

具有三重活性的融合蛋白及其应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域。具体地，涉及具有三重活性的融合蛋白及其应用。

5

背景技术

糖尿病和肥胖症是由糖脂代谢异常引发的疾病，其与多种其他疾病相关，包括心血管疾病(CVD)、外周动脉疾病、微血管并发症和骨关节炎等。因此，针对肥胖症、糖尿病及其并发症开发新的疗法和治疗药物，对于改善人类健康具有重要意义。

10

成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 属于FGF家族 (fibroblast growth factors, FGFs) 成员之一，具有182个氨基酸。FGF21可以促进脂肪细胞对葡萄糖的吸收，增强胰岛素敏感性，而且由于没有促分裂活性，也不会导致潜在的肿瘤风险。目前尚无FGF21长效蛋白上市产品，处于临床试验阶段的有礼来公司的LY2405319、辉瑞公司的PF-05231023和百时施贵宝BMS986036，但均在治疗2型糖尿病上并不能满足临床要求，在降低体重和血脂的疗效也不如GLP-1类药物。因此可以看出单用FGF21并不能满足临床需求。

15

最近有研究报道，联用GLP-1和FGF21在血糖控制、降低体重方面具有协同效果。现有技术中公开了应用GLP-1和FGF21组合物能够协同降低血糖和体重等。

20

虽然目前GLP-1/GIP双重活性类似物 (Tirzepatide)、FGF21类似物以及GLP-1/FGF21融合蛋白都用于治疗糖尿病及减重，但其效果仍然难以令人满意，本领域也没有关于GLP-1/GIP/FGF21三重活性的蛋白的报道。

因此，本领域需要开发能有效地用于治疗糖尿病及减重的具有GLP-1/GIP/FGF21三重活性的融合蛋白。

25

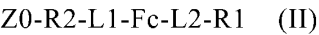
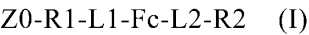
发明内容

本发明的目的在于提供一种具有三重活性的融合蛋白及其应用。

具体地，本发明提供了一种胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP) 和表皮生长因子21 (FGF21) 三重生物活性的融合蛋白，可用于治疗2型糖尿病(T2D)、肥胖症以及其他糖脂代谢异常疾病。

30

在本发明的第一方面，提供了一种融合蛋白，所述融合蛋白从N端到C端具有式I或式II的结构：



35

式中，

Z0为无，或者选自：信号肽、标签序列、或其组合；

R1为GLP-1和GIP突变蛋白元件；

L1为无或连接子；

Fc为Fc元件；

5 L2为无或连接子；

R2为FGF21元件；

“-”为键，其中，

所述GLP-1和GIP突变蛋白元件包含GLP-1和GIP突变蛋白，所述突变蛋白的氨基酸序列是基于SEQ ID NO. 20所示的氨基酸序列的第1、2、13、19、21、23、24位具有选自下组的氨基酸残基的多肽序列：

第1位是His或Tyr，

第2位是Gly或Ser，

第13位是Tyr或Leu，

第19位是Ala或Gln，

15 第21位是Ala或Asp，

第23位是Val或Ile，和

第24位是Ala或Gln或Glu；

并且，所述突变蛋白同时具有结合并激活B类G蛋白偶联受体GLP-1R和人葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)受体的活性。

20 在另一优选例中，所述突变蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 8-19中任一项所示。

在另一优选例中，所述FGF21元件包括FGF21野生型或其突变体。

在另一优选例中，所述FGF21野生型的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

在另一优选例中，所述FGF21突变体的氨基酸序列是基于SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第19、98、171和/或173位具有选自下组的氨基酸残基的多肽序列：R19V、

25 L98R、P171N、Q173T。

在另一优选例中，所述的 FGF21 突变体除所述突变(如第 19、98、171 和/或 173 位氨基酸残基)外，其余的氨基酸序列与 SEQ ID NO. 1 所示的序列相同或基本相同。

在另一优选例中，所述的基本相同是至多有 10 个(较佳地为 1-8 个，更佳地为 1-10 个、更佳地 1-5 个)氨基酸不相同，其中，所述的不相同包括氨基酸的取代、缺失或添加，

30 且所述的突变体仍同时具有成纤维细胞生长因子 21(FGF21)的活性。

在另一优选例中，所述融合蛋白可以是被修饰的或未被修饰的。

在另一优选例中，所述FGF21突变体的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

在另一优选例中，所述R2的氨基酸序列如SEQ ID NO.1或2所示。

在另一优选例中，所述融合蛋白同时具有结合并激活B类G蛋白偶联受体GLP-1R和人葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)受体的活性、和成纤维细胞生长因子21(FGF21)

