多个重复。

[0153] 在一个实施方式中，所述连接肽包括选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19。

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
连接肽	SSGAPPPSGGGGS	9
连接肽	GGGGSGGGGSGGGGS	10
连接肽	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	11
连接肽	GSTGGGGSGKPGSGEGGGGS	12
连接肽	ESGRSGGGGSGGGGS	13
连接肽	EGKSSGSGSESKST	14
连接肽	EGKSSGSGSESKSTQ	15
连接肽	EGKSSGSGSESKVD	16
连接肽	GSTSGSGKSSEGKG	17
连接肽	KESGSVSSEQLAQFRSLD	18
连接肽	ESGSVSSEELAFRSLD	19
连接肽	GGGS	39
连接肽	GGGGS	40
连接肽	GGGGGS	41
连接肽	GGGGGGGS	42

[0154] 在一个实施方式中，连接GLP-1多肽和IgG2/Fc结构域的连接肽可以与如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至 少约90%或至少约95%的序列同一性。在一个实施方式中，所述连接肽包括如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。在一个实施方式中，所述连接肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0155] 在一个实施方式中，在本申请所述的GLP-1融合蛋白中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，所述免疫球蛋白Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示，并且所述连接子的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0156] 融合蛋白

[0157] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、

至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性，并且GLP-1多肽包含A8G、G22E、R36G替换，IgG2-Fc结构域包含C222S、A330S和P331S替换。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性，并且以葡萄糖依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性，并且GLP-1多肽包含A8G、G22E、R36G替换，IgG2-Fc结构域包含C222S、A330S和P331S替换，并且以葡萄糖依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。

[0158] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7具有至少80%(例如，至少约85%、至少约90%或至少约95%)序列同一性的氨基酸序列。

[0159] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

[0160] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
GLP-1-IgG2/Fc融合蛋白(包含GLP-1、连接肽与IgG2/Fc结构域)	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGSSGAP PPSGGGGSERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	7

[0161] 如实施例中所证明的，本文公开的GLP-1融合蛋白，通过序列改造后，具有更长的半衰期，例如，GLP-1融合蛋白YN-011具有约8.6天(207h)的半衰期。

[0162] 在一个实施方式中，本发明的GLP-1融合蛋白中还包含信号肽。

[0163] 如本文所指的术语“信号肽”是指使融合蛋白分泌至细胞外介质的多肽。这种多肽也可以称为“前导肽”、“多肽前体”、“前肽”等。使用信号肽来指导蛋白质的分泌在本领域中是已知的(例如美国专利US8658174，其内容通过引用整体并入本文)。信号肽的实例包括但不限于人CD33信号肽、人生长激素释放激素(GHRH)信号肽、人α-1-微球蛋白/bikunin前体(AMBP)信号肽、高斯荧光素酶信号肽、鼠免疫球蛋白重链信号肽，鼠免疫球蛋白κ轻链信号肽。信号肽在分泌过程中被切割。在一些实施方式中，信号肽的切割在GLP-1多肽的N末端产生活性组氨酸残基。

[0164] 在一个实施方式中，所述信号肽是人CD33信号肽。

[0165] 在一个实施方式中，信号肽与如SEQ ID NO:4(MPLLLLLPLLWAGALA)所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%的的序列同一性，并允许分泌融合蛋白。在一个实施方式中，信号肽具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中，信号肽具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0166] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95% 的序列同一性，并且GLP-1多肽包含A8G、G22E、R36G替换，IgG2-Fc结构域包含C222S、A330S和P331S替换。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列同一性，并且以葡萄糖依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白与如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%

的序列同一性，并且GLP-1多肽包含A8G、G22E、R36G替换，IgG2-Fc结构域包含C222S、A330S和P331S替换，并且以葡萄糖依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。

[0167] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少80%(例如，至少约85%、至少约90%或至少约95%)序列同一性的氨基酸序列。

[0168] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

[0169] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
GLP-1-IgG2/Fc融合蛋白（包含信号肽、GLP-1、连接肽与IgG2/Fc结构域）	MPLLLLLPLLWAGALAHGEGTFTSDVSSYLEEQAAK EFIAWLVKGGGSSGAPPPSGGGGSERKSCVECPPCPA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	8

[0170] 在一个实施方式中，本申请所述的融合蛋白在受试者(例如，人类受试者)体内的半衰期为至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天。

[0171] 在另一优选的实施方式中，所述GLP-1融合蛋白是药品级的。

[0172] 本发明的另一方面，还提供了一种二聚体，其包含由二硫键连接的两条相同的肽链，其中，每条肽链均包括如本文所述的融合蛋白。

[0173] III.核酸

[0174] 在另一个方面，本发明还提供了一种多核苷酸，其包含编码本发明所述的多肽或肽(例如，GLP-1多肽、Fc片段、融合蛋白)的多核苷酸。

[0175] 在另一个方面，本发明还提供了一种核酸分子，其包含编码本文所述多肽或肽(例如，GLP-1多肽、Fc片段、融合蛋白)的多核苷酸。

[0176] 本申请所用的术语“核酸”或“核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非另有说明，否则特定的核苷酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并的密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言，简并的密码子取代可通过产生这样的序列来实现：其中一个或多个选定的(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(参见Batzer et al.,Nucleic Acid Res.19:5081(1991)；Ohtsuka et al.,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985)以及Rossolini et al.,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0177] 在一个实施方式中，本申请所述的多核苷酸是密码子优化的，例如是针对人进行优化。所述核酸分子可用于本文所述的方法中。

[0178] 可以使用标准蛋白质化学技术合成多肽和融合蛋白[23]。此外，自动肽合成仪是可商购的(例如Advanced ChemTech Mode1396；Milligen/Biosearch 9600)。或者本文所述的肽、多肽、或其片段或变体可使用本领域众所周知的各种表达系统重组产生。

[0179] 在一个实施方式中，本申请所述的多核苷酸包含如SEQ ID NO:26所示或如SEQ ID NO:27所示的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27具有至少70%的序列同一性的多核苷酸序列。

[0180] 在一个实施方式中，本申请所述的多核苷酸与SEQ ID NO:26具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多核苷酸序列。在另一个实施方式中，本申请所述的多核苷酸为如SEQ ID NO:26所示的多核苷酸序列。

[0181] 在一个实施方式中，本申请所述的多核苷酸与SEQ ID NO:27具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约9

6%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多核苷酸序列。在另一个实施方式中，本申请所述的多核苷酸为如SEQ ID NO:27所示的多核苷酸序列。

[0182] 在某些实施方式中，本申请所述的多核苷酸包含如SEQ ID NO:20～22中任一所示的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:20～22具有至少70%(例如，至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%)的序列同一性的多核苷酸序列。

[0183] 在某些实施方式中，本申请所述的多核苷酸包含如SEQ ID NO:24所示或如SEQ ID NO:25所示的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25具有至少70%(例如，至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%)的序列同一性的多核苷酸序列。

[0184] 在某些实施方式中，本申请所述的多核苷酸包含如SEQ ID NO:23所示的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少70%(例如，至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%)的序列同一性的多核苷酸序列。

[0185] 在某些实施方式中，本申请所述的多核苷酸包含如SEQ ID NO:28～38任一所示的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:28～38任一所示的序列具有至少70%(例如，至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%)的序列同一性的多核苷酸序列。

[0186] SEQ ID NO:20～38的序列如下表所示。

名称	核苷酸序列	SEQ ID NO
GLP-1(7-36-NH_2)	CACGCCGAGGGCACCTTCACCAGCGACGTGAGCAGCT ACCTGGAGGGCCAGGCCGCCAAG GAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCAGG	20
GLP-1(7-37)	CACGCCGAGGGCACCTTCACCAGCGACGTGAGCAGCT ACCTGGAGGGCCAGGCCGCCAAG GAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCAGGGGC	21
GLP-1 突变(A8G、G22E、R36G 三位点突变)	CACGGCGAGGGCACCTTCACCAGCGACGTGAGCAGCT ACCTGGAGGAGCAGGCCGCCAAG GAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCGGCGGC	22

CD33 信号肽	ATGCCCCTGCTGCTGCTGCTGCCCCTGCTGTGGGCCGG CGCCCTGGCC	23
IgG2/Fc 结构域 (人 IgG2 重链 Fc 区第 219-445 位)	GAGAGGAAGTGCTGCGTGGAGTGCCCCCCCTGCCCCG CCCCCCCCGTGGCCGGCCCCAGC GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCG AGGTGCAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GGGAGGAGCAGTTCAACAGCACC TTCAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCCGCCCCCA TCGAGAAGACCATCAGCAAGACC AAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCAGCAGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCT TCTACCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA AGACCACCCCCCCCATGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC TGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	24
IgG2/Fc 结构域 突变 (人 IgG2 重 链 Fc 区第 219- 445 位，含 C222S、	GAGAGGAAGAGCTGCGTGGAGTGCCCCCCCTGCCCCG CCCCCCCCGTGGCCGGCCCCAGC GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCG AGGTGCAGTTCAACTGGTACGTG	25

A330S、P331S位点突变)	GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GGGAGGAGCAGTTCAACAGCACC TTCAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCA TCGAGAAGACCATCAGCAAGACC AAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCAGCAGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCT TCTACCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA AGACCACCCCCCCCATGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC TGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
GLP-1-IgG2/Fc融合蛋白(包含GLP-1、连接肽与 IgG2/Fc 结构域)	CACGGCGAGGGCACCTTCACCAGCGACGTGAGCAGCT ACCTGGAGGAGCAGGCCGCCAAG GAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCGGCGGCAGCA GCGGCGCCCCCCCCCCCCAGCGGC GGCGGCGGCAGCGAGAGGAAGAGCTGCGTGGAGTGCC CCCCCTGCCCCGCCCCCCCCGTG GCCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAA GGACACCCTGATGATCAGCAGG ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCCGAGGTGCAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAG TTCAACAGCACCTTCAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGT GGTGCACCAGGACTGGCTGAAC	26

	GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGC CTGCCCAGCAGCATCGAGAAGACC ATCAGCAAGACCAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGG TGTACACCCTGCCCCCCAGCAGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG AGAACAACTACAAGACCACCCCC CCCATGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG CAAGCTGACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
GLP-1-IgG2/Fc 融合蛋白(包含信号肽、GLP-1、连接肽与 IgG2/Fc 结构域)	ATGCCCCTGCTGCTGCTGCTGCCCCTGCTGTGGGCCGG CGCCCTGGCCCACGGCGAGGGC ACCTTCACCAGCGACGTGAGCAGCTACCTGGAGGAGC AGGCCGCCAAGGAGTTCATCGCC TGGCTGGTGAAGGGCGGCGGCAGCAGCGGCGCCCCCC CCCCCAGCGGCGGCGGCGGCAGC GAGAGGAAGAGCTGCGTGGAGTGCCCCCCCTGCCCCG CCCCCCCCGTGGCCGGCCCCAGC GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCG AGGTGCAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GGGAGGAGCAGTTCAACAGCACC TTCAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCA TCGAGAAGACCATCAGCAAGACC	27

	AAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCCAGCAGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCT TCTACCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA AGACCACCCCCCCCCATGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC TGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
连接肽	AGCAGCGGCGCCCCCCCCCCCAGCGGCGGCGGCGGCA GC	28
连接肽	(GGCGGCGGCGGCAGC)3	29
连接肽	(GGCGGCGGCGGCAGC)4	30
连接肽	GGCAGCACCGGCGGCGGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCA GCGGCGAGGGCGGCGGCGGCAGC	31
连接肽	GAGAGCGGCAGGAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGC GGCGGCAGC	32
连接肽	GAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAG AGCACC	33
连接肽	GAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAG AGCACCCAG	34
连接肽	GAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAG GTGGAC	35
连接肽	GGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGAGCAGCGAGGGC AAGGGC	36
连接肽	AAGGAGAGCGGCAGCGTGAGCAGCGAGCAGCTGGCCC AGTTCAGGAGCCTGGAC	37
连接肽	GAGAGCGGCAGCGTGAGCAGCGAGGAGCTGGCCTTCA GGAGCCTGGAC	38

[0187] IV. 载体和细胞

[0188] 本发明的再一个方面，还提供了一种包含本申请所述的多核苷酸的载体。

[0189] 可以使用适用于预期的任何载体。例如，可以将一些载体引入表达系统，例如哺乳动物、昆虫或细菌表达系统，用于表达和纯化所表达的蛋白质。一些载体可用于生产病毒。这些不同的载体是本领域公知的。

[0190] 在一些实施方式中，载体与体外表达系统一起用于产生融合蛋白。融合蛋白的表达和纯化可以通过本领域公知的任何合适的方法进行。

[0191] 可能的表达载体包括但不限于质粒或修饰的病毒(例如，复制缺陷型逆转录病毒，包括慢病毒载体、腺病毒和腺相关病毒等)。在一个实施方式中，可以与本发明的融合蛋白一起使用的表达载体是pKN012，可以通过商业途径获得(Beijing Kohnoor Science&Technology Co.，Ltd)。

[0192] 载体可以包含合适的调节序列和组分。合适的调节序列可选自多种来源，包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物或昆虫基因。这种调节序列的例子包括：转录启动子和增强子或RNA聚合酶结合序列、核糖体结合序列，包括翻译起始信号。此外，根据要转染/感染/转导的细胞和所使用的载体，可以将其他序列，例如复制起点、额外的DNA限制性位点、增强子和赋予转录诱导能力的序列掺入表达载体中。在一个实施方式中，调节序列指导或增加神经组织和/或细胞中的表达。在一个实施方式中，载体是病毒载体。重组表达载体还可以含有标记基因，该标记基因有助于选择用于表达本文所述抗体的载体转化、感染或转染的宿主细胞。重组表达载体还可以包含编码例如可以帮助检测的融合部分(例如，用于产生抗体“融合蛋白”)的其他表达盒，包括例如本文所述的标签和标记。

[0193] 在一个实施方式中，载体包含一种或多种，任选地图1所示的组分。例如，在一个实施方式中，包含编码GLP-1融合蛋白的多核苷酸的载体是pKN012-GLP1-IgG2。

[0194] 可以使用多种转导细胞的方法，包括病毒载体、“裸”DNA、脂质或其他纳米颗粒中的DNA、佐剂辅助的DNA、基因枪等。例如，逆转录病毒载体如慢病毒载体也可用于转导体内的细胞。可用于实施本发明的其他载体系统包括基于腺病毒和腺相关病毒的载体。

[0195] 本发明的另一个方面，提供了一种重组细胞，所述细胞包含编码所述GLP-1融合蛋白的多核苷酸，或包含本申请所述的载体。

[0196] 稳定表达的重组细胞可以通过例如用包含多核苷酸、优选地本文所述的任何多核苷酸的载体进行转化、转染或转导重组细胞来制备。

[0197] 在一个实施方式中，本发明的细胞中，所述细胞还重组或天然表达赖氨酰羟化酶。

[0198] 在一个实施方式中，本发明的细胞表达的赖氨酰羟化酶水平或活性高于COS-7细胞表达的赖氨酸羟化酶水平或活性。换言之，所述细胞与COS-7细胞相比赖氨酰羟化酶活性水平增加。例如，所述细胞可以是被修饰的细胞以增加表达赖氨酸羟化酶(例如通过制备重组表达赖氨酸羟化酶的细胞)，或可以是与例如COS-7细胞相比，具有天然增加的赖氨酸羟化酶水平的细胞。例如，本申请所述的细胞表达的赖氨酰羟化酶水平或活性比COS-7细胞表达的赖氨酸羟化酶水平或活性高至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或者至少50%。

[0199] 在一个实施方式中，本申请所述的细胞是真核生物细胞。在某些实施方式中，所述真核生物细胞是哺乳动物细胞。在一个实施方式中，所述哺乳动物细胞是衍生自人的细胞。例如，所述哺乳动物细胞是人胚胎肾细胞293(HEK293细胞)，例如，HEK293T细胞、HEK293S细胞或HEK293F细胞。在一个实施方式中，所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，例如，CHO-K1细胞、CHO-S细胞或CHO-DG44细胞。

[0200] 在一个实施方式中，本发明的重组细胞是由中国仓鼠卵巢细胞经悬浮驯化获得，以CHOK1细胞为示例。

[0201] V.细胞的构建方法、融合蛋白的生产和检测方法

[0202] 本发明的再一个方面，提供了一种重组细胞的构建方法，包括：将编码本发明的GLP-1融合蛋白的多核苷酸引入载体中以构建表达载体；将所述表达载体导入重组或天然表达赖氨酰羟化酶的细胞以得到重组细胞。

