



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115850437 A

(43) 申请公布日 2023.03.28

(21) 申请号 202211067063.X

(22) 申请日 2022.09.01

(66) 本国优先权数据

202111026970.5 2021.09.02 CN

(71) 申请人 广东东阳光药业有限公司

地址 523808 广东省东莞市松山湖园区工业北路1号

(72) 发明人 蒋鹏 肖琳 周林俊 黄丽玫

杨敏 蒋燕 孙宁远 毛剑铭

李勇 李利佳 郭林峰 李静

李文佳

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

专利代理师 顾鲜红

(51) Int. Cl.

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书25页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

GLP-1/GIP双靶多肽、融合蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明提出一种GLP-1/GIP双靶多肽、融合蛋白及其应用,该GLP-1/GIP双靶多肽包括如下所示氨基酸序列中的至少之一:SEQ ID NO:2-112,SEQ ID NO:117-121。本发明所述GLP-1/GIP双靶多肽能有效降低体重和血糖水平。

1. 一种GLP-1/GIP双靶多肽,其特征在于,包含第一多肽,所述第一多肽具有如下氨基酸序列:

$X_1X_2X_3GTFX_4SDYSX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}FX_{15}X_{16}W LX_{17}X_{18}X_{19}$,其中, X_1 为Y或H, X_2 为A或G或S, X_3 为E或Q, X_4 为I或T, X_5 为I或K, X_6 为A或Y或L或I, X_7 为M或L, X_8 为D或E, X_9 为K或E, X_{10} 为I或Q或K或E或L, X_{11} 为H或A或R, X_{12} 为A或Q或V, X_{13} 为K或Q或R或H, X_{14} 为D或E或A或L, X_{15} 为V或I, X_{16} 为N或E或D或Q, X_{17} 为L或I或K或V, X_{18} 为A或E或K, X_{19} 为Q或G;

$X_1 \sim X_{19}$ 不同时满足 X_1 为Y, X_2 为A, X_3 为E, X_4 为I, X_5 为I, X_6 为A, X_7 为M, X_8 为D, X_9 为K, X_{10} 为I, X_{11} 为H, X_{12} 为Q, X_{13} 为Q, X_{14} 为D, X_{15} 为V, X_{16} 为N, X_{17} 为L, X_{18} 为A, X_{19} 为Q。

2. 根据权利要求1所述的GLP-1/GIP双靶多肽,其特征在于,包含第一多肽,所述第一多肽具有如下氨基酸序列:

$X_1X_2EGTFTSDYSIX_6LDKX_{10}AQX_{13}X_{14}FX_{15}X_{16}WLX_{17}AX_{19}$,其中, X_1 为Y或H, X_2 为A或G或S, X_6 为A或Y或L, X_{10} 为I或Q或K或L, X_{13} 为Q或R, X_{14} 为D或E或A, X_{15} 为V或I, X_{16} 为E或D或Q, X_{17} 为L或I或K, X_{19} 为Q或G;

其中,所述第一多肽不包含YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQ (SEQ ID NO:122) 氨基酸序列。

3. 根据权利要求1~2任一项所述的GLP-1/GIP双靶多肽,其特征在于,所述GLP-1/GIP双靶多肽进一步包含第二多肽,所述第二多肽具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的GLP-1/GIP双靶多肽,其特征在于,所述第一多肽的C端与所述第二多肽的N端相连。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的GLP-1/GIP双靶多肽,其特征在于,所述GLP-1/GIP双靶多肽具有如下所示氨基酸序列中的至少之一:SEQ ID NO:2-112,SEQ ID NO:117-121。

6. 根据权利要求5所述的GLP-1/GIP双靶多肽,其特征在于,所述的GLP-1/GIP双靶多肽具有如下所示的氨基酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:25-28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:50-51、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:101-107、SEQ ID NO:110-112。

7. 一种融合蛋白,其特征在于,包括:

(1) 权利要求1~6任一项所述的GLP-1/GIP双靶多肽;以及

(2) Fc片段,所述GLP-1/GIP双靶多肽的C端与所述Fc片段的N端相连。

8. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其特征在于,所述Fc片段为人源IgG₄的Fc片段或其变体。

9. 根据权利要求7或8所述的融合蛋白,其特征在于,所述Fc片段包括SEQ ID NO:113所示的氨基酸序列。

10. 根据权利要求7~9任一项所述的融合蛋白,其特征在于,进一步包括连接肽,所述连接肽具有SEQ ID NO:114所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求7~10任一项所述的融合蛋白,其特征在于,所述连接肽的N端与所述GLP-1/GIP双靶多肽的C端相连,所述连接肽的C端与所述Fc片段的N端相连。

12. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1~6任一项所述的GLP-1/GIP双靶多肽或权利要求7~11任一项所述的融合蛋白。

13. 一种表达载体,其特征在于,包含权利要求12所述的核酸分子。

14. 根据权利要求13所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体为真核表达载体。

15. 一种重组细胞,其特征在于,携带权利要求12所述的核酸分子或权利要求13或14所述的表达载体。

16. 一种药物组合物,其特征在于,包含权利要求1~6任一项所述的GLP-1/GIP双靶多肽、权利要求7~11任一项所述的融合蛋白、权利要求12所述的核酸分子、权利要求13或14所述的表达载体、或权利要求15所述的重组细胞。

17. 权利要求1~6任一项所述的GLP-1/GIP双靶多肽、权利要求7~11任一项所述的融合蛋白、权利要求12所述的核酸分子、权利要求13或14所述的表达载体、或权利要求15所述的重组细胞在制备药物中的用途,所述药物用于治疗糖尿病、肥胖症、脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝疾病、非酒精性脂肪性肝炎、血脂异常和代谢综合征。

18. 一种制备权利要求7~11任一项所述的融合蛋白的方法,其特征在于,所述方法包括:

- 1) 构建权利要求12或13所述的表达载体;
- 2) 将所述表达载体导入宿主细胞中,获得重组细胞,以表达所述融合蛋白。

GLP-1/GIP双靶多肽、融合蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地,涉及GLP-1/GIP双靶多肽、融合蛋白及其应用,更具体地,涉及GLP-1/GIP双靶多肽、编码GLP-1/GIP双靶多肽的核酸分子、融合蛋白、编码融合蛋白的核酸分子、表达载体、重组细胞、GLP-1/GIP双靶多肽及其核酸分子与融合蛋白及其核酸分子与表达载体与重组细胞在制备药物中的用途、药物组合物及制备融合蛋白的方法。

背景技术

[0002] 2型糖尿病是一种慢性代谢失调疾病,与肥胖、高血脂和高血压等有着密切的联系。目前一线治疗2型糖尿病的药物主要作用为降糖,而降低体重的效果非常有限。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是一种进食后由肠道L-细胞分泌的多肽激素,能刺激胰岛β细胞分泌胰岛素,从而稳定餐后血糖的波动;其降低血糖的作用具有葡萄糖浓度依赖性,在调节血糖的同时,大大降低了低血糖的风险。近几年基于GLP-1的药物,如利拉鲁肽、度拉鲁肽及索马鲁肽,逐渐在糖尿病药物中占据了非常重要的地位;而GLP-1类药物在降低血糖时还有减肥的效果,其机理为GLP-1作用于胃肠道延缓胃排空和肠道蠕动,以及作用于中枢神经系统抑制食欲等,从而达到减少摄食的目的。然而,GLP-1受体激动剂类药物用于减肥时,需要使用的剂量一般较大,易产生胃肠道副作用,耐受性差,治疗窗较窄。

[0003] 葡萄糖依赖的肠促胰岛素 (GIP) 是一种由肠道K细胞分泌的多肽激素,含有42个氨基酸,主要在葡萄糖内稳态中发挥作用,保护胰腺β细胞。GIP和GLP-1同为肠降血糖素,均能以血糖浓度依赖的方式促进胰岛素的分泌,降低血糖,GIP介导的血糖降低效果甚至强于GLP-1。然而,可能是由于高血糖导致的受体耐受,糖尿病患者表现出对GIP不敏感,因而对糖尿病患者单独使用GIP受体激动剂并没有达到改善血糖的目的。

[0004] 目前针对机制复杂的疾病,如糖尿病、肥胖等,单靶点药物的效果有限,而一些传统的治疗方法,如注射胰岛素、口服磺酰脲和二甲双胍容易导致低血糖,故仍不能满足临床需求。通过作用于不同靶点,可实现多重作用,提高药物疗效。因此,单分子GLP-1/GIP双重受体激动剂可有效解决现有单靶药物的不足,通过同时激活多个与代谢相关的靶点,达到更佳的降糖与减重作用,开发潜力非常大。

发明内容

[0005] 本申请是基于发明人对以下问题的发现和认识作出的:

[0006] 单分子GLP-1/GIP双重受体激动剂可有效解决现有单靶药物的不足,发明人通过大量实验对野生型GLP-1和GIP进行突变,获得了多种能同时识别GLP-1受体与GIP受体的GLP-1/GIP双靶多肽,利用连接肽将所述GLP-1/GIP双靶多肽与免疫球蛋白的Fc片段进行融合获得融合蛋白,发明人发现所述融合蛋白具有良好的同时激活GLP-1受体与GIP受体的能力,并且不同的突变,会对GLP-1受体与GIP受体的激动活性发生提高或下降的影响。

[0007] 因此,在本发明的第一方面,本发明提出了一种GLP-1/GIP双靶多肽。根据本发明

的实施例,包含第一多肽,所述第一多肽具有如下氨基酸序列: $X_1X_2X_3GTFX_4SDYSX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}FX_{15}X_{16}WLX_{17}X_{18}X_{19}$,其中, X_1 为Y或H, X_2 为A或G或S, X_3 为E或Q, X_4 为I或T, X_5 为I或K, X_6 为A或Y或L或I, X_7 为M或L, X_8 为D或E, X_9 为K或E, X_{10} 为I或Q或K或E或L, X_{11} 为H或A或R, X_{12} 为A或Q或V, X_{13} 为K或Q或R或H, X_{14} 为D或E或A或L, X_{15} 为V或I, X_{16} 为N或E或D或Q, X_{17} 为L或I或K或V, X_{18} 为A或E或K, X_{19} 为Q或G; $X_1\sim X_{13}$ 不同时满足 X_1 为Y, X_2 为A, X_3 为E, X_4 为I, X_5 为I, X_6 为A, X_7 为M, X_8 为D, X_9 为K, X_{10} 为I, X_{11} 为H, X_{12} 为Q, X_{13} 为Q, X_{14} 为D, X_{15} 为V, X_{16} 为N, X_{17} 为L, X_{18} 为A, X_{19} 为Q。发明人将野生型GLP-1和GIP进行定点突变,获得的GLP-1/GIP双靶多肽与GLP-1和/或GIP受体均具有一定的结合活性。

[0008] 根据本发明的实施例,上述GLP-1/GIP双靶多肽还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0009] 根据本发明的实施例,包含第一多肽,所述第一多肽具有如下氨基酸序列: $X_1X_2EGTFTSDYSIX_6LDKX_{10}AQX_{13}X_{14}FX_{15}X_{16}WLX_{17}AX_{19}$,其中, X_1 为Y或H, X_2 为A或G或S, X_6 为A或Y或L, X_{10} 为I或Q或K或L, X_{13} 为Q或R, X_{14} 为D或E或A, X_{15} 为V或I, X_{16} 为E或D或Q, X_{17} 为L或I或K, X_{19} 为Q或G;其中,所述第一多肽不包含YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQ氨基酸序列(SEQ ID NO:122)。发明人将野生型GLP-1和GIP进行定点突变,获得的GLP-1/GIP双靶多肽具有良好的与GLP-1和/或GIP受体结合的生物活性,由此,可以同时激活GLP-1受体与GIP受体,所述GLP-1/GIP双靶多肽具有减重和降糖的双重功能。

[0010] 根据本发明的实施例,所述GLP-1/GIP双靶多肽进一步包含第二多肽,所述第二多肽具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。SEQ ID NO:1具体氨基酸序列为:GPSSGAPPPS。

[0011] 根据本发明的实施例,所述第一多肽的C末端氨基酸与所述第二多肽的N末端氨基酸相连。

[0012] 根据本发明的实施例,所述GLP-1/GIP双靶多肽具有表1所示氨基酸序列中的至少之一。

[0013] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种融合蛋白。根据本发明的实施例,包括:(1)第一方面所述的GLP-1/GIP双靶多肽;(2)Fc片段,所述GLP-1/GIP双靶多肽的C端与所述Fc片段的N端相连。根据本发明实施例的融合蛋白同样具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,能有效控制或降低体重和血糖水平。

[0014] 根据本发明的实施例,上述融合蛋白还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0015] 根据本发明的实施例,所述Fc片段为人源IgG4的Fc片段或其变体。