的活性。

在另一优选例中，所述Fc元件为免疫球蛋白IgG的Fc片段，所述的IgG选自下组：IgG1、IgG2、IgG4，较佳地为IgG4。

在另一优选例中，所述Fc元件的序列如SEQ ID NO. 21所示。

5 在另一优选例中，所述Fc片段包括IgG4的铰链区、CH2和CH3结构域。

在另一优选例中，所述L1和/或L2为柔性接头。

在另一优选例中，所述L1和/或L2的氨基酸序列为 $(G_4S)_n$ 或 $(G_4S)_nA$ 或其变体，其中，n为正整数(例如1、2、3、4、5或6)，优选地，n=3。

10 在另一优选例中，所述 $(G_4S)_n$ 的变体包括：将所述序列中性能相近或相似的氨基酸进行取代所获得的 $(G_4S)_nA$ 接头序列的变体，如将一个或多个S分别突变为T；或者在所述序列中插入1-3个氨基酸。

在另一优选例中，所述L1和L2相同或不同。

在另一优选例中，所述L1各自独立地为 $(G_4S)_nA$ ，n为选自2-5的正整数(例如1、2、3、4、5或6)，较佳地n为3。

15 在另一优选例中，所述L2各自独立地为 $(G_4S)_n$ ，n为选自2-5的正整数(例如1、2、3、4、5或6)，较佳地n为3。

在另一优选例中，所述L1的序列如SEQ ID NO. 22所示。

在另一优选例中，所述L2的序列如SEQ ID NO. 23所示。

在另一优选例中，所述融合蛋白具有选自下组的氨基酸序列：

20 (a)如SEQ ID NO. 4-7任一所示的序列；

(b)与SEQ ID NO. 4-7任一所示序列的同源性至少为80%，较佳地至少为85%或90%，更佳地至少为95%，更佳地至少为98%，更佳地至少为99%的氨基酸序列；

并且，所述融合蛋白同时具有结合并激活B类G蛋白偶联受体GLP-1R和人葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)受体的活性、和成纤维细胞生长因子21(FGF21)的活性。

25 在本发明的第二方面，提供了一种分离的多核苷酸，所述多核苷酸编码如本发明的第一方面所述的融合蛋白。

本发明的第三方面，提供了一种载体，所述载体包括如本发明的第二方面所述的多核苷酸。

30 在另一优选例中，所述的载体选自下组：DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、转座子、或其组合。

本发明的第四方面，提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞含有如本发明的第三方面所述的载体，或染色体中整合有外源的如本发明的第二方面所述的多核苷酸。

本发明的第五方面，提供了一种制备如本发明的第一方面所述的融合蛋白的方法，包括步骤：

35 (i)在合适的条件下，培养如本发明的第四方面所述宿主细胞，获得含有如本发明

的第一方面所述的融合蛋白的混合物；和

(ii)对步骤(i)中得到的混合物进行纯化和/或分离，从而获得如本发明的第一方面所述的融合蛋白。

本发明的第六方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

5 (I)如本发明的第一方面所述的融合蛋白；和

(II)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述药物组合物用于制备用于预防和/或治疗与糖尿病或肥胖相关代谢疾病的药物，所述的与糖尿病或肥胖相关代谢疾病包括：I型糖尿病、II型糖尿病、妊娠糖尿病、肥胖症以及非酒精性脂肪肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。

10 在另一优选例中，所述药物组合物中还含有其他可用于预防和/或治疗与糖尿病或肥胖相关代谢疾病的药物。

本发明的第七方面，提供了如本发明的第一方面所述的融合蛋白或如本发明的第六方面所述的药物组合物的用途，用于制备一药物，所述药物用于：

(i)控制有所需要的对象的体内的血糖含量；

15 (ii)降低有所需要的对象的体内的血脂含量；

(iii)降低有所需要的对象的体脂率，或抑制体重增长；

(iv)改善肝功能；和/或

(v)用于预防和/或治疗与糖尿病或肥胖相关代谢疾病。

在另一优选例中，所述血脂包括总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇。

20 在另一优选例中，所述的药物用于降低有所需要的对象的体脂率，或抑制体重增长。

在另一优选例中，所述的与糖尿病或肥胖相关代谢疾病包括：I型糖尿病、II型糖尿病、妊娠糖尿病、肥胖症以及非酒精性脂肪肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。

25 本发明的第八方面，提供了一种预防和/或治疗与糖尿病或肥胖相关代谢疾病的方法，向有所需要的对象施用有效量的如本发明第一方面所述的融合蛋白或如本发明的第六方面所述的药物组合物。