[0203] 在一个实施方式中，所述重组或天然表达赖氨酰羟化酶的细胞表达的赖氨酸羟化酶较其它细胞(例如，COS-7细胞)表达的赖氨酸羟化酶的水平或活性升高。

[0204] 在一个实施方式中，所述细胞为CHO细胞，例如，CHO-K1细胞、CHO-S细胞或CHO-DG44细胞。

[0205] 在一个实施方式中，所述载体可以是pKN012载体。

[0206] 在一个实施方式中，所述重组细胞的构建方法包括以下步骤：

[0207] a)将SEQ ID NO:26所示的多核苷酸序列插入pKN012载体的NcoI和HindIII位点，生成pKN012-GLP1-IgG2/Fc表达载体；

[0208] b)将pKN012-GLP1-IgG2/Fc表达载体导入CHO-K1细胞中得到重组细胞。

[0209] 在另一个实施方式中，所述重组细胞的构建方法包括以下步骤：

[0210] a)将SEQ ID NO:27所示的多核苷酸序列插入pKN012载体的NcoI和HindIII位点，生成pKN012-GLP-1-IgG2/Fc表达载体；

[0211] b)将pKN012-GLP-1-IgG2/Fc表达载体导入CHO-K1细胞中得到重组细胞。

[0212] 本发明的再一个方面，提供了一种生产所述GLP-1融合蛋白的方法，包括使用本文所述的重组细胞或本文所述的构建方法制备的细胞得到融合蛋白的步骤。

[0213] 如本文所述，可以合成GLP-1融合蛋白。如本文所示，所述融合蛋白也可以使用重组细胞制备，包括例如重组表达GLP-1融合蛋白的重组中国仓鼠卵巢细胞。因此，本发明还提供了一种制备GLP-1融合蛋白的方法，所述方法包括培养表达GLP-1融合蛋白的重组细胞，其中所述培养包含示例中所述的一个或多个工艺步骤或材料。例如，所述方法可包括如表2所述的一个或多个工艺步骤和/或如表3或4所述的一个或多个材料。

[0214] 在一些实施方式中，表达GLP-1融合蛋白的重组细胞是使用HEK293T、HEK293S、HEK293F和/或CHO细胞(例如CHO-K1细胞)制备的，例如在适合体内使用的条件下，所述重组细胞可用于产生重组多肽和/或融合蛋白。

[0215] 在一个实施方式中，所述方法还包括如下步骤：检测所述融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平。不受任何理论的束缚，但是认为当所述GLP-1融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平在10％和100％之间(例如，例如，大于等于10％、大于等于15％、大于等于20％、大于等于26％、大于等于27％、大于等于28％、大于等于29％、大于等于30％、大于等于35％、大于等于40％、大于等于45％、大于等于50％、大于等于55％、大于等于60％、大于等于65％、大于等于70％、大于等于75％、大于等于80％、大

于等于85%、大于等于90%、或大于等于95%)时认为制备得到的融合蛋白是合格的(例如，符合药品出厂标准)。

[0216] 本发明的再一个方面，还提供了一种检测融合蛋白质量的方法，其中，所述融合蛋白包含GLP-1多肽和免疫球蛋白IgG2-Fc结构域，所述方法包括以下步骤：检测所述融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平。

[0217] 在一个实施方式中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且所述GLP-1多肽包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G；和/或所述IgG2-Fc结构域包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。在一个实施方式中，所述GLP-1多肽包含如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列，并且所述IgG2-Fc结构域包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在一个实施方式中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，并且所述IgG2-Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0218] 在一个实施方式中，当所述融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平在10%和100%之间(例如，大于等于10%、大于等于15%、大于等于20%、大于等于 26%、大于等于27%、大于等于28%、大于等于29%、大于等于30%、大于等于35%、大于等于40%、大于等于45%、大于等于50%、大于等于55%、大于等于60%、大于等于65%、大于等于70%、大于等于75%、大于等于80%、大于等于85%、大于等于90%、或大于等于95%)时将所述融合蛋白的质量确认为合格。“合格”是指符合国家药品监督管理部门或同类机构制定的药品标准体系，例如药品标准、药品注册标准、企业药品标准、药典等，从而使得生产的药品符合药品出厂标准。

[0219] VI.组合物

[0220] 本发明的另一方面，还提供了一种包含本申请所述的GLP-1融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体或重组细胞的组合物。

[0221] 在一个实施方式中，组合物还可以包含合适的稀释液或载体。在另一优选实施方式中，载体是药学上可接受的载体。

[0222] 在一个实施方式中，所述组合物是药学上的组合物。

[0223] 在一个实施方式中，所述组合物是包含GLP-1融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0224] 在一个实施方式中，所述组合物包含GLP-1融合蛋白，所述融合蛋白的GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第34位赖氨酸(K34)上具有一定的羟基化水平。在某些实施方式中，在所述融合蛋白中，有大于等于10%、大于等于15%、大于等于20%、大于等于26%、大于等于27%、大于等于28%、大于等于29%、大于等于30%、大于等于35%、大于等于40%、大于等于45%、大于等于50%、大于等于55%、大于等于60%、大于等于65%、大于等于70%、大于等于75%、大于等于80%、大于等于85%、大于等于90%、或大于等于95%的融合蛋白中的GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的K34上被羟基化。

[0225] 在一个实施方式中，所述组合物包含GLP-1融合蛋白，所述融合蛋白的GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第31位色氨酸(W31)上基本上未被氧化。在某些实施方式中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的W31上的氧化水平低于5%(例如，低于4%、低于3%、低于2%、低于1%、低于0.5%、低于0.4%、低于0.3%、低于0.2%、低于0.1%)或无法检测。

[0226] 在一个实施方式中，所述组合物包含GLP-1融合蛋白，所述融合蛋白的IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的第253位蛋氨酸(M253)上具有一定的氧化水平。在某些实施方式中，所述IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的第253位蛋氨酸(M253)上的氧化水平小于等于15%，例如小于等于10%、小于等于9%、小于等于8%、小于等于 7%、小于等于6%、小于等于5%、小于等于4%、小于等于3%、小于等于2%、小于等于1%或小于等于0.5%或无法检测。

[0227] 在一个实施方式中，所述组合物进一步包含缓冲盐水。

[0228] 在一个实施方式中，所述组合物进一步包含糖类。

[0229] 在一个实施方式中，所述组合物进一步包含表面活性剂。本发明的药物组合物可以作为一个单位剂量和/或多个单位剂量成批制备、包装和/或销售。所述组合物可以多种形式制备。

[0230] 在一个实施方式中，所述组合物包含GLP-1融合蛋白，配制成制剂，给药剂量为约0.25mg至约20mg，例如，约0.25mg、约0.3mg、约0.35mg、约0.4mg、约

0.45mg、约0.5mg、约0.55mg、约0.6mg、约0.65mg、约0.7mg、约0.75mg、约0.8mg、约0.85mg、约0.9mg、约0.95mg、约1mg、约1.5mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约3.5mg、约4mg、约4.5mg、约5mg、约5.5mg、约6mg、约7mg、约7.5mg、约8mg、约8.5mg、约9mg、约9.5mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg或约20mg的GLP-1融合蛋白。

[0231] 所述GLP-1融合蛋白、多核苷酸、载体、重组细胞或组合物可用于制备药物和/或用于例如通过胃肠外、静脉内、皮下或肌肉内给药。

[0232] 在一个实施方式中，所述的GLP-1融合蛋白或其组合物可以经胃肠外给药或配制成制剂用于经肠外给药。

[0233] 在一个实施方式中，所述的GLP-1融合蛋白或其组合物可以经皮下给药或配制成制剂用于皮下给药。

[0234] 在一个实施方式中，所述的GLP-1融合蛋白或其组合物可以经静脉给药或配制成制剂用于静脉给药。

[0235] 在一个实施方式中，所述的GLP-1融合蛋白或其组合物可以经肌肉内给药或经配制成制剂用于肌肉内给药。

[0236] 适用于GLP-1融合蛋白和/或细胞的稀释液包括但不限于盐水溶液、pH缓冲溶液和本文所描述的稀释液以及甘油溶液或适用于冷冻多肽和/或细胞的其它溶液。

[0237] 适用于核酸和/或载体的稀释液包括但不限于盐水溶液、pH缓冲溶液和本文所描述的稀释液以及水等。

[0238] 在另一优选实施方式中，所述稀释液是无菌的。

[0239] VII.治疗和预防疾病的方法和用途

[0240] 如本文所示，GLP-1多肽A8G、G22E和/或R36G替换，和/或在K34处的羟基化水平增加，在W31处的氧化水平减少和/或IgG2/Fc部分的M253和/或IgG2/Fc部分中的C222S、A330S和P331S一个或多个替换增加了GLP-1融合蛋白的产量、活性和/或半衰期。本文所述经修饰的GLP-1融合蛋白、核酸、载体和重组细胞适合于制备药物及其组合物，并用于相应的药物治疗用途。

[0241] 本发明的另一方面，本文公开的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或组合物可在受试者中用于治疗或预防疾病或病症的发作或减缓其进展。

[0242] 本发明的另一方面，提供了一种所述的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或其组合物作为GLP-1受体激动剂的用途。

[0243] 本发明的另一方面，提供了一种所述融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或其组合物用于治疗、预防或减缓疾病或病症进展。

[0244] 本发明的另一方面，提供了一种融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或其组合物用于制备治疗、预防或减缓疾病或病症进展的药物。

[0245] 本发明的另一方面，提供了一种通过向有需要的受试者给予治疗有效量的所述融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或其组合物治疗、预防或减缓疾病或病症进展的方法。

[0246] 本发明的另一方面，提供了本文所述的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物在制备用于治疗或预防疾病的药物中的用途。

[0247] 本发明的另一方面，提供了本文所述的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物用于治疗或预防疾病的用途。

[0248] 本发明的另一方面，提供了一种治疗或预防疾病的方法，所述方法包括：向受试者施用治疗有效量的本文所述的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物。

[0249] 在一个实施方式中，包含融合蛋白的药物以融合蛋白为约0.2mg至约20mg(每人每次)的量施用。在一个实施方式中，融合蛋白的量为约1mg至约10mg。在一个实施方式中，融合蛋白的量为约1mg至约5mg。在一个实施方式中，融合蛋白的量为约0.25mg、约0.3mg、约0.35mg、约0.4mg、约0.45mg、约0.5mg、约0.55mg、约0.6mg、约0.65mg、约0.7mg、约0.75mg、约0.8mg、约0.85mg、约0.9mg、约0.95mg、约1mg、约1.5mg、约2mg、约2.5mg、约3mg、约3.5mg、约4mg、约4.5mg、约5mg、约5.5mg、约6mg、约6.5mg、约7mg、约7.5mg、约8mg、约8.5mg、约9mg、约9.5mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg或约20mg。

[0250] 可以使用不同的剂型，合适的剂型可以包括但不限于溶液、悬浮液、丸剂、片剂。

[0251] 在一个实施方式中，治疗方案可以包括多次给药。

[0252] 在一个实施方式中，所述GLP-1融合蛋白或其组合物给药次数为每3天一次，或每周一次，或每两周一次。

[0253] 在一个实施方式中，所述GLP-1融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或其组合物给药方案为一周一次后停药，随后每周给药一次。在另一优选例中，所述停药时间为2周。

[0254] 在一个实施方式中，所述GLP-1融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或其组合物可以单次给药后停药两周，然后每周连续给药4次。在另一优选实施方式中，治疗进一步包括在给药方案开始前一周给予1mg的初始剂量。

[0255] 在一个实施方式中，所述GLP-1融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞或其组合物通过胃肠外、静脉、皮下或肌肉内等途径给药。

[0256] 在一个实施方式中，所述疾病包括糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病、代谢性疾病的并发症、神经系统疾病或其他相关疾病。

[0257] 在一个实施方式中，所述疾病或病症是糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病。

[0258] 在一个实施方式中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病选自下组：糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肥胖症和代谢综合征。

[0259] 在一个实施方式中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病是或包括糖尿病。在一个实施方式中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病是2型糖尿病。在另一实施方式中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病是或包括肥胖症。在另一实施方式中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病是或包括非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。在另一实施方式中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病是非酒精性肝纤维化(NASH)。

[0260] 在一个实施方式中，受试者是新诊断的或先前已被诊断患有糖尿病(例如，2型糖尿病)。糖尿病可以通过多种方式进行诊断，例如空腹血糖(FPG)。根据美国糖尿病协会规定，当空腹血糖大于或等于126mg/dl时诊断为糖尿病。

[0261] 在一个实施方式中，受试者患糖尿病(例如，2型糖尿病)的可能性增加。例如，受试者可能易患糖尿病，由于受试者肥胖或受试者具有遗传易感性，例如当受试者具有糖尿病家族史时。

[0262] 在一个实施方式中，受试者是肥胖症患者。肥胖可以通过参考体重指数(BMI)来定义。例如，世界卫生组织(WHO)将肥胖定义为具有等于或大于30的BMI。在另一实施方式中，受试者具有至少约20kg/m^2的BMI。在另一实施方式中，受试者可以是血糖高于相当体重的同龄人平均水平，但不足以诊断为糖尿病。在另一实施方式中，实施方式受试者也可以是具有糖尿病家族史的个体。

[0263] 在一个实施方式中，受试者是新诊断的或之前被诊断为NAFLD或NASH的患者。在另一实施方式中，受试者发生NAFLD或NASH的可能性增加。例如，受试者可能对NAFLD或NASH具有遗传易感性。

[0264] 在一个实施方式中，所述代谢性疾病的并发症包括由代谢性疾病引起的心血管并发症(例如，冠心病、心源性猝死、心力衰竭等)、肾脏并发症(例如，急性肾损伤、糖尿病肾病)或肝脏并发症。

[0265] 在一个实施方式中，所述疾病或病症是神经系统疾病。在一个实施方式中，所述神经系统疾病是神经退行性疾病。在一个实施方式中，所述神经退行性疾病选自下组：阿尔茨海默病(AD)、运动神经元病、亨廷顿病和帕金森病(PD)。

[0266] 在一个实施方式中，神经退行性疾病是阿尔茨海默病。在另一个实施方式中，神经退行性疾病是帕金森病。在另一个实施方式中，神经退行性疾病是运动神经元疾病。在另一个实施方式中，神经退行性疾病是亨廷顿病。

[0267] 在一个实施方式中，对象是新诊断的或先前已被诊断患有阿尔茨海默病。在另一个实施方式中，受试者患阿尔茨海默病的可能性增加。例如，受试者可能是由于受试者的遗传而易患阿尔茨海默病的受试者，例如当受试者具有阿尔茨海默病家族史或与阿尔茨海默病相关的Tau或APP突变时。

[0268] 在一个实施方式中，受试者是新诊断的或先前已被诊断患有帕金森病。在另一个实施方式中，受试者发生帕金森病的可能性增加。例如，受试者可能是由于受试者的遗传而易患帕金森病的受试者，例如当受试者具有帕金森病家族史时。

[0269] 本发明的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物可以与任何其他已知的药物或疗法结合用于治疗疾病。

[0270] 在一个实施方式中，本文所公开的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物可以与治疗糖尿病的药物结合使用，可以是目前已经上市的药物，例如胰岛素、二甲双胍，磺酰脲类主要包括格列美脲、格列本脲、格列齐特、格列喹酮等，α葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖等，还包括其它已经上市和正在研发的治疗糖尿病的药物。在一个实施方式中，糖尿病药物是二甲双胍或胰岛素。在一个实施方式中，糖尿病药物是二 甲双胍或胰岛素。在一个实施方式中，本文所公开的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物可以与阿尔茨海默病药物和/或非药物干预如认知疗法联合使用。在一个实施方式中，本文所公开的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物与γ-氨基丁酸联合使用，用于治疗神经退行性疾病。在一个实施方式中，本文所公开的融合蛋白、二聚体、多核苷酸、载体、细胞、或组合物与γ-氨基丁酸联合使用，用于治疗阿尔茨海默病。

[0271] 在某些实施方式中，本文所公开的GLP-1融合蛋白与γ-氨基丁酸联合使用可以抑制TNF-α降低SH-SY5Y细胞活力的作用。

[0272] 在某些实施方式中，本文所公开的GLP-1融合蛋白与γ-氨基丁酸联合使用可以减少TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡。

[0273] 在某些实施方式中，本文所公开的GLP-1融合蛋白与γ-氨基丁酸联合使用可以对TNF-α损伤的神经元细胞产生保护作用。

[0274] 在某些实施方式中，本文所公开的GLP-1融合蛋白与γ-氨基丁酸联合使用可以减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡。

[0275] 在某些实施方式中，本文所公开的GLP-1融合蛋白与γ-氨基丁酸联合使用可以降低HMC3小胶质细胞中$A\beta_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子(例如，TNF-α、IL-6)mRNA表达。