30 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图1显示了db/db糖尿病小鼠多次给药后随机血糖。

图2显示了db/db糖尿病小鼠多次给药后空腹血糖。

35

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究，通过大量筛选，首次意外开发一种具有GLP-1、GIP、FGF21三重活性融合蛋白，所获得的融合蛋白能够显著降低DIO小鼠体重、血浆总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇，改善肝功能以及降低db/db小鼠血糖，其作用显著
5 著优于单一的GLP-1/GIP活性蛋白或者FGF21活性的蛋白。在此基础上完成了本发明。

术语

除非另有定义，否则本文中所用的全部技术术语和科学术语均具有如本发明所属领域普通技术人员通常理解相同含义。

10 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

如本文所用，术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由...构成”、或“由...构成”。

15 胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide, GLP-1)

胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide, GLP-1) 是一种有37个氨基酸的肠促胰素，其刺激胰岛素分泌、保护胰腺β细胞、并抑制胰高血糖素分泌、胃排空和食物摄入，导致体重减轻。利拉鲁他 (Liraglutide) 和司美格鲁肽 (Semaglutide) 是GLP-1受体激动剂，已经批准用于治疗2型糖尿病和肥胖症。但许多2型糖尿病患者和肥胖患者
20 者仍然没有得到充分控制，目前市售的肠促胰岛素模拟物或二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制剂仅利用单一确立机制用于血糖和体重控制。

葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP)

葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP) 是42个氨基酸的胃肠调节肽，其通过在葡萄糖
25 糖存在下刺激从胰腺β细胞分泌胰岛素以及保护胰腺β细胞，在葡萄糖内稳态中发挥生理作用。在现有技术中描述了基于天然GIP多肽序列的GLP-1/GIP受体双重激动剂化合物LY3298176，在降低血糖和体重具有良好的效果，目前，该产品已获得FDA批准用于治疗2型糖尿病，通用名为Tirzepatide。

30 成纤维细胞生长因子21 (FGF21)

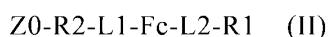
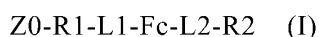
成纤维细胞生长因子21 (FGF21) 属于FGF家族 (fibroblast growth factors, FGFs) 成员之一，具有182个氨基酸。FGF21可以促进脂肪细胞对葡萄糖的吸收，增强胰岛素敏感性，而且由于没有促分裂活性，也不会导致潜在的肿瘤风险。此外，FGF21也有很好的降脂作用，通过抑制肝脏SREBP-2合成，降低血清总胆固醇和低密度脂蛋白
35 含量，从而缓解高胆固醇血症。然而，天然的FGF21也存在一定的缺陷，如体外容易

聚集稳定性较差、易被蛋白酶水解，在体内半衰期较多，在食蟹猴体内半衰期只有2-3小时。这些缺点限制了FGF21的应用。因此针对FGF21，有多种方法进行改进，例如将19位的精氨酸（R）突变位缬氨酸（V）、在C端增加N-糖基化位点和连接IgG Fc可以抑制FGF21在体外的降解并延长在食蟹猴中的半衰期，通过L98R、P171G、A180E三个突变将FGF21在食蟹猴的半衰期提高到约70小时。

本发明的融合蛋白

在本发明中，提供了一种具有胰高血糖素样肽-1（GLP-1）、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽（GIP）和表皮生长因子 21（FGF21）三重生物活性的融合蛋白。

如本文所用，术语“本发明的融合蛋白”、“本发明的三重生物活性的融合蛋白”、“具有三重活性的融合蛋”可互换使用，所述融合蛋白从N端到C端具有式I或式II的结构：



式中，

Z0为无，或者选自：信号肽、标签序列、或其组合；

R1为GLP-1和GIP突变蛋白元件；

L1为无或连接子；

Fc为Fc元件；

L2为无或连接子；

R2为FGF21元件；

“-”为键，其中，

所述GLP-1和GIP突变蛋白元件包含GLP-1和GIP突变蛋白，所述突变蛋白的氨基酸序列是基于SEQ ID NO. 20所示的氨基酸序列的第1、2、13、19、21、23、24位具有选自

下组的氨基酸残基的多肽序列：

第1位是His或Tyr，

第2位是Gly或Ser，

第13位是Tyr或Leu，

第19位是Ala或Gln，

第21位是Ala或Asp，

第23位是Val或Ile，和

第24位是Ala或Gln或Glu；

并且，所述突变蛋白同时具有结合并激活B类G蛋白偶联受体GLP-1R和人葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)受体的活性。