[0276] 在一个实施方式中，本发明应用中，所述药物为GLP-1受体激动剂。

[0277] 上述公开内容概括地描述了本申请。参考下面的具体例子可以得到更完整的理解。这些示例仅出于说明的目的进行描述，并不旨在限制本申请的范围。当情

况可能建议或变得方便时，可以考虑形式的改变和等效物的替换。尽管在此使用了特定的术语，但是这些术语是为了描述性的而不是为了限制的目的。

[0278] 以下非限制性实施例用于描述本发明内容。

[0279] 实施例

[0280] 下述实施例所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0281] 下述实施例所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0282] 实施例1：融合蛋白表达及活性检测

[0283] 1.1质粒构建

[0284] 构建了编码GLP-1融合蛋白的载体，该融合蛋白包含人GLP-1(7-37)和人源IgG2/Fc(含人源IgG2重链中铰链、CH2和CH3区，即Hinge-CH2-CH3)。人CD33(hCD33)分泌前导肽序列与GLP-1序列融合指导合成肽分泌到培养基中。化学合成编码融合蛋白hCD33-GLP-1-IgG2/Fc(hinge-ch2-ch3)的cDNA片段(如SEQ ID NO:27所示)，将其插入pKN012载体的NcoI和HindIII位点，生成pKN012-GLP-1-IgG2/Fc。

[0285] 将pKN012-GLP-1-IgG2/Fc稳定表达载体转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中。从含有pKN012-GLP-1-IgG2/Fc的菌株中提取质粒，用PvuI酶切。电泳后，有一条具有正确分子量的目标条带。在乙醇沉淀后对线性化的质粒进行定量并用于稳定转染。

[0286] 为了建立稳定表达GLP-1-IgG2/Fc的CHO-K1细胞(Lot#58995535/ATCC)，通过电穿孔(电转染)技术，用2μg线性化的pKN012-GLP-1-IgG2/Fc转染在6孔板(2.5 x 10^5细胞/孔)中生长的CHO-K1细胞。转染后24小时，将细胞分散并在含有MSX(甲硫氨酸亚砜亚胺，100μM/L)的CD-CHO培养基中培养，选择那些已将重组质粒稳定整合到基因组中的细胞。每3天更换一次培养基，直到形成菌落。分离单个菌落并扩增至稳定的细胞系，使用大鼠GLP-1RIA试剂盒测试在24孔板中生长的细胞系的组织培养上清液中的GLP-1融合蛋白(YN-011)。选择能够分泌融合蛋白的细胞用于进一步鉴定。制备得到的GLP-1融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示(在本申请中也称为“YN-011”)。

[0287] 1.2通过诱导cAMP水平检测YN-011活性

[0288] 天然GLP-1以葡萄糖依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。为了评估纯化的YN-011是否具有天然GLP-1的功能，测定对克隆胰岛素分泌INS-1细胞的胰岛素分泌的影响。INS-1细胞经过血清和葡萄糖饥饿处理，然后在所示的0、5或20mM葡萄糖存在下用不同量的纯化YN-011处理。在没有葡萄糖的情况下，YN-011不会刺激β细胞分泌胰岛素。然而，在5mM或20mM葡萄糖存在下，YN-011以剂量依赖性方式刺激β细胞分泌胰岛素。数据表明GLP-1-IgG2/Fc融合蛋白YN-011具有生物活性，能够以葡萄糖依赖性方式刺激INS-1细胞中的胰岛素分泌。

[0289] 在不存在葡萄糖的情况下，用YN-011(120nM)处理的INS-1细胞的cAMP处于基础水平，在存在5mM葡萄糖的情况下，YN-011处理的细胞的cAMP水平显著增加，与度拉鲁肽水平相当。

[0290] 实施例2：增加GLP-1K34羟基化水平可提高蛋白质产量和活性

[0291] 2.1通过基于LC-MS/MS的肽图谱测定修饰水平

[0292] 采用Lys-C酶切进行质谱分析鉴定。YN-011样品依次变性、还原和烷基化，然后通过Lys-C酶水解成肽。采用Thermo LTQ velos Orbitrap仪器进行在线LC-MS/MS分析，采用mascot软件对数据进行处理分析。观察到肽段21-28：EFIAWLVK的分子量增加了16道尔顿(Da)的修饰。YN-011样品的不含+16Da修饰的肽和含+16Da修饰的肽的一级和二级质谱如图2所示。一级分子量误差在10ppm以内。通过分析二级碎片离子的荷质比，增加16Da修饰的位点为K28。K28也称为K34，因为活性GLP-1(例如GLP-1的7-37位氨基酸)包含前6个残基的缺失。21-28肽也在天然人的GLP-1中也可以称为27-34肽。

[0293] 通过UV280和EIC(离子流色谱，Extracted Ion Chromatography)方法检测YN-011中K34位上的修饰水平，结果如表1和图3A与3B所示。UV280的计算方法如下所示：

$$k=\frac{\frac{k\varepsilon_W}{k\varepsilon_W+\varepsilon_Y}A_1}{\frac{k\varepsilon_W}{k\varepsilon_W+\varepsilon_Y}A_1+A_2}\qquad \varepsilon_W=5500,\ \varepsilon_Y=1490$$

[0294] 其中：

[0295] K：含有+16Da的修饰肽占氨基酸21-28肽段总量(未修饰肽段和+16Da修饰段含量之和)；

[0296] A1：不含+16Da修饰的氨基酸21-28肽段在280nm的吸光度值；

[0297] A0：含+16Da修饰的氨基酸21-28肽段在280nm的吸光值

[0298] 表1.UV280和EIC方法检测YN-011中K34修饰水平

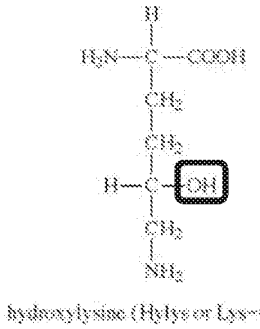
样本名称	序列位置	氨基酸序列	翻译后修饰(PTMs)	UV280比例(%)	EIC* 比例(%)
YN-011 样本 1	21-28	EFIAWLVK	/	/	/
		EFIAWLV**K**	+16Da	29.6%	31.8%
YN-011 样本 2	21-28	EFIAWLVK	/	/	/
		EFIAWLV**K**	+16Da	37.0%	31.4%
YN-011 样本 3	21-28	EFIAWLVK	/	/	/
		EFIAWLV**K**	+16Da	30.0%	31.1%
度拉鲁肽	21-28	EFIAWLVK	/	/	/
		EFIAWLV**K**	+16Da	8.2%	4.4%

*为质谱EIC相对定量

[0299] 2.2 YN-011中K34的羟基化水平

[0300] 在经过质谱分析确定+16Da发生在第34位赖氨酸(Lys)后，考虑到16Da是一个氧原子的分子量，提示有可能是氧化反应的结果。事实上细胞中有两类催化赖氨酸侧链修饰的酶，一种称为赖氨酸氧化酶(Lysyl oxidase，参考https://en.wikipedia.org/wiki/Lysyl_oxidase)，另一种是赖氨酸羟基化酶(Lysyl hydroxylase，参考https://en.wikipedia.org/wiki/Lysyl_hydroxylase)。赖氨酸氧化酶可以在赖氨酸侧链的第6位碳上的氨基氧化成醛基，但这种修饰与未

修饰的差别为1Da，与增加16Da结果不符。赖氨酸羟基化酶则会在赖氨酸侧链的碳(γ位)上加上一个羟基，形成稳定的羟基化赖氨酸(Hydroxylysine)。羟基化赖氨酸在赖氨酸的侧链上增加了一个羟基而减少了一个氢原子，因而刚好比原始分子量增加了16Da。K34位羟基化位置如下：



Hydroxylysine (Hyly or Lys-OH)

[0301] 综上所述，YN-011中K34上增加16Da极有可能是由赖氨酸羟基化造成的。因此在细胞培养过程中添加羟基化反应抑制剂，一方面验证+16Da的修饰为赖氨酸羟基化，另一方面收获不同+16Da修饰比例的蛋白，研究+16Da修饰比例高低对蛋白生物学活性的影响。

[0302] 本实验中使用的实施例1中能够分泌融合蛋白YN-011的稳定CHOK1细胞的细胞培养过程如表2所示。表3和表4列出了细胞培养所需的相关材料和细胞培养基。采用前文所述的质谱分析检测融合蛋白的修饰水平。发明人发现融合蛋白在K34上确实为羟基化修饰，具有15％～40％的羟基化水平。

[0303] 为了检测K34羟基化的生物学效应，实验中设置了8个摇瓶(SF1-SF8)用于培养稳定表达融合蛋白YN-011的CHOK1细胞。SF1-SF8用于评估各种不同条件。在细胞培养 过程中添加羟基化反应抑制剂，收获不同羟基化修饰比例的蛋白，研究羟基化比例高低对蛋白生物学活性的影响。米诺地尔(Minoxidil)是赖氨酸羟化酶的抑制剂，可抑制赖氨酸羟基化作用，而Zn^{2+}离子可以通过在反应过程中与Fe^{2+}离子竞争，从而抑制羟基化酶的作用。SF1用作对照，不添加任何抑制剂。本实验中使用的米诺地尔溶解在0.1N HCl溶液中。将HCl添加到SF2作为HCl对照。在SF3到SF5中加入不同浓度的米诺地尔，浓度分别为0.1mM、0.5mM和1.0mM。SF6和SF7为添加Zn^{2+}实验组，所使用Zn^{2+}试剂为$ZnSO_4$，所使用的$ZnSO_4$浓度分

别为200μM和400μM。SF8同时添加了米诺地尔和Zn^{2+}(由$ZnSO_4$提供)两种抑制剂，米诺地尔和Zn^{2+}的总添加浓度分别为0.5mM和200μM。

[0304] 表2.细胞培养过程

基础培养基	细胞密度	添加剂	时间	百分比	温度
Dynamis (0.5%ACA)	0.5(×10^6 细胞/ml)	Feed C(15g/L FM012），FAA02	3、6、8、10 天	7.7%、11%、11%、8.8%	36.5℃→30℃ (Day 4)

[0305] 表3.细胞培养过程所使用的材料

名称	缩写	公司	货号
Dynamis™ AGT 培养基	Dynamis	Gibco	A26175
CD Efficient Feed C AGT	Feed C	Gibco	A1327501
Sheff-CHO PLUS PF ACF	FM012	Sheffield	5X00483
L-胱氨酸	Cys	Applichem	A3671
L-酪氨酸	Tyr	Applichem	A3401
L-谷氨酰胺	Gln	J.T.Baker	2078-06
无水葡萄糖	Glucose	J.T.Baker	1919-09
盐酸，6.0N 溶液	HCl	J.T.Baker	0327-02
氢氧化钠，10N 溶液	NaOH	J.T.Baker	5000-02
米诺地尔	Minoxidil	Sigma	M4145
$ZnSO_4$	Zn^{2+}	Sigma	Z0251
抗凝结剂	ACA	Gibco	0010057

[0306] 表4.细胞培养基及其成分

细胞培养基	成分
Dynamis（0.5% ACA）	IL Dynamis (添加 5ml ACA)
Feed C(含 15g/L FM012)	1L Feed C 溶解 15g FM012
FAA02	IL FAA02(含 7.95g L-胱氨酸和 4.75g L-酪氨酸)

[0307] 2.3增加GLP-1的K34羟基化水平可提高蛋白质产量和活性

[0308] 蛋白质产量和活性结果见表5。空白对照SF1和仅添加HCl的SF2的羟基化水平为15.7%～16.0%。从SF3到SF5，随着米诺地尔(羟基化抑制剂之一)浓度的增加，羟基化的比例逐渐下降。当米诺地尔用量达到0.5mM时，羟基化比例为8.7%。当米诺地尔浓度增加到1mM时，比例为9.4%。细胞生长和蛋白表达受到明显抑制：活细胞峰值密度下降约17%，蛋白产量下降57.0%～67.9%。此外，当细胞培养物中加入400μm的Zn^{2+}(另一种羟基化抑制剂)时，羟基化水平也下降到10.7%。在混合添加抑制剂(米诺地尔，0.5mM；Zn^{2+}，200uM)的实验中，SF8中的羟基化水平也降低到9.6%。

[0309] 当存在羟基化抑制剂如米诺地尔时，羟基化比例随着添加浓度的增加而逐渐降低。细胞生长和蛋白表达受到明显抑制：活细胞峰值密度下降约17%，产量逐渐下降，下降57.0%～67.9%；同样，在羟基化抑制剂Zn^{2+}存在下，羟基化水平也随着Zn^{2+}浓度的增加而降低，蛋白收率下降22.9%～34.2%；当羟基化水平达到15.7%～16.0%时，收率增加，与低羟基化水平相比，收率提高了一倍。因此，羟基化水平越高，产率越高。

[0310] SUPA-1是美国专利US8658174中公开的GLP-1-IgG2/Fc融合蛋白。GLP-1多肽和IgG2/Fc之间没有使用连接肽。除GLP-1多肽A8G替换外，无其它GLP-1多肽和IgG2/Fc上的位点突变。SUPA-1未检测到羟基化，未检测到其它修饰，相同条件下蛋白产量为22mg/L。而当YN-011中K34的羟基化水平为8.7%～9.6%时，产量可达0.77g/l～1.03g/l，是SUPA-1的100倍以上。当K34的羟基化程度高于15%时，YN-011的产量率可以达到SUPA-1的500倍以上。

[0311] 此外，选择空白对照(SF1)和羟基化水平最低的两个样品(SF4和SF5)采用实施例1的1.2中的方法来检测YN-011的生物活性。结果表明SF1为88%，SF4和SF5分别为83%和68%。因此，羟基化比例越高，生物活性有升高的趋势。

[0312] 综上所述，融合蛋白中K34上确实为羟基化修饰，且该修饰大大提高了YN-011的产量，并且生物活性也有增加的趋势。

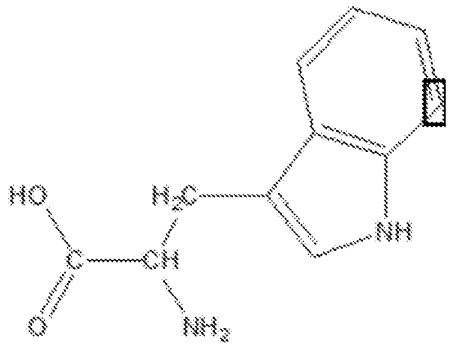
[0313] 进一步放大细胞培养规模，YN-011中试15L和三批200L反应器得到的YN-011在34位含有20%～30%的赖氨酸羟基化，YN-011的收率可达约2.7克/升。

[0314] 表5.产量和蛋白质活性结果总结

编号	试验条件	通过UV280检测的羟基化水平	初始细胞接种密度($\times10^6$细胞/mL)	累积的活细胞接种密度($\times10^6$个细胞·天/mL)	时间（天）	蛋白质产量(g/L)	**单细胞产量(pg/细胞/天)**
SF1	对照组 1	15.7	0.5	221.9	14	2.4	10.81
SF2	对照组 2，0.1N HCl	16.3	0.5	213.3	14	2.28	10.69
SF3	米诺地尔，0.1 mM	12.7	0.5	215.4	14	2.1	9.75
SF4	米诺地尔，0.5 mM	8.7	0.5	179.8	14	1.03	5.73
SF5	米诺地尔，1.0 mM	9.4	0.5	170.5	14	0.77	4.52
SF6	Zn2+，200uM	14.6	0.5	203.6	14	1.85	9.09
SF7	Zn2+，400uM	10.7	0.5	206.5	14	1.58	7.65
SF8	米诺地尔，0.5 mM；Zn^{2+}，200uM	9.6	0.5	174.9	14	0.92	5.26

[0315] 实施例3：通过LC-MS/MS测定氧化水平

[0316] 根据实施例2中或Bettinger等人[19]蛋白氧化测定方法，进行氧化水平的测定，发现本发明的GLP-1融合蛋白YN-011在W31上未被氧化，而度拉鲁肽在相同位置的氧化水 平大于5%。所述氧化发生在W31结构式中矩形框处：



[0317] 同时，本发明的GLP-1融合蛋白YN-011在M253处约有2%-4%的氧化水平。而度拉鲁肽在相同位置的氧化水平大于5%。

[0318] 实施例4：YN-011在糖尿病db/db小鼠中(2型糖尿病模型)的预防和治疗效果

[0319] 在db/db小鼠(Jackson Laboratories，000642)中评估YN-011皮下注射多次给药对降低血糖的影响。小鼠饲养于正常光照(12小时光照/12小时黑暗)和室温条件下，可以自由获取食物(正常的啮齿动物食物)和水。db/db小鼠缺乏瘦素受体，在4周龄时就会自发出现肥胖、高血糖和胰腺β细胞萎缩。

[0320] 60只患病的db/db小鼠(33-45g)分为6组，每组10只(5雄5雌)，给予0(溶剂PBS缓冲液对照)、0.15、0.3、0.6、1.2mg/kg的YN-011，或0.3mg/kg度拉鲁肽，通过皮下注射。另一组具有相同遗传背景的野生型小鼠(17-22g)作为正常对照。给药频率为每3天一次(Q3D)，在26天内总计给药9次。

[0321] 如图6所示，整个实验期间，模型对照组db/db小鼠随机血糖均维持在较高的水平且显著高于正常对照组小鼠($P<0.001$)，在第一次给药后，YN-011显著降低了db/db小鼠的随机血糖(RPG)浓度，治疗效果从给药后3小时，低至0.15mg/kg的剂量即可观察到。在0.15-1.2mg/kg的剂量范围内，降血糖作用的持续时间为34－72小时。YN-011也能够显著促进胰岛素分泌，并在给药后3小时开始增加血清胰岛素水平。

[0322] YN-011第9次给药后，YN-011治疗小鼠的RPG水平在所有剂量组和测量时间点均显著低于对照组，除了在0.15mg/kg组第4次给药后(第10天)无显著性差异(P＝0.07)。为较直观地了解各组小鼠的血糖下降情况，计算了整个实验中各测定时间点随机血糖下降率的平均值。结果显示，0.15、0.3、0.6YN-011组小鼠第7次给药后72小时 的随机血糖下降率分别为31.8％、46.2％、50.8％，1.2mg/kg的YN-011治疗组的血糖降低率则高达54.3％。重复给药YN-011后，YN-011的减低RPG作用可维持72小时。

[0323] YN-011长期给药也能明显降低db/db小鼠的空腹血糖水平。整个实验期间，db/db小鼠随机血糖均维持在较高的水平，且显著高于正常对照组小鼠(P<0.001)。db/db小鼠每3天一次连续皮下注射不同剂量YN-011后，各组小鼠所有测定时间点的空腹血糖与模型对照组相比均显著下降(P<0.001)。0.15、0.3、0.6和1.2mg/kg YN-011组小鼠第7次给药后54小时(21天)的空腹血糖下降率分别为46.8％、55.6％、59.5％和64.7％。由此提示，0.15、0.3、0.6和1.2mg/kg YN-011每3天一次连续多次给药后降低空腹血糖的药效维持时间均可至少维持至给药后54小时(给药后第3天)。阳性对照0.3mg/kg度拉鲁肽组小鼠所有测定时间点的空腹血糖也均显著下降。

[0324] 为较直观地了解各组小鼠的血糖下降情况，计算了整个实验中各测定时间点空腹血糖下降率的平均值。0.15、0.3、0.6和1.2mg/kg的YN-011组小鼠的空腹血糖平均下降率分别为55.0％、61.8％、63.7％和66.1％。阳性对照0.3mg/kg度拉鲁肽组小鼠的空腹血糖平均下降率为63.6％。

[0325] 因此，YN-011每3天一次连续多次给药后可显著降低2型糖尿病db/db小鼠的空腹血糖，剂量为0.15mg/kg时即有明显效果，且0.15、0.3、0.6和I.2mg/kg YN-011的降空腹血糖作用可至少维持至给药后54小时(给药后第3天)。

[0326] 皮下注射9次0.15-0.6mg/kg的YN-011治疗的db/db小鼠血清果糖胺显示出降低趋势，1.2mg/kg的YN-011治疗组db/db小鼠血清果糖胺水平显著降低。

[0327] 溶剂对照组db/db小鼠的随机和空腹体重在实验期间持续增加，而0.3、0.6和I.2mg/kg的YN-011治疗组动物的随机和空腹体重明显下降(P<0.05，P

<0.01，P<0.001)。而美国专利US8658174中公开的SUPA-1融合蛋白对db/db小鼠的体重没有明显的影响。说明本申请的GLP-1融合蛋白的效果更好。

[0328] 与溶剂对照组相比，YN-011治疗组的附睾脂肪含量及其与体重的比率显著降低；0.15、0.3和0.6mg/kg的YN-011组肩胛脂肪含量显著降低；0.3、0.6和1.2mg/kg的YN-011组皮下脂肪含量、腹股沟脂肪含量及其与体重的比值显著降低；1.2mg/kg的YN-011组肾周脂肪含量显著降低。

[0329] YN-011在最后一次给药后30小时(第9次给药，第26天)以剂量依赖性方式增加db/db小鼠的空腹血清胰岛素水平，伴随胰腺β细胞量的显著增加。

[0330] 与溶剂对照组相比，多次皮下注射YN-011显著降低血清甘油三酯水平，并且0.6mg/kg的YN-011显著降低db/db小鼠的血清游离脂肪酸水平。

[0331] 总之，YN-011多次皮下注射在db/db小鼠中显示出显著的治疗效果，不但对糖代谢有明显的改善作用，还对脂代谢异常也有明显的治疗作用。

[0332] 实施例5：YN-011的IIa期临床试验

[0333] 5.1试验设计

[0334] 该IIa期临床试验是一项在患有T2DM的受试者中进行的双盲、安慰剂对照的研究，评估以1mg、2mg、3mg和4mg剂量的YN-011皮下给药的药效和安全性，该研究的设计如图5所示。

[0335] IIa期研究的主要纳入标准：

[0336] • 至少1周未服用二甲双胍且至少2周未服用任何其他口服降糖药的T2DM患者(WHO 1999)。

[0337] • 筛查时糖化血红蛋白HbA1c：7.0%≤HbA1c≤10.0%。

[0338] • 筛查时年龄为18-65岁

[0339] • BMI≥20kg/m^2且≤40kg/m^2

[0340] IIa期研究的主要排除标准：

[0341] • 1型糖尿病

[0342] • 空腹C肽<0.81ng/mL

[0343] • 实验室检查指标符合以下标准之一：丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平≥2.5 x ULN，和/或天冬氨酸氨基转移酶(AST)≥2.5x ULN，空腹甘油三酯>5.6mmol/L；通过CKD-EPI(EPI-(Scr))方程计算的肾小球滤过率(eGFR)<45mL/min/1.73m^2，

[0344] • 已知易感家族(一级亲属)或个人有2型多发性内分泌肿瘤或甲状腺髓样癌病史

[0345] • 不受控制的高血压

[0346] • 已知有胰腺炎、胰腺癌或血清淀粉酶>1.2x ULN病史，或筛查时有患胰腺炎的高危因素

[0347] • 未能控制的甲状腺功能不全的患者

[0348] • 疑似活动性感染

[0349] • 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎抗体(HCV-Ab)、免疫缺陷病毒抗体(HIV-Ab)或梅毒螺旋体抗体(TPAb)阳性

[0350] • 在随机分组前3个月内接受了GLP-1受体激动剂或DPP-4抑制剂或胰岛素治疗

[0351] • 对任何蛋白质药物的CTCAE 3-4级过敏史。

[0352] • 筛查前3个月内献血或失血超过450mL

[0353] • 任何明显的内分泌、免疫、凝血、泌尿生殖道异常或血液疾病

[0354] • 有临床意义的胃排空异常(如胃出口梗阻)、严重的慢性胃肠道疾病(如6个月内的活动性溃疡)、长期使用直接影响胃肠动力的药物或接受过胃肠道手术

[0355] • 研究者或主治医师认为可能不适合参与研究的任何其它情况。

[0356] 受试者以4:1的比例随机接受YN-011或安慰剂。YN-011的给药剂量为1、2和3mg，给药方案是单次给药，然后休息两周，然后每周给药1次，连续4次。4mg组的受试者具有相同的给药方案，只是给药前1周给予一次1mg的初始剂量。所有受试者总共接受了5次随机给药。

[0357] 主要终点是YN-011在T2DM受试者中的安全性和耐受性，次要终点包括每周空腹血糖相对于基线的变化、HbA1c相对于基线的第4周和第7周的变化、糖基化白蛋白相对于基线的第4周和第7周的变化，糖耐量变化及通过口服葡萄糖耐量试验评估胰腺β细胞功能的变化。收集所有受试者血样进行药物代谢动力学试验。

安全性评估包括不良反应事件、实验室测试、生命体征、12导联心电图、体检和抗药物抗体(ADA)评估。

[0358] 5.2 YN-011单次或多次的代谢动力学

[0359] 在1.0mg-4.0mg的剂量范围内，YN-011呈现递增的趋势。单次给药后，YN-011的半衰期(T1/2)约为207小时(8.6天)，中位Tmax为60-84小时(图4)。YN-011在随机分组后第一次给药，2周后，每周给药一次。在连续第四次给药后，YN-011的血浆浓度维持在稳定状态(图4)。本申请的融合蛋白经过氨基酸替换后，较SUPA-1的半衰期明显延长，另外与已经上市的度拉鲁肽和索玛鲁肽的消除半衰期分别为4.7-5.5天[22]和5.7-6.7天[24]相比，YN-011的半衰期也明显较度拉鲁肽和索玛鲁肽延长。

[0360] 5.3 YN-011对2型糖尿病的治疗效果

[0361] YN-011以1mg、2mg、3mg和4mg的正式给药剂量水平皮下给药(给药方案设计见图5)。

[0362] 共有40名受试者接受了至少一剂YN-011或安慰剂，并被纳入安全性分析。他们的 平均年龄为51.7±10.32岁，平均BMI为25.80±2.875kg/m2，平均体重为71.91±12.360kg，40％为女性。40名受试者中，38名(95％)并发疾病，其中32名(80％)超声证实为脂肪肝，25名(62.5％)高脂血症，19名(47.5％)高血压，10名(22.5％)动脉粥样硬化和10名(22.5％)有肺部肿物。在整个试验过程中，40名受试者均未联合其它药物治疗，基本情况如下表(表6)。

[0363] 表6.T2DM受试者的基本特征

	1 mg n = 8	2 mg n = 8	3 mg n = 8	4 mg n = 8	安慰剂 n = 8
超重 N (%)	2 (25%)	7 (87.5%)	6 (75%)	4 (50%)	4 (50%)
肥胖 N (%)	0 (0%)	1 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12.5%)
超声检查存在脂肪肝，N (%)	4 (50.0%)	6 (75.0%)	6 (75.0)	8 (100%)	8 (100%)
AST/ALT/总胆红素 > ULN 基线 N (%)	1 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12.5%)
血脂异常 N (%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	7 (87.5%)	5 (62.5%)	5 (62.5%)
高血压 N (%)	2 (25.0%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	5 (62.5%)	4 (50.0%)
动脉粥样硬化 N (%)	0 (0%)	3 (37.5%)	4 (50.0%)	2 (25.0%)	0 (0%)
肺部肿物 N (%)	2 (25.0%)	3 (37.5%)	1 (12.5%)	3 (37.5%)	0 (0%)

[0364] YN-011不同剂量对空腹血糖的影响如图6所示。与安慰剂相比，3mg或4mg的YN-011多次皮下给药导致空腹血糖持久的、具有显著临床意义和统计学的显著改善。

[0365] YN-011不同剂量对HbA1c的影响如图7所示。与安慰剂相比，YN-011不同剂量1mg、3mg或4mg的多次皮下给药持久改善HbA1c水平，具有显著的临床意义和统计学差异。且未发现有明显的副作用或安全性风险。

[0366] 实施例6：YN-011对肥胖症的预防和治疗作用

[0367] 6.1 YN-011在高脂饮食诱导的肥胖小鼠中的作用

[0368] 在高脂肪饮食(HFD)诱导的肥胖小鼠中评估YN-011多次给药对葡萄糖耐量、胰岛素敏感性、代谢和体重减轻的影响。5月龄的雄性C57BL/6小鼠(可从商业化途径购买，例如上海斯莱克实验动物有限责任公司，常规饲养条件)持续6个月给予HFD(60％总卡路里来自脂肪，20％来自碳水化合物)，建立肥胖模型小鼠(饮食诱导的肥胖，简称DIO)。然后将DIO小鼠(体重>50g)分为2组(每组5只动物)，实验组每周两次(BIW)注射0.3mg/kg的YN-011，对照组注射磷酸盐缓冲溶液(PBS)，治疗持续4周。

[0369] 实验结果显示，持续4周每周注射两次YN-011对DIO小鼠具有显著的体重减轻效果。与PBS对照组相比，在YN-011处理的小鼠中发现内脏脂肪，尤其是附睾脂肪含量显著减少。YN-011对其他与体重相关的组织重量没有影响，包括棕色脂肪组织(BAT)、白色脂肪组织(WAT，腹股沟)、胰腺或小腿肌肉。

[0370] 与PBS对照组相比，持续4周BIW注射YN-011显著降低异位脂质积累和肝脏甘油三酯，以及血清ALT(YN-011vs.Ctrl＝34.2±7.7vs.153.4±18.7，P<0.01)和AST水平(YN-011vs.Ctrl＝72.20±19.29VS.145.6±16.8，P<0.05)。在BIW治疗4周后，YN-011还显著改善了血脂谱，总胆固醇(TC)降低30％(P<0.001)，甘油三酯(TG)降低68％(P<0.001)，游离脂肪酸(NEFA)降低57％(P<0.001)。

[0371] 与对照组相比，YN-011多次给药的DIO小鼠显示食物消耗显著减少。YN-011治疗组代谢速率(VO2和VCO2)和能量消耗(EE)呈增加趋势，但无统计学意义。当通过体重标准化时，YN-011处理的小鼠在夜晚的VO2、VCO2和EE显著增加。YN-011对BAT和附睾WAT中UcP1表达无影响，但显著上调腹股沟WAT中Ucp1表达，说明YN-011不增强BAT产热，但促进腹股沟白色脂肪组织褐变。因此，YN-011处理的DIO小鼠在室温下表现出更高的核心体温，并且在暴露于寒冷环境时保持更高的直肠温度，表明与对照组相比产热更活跃。这些结果表明，YN-011通过产生更多卡路里来增强肥胖小鼠暴露于寒冷环境的适应能力。

[0372] 通过葡萄糖波动、经腹腔注射葡萄糖耐量检测和胰岛素耐量实验，YN-011在治疗4周后显著降低DIO小鼠的血糖(P<0.01)并改善胰岛素敏感性(P<0.01)。

[0373] 总之，YN-011治疗有效地降低了肥胖小鼠的体重，并改善了肥胖相关的代谢紊乱，包括高血糖症、高脂血症和肝脂肪变性。YN-011对代谢的有益作用与抑制食物消耗和WAT褐变和重塑有关。

[0374] 6.2 YN-011对肥胖恒河猴的治疗作用

[0375] 肥胖恒河猴来源于四川普莱美生物科技集团有限公司。本次实验选用初发病1年内未接受过药物治疗，处于IGT/IFG、高血糖阶段的15只雄性肥胖恒河猴，年龄8-21岁(相当于人的30-60岁)，体重9.25-15.70kg，FPG在5.50-8.58mmol/L之间，HbA1c在4.5-5.0％之间；肝、肾功能正常。根据FPG分层随机分组。入选动物均在给药前进行IVGTT试验检测血糖、胰岛素。设安慰剂(Placebo)

组，YN-011 50μg/kg和YN-011 25μg/kg组，每组5例，皮下注射(SC)给药，1次/周，连续4周，即在第0天(D0)、第7天(D7)、第14天(D14)、第21天(D21)皮下给药。

[0376] YN-011对肥胖恒河猴体重(BW)的影响如表7，图8所示。安慰剂组在整个试验期间，5例动物体重未见显著改变，证明该模型较为稳定。YN-011 25μg/kg组与基线值比，每周1次给药频率(4次)，D7-D28天体重持续降低(2.60%-6.71%,P<0.05或P<0.01)，D28天降低6.17%；与安慰剂组比，BW在D14和D21天显著降低(P<0.05)。YN-011 50μg/kg组与基线值比，每周1次给药频率(4次)，D7-D28天体重持续降低(4.06%-7.32%,P<0.05)，D28显著降低7.32%(P<0.05)；与安慰剂组比，BW在D7-D28天显著或极显著降低(P<0.05或P<0.01)。