如本文所用，术语“GLP-1 和 GIP 突变蛋白”、“GLP-1 和 GIP 突变体”、“GLP-1

和 GIP 突变多肽”可互换使用，均指本发明中的同时具有结合并激活 B 类 G 蛋白偶联受体 GLP-1R 和 GIP 受体的活性的 GLP-1 和 GIP 突变蛋白。

如本文所用，“接头”优选为柔性接头，通常为可以富含 G、S 和/或 A 的连接肽，例如可以由甘氨酸 G、丝氨酸 S 和丙氨酸 A 组成，一个优选的接头为 $(G_4S)_nA$ 或其变体，其中，n 为正整数(例如 1、2、3、4、5 或 6)，优选地，n=3；所述 $(G_4S)_nA$ 的变体包括：将所述序列中性能相近或相似的氨基酸进行取代所获得的 $(G_4S)_nA$ 接头序列的变体，如将一个或多个 S 分别突变为 T；或者在所述序列中插入 1-3 个氨基酸。

在另一优选例中，所述 L1 各自独立地为 $(G_4S)_nA$ ，n 为选自 2-5 的正整数(例如 1、2、3、4、5 或 6)，较佳地 n 为 3。

在另一优选例中，所述 L2 各自独立地为 $(G_4S)_n$ ，n 为选自 2-5 的正整数(例如 1、2、3、4、5 或 6)，较佳地 n 为 3。

优选地，本发明的融合蛋白中，R1 的序列选自 SEQ ID NO. 8-19 中任一所示的氨基酸序列，R2 的序列选自 SEQ ID NO. 1 或 2 所示的氨基酸序列（优选 SEQ ID NO. 2 所示的 FGF21 突变体序列），Fc 的序列选自 SEQ ID NO. 21 所示的氨基酸序列；L1 的序列如 SEQ ID NO. 22 所示，L2 的序列如 SEQ ID NO. 23 所示。

更佳地，本发明的融合蛋白具有如 SEQ ID NO. 4-7 所示的氨基酸序列。

如本文所用，术语“本发明融合蛋白”还包括具有上述活性的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于)：1-3 个(通常为 1-2 个，更佳地 1 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加或缺失一个或数个(通常为 3 个以内，较佳地为 2 个以内，更佳地为 1 个以内)氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加或缺失一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的结构和功能。此外，所述术语还包括单体和多聚体形式的本发明多肽。该术语还包括线性以及非线性的多肽(如环肽)。

本发明还包括本发明的融合蛋白的活性片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明 GLP-1 和 GIP 突变蛋白或融合蛋白的功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或几个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合于此多肽序列而形成的多肽(与先导序列、分泌序列或 6His 等标签序列融合而形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

一类优选的活性衍生物指与本发明的氨基酸序列相比，有至多 3 个，较佳地至多 2 个，更佳地至多 1 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 A 进行氨基酸替换而产生。

表A

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

5 本发明还提供本发明融合蛋白的类似物。这些类似物与本发明的多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如β、γ-氨基酸)的类似物。应理解，本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

10 此外，还可以对本发明融合蛋白进行修饰。修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

术语“本发明的多核苷酸”可以是包括编码本发明GLP-1和GIP突变蛋白或融合蛋白的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

15 本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或融合蛋白的片段、类似物和衍生物。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的GLP-1和GIP突变蛋白或融合蛋白的功能。

20 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，较佳地至少70%，

更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件(或严紧条件)下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中,“严格条件”是指:(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如0.2×SSC, 0.1%SDS, 60°C;或(2)杂交时加有变性剂,如50%(v/v)甲酰胺, 0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42°C等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少

5 至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。

本发明的融合蛋白和多核苷酸优选以分离的形式提供,更佳地,被纯化至均质。

本发明多核苷酸全长序列通常可以通过PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各

10 次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通

15 过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

应用PCR技术扩增DNA/RNA的方法被优选用于获得本发明的多核苷酸。特别是很难

20 从文库中得到全长的cDNA时,可优选使用RACE法(RACE-cDNA末端快速扩增法),用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

表达载体

25 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或本发明融合蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

通过常规的重组DNA技术,可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的融合蛋白。一般来说有以下步骤:

- 30 (1).用本发明的编码本发明融合蛋白的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;
- (2).在合适的培养基中培养的宿主细胞;
- (3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中,编码融合蛋白的多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒

35 如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。只要能在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可