[0377] 表7.YN-011反复皮下注射给药对肥胖恒河猴BW的影响

组别及时间点	BW（kg）						
	D1 SC1 基线值[a]	D7 SC2	D14 SC3	D21 SC4	D28	D35	D42
安慰剂组 N = 5	10.75 ± 1.08	10.66 ± 1.10	10.64 ± 1.11	10.64 ± 1.12	10.47 ± 1.13	10.52 ± 1.11	10.44 ± 1.05
YN-011 25 μg/kg 组 N = 5	12.72 ± 1.82	12.39 ± 1.76#	12.16 ± 1.61##	12.06 ± 1.59##	11.84 ± 1.46##	12.05 ± 1.56##	12.03 ± 1.51#
YN-011 50 μg/kg 组 N = 5	10.29 ± 1.01	9.85 ± 0.80#	9.64 ± 0.77#	9.63 ± 0.69#	9.52 ± 0.76#	9.79 ± 0.83#	9.81 ± 0.91#

注：“a”给药前2天检测；#与基线比P<0.05，##与基线比P<0.01。SC，皮下注射给药。

[0378] 实施例7：YN-011在恒河猴非酒精性脂肪肝(NASH)模型中的预防和治疗效果

[0379] 7.1实验方法

[0380] 7.1.1 GE超声引导下肝脏活检

[0381] 动物数量：15只

[0382] 标本采集量：≤2针，每针标本长度≤1.5cm，每次采集的标本长度合计≤3cm

[0383] 取出的约2cm组织立即放入4%多聚甲醛缓冲液常温固定24h以上，经修正，脱水，包埋，切片后进行HE染色和Masson染色。

[0384] 仪器设备：超声采用GE Vivid S5超声仪，切片采用LEICA RM2135切片机，阅片采用OLYMPUS BX43显微镜，显微照相采用OLYMPUS DP22-CU相机。

[0385] 组织切片进行H&E和Masson染色，病理切片由病理专家根据美国肝脏病学会AASLD，美国胃肠病学院ACG和美国胃肠病学会AGA共同起草的非酒精性脂肪肝诊疗指南进行评估。诊断标准见表2和表3。

[0386] 7.1.2组织处理、包埋和切片

[0387] 肝脏穿刺标本固定良好后，直接进行脱水、浸蜡、包埋、切片(5μm)。

[0388] 7.1.3 HE染色

[0389] 切片常规脱蜡，分别加入100%无水乙醇Ⅰ、100%无水乙醇Ⅱ和95%、85%、75%的乙醇，各3min，自来水冲洗3min，苏木精染液染色12min，自来水冲洗5min，伊红Y溶液(水溶性)染色3min。用95%乙醇快速脱水，无水乙醇脱水2次，每次2-5min，二甲苯透明2次，每次10min。中性树胶封固，显微镜观察。

[0390] 7.1.4 Masson染色

[0391] 对切片进行常规脱蜡，至水丽春红品红染色液染色5-7min，同时按蒸馏水:弱酸溶液＝2:1比例配置弱酸工作液，用弱酸工作液洗1min。磷钼酸溶洽洗1～2min后直接放入苯胺蓝染色液中染色1～2min，用配制好的弱酸工作液洗1min。用95%乙醇快速脱水，无水乙醇脱水2次，每次2-5min，二甲苯透明2次，每次10min。中性树胶封固，显微镜观察。

[0392] 7.1.5组织病理学检查

[0393] 切片显微镜(带数码成相系统)观察、病理诊断及拍照,分析。根据病理组织学诊断结果，按照评分标准对HE和Masson结果进行非酒精性脂肪性肝病NAFLD活动评分NAS(表8)和肝纤维化分期(表9)。

[0394] 表8.NAS评分标准

特征 \ 得分	0	1	2	3
脂肪变性	< 5%	5%~33%	34%~66%	> 66%
小叶间炎症（200 倍视野）	未见炎症灶	少量到 2 个炎症灶	2-4 个炎症灶	4 个以上炎症灶
气球状变性	未见气球样变性	少量细胞气球样变性	大量细胞气球样变性	/

[0395] 备注：NAS评分＝脂肪变评分+小叶间炎症评分+气球样变性评分

[0396] 表9.肝纤维化分级评分标准

等级	描述
0	未观察到纤维化
1a	3 区轻度窦周纤维化
1b	3 区中度鼻窦纤维化
1c	门静脉周围纤维化
2	窦周和门静脉周围纤维化
3	桥接纤维化
4	肝硬化

[0397] 7.1.6 GE 3.0T MRI定量分析肝脂肪含量

[0398] 本试验使用GE3.0T MRI扫描仪(750W3T MRI,GE Healthcare)进行肝脏扫描。采用IDEAL-IQ序列扫描，IDEAL-IQ技术是基于IDEAL基础上结合快速三维多回波成像的技术，其包含了多回波水脂分离技术、采用区域增长技术、同时还包含了组织脂肪定量分数值与R2*驰豫率的多种成像。通过一次屏气扫描采集6个不同TE时间回波信号，经过计算机重建可获得同、反相位、水相、脂相及脂肪分数图、R2*图6种对比图像。IDEAL-IQ混合型水脂分离算法分两步进行。第一步应用复数域重建法得到水像、脂像与T2*图。第二步生成另外一套估测的水、脂图像。然后将两组图像进行混合算法整合,生成最后的水、脂像。

[0399] 在执行本试验前需要完成Phantom试验:在对Clare P.[11]等使用的体模配制方法经过 部分修改后,共配制了5种已知脂肪含量的标准脂肪溶液,以纯水作为0%。称取60mmol十二烷基硫酸钠溶于1L去离子水中，将十二烷基硫酸钠溶液加

热至50℃，称取40g卡拉胶加入其中，混匀。将3、6、12、24和120ml大豆油(国药集团化学试剂有限公司)分别与117、114、108、96和0ml上述溶液混合，配制成脂肪含量分别为0%、2.5%、5%、10%、20%和100%的溶液，分别装入6个100ml EP管内，用于后续扫描操作。

[0400] 每次扫描前均需进行Phantom验证实验。全例动物执行基线期扫描和给药结束后1次扫描，共2次，在3.0T MRI室，扫描参数见表10。麻醉方法如下：肌肉注射10mg/kg盐酸氯胺酮，麻醉后气管插管，连呼吸麻醉机用异氟烷伴氧吸入维持麻醉。在扫描过程中，由兽医监测心电图、血氧、呼吸频率等，并进行兽医监督，直至动物完全清醒并恢复自主呼吸。

[0401] 表10.肝脏MRI扫描参数

特征	No.	序列名称	所需等级
定位像	1	3-PI Loc SSFSE	NA
水脂分离	2	BH LAVA-Flex	肝脏横截面
脂肪含量	3	BH IDEAL IQ	肝脏横截面

[0402] 图像后处理和分析：恒河猴MRI图像采集保存后使用750W 3T MRI配套分析工作站。肝脏MRI影像选取主要选择肝脏右叶面积暴露最大的层面(1-3层)，避开大血管，胆管和胆囊，避免产生容积效应，进行ROI的选取，每个ROI面积为90-110mm^2。肝内脂肪含量MRI-PDFF%>6%即为中度脂肪肝(与临床标准一致)。

[0403] 7.2实验结果

[0404] YN-011的体内药效研究在NASH恒河猴中进行。评估的临床参数包括通过磁导共振成像质子密度脂肪分数(MRI-PDFF%)评估肝脏脂质含量、NAFLD活动评分(NAS)和通过肝脏组织学、体重和体重指数(BMI)、血脂谱、果糖代谢、其他生化参数和食物消耗评估的肝纤维化阶段。

[0405] 本研究选择的恒河猴为11-23岁，相当于人类30-70岁。所有恒河猴均为雄性，体重13.63-22.85kg，脂质代谢异常2年以上，MRI-PDFF%为7.8%-11.9%，组织学表现NAS≥3，6个月内纤维化评分0-1c。这些动物在临床上符合NASH的定义。

[0406] 将15只恒河猴分成3组，每组5只，并接受0(溶剂对照，安慰剂对照组)，0.050或0.150mg/kg YN-011皮下注射，每周一次(QW)，持续13周。0.150mg/kg YN-011 组给予适应性给药(首剂0.1mg/kg，其余12次给药0.150mg/kg)。

[0407] 在研究期间，所有的恒河猴都接受了指定治疗，并且没有一只恒河猴错过了治疗结束的活检或退出治疗。研究期间，任何治疗组均未发现明显不良反应。

[0408] 如表11所示，与安慰剂对照组相比，每周一次YN-011治疗13周后肝脏脂质含量降低了约40％。

[0409] 为了研究YN-011治疗是否导致肝脏组织学改善，在第一次注射之前和之后的第89天从所有恒河猴采集肝脏活检标本。肝切片用HE和Masson染色进行组织学分析，根据NAFLD活性和NASH进展的标准对脂肪变性、炎症、肝细胞气球样变和纤维化的程度进行评分。肝活检结果显示，经过YN-011治疗的恒河猴，NAS和肝纤维化评分均下降，而NASH没有明显进展(表12)。

[0410] MRI-PDFF检测的肝脂肪在50μg/kg YN-011组中从9.0％±0.9％下降到5.0％±0.2％，在150μg/kg YN-011组中从9.4％±1.5％下降到5.6％±1.5％，给药结束时与基线相比，降低百分比分别为43.8％和39.7％。50μg/kg和150μg/kg YN-011组MRI-PDFF变化无显著差异。

[0411] 组织学分析显示，在50μg/kg YN-011组中，与给药结束时的基线相比，平均NAS从3.6±0.5下降到1.6±0.5(P＝0.003)。在150μg/kg YN-011组中，与给药结束时的基线相比，平均NAS从3.6±0.5下降到1.4±0.5(P<0.001)。在50μg/kg和150μg/kg的YN-011组之间未发现NAS显著性差异。

[0412] 关于代谢测量，包括肝损伤生物标志物、脂质谱和体重，YN-011治疗在50μg/kg和150μg/kg组中均表现出优异的改善。

[0413] 表11.重复SC给药后YN-011对NASH恒河猴肝脏脂肪含量百分比变化的影响

组别	平均 ROI 基线 (%)	给药第 80 天的平均 ROI (%)	变化率 (%)
安慰剂	8.9 ± 1.0	9.0 ± 1.1	1.9 ± 7.9
YN-011 (0.05 mg/kg)	9.0 ± 0.9	5.0 ± 0.2**	-43.8 ± 7.4##
YN-011 (0.15 mg/kg)	9.4 ± 1.5	5.6 ± 1.5**	-39.7 ± 14.2##

注：ROI：感兴趣区域；**与基线相比，P<0.01；##与安慰剂组相比，P<0.01；变化率＝(当前值-基线值)/基线值×100%。

[0414] 表12.NASH恒河猴中YN-011重复SC给药后对肝脏NAS和纤维化评分的影响

组别	动物编号	基线					注射后第 89 天				
		脂肪变性	炎症	气球状变性	NAS 评分	纤维化评分	脂肪变性	炎症	气球状变性	NAS 评分	纤维化评分
YN-011 150 μg/kg 组 (n = 5)	4801	2	1	0	3	0~1a	0	1	0	1	0~1a
	1261	3	1	0	4	1b	0	1	0	1	0~1a
	4283	2	1	0	3	1a	1	0	0	1	1a
	4985	2	1	1	4	1a	1	1	0	2	1a
	2065	2	1	1	4	1b	1	1	0	2	1b
	Mean ± SD	/	/	/	3.6 ± 0.5	/	/	/	/	1.4 ± 0.5**	/
YN-011 50 μg/kg 组 (n = 5)	4821	1	1	1	3	1a	0	1	1	2	1a
	5091	1	1	1	3	1a	0	1	0	1	0~1a
	1545	1	2	1	4	1c	0	1	1	2	0~1a
	1919	2	2	0	4	0-1a	1	1	0	2	0~1a
	157	1	3	0	4	1c	0	1	0	1	1a
	Mean ± SD	/	/	/	3.6 ± 0.5	/	/	/	/	1.6 ± 0.5	/

安慰剂组（n = 5）	1477	1	2	0	4	1a	2	1	0	4	1a
	1493	1	2	0	3	1a	1	2	0	3	1c
	4779	3	1	0	3	1a	3	1	0	3	1a
	2043	1	2	0	3	1b	1	2	0	3	1c
	3581	2	1	0	3	1c	2	1	0	3	1c
	Mean ± SD	/	/	/	3.2 ± 0.4	/	/	/	/	3.2 ± 0.4	/

[0415] 此外，与基线相比，YN-011治疗组(第7天-第84天)中恒河猴的体重和BMI显著下降。YN-011治疗还在治疗期间的各个测量时间点显著降低了血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)、总胆固醇和(TC)和总甘油三酯(TG)，0.15mg/kg YN-011显示出更一致的降脂效果。与基线值相比，YN-011治疗组的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)水平呈下降趋势。血清脂质谱的这些变化归因于YN-011治疗动物的食物消耗减少。在研究过程中，所有组的血浆FPG水平在正常范围内波动，在YN-011和安慰剂给药后未检测到明显的组间差异。血浆FRA是一种经过验证的生物标志物，可反映过去2-3周的平均血糖控制水平，显示YN-011组在第一次注射后1周有降低趋势，150μg/kg YN-011治疗12周后显著降低4.3%。这些结果表明YN-011在患有NASH的恒河猴中具有血糖控制功效。在YN-011处理的动物中存在食物消耗的剂量依赖性减少，是YN-011的正常药理作用。总之，这些数据表明多次皮下注射YN-011为NASH恒河猴提供了相当大的治疗益处。

[0416] 实施例8：神经退行性疾病体外实验

[0417] 8.1 TNF-α浓度依赖性降低神经元细胞SH-SY5Y的活力

[0418] 使用0.25%胰酶将神经元细胞SH-SY5Y消化，制备单细胞悬液。在96孔板中接种该单细胞悬液，细胞密度为100μl的每孔中含10000个细胞。将培养板放入培养箱中预培养过夜(37℃，5%CO_2)，使细胞贴壁。更换分别含10%FBS和5%FBS的培养液，使用20、40、60、80、100ng/ml TNF-α刺激细胞48小时，每个药物处理做6个复孔。药物处理48小时后，每孔各加入10μl CCK-8溶液，在加完试剂后轻轻晃动培养板以混匀，另外注意，加样的过程中尽量不要产生气泡。将

培养板放入培养箱中孵育1-4小时。用酶标仪测定450nm处的吸光值(OD)，并采用如下公式进行细胞活力计算：

[0419] 细胞活力(%)＝[$A_{(加药)}$-$A_{(空白)}$]/[$A_{(未加药)}$-$A_{(空白)}$]×100

[0420] $A_{(加药)}$：具有细胞、CCK-8溶液和药物溶液的孔的OD值

[0421] $A_{(未加药)}$：具有细胞、CCK-8溶液而没有药物溶液的孔的OD值

[0422] $A_{(空白)}$：没有细胞的孔的OD值

[0423] 实验结果显示(如图9所示)，神经元SH-SY5Y细胞活力随着TNF-α浓度的升高而显著下降。

[0424] 8.2 YN-011和γ-氨基丁酸(GABA)抑制TNF-α降低SH-SY5Y细胞活力的作用

[0425] 实验步骤请参考第8.1部分，但本实验的药物处理步骤与第8.1部分不同。即本实验的药物处理步骤为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入10、100或500nM YN-011，或同时分别加入1、10或100μM GABA处理细胞48小时，每个药物处理做6个复孔。

[0426] 实验结果显示(如图10所示)，SH-SY5Y细胞活力在60ng/ml的TNF-α存在下显著下降，而使用10、100和500nM YN-011处理后，或使用100μM GABA处理后，细胞活力显著增强。

[0427] 8.3联合使用YN-011和GABA显著增加SH-SY5Y的细胞活力

[0428] 实验步骤请参考第8.1部分，但本实验的药物处理步骤与第8.1部分不同。即本实验的药物处理步骤为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时加入100nM YN-011和/或100μM GABA处理细胞48小时，每个药物处理做6个复孔。

[0429] 实验结果显示(如图11所示)，神经元SH-SY5Y细胞活力在60ng/ml TNF-α存在下显著下降，而100nM YN-011和100μM GABA显著增强了细胞活力。YN-011和GABA联合使用与单独使用相比，在增强细胞活力方面显示出更强的效力。

[0430] 8.4 YN-011减少TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡

[0431] 本实验步骤如下：

[0432] 1)将10cm培养皿中的神经元细胞SH-SY5Y用0.25%胰酶进行消化，接种于12孔板中。

[0433] 2)将培养板放入培养箱中预培养过夜(37℃，5%CO_2)，使细胞贴壁。

[0434] 3)使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入10、 100或500nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0435] 4)48小时后，弃掉上清液，加入PBS轻轻洗一遍，将细胞培养板放置于冰上，每孔加入120ul RIPA细胞裂解液(碧云天P0013B)，裂解液中加入蛋白酶抑制剂和磷酸化蛋白酶抑制剂，裂解15分钟。

[0436] 5)将细胞裂解液置于1.5ml EP管中，14000rpm离心30分钟。

[0437] 6)可以看到有细胞沉淀于EP管底部，将上清液轻轻吸入到新的EP管中，加入含β-巯基乙醇的5 x loading buffer，于100℃煮10分钟，使蛋白变性。

[0438] 7)使用SDS-PAGE凝胶电泳，每孔蛋白上样量10μg。将凝胶板垂直靠在电泳槽里的电源架上，使凝胶板的凹沿面靠向电源架。两块凝胶板共用一个电源架。将凝胶板与电源架按要求固定于电源槽内。按要求加入电泳缓冲液，使分别加入在两块凝胶板中间电源架内的电泳缓冲液与加入在电泳槽中的电泳缓冲液互不相通。轻轻地拔去凝胶板内的梳子。

[0439] 8)电泳：用二根导线连接电泳槽与电泳仪，注意红色与黑色电极的插头和插口相配。电泳时上层胶使用低电压恒压电泳，打开电源将电压调到80V(一般15分钟左右)，在溴酚蓝进入下层胶时使用高压恒压电泳，将电压调到120V至溴酚蓝到达胶的底端处附近即可停止电泳。

[0440] 9)采用湿转进行转膜，湿式转膜三明治排列为：海绵/滤纸/胶/膜/滤纸/海绵，紧密排列，胶/膜之间不能留有气泡，三明治安放的方向确认正确，负极方为带负电的胶里的蛋白，向正极方(膜)电迁移。SDS-PAGE电泳完毕，用薄板将凝胶板的两块玻璃轻轻撬开，使凝胶倾伏在其中一块玻璃板上。用刀片在凝胶上沿分离胶与浓缩胶的交界处，将分离胶切下，并在分离胶的左上角切掉一小角，以标记样品顺序。然后将胶小心移入转膜缓冲液中。剪下与分离胶同样大小的0.22μm的PVDF膜，以甲醇浸泡5秒钟。剪下6张同样大小的滤纸，与PVDF膜、胶同时以转移缓冲液平衡15分钟。在转膜装置上从负极(黑底)到正极放置海绵垫片、滤纸、胶、膜、滤纸、海绵垫片(由下而上)，放置时一定要排除气

泡，特别是膜与滤纸、胶与膜、滤纸与胶之间。设置转膜电流为恒流，200mA，时间约需90分钟。

[0441] 10)将转膜完成的PVDF膜取出，放入TBST中稍微洗一下，倒去TBST，加入5%牛奶封闭液，覆盖PVDF膜，室温摇床上缓慢封闭1小时(转速30rpm)。

[0442] 11)一抗孵育，去除封闭液，用TBST将膜洗3次，每次5分钟后，按照分子量大小 裁膜，加入相应稀释倍数的一抗(Bcl-2，CST#3498S，1:1000；Cleaved-caspase3，CST#9661S，1:1000；Caspase3，CST#9662S，1:1000；HSP90，Proteintech#13171-1-AP，1:10000)，放于4℃摇床孵育过夜。

[0443] 12)洗膜，将孵育过夜的PVDF膜取出，抗体回收至-20℃冰箱。取出的PVDF膜置于TBST溶液中，快速漂洗3遍，每次15分钟。

[0444] 13)二抗孵育加入封闭液按比例配制的相应种属的二抗(Jackson Lab，1:10000)，室温下缓慢封闭1小时。

[0445] 14)洗膜，去除二抗，将PVDF膜置于TBST溶液中，快速漂洗3遍，每次15分钟。

[0446] 15)ECL化学发光，在避光条件下，按照ECL发光试剂盒(Millipore#WBKLS0500)中说明书配制新鲜显影工作液(A液：B液＝1：1)，均匀滴加在膜上，置于成像仪中显影采集图像。

[0447] 16)蛋白表达量分析，利用Image J软件统计分析western blot条带灰度值，以内参蛋白HSP90的灰度值校正，计算目的蛋白相对表达量。

[0448] 实验结果显示(如图12所示)，YN-011显著减少了TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡。

[0449] 8.5 GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡

[0450] 实验步骤请参考第8.4部分，但本实验的药物处理步骤3)与第8.4部分不同。即本实验的药物处理步骤3)为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入1、10、100μM的GABA在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0451] 实验结果显示(如图13所示)，GABA减少了TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡。

[0452] 8.6联合使用YN-011和GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡

[0453] 实验步骤请参考第8.4部分，但本实验的药物处理步骤3)与第8.4部分不同。即本实验的药物处理步骤3)为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入100μM GABA和/或100nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0454] 实验结果显示(如图14所示)，联合使用YN-011和GABA显著减少了TNF-α诱导的神经元细胞SH-SY5Y的凋亡。

[0455] 8.7 TNF-α促进神经元细胞SH-SY5Y的损伤

[0456] 将10cm培养皿中的神经元细胞SH-SY5Y用0.25%胰酶进行消化，制备单细胞悬液。将该单细胞悬液接种于24孔板中。将培养板放入培养箱中预培养过夜(37℃,5%CO_2)，使细胞贴壁。使用含5%FBS的培养液，每孔用20、40、60或80ng/ml TNF-α在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。将荧光染料Hoechst 33342(碧云天)，按1:1000的稀释浓度加入到孔板中，37℃培养箱孵育10分钟后将细胞培养板取出。洗掉培养液，PBS轻轻洗2遍，立刻拿到荧光显微镜下拍照(20倍)。每个细胞孔拍10个视野，统计每个视野下的蓝色阳性细胞的数目。

[0457] 实验结果显示(如图15所示)，TNF-α促进了神经元细胞SH-SY5Y的损伤。

[0458] 8.8 YN-011对TNF-α损伤的神经元细胞的保护作用

[0459] 实验步骤请参考第8.7部分，但本实验的药物处理步骤与第8.7部分不同。即本实验的药物处理步骤为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入10、100或500nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0460] 实验结果显示(如图16所示)，YN-011对TNF-α损伤的神经元细胞具有保护作用。

[0461] 8.9 GABA对TNF-α损伤的神经元细胞的保护作用

[0462] 实验步骤请参考第8.7部分，但本实验的药物处理步骤与第8.7部分不同。即本实验的药物处理步骤为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入1、10或100μM GABA在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0463] 实验结果显示(如图17所示)，GABA对TNF-α损伤的神经元细胞具有保护作用。

[0464] 8.10联合使用YN-011和GABA对TNF-α损伤的神经元细胞的保护作用

[0465] 实验步骤请参考第8.7部分，但本实验的药物处理步骤与第8.7部分不同。即本实验的药物处理步骤为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入100μM GABA和/或100nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0466] 实验结果显示(如图18所示)，联合使用YN-011和GABA对TNF-α损伤的神经元细胞具有保护作用。

[0467] 8.11 YN-011减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡

[0468] 本实验步骤如下：

[0469] 1)使用0.25%胰酶将10cm培养皿中的神经元细胞SH-SY5Y进行消化，制备单细胞悬液。将该单细胞悬液接种于24孔板中，24孔板中放入无菌爬片。

[0470] 2)将培养板放入培养箱中预培养过夜(37℃，5%CO_2)，使细胞贴壁。

[0471] 3)使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入10、100或500nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0472] 4)48小时后，吸掉培养液，每孔加入400μl的4%多聚甲醛(PFA)室温固定15分钟。

[0473] 5)PBS洗2次，每次5分钟。

[0474] 6)加入0.1%Triton X-100，破膜，室温10分钟。

[0475] 7)PBS洗2次，每次5分钟。

[0476] 8)加入10%山羊血清(Goat serum，GS)，室温封闭30分钟。

[0477] 9)吸掉10%GS，加入一抗Cleaved-caspase3(CST 9661S)，使用1%GS的抗体稀释液，抗体稀释比1:400，每张爬片30μl。

[0478] 10)放置于4℃冰箱中过夜。

[0479] 11)次日，吸掉一抗，加入PBS洗3次，每次5分钟。

[0480] 12)加入荧光二抗(AlexaFluor®488Conjugate)，室温避光孵育1小时。

[0481] 13)PBS洗3次，每次5分钟。

[0482] 14)DAPI染色5分钟，然后PBS洗3次，每次5分钟。

[0483] 15)将封片剂滴在干净的载玻片上，将细胞爬片沥干倒扣在封片剂上，阴凉通风处室温过夜。

[0484] 16)荧光显微镜下拍照(40倍)。

[0485] 17)每个处理组拍摄10个视野，统计每个视野下的绿色阳性细胞的数目。

[0486] 实验结果显示(如图19所示)，YN-011显著减少了TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡。

[0487] 8.12 GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡

[0488] 实验步骤请参考第8.11部分，但本实验的药物处理步骤3)与第8.11部分不同。即本实验的药物处理步骤3)为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入1、10或100μM GABA在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0489] 实验结果显示(如图20所示)，GABA减少了TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡。

[0490] 8.13联合使用YN-011和GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡

[0491] 实验步骤请参考第8.11部分，但本实验的药物处理步骤3)与第8.11部分不同。即本实验的药物处理步骤3)为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入100μM GABA和/或100nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0492] 实验结果显示(如图21所示)，联合使用YN-011和GABA显著减少了TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡。

[0493] 8.14 YN-011减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡

[0494] 使用0.25%胰酶将10cm培养皿中的神经元细胞SH-SY5Y进行消化，制备单细胞悬液。将该单细胞悬液接种于12孔板中。将培养板放入培养箱中预培养过夜(37℃,5%CO_2)，使细胞贴壁。使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入10、100或500nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。收集细胞，使用0.25%不含EDTA的胰酶消化细胞1分钟。将细胞悬液吸入1.5ml EP管中，1000rpm离心5分钟，细胞沉淀于管底。将10^5个细胞重悬于100μl Binding Buffer中，加入5μl PI和5μl Annexin V-

FITC溶液，室温避光孵育15分钟。每管加入400μl Binding Buffer，用流式细胞仪进行检测(Annexin V-FITC激发波长为488nm，发射波长为520nm；PI激发波长为535nm，发射波长为617nm)。统计每个样品中Annexin V-FICT阳性细胞和PI阴性细胞的数目。

[0495] 实验结果显示(如图22所示)，YN-011显著减少了TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡。

[0496] 8.15 GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡

[0497] 实验步骤请参考第8.14部分，但本实验的药物处理步骤与第8.14部分不同。即本实 验的药物处理步骤为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入1、10或100μM GABA在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0498] 实验结果显示(如图23所示)，GABA减少了TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡。

[0499] 8.16联合使用YN-011和GABA减少TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡

[0500] 实验步骤请参考第8.14部分，但本实验的药物处理步骤与第8.14部分不同。即本实验的药物处理步骤为：使用含5%FBS的培养液，每孔用60ng/ml TNF-α单独，或同时分别加入100μM GABA和/或100nM YN-011在37℃培养箱中处理细胞48小时，每个药物处理做3个复孔。

[0501] 实验结果显示(如图24所示)，联合使用YN-011和GABA显著减少了TNF-α诱导的神经元细胞的凋亡。

[0502] 8.17 GABA降低HMC3小胶质细胞中Aβ1-42寡聚体诱导的炎症因子mRNA表达。

[0503] 在无菌条件下，将合成的$A\beta_{1-42}$肽(AnaSpec#AS-20276)溶解在六氟异丙醇(Mecklin#H811026)中以获得1mM溶液。将溶液等分到1.5ml无菌离心管中，然后在真空干燥器中蒸发六氟异丙醇。干燥后的多肽在管中成膜，-20℃保存备用。如下所示，从干燥的肽膜中新鲜制备$A\beta_{1-42}$寡聚物。将干燥的肽膜先溶解在无水DMSO中，得到5mM溶液，然后用冷细胞培养基础培养基稀释，得到100μM储备液。4℃孵育24小时后，将储备液用于细胞培养。

[0504] 将人小胶质细胞HMC3细胞接种到24孔板中。在37℃和5%CO_2的培养箱中孵育过夜后，用10μM $A\beta_{1-42}$寡聚体单独，或同时分别加入1、10或100μM GABA处理细

胞48小时。每个药物处理做3个复孔。处理48小时后，按照制造商的说明书，每孔使用1ml Trizol(Invitrogen#15596026)从细胞中分离总RNA。将RNA沉淀溶解在20μl DEPC处理的水中。通过NanoDrop 2000测量RNA浓度和纯度。使用逆转录试剂盒(Yeasen#11141ES60)将RNA转化为cDNA。PCR反应准备如下：5μl PCR混合物(Yeasen#10108ES03)、0.2μl正向引物、0.2μl反向引物、1μl cDNA和3.6μl水。使用以下热程序在Applied Biosystems 7500实时PCR系统上进行qPCR：95℃预变性3分钟和40个变性循环(95℃、30秒)，60℃退火30秒，并在72℃下延伸1分钟。使用ΔΔCt方法比较处理细胞和未处理细胞之间TNF-α和IL-6的相对mRNA表达，这些mRNA表达用持家基因RPLP0的表达归一化。

[0505] 实验结果显示(如图25所示)，在10μM $A\beta_{1-42}$寡聚体存在下，HMC3细胞中TNF-α和IL-6的mRNA表达显著增加，而100μM GABA显著降低了TNF-α的mRNA表达，10μM和100μM GABA显著降低了IL-6的mRNA表达。

[0506] 8.18 YN-011降低HMC3小胶质细胞中Aβ1-42寡聚体诱导的炎症因子mRNA表达。

[0507] 实验步骤请参考第8.17部分，但本实验的药物处理步骤与第8.17部分不同。即本实验的药物处理步骤为：用10μM $A\beta_{1-42}$寡聚体单独，或同时分别加入10、100或500nM YN-011处理细胞48小时。每个药物处理做3个复孔。

[0508] 实验结果显示(如图26所示)，在10μM $A\beta_{1-42}$寡聚体存在下，HMC3细胞中TNF-α和IL-6的mRNA表达显著增加，而100nM和500nM YN-011显著降低了TNF-α和IL-6的mRNA表达。

[0509] 8.19联合使用YN-011和GABA降低HMC3小胶质细胞中$A\beta_{1-42}$寡聚体诱导的炎症因子mRNA表达。

[0510] 实验步骤请参考第8.17部分，但本实验的药物处理步骤与第8.17部分不同。即本实验的药物处理步骤为：用10μM $A\beta_{1-42}$寡聚体单独，或同时分别加入100μM GABA和/或100nM YN-011处理细胞48小时。每个药物处理做3个复孔。

[0511] 实验结果显示(如图27所示)，相较于GABA或YN-011单独处理，使用100μM GABA和100nM YN-011联合处理对10μM $A\beta_{1-42}$寡聚体诱导的TNF-αmRNA表达具有显著更强的抑制作用。

[0512] 8.20 GABA降低HMC3小胶质细胞中Aβ1-42寡聚体诱导的炎症因子表达。

[0513] 将人小胶质细胞HMC3细胞接种到12孔板中。在37℃和5％CO_2的培养箱中培养过夜后，用10μM Aβ$_{1-42}$寡聚物单独，或分别加入1、10或100μM GABA处理细胞48小时。每个药物处理做3个复孔。处理48小时后，用PBS冲洗细胞，在冰上用补充有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液(Beyotime#P0013B)裂解细胞15分钟。将细胞裂解液以14000rpm离心30分钟。收集上清液，与补充有β-巯基乙醇的5x loading buffer混合，并在100℃下煮沸10分钟。通过SDS-PAGE分离变性的蛋白质。简而言之，将10μg的蛋白质上样到预制的迷你聚丙烯酰胺凝胶(SurePAGE，GenScript#M00657)，在120V电压下运行。此后，在200mA下将凝胶电印到0.22μm的PVDF膜上，持续90 分钟。解开夹层后，在室温下在5％的牛奶溶液中封闭膜1小时，然后在4℃下用一抗稀释液(TNF-α，Proteintech#60291-Ig；IL-6，Proteintech#21865-1-AP；HSP90，Proteintech#13171-1-AP)孵育过夜。洗涤后，用相应的二抗稀释液(Jackson Lab，1:10000)在室温下孵育膜1小时。洗涤后，使用ECL试剂盒(Millipore#WBKLS0500)按照制造商的说明书对膜上的二抗信号进行可视化。使用ImageJ计算相对于内源蛋白HSP90归一化的蛋白量。

[0514] 结果显示(如图28所示)，在10μM Aβ$_{1-42}$寡聚体存在下，HMC3细胞中TNF-α和IL-6的表达显著增加，而100μM GABA显著降低了IL-6的表达，10μM和100μM GABA则显著降低了TNF-α的表达。