以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含本发明融合蛋白编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导mRNA
5 合成。这些启动子的代表性例子有：大肠杆菌的lac或trp启动子；λ噬菌体PL启动子；真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、反转录病毒的LTRs和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白
10 (GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的
15 细菌细胞；真菌细胞如酵母、植物细胞(如人参细胞)。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是DNA的顺式作用因子，通常大约有10到300个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。可举的例子包括在复制起始点晚期一侧的100到270个碱基对的
20 SV40增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用CaCl₂法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔
25 的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。
30

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、
35 吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的

结合。

本发明的主要优点包括

（1）本发明首次提供了一种新的GLP-1/GIP/FGF21三重活性融合蛋白，在控制
5 血糖、体重和血脂上比现有单一活性或者双重活性的蛋白更具有优势。

（2）本发明的融合蛋白能够显著降低小鼠体重、体脂比、血浆总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇，改善肝功能以及降低小鼠血糖，其作用显著优于单一的GLP-1/GIP活性蛋白或者FGF21活性的蛋白，具有协同效应。

（3）本发明的融合蛋白可用于治疗2型糖尿病(T2D)、肥胖症以及其他糖脂代谢
10 异常疾病。

下面结合具体实施例，进一步陈述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor
15 Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

本发明的融合蛋白的结构如下式所示：

R1-L1-Fc-L2-R2，

20 其中R1为具有GLP-1、GIP双重活性的多肽，L1、L2为连接子，Fc为IgG Fc片段，R2为FGF21或其突变体。

R1具有以下结构的序列，具有GLP-1、GIP双重活性：

X₁X₂EGTFTSDYSIX₁₃LDKIX₁₉KX₂₁FX₂₃X₂₄WLIAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO.
20)

25 其中X₁为His或Tyr，

X₂为Gly或Ser，

X₁₃为Tyr或Leu，

X₁₉为Ala或Gln，

X₂₁为Ala或Asp，

30 X₂₃为Val或Ile，

X₂₄为Ala或Gln或Glu，

L1和/或L2为连接子；

Fc为IgG Fc片段，可选择IgG1、IgG2、IgG4，主要作用是延长半衰期；

R2为FGF21或其突变体，优选地为FGF21突变体，所述FGF21突变体的氨基酸序列是基于SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第19、98、171和/或173位具有选自下组的氨基酸残基的多肽序列：R19V、L98R、P171N、Q173T。

其中，L1为(G₄S)₃A，L2为(G₄S)₃。

5

实施例1 融合蛋白样品制备

根据 12C1-F、12C2-F、12C3-F、12C4-F、12C5-F、12C6-F、12C7-F、12C8-F、12C9-F、12C10-F、12C11-F、12C12-F 融合蛋白的氨基酸序列化学合成相应的基因，并克隆至 pcDNA3.1 载体上，大量抽提质粒后转染至 ExpiCHO-S 细胞中（Life Technologies），转染 24 小时后加入 Feed 和 Enhancer，并将细胞于恒温摇床中培养，条件为 5%、120rpm、32℃，培养 7 天后将细胞液离心（10000×g）30min，取离心后上清用 0.45 μm 的过滤器过滤。将滤液加样到磷酸盐缓冲液平衡的 MabSelect SuRe 柱上，然后用 10 倍柱床体积的磷酸盐缓冲液淋洗柱子，用 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲液（pH3.0）洗脱结合的融合蛋白，并用 1 mol/L 的 Tris-HCl 溶液中和至 pH 为 7.0。利用 HPLC-SEC 检测融合蛋白的纯度，紫外分光光度计测定融合蛋白在 280nm 处的吸收值，根据融合蛋白的消光系数和纯度计算融合蛋白的含量。

实施例2 融合蛋白体外生物活性测定

使用表达人类 GLP-1 受体和 CRE-荧光素酶的 CHO-K1 细胞进行融合蛋白 GLP-1 体外活性检测。在 96 孔板中接种该细胞，密度为 30000 个细胞/孔/100μL，在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 1 小时。对于每种待测蛋白样品，分别将蛋白溶液用含 2%HAS 的 PBS 从一定浓度开始 4 倍梯度稀释 9 次，每个样品共有 10 个不同浓度的稀释物，分别取 50 μL 加入到接种细胞的 96 孔板中，在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 5 小时。将 96 孔板从培养箱中取出放置室温平衡 10 分钟，在每个孔中加入 100 μL 反应液，200 转/分钟振荡 10 分钟后，在多功能酶标仪上检测荧光读数。以样品浓度为横坐标，以荧光读数为纵坐标，作曲线并计算每个样品的半数效应浓度（EC₅₀）。Tirzepatide 作为阳性对照，结果见下表。