[0515] 8.21 YN-011降低HMC3小胶质细胞中Aβ1-42寡聚体诱导的炎症因子表达。

[0516] 实验步骤请参考第8.20部分，但本实验的药物处理步骤与第8.20部分不同。即本实验的药物处理步骤为：用10μM Aβ$_{1-42}$寡聚体单独，或同时分别加入10、100或500nM YN-011处理细胞48小时。每个药物处理做3个复孔。

[0517] 实验结果显示(如图29所示)，在10μM Aβ$_{1-42}$寡聚体存在下，HMC3细胞中TNF-α和IL-6的表达显著增加，而100nM和500nM YN-011显著降低TNF-α和IL-6的表达。

[0518] 8.22联合使用YN-011和GABA降低HMC3小胶质细胞中Aβ1-42寡聚体诱导的炎症因子表达。

[0519] 实验步骤请参考第8.20部分，但本实验的药物处理步骤与第8.20部分不同。即本实验的药物处理步骤为：用10μM Aβ$_{1-42}$寡聚体单独，或同时分别加入100μM GABA和/或100nM YN-011处理细胞48小时。每个药物处理做3个复孔。

[0520] 实验结果显示(如图30所示)，相较于GABA或YN-011单独处理，使用100μM GABA和100nM YN-011联合处理对10μM Aβ$_{1-42}$寡聚体诱导的TNF-α和IL-6表达具有显著更强的抑制作用。

[0521] 实施例9：神经退行性体内疾病

[0522] 神经退行性疾病，如阿尔茨海默病(Alzheimer’s disease，AD)、帕金森病(Parkinson’s disease，PD)、亨廷顿氏舞蹈病(Huntington’s disease，HD)等是中枢神 经元或其髓鞘损伤而逐渐丧失功能的中枢神经系统疾病，以神经元细胞结构和功能的逐渐丧失为特征，表现为痴呆、运动等障碍。

[0523] 其中，阿尔茨海默病(AD)也被称为老年痴呆症，表现为进行性认知功能障碍和记忆损害，目前没有有效的治疗方法。研究表明，AD患者的大脑中积累具有神经毒性的斑块(plaques)，这些斑块是由β-淀粉样蛋白(beta-amyloid，Aβ)异常聚集而形成。Aβ可以导致脑内老年斑的形成和神经细胞的凋亡，是导致AD的重要因素。Aβ是含有39～43个氨基酸的多肽，人体内Aβ最常见的亚型是Aβ40和Aβ42，容易聚集，从而形成Aβ沉淀的核心，引发神经毒性作用。

[0524] 研究表明，GLP-1具有神经保护的生物学作用，可改善AD症状[10,25,26]。动物模型中，GLP-1改善AD模型小鼠认知功能的同时，伴随Aβ沉积减少，缓解Aβ诱导的胶质细胞过度激活，减轻大脑中氧化应激和炎症，显示GLP-1在AD中起到了中枢神经的保护作用。本发明披露了一种长效的GLP-1受体激动剂(GLP-1RA)，发挥GLP-1保护神经元的生物学作用并可改善中枢神经功能，有助于改善AD病状。

[0525] 实验采用患阿尔茨海默症的模型小鼠与同遗传背景的野生型对照成年小鼠。动物被单独饲养在笼子里，保持12/12小时明暗循环(08:00开灯，20:00关灯)，温度控制在21.5摄氏度。食物和水可以随意获得。在行为学实验之前，持续16周每周给小鼠腹腔内(ip.)注射YN-011或安慰剂。

[0526] Morris水迷宫设置

[0527] 迷宫由直径为120cm、壁高40cm的白色不透明塑料制成，并在25℃下注满水以避免体温过低。一个小型逃生平台(10×6.5×21.5cm)被放置在一个象限中的固定位置，距周边25cm，并隐藏在水面以下1cm处。房间的墙上有许多固定的视觉提示。

[0528] 空间记忆

[0529] 沿泳池圆周等距分布的四个点(北、南、东、西)作为起始位置，每天在四次实验中随机分配起始位进行训练，训练老鼠找到固定在泳池某位置并半潜入水中的安全平台。训练期结束24小时后，取出泳池中安全平台，从随机起始位开始，记录老鼠游泳路径的长度和时间(每组n＝12)。分别用单和双因素方差分析(One-way ANOVA，Two-way ANOVA)分析已采集数据，用于评估空间记忆为到达安全平台原位置所需的时间和路径长度，空间敏锐度为游泳至安全平台所在的区域停留寻找的时间。

[0530] 检测Aβ40和Aβ42水平

[0531] 使用Aβ检测试剂盒测量Aβ40和Aβ42水平。简而言之，将对照和YN-011处理的AD模型小鼠大脑的半球和对照半球在加入蛋白酶抑制剂(Sigma，250ml/5ml缓冲液)的Tris缓冲盐水(25mM Tris HCl，pH 7.4；150mM NaCl)中匀浆。将脑匀浆在100，000g和4℃下离心1小时。然后将上清液按1:10稀释，然后进行ELISA，ELISA仅测量可溶性β淀粉样蛋白寡聚体水平，但不测量淀粉样蛋白单体。使用Bradford蛋白质测定法对蛋白质进行定量。在归一化至总蛋白水平后确定最终的Aβ值(每组n＝6)。

[0532] 实施例10：YN-011的IIb和III期临床试验(单药治疗)

[0533] 10.1试验设计

[0534] 该IIb和III期临床试验是一项在饮食和运动干预后血糖控制不佳的T2DM患者中进行的多中心、随机、双盲、安慰剂对照的有效性和安全性临床研究。IIb期阶段临床试验为探索剂量效应和安全性评估的临床试验(分为四组：YN-011(1mg)组、YN-011(2mg)组、YN-011(3mg)组和安慰剂对照组)，为III期阶段临床试验获得YN-011的III期临床推荐剂量(Recommended Phase 3Dose,RP3D)，即RP3D低剂量和RP3D高剂量。III期阶段临床试验为疗效确证临床试验。

[0535] IIb和III期研究的主要纳入标准：

[0536] • 筛选时年龄为18-75岁

[0537] • 确诊为2型糖尿病至少8周(WHO 2000)，且筛选前8周内未接受过任何降糖药物治疗。

[0538] • 筛选时糖化血红蛋白HbA1c：7.5%≤HbA1c≤11%。

[0539] • 随机分组前糖化血红蛋白(HbA1c)：7.5%≤HbA1c≤10.5%

[0540] • 筛选时和随机分组前空腹血浆葡萄糖(FPG)：<13.9mmol/L。

[0541] • BMI≥18.5kg/m^2且≤40kg/m^2

[0542] IIb和III期研究的主要排除标准：

[0543] • 1型糖尿病

[0544] • 筛选前3个月内使用过任何DPP-4抑制剂和/或GLP-1类似物

[0545] • 筛选前一年内连续使用胰岛素治疗时间超过14天(妊娠期糖尿病接受胰岛素治疗的时间不在此限定范围内)，

[0546] • 空腹C肽<0.3nmol/mL

[0547] • 筛选前6个月内有糖尿病酮症酸中毒、糖尿病乳酸酸中毒或高渗性非酮症性糖尿病昏迷，

[0548] • 筛选期6个月内有病情不稳定或需要治疗的增殖性视网膜病变或黄斑病变、严重糖尿病神经病变、间歇性跛行或糖尿病足，

[0549] • 筛选前6个月内曾发生过不明诱因的严重低血糖(III级低血糖)事件，或筛选前1个月内发生3次或以上低血糖事件(血糖＜3.9mmol/L)，或反复出现低血糖相关症状，

[0550] • 筛选前1个月内发生过可能影响血糖控制的严重外伤、严重感染或手术，

[0551] • 筛选前3个月内献血或大量失血(>400mL)或接受过输血；

[0552] • 未得到稳定控制的高血压

[0553] • 有急慢性胰腺炎病史、有症状的胆囊病史、胰腺损伤史等可能导致胰腺炎的高风险因素存在的患者，或筛选时血淀粉酶和或血脂肪酶≥1.5倍正常值上限(ULN)的患者；

[0554] • 有甲状腺髓样癌史、多发性内分泌肿瘤(MEN)2A或2B综合征病史，或相关家族史；或其他恶性肿瘤史患者；

[0555] • 有临床显著的胃排空异常，严重慢性胃肠道疾病，长期服用对胃肠蠕动有直接影响的药物，或筛选前6个月内接受过胃肠道手术，经研究者评估不适宜参加本临床研究者；

[0556] • 患有血液系统疾病或任何引起溶血或红细胞不稳定的疾病；

[0557] • 未被控制的甲状腺功能亢进或甲状腺功能减退；

[0558] • 乙肝表面抗原(HBsAg)阳性且乙肝病毒载量(HBV-DNA)高于当地实验室检测下限值、丙肝抗体(HCV-Ab)、免疫缺陷病毒抗体(HIV-Ab)、梅毒螺旋体抗体(TP-Ab)或新型冠状病毒肺炎(COVID-19)核酸检测阳性者；

[0559] • 有急性或慢性肝炎，或实验室检查指标符合以下标准之一：丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平≥2.5 x ULN，和/或天冬氨酸氨基转移酶(AST)≥2.5 x ULN，空腹甘油三酯>5.7mmol/L；通过CKD-EPI(EPI-(Scr))方程计算的肾小球滤过率(eGFR)<60mL/min/1.73m^2，

[0560] • 研究者或主治医师认为可能不适合参与研究的任何其它情况。

[0561] 研究药物治疗方案如下所示：

[0562] IIb期阶段剂量确证阶段入组的受试者：

组别	治疗（腹部皮下注射，1 次/周，连续给药 52 周）		
	双盲治疗期（前 12 周）	双盲治疗期（后 12 周）	开放治疗期（28 周）
	合计 24 周		
剂量组 1	YN-011 1 mg	YN-011 1 mg	RP3D 确定前进入开放治疗期的受试者：YN-011 (1 mg) RP3D 确定后进入开放治疗期的受试者： • IDMC选择的YN-011剂量组（RP3D 低剂量组或高剂量组），维持原剂量治疗 • 其他受试者按 1:1 的比例二次随机，接受YN-011 RP3D低剂量或高剂量治疗
剂量组 2	YN-011 2 mg	YN-011 2 mg	
剂量组 3	YN-011 3 mg	YN-011 3 mg	
对照组	安慰剂	安慰剂	RP3D确定前进入开放治疗期的受试者：YN-011 (1 mg) RP3D确定后进入开放治疗期的受试者：按1:1的比例二次随机，接受YN-011 RP3D低剂量或高剂量治疗

[0563] III期阶段疗效确证阶段入组的受试者：

组别	治疗（腹部皮下注射，1 次/周，连续给药 52 周）	
	双盲治疗期（24 周）	开放治疗期（28 周）
剂量组 1	YN-011 RP3D 低剂量，开放治疗期维持原剂量治疗	
剂量组 2	YN-011 RP3D 高剂量，开放治疗期维持原剂量治疗	
对照组	安慰剂	按 1:1 的比例二次随机，接受YN-011 RP3D 低剂量或高剂量治疗

[0564] 主要有效性终点是在T2DM患者中比较YN-011与安慰剂双盲给药12周后(IIb期)或24周后(III期)HbA1c水平相对基线的变化。次要有效性终点主要包括：FPG、空腹胰岛素、空腹C-肽、空腹胰高血糖素、空腹血脂谱和空腹体重等指标相对基线(针对IIb 期治疗12周和III期治疗24周)、24周(针对III期开放治疗28周)的变化；HbA1c达标率(HbA1c<7.0%和HbA1c<6.5%的受试者比例)；混合餐耐量

试验(MMTT)期间血糖曲线下面积和MMTT期间胰岛素或C-肽曲线下面积等。安全性评估包括不良反应事件、实验室检查、生命体征、12导联心电图评估。

[0565] 10.2 YN-011对2型糖尿病的治疗效果

[0566] 临床试验结果显示，使用1mg YN-011治疗24周后，HbA1c水平降低了1.73%。据报道，司美格鲁肽以1mg剂量治疗30周后，HbA1c水平降低了1.55%(Sorli et al.,Lancet Diabetes Endocrinol 2017; 5:251-60)；度拉鲁肽以1.5mg剂量治疗26周后，HbA1c水平降低了1.46%(Shi et al.,J Diabetes Investig 2020; 11:142-150)。

[0567] 此外，临床试验结果还显示，使用1mg和3mg YN-011治疗24周后，低血糖(<3.9mmol/L)的不良反应发生率分别为0.8%和1.7%。据报道，度拉鲁肽以0.75mg和1.5mg剂量治疗26周后，低血糖的不良反应发生率分别为4.1%和6.3%(Shi et al.,J Diabetes Investig 2020; 11:142-150)。

[0568] 此外，临床试验结果还显示，使用1mg和3mg YN-011治疗24周后，恶心的不良反应发生率分别为3.4%和6.0%。据报道，司美格鲁肽以0.5mg和1mg剂量治疗30周后，恶心的不良反应发生率分别为20%和24%(Sorli et al.,Lancet Diabetes Endocrinol 2017; 5:251-60)；度拉鲁肽以1.5mg剂量治疗26周后，恶心的不良反应发生率为9.5%(Shi et al.,J Diabetes Investig 2020; 11:142-150)；洛塞那肽以1mg和3mg剂量治疗24周后，恶心的不良反应发生率分别为5.6%和10%(Shuai et al.,Diabetes Obes Metab.2021; 23(1):116-124)。

[0569] 实施例11：YN-011与二甲双胍联用的IIb和III期临床试验

[0570] 11.1试验设计

[0571] 该IIb和III期临床试验是一项在二甲双胍治疗后血糖控制不佳的T2DM患者中进行的多中心、随机、双盲、安慰剂对照的有效性和安全性临床研究。IIb期阶段临床试验为探索剂量效应和安全性评估的临床试验(分为三组：1mg YN-011联合二甲双胍组、3mg YN-011联合二甲双胍组和安慰剂联合二甲双胍对照组)，为III期阶段临床试验获得III期临床推荐剂量(Recommended Phase 3 Dose,RP3D)。III期阶段临床试验为疗效确证临床试验。

[0572] YN-011与二甲双胍联用的IIb和III期研究的受试者主要纳入标准除以下一点外均与实施例10中的纳入标准相同：

[0573] • 确诊为2型糖尿病至少8周(WHO 2000)，且满足以下任一情况：

[0574] a)接受二甲双胍单药治疗≥8周且二甲双胍剂量≥1500mg/日或最大耐受剂量(<1500mg/日但≥1000mg/日)者(筛选合格后可直接进入导入期)；

[0575] b)接受二甲双胍单药治疗<8周且二甲双胍剂量≥1500mg/日或最大耐受剂量(<1500mg/日但≥1000mg/日)者(筛选合格后需进入二甲双胍剂量稳定期)；

[0576] c)接受二甲双胍单药治疗剂量<1500mg/日且尚未达到最大耐受剂量者(筛选合格后需进入二甲双胍剂量滴定期和剂量稳定期)。

[0577] YN-011与二甲双胍联用的IIb和III期研究的受试者主要排除标准请参考实施例10中的排除标准部分。

[0578] 研究药物治疗方案如下所示：

[0579] IIb期阶段剂量确证阶段入组的受试者：

组别	治疗（腹部皮下注射，1次/周，连续给药52周）		
	双盲治疗期（前12周）	双盲治疗期（后12周）	开放治疗期（28周）

	合计 24周		
剂量组1	YN-011 1 mg	YN-011 1 mg	期中分析完成前：YN-011 1 mg 期中分析完成后：接受YN-011 RP3D剂量治疗
剂量组2	YN-011 3 mg	YN-011 3 mg	
对照组	安慰剂	安慰剂	

[0580] III期阶段疗效确证阶段入组的受试者：

组别	治疗（腹部皮下注射，1次/周，连续给药52周）	
	双盲治疗期（24周）	开放治疗期（28周）
YN-011 组	YN-011 RP3D 剂量，开放治疗期维持原剂量治疗	
对照组	安慰剂	YN-011 RP3D 剂量治疗

[0581] 主要有效性终点是在二甲双胍治疗后血糖控制不佳的T2DM患者中比较YN-011联合二甲双胍与安慰剂联合二甲双胍双盲给药12周后(IIb期)或24周后(III期)H

bA1c水平相对基线的变化。次要有效性终点与安全性评估请参考实施例10相应部分。

[0582] 11.2 YN-011与二甲双胍联用对2型糖尿病的治疗效果

[0583] 本临床试验结果显示，使用3mg YN-011联合二甲双胍治疗24周后，HbA1c水平降低了1.8%，FPG水平降低了2.42%。据报道，度拉鲁肽以1.5mg联合二甲双胍治疗40周后，HbA1c水平降低了1.42%，FPG水平降低了1.93%(Dungan et al.,Lancet 2014; 384:1349-57)。

[0584] 本临床试验结果还显示，使用3mg YN-011联合二甲双胍治疗24周后，低血糖(<3.9mmol/L)的不良反应发生率为1.8%，与对照组安慰剂联合二甲双胍的低血糖发生率(1.7%)相当。据报道，度拉鲁肽以1.5mg剂量联合二甲双胍治疗40周后，低血糖的不良反应发生率为9%(Dungan et al.,Lancet 2014; 384:1349-57)。

[0585] 此外，本临床试验还结果显示，使用3mg YN-011联合二甲双胍治疗24周后，恶心的不良反应发生率为7.0%。据报道，度拉鲁肽以1.5mg剂量联合二甲双胍治疗40周后，恶心的不良反应发生率为20%(Dungan et al.,Lancet 2014; 384:1349-57)；司美格鲁肽以1mg剂量联合二甲双胍治疗30周后，恶心的不良反应发生率为13.4%(Ji et al.,Diabetes Obes Metab.2021; 23:404-414)。

[0586] 上述例举，罗列了当前被认为呈现了本申请优选示例的内容，但是应当理解，本申请不限于所公开的示例。相反，本申请旨在涵盖包括在所附权利要求的精神和范围内的各种修改和等效示例。

[0587] 所有的出版物、专利和专利申请都以引用的方式整体并入本文。具体地，与本文提供的每个登录号相关的序列，包括例如表中或其它地方提供的登录号和/或生物标志物序列(例如蛋白质和/或多核苷酸)，通过引用整体并入。

[0588] 权利要求的范围不应受优选例和实施例的限制，而应理解为与说明书一致的最宽泛的解释。

[0589] 参考文献

[0590] 1. Leech, C. A., et al., Expression of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors in pancreatic beta-cells. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 278(1): p. 44-7.

[0591] 2. Drucker, D. J., Glucagon-like peptides. Diabetes, 1998. 47(2): p. 159-69.

[0592] 3. Montrose-Rafizadeh, C., et al., Pancreatic glucagon-like peptide-1receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. Endocrinology, 1999. 140(3): p. 1132-40.

[0593] 4. Ahren, B. and O. Schmitz, GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. Horm Metab Res, 2004. 36(11-12): p. 867-76.

[0594] 5. Green, B. D., et al., Structurally modified analogues of glucagon-like peptide-1(GLP-1)and glucose-dependent insulinotropic polypeptide(GIP)as future antidiabetic agents. Curr Pharm Des, 2004. 10(29): p. 3651-62.

[0595] 6. Chang, A. M., et al., The GLP-1 derivative NN2211 restores beta-cell sensitivity to glucose in type 2 diabetic patients after a single dose. Diabetes, 2003. 52(7): p. 1786-91.

[0596] 7. Liu, H. K., et al., N-acetyl-GLP-1:a DPP IV-resistant analogue of glucagon-like peptide-1(GLP-1)with improved effects on pancreatic beta-cell-associated gene expression. Cell Biol Int, 2004. 28(1): p. 69-73.

[0597] 8. Kim, J. G., et al., Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate:the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. Diabetes, 2003. 52(3): p. 751-9.

[0598] 9. Nielsen, R., et al., Effect of liraglutide on myocardial glucose uptake and blood flow in stable chronic heart failure patients:A

double-blind, randomized, placebo-controlled LIVE sub-study. J Nucl Cardiol, 2019. 26(2): p. 585-597.

[0599] 10. Duarte, A. I., et al., Liraglutide Protects Against Brain Amyloid-beta1-42 Accumulation in Female Mice with Early Alzheimer's Disease-Like Pathology by Partially Rescuing Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation. Int J Mol Sci, 2020. 21(5).

[0600] 11. Elbassuoni, E. A. and R. F. Ahmed, Mechanism of the neuroprotective effect of GLP-1 in a rat model of Parkinson's with pre-existing diabetes. Neurochem Int, 2019. 131: p. 104583.

[0601] 12. Muskiet, M. H. A., et al., GLP-1 and the kidney: from physiology to pharmacology and outcomes in diabetes. Nat Rev Nephrol, 2017. 13(10): p. 605-628.

[0602] 13. Hou, Y., et al., Nutrient Optimization Reduces Phosphorylation and Hydroxylation Level on an Fc-Fusion Protein in a CHO Fed-Batch Process. Biotechnol J, 2019. 14(3): p. e1700706.

[0603] 14. Karlin, S. and S. F. Altschul, Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(6): p. 2264-8.

[0604] 15. Karlin, S. and S. F. Altschul, Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(12): p. 5873-7.

[0605] 16. Altschul, S. F., et al., Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 1990. 215(3): p. 403-10.

[0606] 17. Altschul, S. F., et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 1997. 25(17): p. 3389-402.

[0607] 18. Myers, E. W. and W. Miller, Optimal alignments in linear space. Comput Appl Biosci, 1988. 4(1): p. 11-7.

[0608] 19. Bettinger, J. Q., et al., Quantitative Analysis of in Vivo Methionine Oxidation of the Human Proteome. J Proteome Res, 2020. 19(2): p. 624-633.

[0609] 20. Allen, L. V., Jr., Remington: The Science and Practice of Pharmacy: from the past into the future. Int J Pharm Compd, 2012. 16(5): p. 358-62.

[0610] 21. Toft-Nielsen, M. B., S. Madsbad, and J. J. Holst, Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients. Diabetes Care, 1999. 22(7): p. 1137-43.

[0611] 22. Geiser, J. S., et al., Clinical Pharmacokinetics of Dulaglutide in Patients with Type 2 Diabetes: Analyses of Data from Clinical Trials. Clin Pharmacokinet, 2016. 55(5): p. 625-34.

[0612] 23. Bodanszky, M., Principles of peptide synthesis. 2nd rev. ed. Springer laboratory. 1993, Berlin; New York: Springer-Verlag. xii, 329 p.

[0613] 24. Pratley, R. E., et al., Semaglutide versus dulaglutide once weekly in patients with type 2 diabetes (SUSTAIN 7): arandomised, open-label, phase 3b trial. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. 6(4): p. 275-286.

[0614] 25. Zheng, J., et al., GLP-1 improves the supportive ability of astrocytes to neurons by promoting aerobic glycolysis in Alzheimer's disease. Mol Metab, 2021. 47: p. 101180.

[0615] 26. Park, J. S., et al., Blocking microglial activation of reactive astrocytes is neuroprotective in models of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol Commun, 2021. 9(1): p. 78.

权利要求书

[权利要求 1] 一种融合蛋白，其包含GLP-1多肽和免疫球蛋白Fc结构域，其中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域共价连接，其中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且所述GLP-1多肽包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G；所述免疫球蛋白Fc结构域包含或为IgG2-Fc结构域，所述IgG2-Fc结构域包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第34位赖氨酸(K34)上具有一定的羟基化水平。

[权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的融合蛋白，其中，所述羟基化水平在10％和100％之间，例如大于等于10％、或大于等于15％、或大于等于20％、或大于等于26％、或大于等于30％、或大于等于40％、或大于等于50％、或大于等于60％、或大于等于70％、或大于等于80％、或大于等于90％。

[权利要求 4] 根据权利要求1-3中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的第31位色氨酸(W31)上基本上未被氧化。

[权利要求 5] 根据权利要求4所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的W31上的氧化水平低于0.5％或无法检测。

[权利要求 6] 根据权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽与如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列相比具有至少90％的序列同一性，并且包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G。

[权利要求 7] 根据权利要求1-6中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且包含相对于天然人GLP-1的A8G和G22E替换。

[权利要求 8] 根据权利要求7所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且包含相对于天然人GLP-1的A8G、G22E和R36G替换。

[权利要求 9] 根据权利要求8所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽为人GLP-1(7-37)，并且包含相对于天然人GLP-1的A8G、G22E和R36G替换。

[权利要求 10] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[权利要求 11] 根据权利要求1-10中任一项所述的融合蛋白，其中，所述IgG2-Fc结构域为来自人IgG2的Fc结构域。

[权利要求 12] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述IgG2-Fc结构域与如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有至少90％的序列同一性，并且包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。

[权利要求 13] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述IgG2-Fc结构域与如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有至少90％的序列同一性，并且包含A330S和P331S替换。

[权利要求 14] 根据权利要求13所述的融合蛋白，其中，所述IgG2-Fc结构域还包含C222S替换。

[权利要求 15] 根据权利要求14所述的融合蛋白，其中，所述IgG2-Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[权利要求 16] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，并且所述免疫球蛋白Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[权利要求 17] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽位于所述免疫球蛋白Fc结构域的N末端或者C末端。

[权利要求 18] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域直接共价连接。

[权利要求 19] 根据权利要求1-17中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽与所述免疫球蛋白Fc结构域通过连接子共价连接。

[权利要求 20] 根据权利要求19所述的融合蛋白，其中，所述连接子选自下组：可切割连接子、不可切割连接子、柔性连接子、刚性连接子、螺旋连接子和非螺旋连接子。

[权利要求 21] 根据权利要求20所述的融合蛋白，其中，所述连接子包括连接所述GLP-1多肽和所述IgG2-Fc结构域的连接肽。

[权利要求 22] 根据权利要求21所述的融合蛋白，其中，所述连接肽包括含有甘氨酸和丝氨酸的连接子。

[权利要求 23] 根据权利要求22所述的融合蛋白，其中，所述含有甘氨酸和丝氨酸的连接子包括如SEQ ID NO:39(GGGS)、SEQ ID NO:40(GGGGS)、SEQ ID NO:41(GGGGGS)或SEQ ID NO:42(GGGGGGGS)所示的一个、两个、三个、四个或更多个重复。

[权利要求 24] 根据权利要求19-23中任一项所述的融合蛋白，其中，所述连接子包括选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19。

[权利要求 25] 根据权利要求24所述的融合蛋白，其中，所述连接子包括如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

[权利要求 26] 根据权利要求19-25中任一项所述的融合蛋白，其中，所述GLP-1多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，所述免疫球蛋白Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示，并且所述连接子的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[权利要求 27] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7具有至少80％序列同一性的氨基酸序列。

[权利要求 28] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中，所述IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的第253位蛋氨酸(M253)上具有一定的氧化水平。

[权利要求 29] 根据权利要求28所述的融合蛋白，其中，所述IgG2-Fc结构域在对应于SEQ ID NO:7的M253上的氧化水平小于等于5%。

[权利要求 30] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其还包含信号肽。

[权利要求 31] 根据权利要求30所述的融合蛋白，其中，所述信号肽是人CD33信号肽。

[权利要求 32] 根据权利要求30或31所述的融合蛋白，其中，所述信号肽具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[权利要求 33] 根据权利要求30-32中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[权利要求 34] 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白，其中所述融合蛋白在人类受试者体内的半衰期为至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天。

[权利要求 35] 一种二聚体，其包含由二硫键连接的两条相同的肽链，其中，每条肽链均包括如权利要求1-34中任一项所述的融合蛋白。

[权利要求 36] 一种核酸分子，其包含编码如权利要求1-34中任一项所述的融合蛋白的多核苷酸。

[权利要求 37] 根据权利要求36所述的核酸分子，其包含如SEQ ID NO:26所示或如SEQ ID NO:27所示的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27具有至少70%的序列同一性的多核苷酸序列。

[权利要求 38] 一种载体，其包含如权利要求36或37所述的核酸分子。

[权利要求 39] 一种细胞，其包含如权利要求36或37所述的核酸分子或如权利要求38所述的载体。

[权利要求 40] 根据权利要求39所述的细胞，其还重组表达或天然表达赖氨酰羟化酶。

[权利要求 41] 根据权利要求40所述的细胞，其表达的赖氨酰羟化酶水平或活性高于COS-7细胞表达的赖氨酸羟化酶水平或活性。

[权利要求 42] 根据权利要求39-41中任一项所述的细胞，其中所述细胞是原核生物细胞或真核生物细胞。

[权利要求 43] 根据权利要求42所述的细胞，其中所述真核生物细胞是哺乳动物细胞。

[权利要求 44] 根据权利要求43所述的细胞，其中所述哺乳动物细胞是衍生自人的细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[权利要求 45] 根据权利要求43所述的细胞，其中所述哺乳动物细胞是人胚胎肾细胞293(HEK293细胞)、或CHO-K1细胞、或CHO-S细胞或CHO-DG44细胞。

[权利要求 46] 一种组合物，其包含如权利要求1-34中任一项所述的融合蛋白、或权利要求35所述的二聚体、或权利要求36或37所述的核酸分子、或权利要求38所述的载体、或权利要求39-45所述的细胞。

[权利要求 47] 根据权利要求46所述的组合物，其中在所述融合蛋白中，有大于等于10％、或大于等于15％、或至少大于等于20％、或大于等于26％、或大于等于30％、或大于等于40％、或大于等于50％、或大于等于60％、或大于等于70％、或大于等于80％、或大于等于90％的融合蛋白中的GLP-1多肽在相对于天然人GLP-1的K34上被羟基化。

[权利要求 48] 根据权利要求39-45中任一项所述的细胞的构建方法，包括：

a)将编码所述融合蛋白的多核苷酸引入载体中以构建表达载体；

b)将所述表达载体导入重组表达或天然表达赖氨酰羟化酶的细胞以得到重组细胞；

优选地，所述重组表达或天然表达赖氨酰羟化酶的细胞表达的赖氨酸羟化酶水平或活性高于COS-7细胞表达的赖氨酸羟化酶水平或活性，

更优选地，所述细胞为CHO细胞，特别是CHO-K1细胞，

还更优选地，所述载体是pKN012载体。

[权利要求 49] 一种重组细胞的构建方法，包括：

a)将SEQ ID NO:26所示的多核苷酸序列插入pKN012载体的NcoI和HindIII位点，生成pKN012-GLP1-IgG2/Fc表达载体；

b)将pKN012-GLP1-IgG2/Fc表达载体导入CHO-K1细胞中得到重组细胞。

[权利要求 50] 一种生产融合蛋白的方法，包括使用如权利要求39-45中任一项所述的细胞或如权利要求48或49所述的构建方法制备的细胞得到融合蛋白的步骤。

[权利要求 51] 根据权利要求50所述的方法，还包括如下步骤：检测所述融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平。

[权利要求 52] 一种检测融合蛋白质量的方法，其中，所述融合蛋白包含GLP-1多肽和免疫球蛋白IgG2-Fc结构域，所述方法包括以下步骤：检测所述融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平。

[权利要求 53] 根据权利要求52所述的方法，其中，所述GLP-1多肽选自人GLP-1(7-37)、人GLP-1(7-36)氨基和DPP-IV抗性人GLP-1，并且所述GLP-1多肽包含相对于天然人GLP-1的选自下组的一种或多种氨基酸替换：A8G、G22E和R36G；和/或所述IgG2-Fc结构域包含选自下组的一种或多种氨基酸替换：C222S、A330S和P331S。

[权利要求 54] 根据权利要求52或53所述的方法，其中，当所述融合蛋白在相对于天然人GLP-1的K34上的羟基化水平在10％和100％之间(例如，大于等于10％、或大于等于15％、或大于等于20％、或大于等于26％、或大于等于30％、或大于等于40％、或大于等于50％、或大于等于

60%、或大于等于70%、或大于等于80%、或大于等于90%)时将所述融合蛋白的质量确认为合格。

[权利要求 55] 根据权利要求1-34中任一项所述的融合蛋白、或权利要求35所述的二聚体、或权利要求36或37所述的多核苷酸、或权利要求38所述的载体、或权利要求39-45所述的细胞、或权利要求46或47所述的组合物在药物中的用途或者在制备用于治疗或预防疾病的药物中的用途。

[权利要求 56] 根据权利要求55所述的用途，其中所述疾病选自下组：糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病、代谢性疾病的并发症和神经系统疾病以及其他相关疾病。

[权利要求 57] 根据权利要求56所述的用途，其中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病选自下组：糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、肥胖症和代谢综合征。

[权利要求 58] 根据权利要求56-57中任一项所述的用途，其中，所述糖代谢和/或脂代谢紊乱相关的代谢性疾病是糖尿病(例如，2型糖尿病)。

[权利要求 59] 根据权利要求56所述的用途，其中，所述代谢性疾病的并发症包括由代谢性疾病引起的心血管并发症、肾脏并发症或肝脏并发症。

[权利要求 60] 根据权利要求56所述的用途，其中所述神经系统疾病为神经退行性疾病。

[权利要求 61] 根据权利要求60所述的用途，其中所述神经退行性疾病选自下组：阿尔茨海默病、运动神经元病、亨廷顿病和帕金森病。