使用表达人类GIP受体和CRE-荧光素酶的CHO-K1细胞进行融合蛋白GIP体外活性检测。在96孔板中接种该细胞，密度为30000个细胞/孔/100μL，在37℃、5%CO₂条件下培养1小时。对于每种待测蛋白样品，分别将蛋白溶液含2%HAS的PBS从一定浓度开始 4倍梯度稀释9次，每个样品共有10个不同浓度的稀释物，分别取50 μL加入到接种细胞的96孔板中，在37℃、5%CO₂条件下培养5小时。将96孔板从培养箱中取出放置室温平衡10分钟，在每个孔中加入100 μL反应液，200转/分钟振荡10分钟后，在多功能酶标仪上检测荧光读数。以样品浓度为横坐标，以荧光读数为纵坐标，作曲线并计算每个样品的半数效应浓度（EC₅₀）。Tirzepatide作为阳性对照，结果见下表，所筛选的部分融合蛋白活性远高于对照Tirzepatide。

表1 融合蛋白体外生物活性

样品	GLP-1 EC50 (nmol/L)	GIP EC50 (nmol/L)
Tirzepatide	12.814	0.059
Fc-FGF21突变体	-	-
12C1-F	0.830	0.064
12C2-F	2.659	0.073
12C3-F	0.515	0.055
12C4-F	2.563	0.056
12C5-F	6.321	0.032
12C6-F	7.125	0.009
12C7-F	0.988	0.093
12C8-F	2.235	0.022
12C9-F	10.693	0.093
12C10-F	7.355	0.111
12C11-F	0.255	0.036
12C12-F	0.642	0.006

注：不同序列主要区别是是基于R1不同位置突变结果

X₁X₂EGTFTSDYSIX₁₃LDKIX₁₉KX₂₁FX₂₃X₂₄WLIAGGPSSGAPPPS

结果表明：综合GLP-1、GIP体外活性，12C1-F、12C3-F、12C11-F、12C12-F为优选的融合蛋白；选择其中综合性能最优的12C12-F融合蛋白进行后续实验。

实施例3 db/db糖尿病小鼠多次皮下注射给药降低血糖试验

本实施例的目的是研究皮下注射12C12-F融合蛋白对DIO小鼠体重等指标的影响作用，同时与Tirzepatide、Fc-FGF21作药效比较。

动物适应性饲养后，每周测定一次禁食4 h空腹血糖，除6只Control组（Wild type）外，待db/db小鼠空腹4 h血糖值达到高血糖标准后（≥16.7 mmol/L）开始分组进行实验，将达到高血糖标准的24只雄性db/db小鼠根据血糖值及体重平均分成4组，每组6只，分别为：Tirzepatide组、Fc-FGF21组、12C12-F组、溶媒组（PBS），同时设置正常小鼠对照组（Wild type）。实验动物分组后，开始给予相应药物治疗，皮下注射给药（每周2次），剂量为30 nmol/kg，给药期间，2次/周测随机血糖和空腹血糖（禁食4 h）。随机血糖如图1所示，空腹血糖如图2所示。

结果显示，12C12-F降糖效果明显优于Tirzepatide（GLP-1/GIP双重活性）和Fc-FGF21（FGF21单一活性），基本与正常对照组一致，即糖尿病小鼠血糖已恢复至正常。

实施例4 DIO小鼠多次皮下注射给药降低体重试验

本实施例的目的是研究皮下注射融合蛋白对DIO小鼠体重等指标的影响作用，同时与Tirzepatide作药效比较。

用7周龄C57BL/6Nju小鼠，喂养高脂饲料（蛋白质约占20%，脂肪约占60%）12周进行造模，饲养条件：每日12 h/12 h交替照明，自由采食，温度为20~25℃，相对湿度为40~70%，换气次数为10~15次/小时。给药前一天根据体重、饮水量及摄食量进行随机分组，组别设计：设Tirzepatide组、Fc-FGF21组、12C12-F组、溶媒组（PBS）、正常对照组，每组6只小鼠。皮下注射给药处理，一周注射两次，连续5周，共给药10次。给药结束后，检测小鼠体重、OGTT、体脂比、血脂四项和肝功能，数据以均值±标准差表示，采用One-Way ANOVA对数据进行统计学分析。

12C12-F能够显著降低DIO肥胖小鼠体重和体脂率，降低幅度显著大于对照Tirzepatide和Fc-FGF21；同时能显著降低血糖、血浆总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇，改善肝功能，基本恢复至正常。

表2 DIO肥胖小鼠给药后体重和体脂率变化

样品	%白起始体重的变化	体脂比（%）
模型对照	11.94±4.03	47.98±3.72
Tirzepatide (30 nmol/kg)	-22.55±4.05****	32.20±3.87****
Fc-FGF21 (30 nmol/kg)	-6.65±3.33**	42.88±3.88
12C12-F (30 nmol/kg)	-39.73±4.28	16.16±5.56****

15 **p<0.01，****p<0.0001相对于对照组（One-Way ANOVA，Dunnett's）.结果表示为每组6只小鼠的平均值±SD

表3 DIO小鼠空腹血糖、肝酶、血浆总胆固醇、血浆低密度脂蛋白胆固醇

样品	血糖 (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
正常对照	7.8±0.88**	38.350±24.67** *	50.967±3.24*	3.753±0.19****	0.347±0.03* ***
模型对照	10.1±1.19	99.133±53.56	109.367±78.38	6.577±0.92	0.952±0.29
Tirzepatide (30 nmol/kg)	7.2±0.22***	19.000±2.91*** *	54.683±5.53*	3.923±0.28****	0.423±0.06* ***
Fc-FGF21 (30 nmol/kg)	9.12±	88.365±5.36	77.658±56.32	5.364±0.99	0.656± 0.31**
12C12-F (30 nmol/kg)	5.2±0.44***	14.683±2.19*** *	55.183±5.22*	3.348±0.30****	0.383±0.02* ***

*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001，****p<0.0001相对于对照组（One-Way ANOVA，Dunnett's）.结果表示为每组6只小鼠的平均值±SD

本发明的序列如下所示：

表4 12C1-12C12的氨基酸序列。

SEQ	编号	序列
8	12C1	<u>Y</u> GEGTFTSDYSI <u>L</u> LDKIA <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> WLIAGGPSSGAPPPS
9	12C2	<u>H</u> SEGTFTSDYSI <u>Y</u> LDKIA <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> WLIAGGPSSGAPPPS
10	12C3	<u>Y</u> GEGTFTSDYSI <u>Y</u> LDKIA <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> WLIAGGPSSGAPPPS
11	12C4	<u>H</u> SEGTFTSDYSI <u>L</u> LDKIA <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> WLIAGGPSSGAPPPS
12	12C5	<u>Y</u> GEGTFTSDYSI <u>L</u> LDKIA <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Q</u> WLIAGGPSSGAPPPS
13	12C6	<u>H</u> GEGTFTSDYSI <u>L</u> LDKIA <u>Q</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Q</u> WLIAGGPSSGAPPPS
14	12C7	<u>H</u> SEGTFTSDYSI <u>Y</u> LDKIA <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> WLIAGGPSSGAPPPS
15	12C8	<u>Y</u> GEGTFTSDYSI <u>Y</u> LDKIA <u>A</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Q</u> WLIAGGPSSGAPPPS
16	12C9	<u>H</u> SEGTFTSDYSI <u>L</u> LDKIA <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Q</u> WLIAGGPSSGAPPPS
17	12C10	<u>Y</u> SEGTFTSDYSI <u>Y</u> LDKIA <u>A</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Q</u> WLIAGGPSSGAPPPS
18	12C11	<u>H</u> GEGTFTSDYSI <u>Y</u> LDKIA <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> WLIAGGPSSGAPPPS
19	12C12	<u>H</u> SEGTFTSDYSI <u>L</u> LDKIA <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> WLIAGGPSSGAPPPS

SEQ.ID NO 1（野生型FGF21）

5 HPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALK
PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPS
YAS

SEQ.ID NO 2（FGF21突变体）

10 HPIPDSSPLLQFGGQVRQVYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKAL
KPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLH
LPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGNSTGRSPS
YAS

SEQ.ID NO 3（Fc-FGF21突变体）

15 ESKYGPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGG
SGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQVYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQ
20 SPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNV
YQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLS
MVGNSTGRSPSYAS*

SEQ.ID NO 4（12C1-F融合蛋白）

25 YGEGTFTSDYSILLDKIAQKAFIEWLIAGGPSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSAESKY
GPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQVYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPES
30 LLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDGYNVYQSE
AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG
NSTGRSPSYAS

SEQ.ID NO 5（12C3-F融合蛋白）

35 YGEGTFTSDYSIYLDKIAQKAFIEWLIAGGPSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSAESKY
GPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA

- KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGGSGGG
GSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQVYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPES
LLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRERLLEDGYNVYQSE
5 AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG
NSTGRSPSYAS
- SEQ.ID NO 6 (12C11-F融合蛋白)**
HGEFTFTSDYSIYLDKIAAKDFIEWLIAGGPSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSAESKY
GPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
10 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGGSGGG
GSGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQVYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPES
LLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRERLLEDGYNVYQSE
15 AHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVG
NSTGRSPSYAS
- SEQ.ID NO 7 (12C12-F融合蛋白)**
HSEGTFTSDYSILLDKIAQKAFIEWLIAGGPSSGAPPPSGGGGSGGGGSGGGGSAESKYG
PPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
20 EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGGSGGG
SGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQVYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLL
QLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGSLHFDPEACSFRERLLEDGYNVYQSEAH
25 GLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGNS
TGRSPSYAS
- SEQ ID NO. 20 (多肽模板)**
 X_1X_2 EGTFTSDYSIX₁₃LDKIX₁₉KX₂₁FX₂₃X₂₄WLIAGGPSSGAPPPS
其中X₁为H或Y, X₂为G或S, X₁₃为Y或L, X₁₉为A或Q, X₂₁为A或D, X₂₃为V或I, X₂₄为A
30 或Q或E
- SEQ ID NO. 21 (Fc段)**
ESKYGPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
35 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSLG
- SEQ ID NO. 22 (linker1)**
GGGGSGGGGSGGGGSA
- SEQ ID NO. 23 (linker2)**
40 GGGGSGGGGSGGGGS

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

权利要求

1、一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白从N端到C端具有式I或式II的结构：

5 Z0-R1-L1-Fc-L2-R2 (I)

Z0-R2-L1-Fc-L2-R1 (II)

式中,

Z0为无，或者选自：信号肽、标签序列、或其组合；

R1为GLP-1和GIP突变蛋白元件;

10 L1为无或连接子;

Fc为Fc元件:

L2为无或连接子;

R2为FGF21元件；

“-”为键，其中，

15 所述GLP-1和GIP突变蛋白元件包含GLP-1和GIP突变蛋白，所述突变蛋白的氨基酸序列是基于SEQ ID NO. 20所示的氨基酸序列的第1、2、13、19、21、23、24位具有选自下组的氨基酸残基的多肽序列：

第1位是His或Tyr,

第2位是Gly或Ser,

20 第13位是Tyr或Leu,

第19位是Ala或Gln,

第21位是Ala或Asp,

第23位是Val或Ile, 和

第24位是Ala或Gln或Glu;

25 并且,所述突变蛋白同时具有结合并激活B类G蛋白偶联受体GLP-1R和人葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)受体的活性。

2、如权利要求1所述的融合蛋白，其特征在于，所述突变蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 8-19中任一项所示。

30 3、如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述FGF21元件包括FGF21野生型或其突变体,所述FGF21突变体的氨基酸序列是基于SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第19、98、171和/或173位具有选自下组的氨基酸残基的多肽序列: R19V、L98R、P171N、O173T。

4、如权利要求1所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白具有选自下组的氨基酸序列：

35 (a)如SEQ ID NO. 4-7任一所示的序列;

(b)与SEQ ID NO. 4-7任一所示序列的同源性至少为80%，较佳地至少为85%或90%，更佳地至少为95%，更佳地至少为98%，更佳地至少为99%的氨基酸序列；

5 并且，所述融合蛋白同时具有结合并激活B类G蛋白偶联受体GLP-1R和人葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)受体的活性、和成纤维细胞生长因子21(FGF21)的活性。

5、一种分离的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码如权利要求1-4任一项所述的融合蛋白。

6、一种载体，其特征在于，所述载体包括如权利要求5所述的多核苷酸。

10 7、一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有如权利要求6所述的载体，或染色体中整合有外源的如权利要求5所述的多核苷酸。

8、一种制备如权利要求1所述的融合蛋白的方法，其特征在于，包括步骤：

(i)在合适的条件下，培养如权利要求7所述的宿主细胞，获得含有如权利要求1所述的融合蛋白的混合物；和

15 (ii)对步骤(i)中得到的混合物进行纯化和/或分离，从而获得如权利要求1所述的融合蛋白。

9、一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(I)如权利要求1所述的融合蛋白；和

(II)药学上可接受的载体。

20 10. 如权利要求1所述的融合蛋白的用途或如权利要求9所述的药物组合物的用途，其特征在于，用于制备一药物，所述药物用于：

(i)控制有所需要的对象的体内的血糖含量；

(ii)降低有所需要的对象的体内的血脂含量；

(iii)降低有所需要的对象的体脂率，或抑制体重增长；

25 (iv)改善肝功能；和/或

(v)用于预防和/或治疗与糖尿病或肥胖相关代谢疾病。