[0016] 根据本发明的实施例,所述Fc片段包括SEQ ID NO:113所示的氨基酸序列。

[0017] GluSerLysTyrGlyProProCysProProCysProAlaProGluAlaAlaGlyGlyProSerValPheLeuPheProProLysProLysAspThrLeuMetIleSerArgThrProGluValThrCysValValValAspValSerGlnGluAspProGluValGlnPheAsnTrpTyrValAspGlyValGluValHisAsnAlaLysThrLysProArgGluGluGlnPheAsnSerThrTyrArgValValSerValLeuThrValLeuHisGlnAspTrpLeuAsnGlyLysGluTyrLysCysLysValSerAsnLysGlyLeuProSerSerIleGluLysThrIleSerLysAlaLysGlyGlnProArgGluProGlnValTyrThrLeuProProSerGlnGluGluMetThrLysAsnGlnValSerLeuThrCysLeuValLysGlyPheTyrProSerAspIleAlaValGluTrpGluSerAsnGlyGlnProGluAsnAsnTyrLysThrThrProProValLeuAspSerAspGlySerPhePheLeuTyrSerArgLeuThrValAspLysSerArgTrpGln

GluGlyAsnValPheSerCysSerValMetHisGluAlaLeuHisAsnHisTyrThrGlnLysSerLeuSerLeuSerLeuGly (SEQ ID NO:113)。

[0018] 根据本发明的实施例,进一步包括连接肽,所述连接肽具有SEQ ID NO:114所示的氨基酸序列。

[0019] GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerAla (SEQ ID NO:114)。

[0020] 根据本发明的实施例,所述连接肽的N端与所述GLP-1/GIP双靶多肽的C端相连,所述连接肽的C端与所述Fc片段的N端相连。

[0021] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种核酸分子。根据本发明的实施例,所述核酸分子编码第一方面所述的GLP-1/GIP双靶多肽或第二方面所述的融合蛋白。根据本发明实施例的核酸分子编码的GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白均同样具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,能有效控制或降低体重和血糖水平。

[0022] 在本发明的第四方面,本发明提出了一种表达载体。根据本发明的实施例,包含第三方面所述的核酸分子。

[0023] 根据本发明的实施例,上述表达载体还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0024] 根据本发明的实施例,所述表达载体为真核表达载体。

[0025] 在本发明的第五方面,本发明提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例,携带第三方面所述的核酸分子或第四方面所述的表达载体。根据本发明实施例的重组细胞可表达所述GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白,所述GLP-1/GIP双靶多肽和融合蛋白具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,能有效控制或降低体重和血糖水平。

[0026] 在本发明的第六方面,本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例,包含第一方面所述的GLP-1/GIP双靶多肽、第二方面所述的融合蛋白、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的表达载体、或第五方面所述的重组细胞。所述药物组合物可包括:药学上可接受的辅剂,所述药学上可接受的辅剂包括稳定剂、湿润剂、乳化剂、粘合剂、等渗剂的至少之一;所述药物组合物呈片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂、溶液剂、悬浮剂、冻干制剂的至少一种。根据本发明实施例的药物组合物具有长效的发挥减重和/或降糖的功能,能有效的控制或降低体重和血糖水平。

[0027] 在本发明的第七方面,本发明提出了第一方面所述的GLP-1/GIP双靶多肽、第二方面所述的融合蛋白、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的表达载体、或第五方面所述的重组细胞在制备药物中的用途。根据本发明的实施例,所述药物用于控制或降低血糖和体重。

[0028] 在本发明的第八方面,本发明提出了一种制备第二方面所述的融合蛋白的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:1) 构建第四方面所述的表达载体;2) 将所述表达载体导入宿主细胞中,获得重组细胞,以表达所述融合蛋白。根据本发明实施例的方法制备的融合蛋白具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,可有效控制或降低体重和血糖水平。

[0029] 在本发明的第九方面,本发明提出了一种降低患者血糖和/或体重的方法。根据本发明的实施例,包括向患者施用以下中的至少之一:1) 第一方面所述的GLP-1/GIP双靶多

肽;2) 第二方面所述的融合蛋白;3) 第三方面所述的核酸分子;4) 第四方面所述的表达载体;5) 第五方面所述的重组细胞;以及6) 第六方面所述的药物组合物。根据本发明实施例的方法可以有效的长效控制或降低患者的体重和/或血糖水平。

[0030] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0031] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0032] 图1显示了本发明实施例的HEC-G123组、HEC-G128组、HEC-G131组、HEC-G132组不同时间血糖值;

[0033] 图2显示了本发明实施例的HEC-G123组、HEC-G128组、HEC-G131组、HEC-G132组曲线下面积;

[0034] 图3显示了本发明实施例的HEC-G113组、HEC-G122组、HEC-G126组、HEC-G127组不同时间血糖值;

[0035] 图4显示了本发明实施例的HEC-G113组、HEC-G122组、HEC-G126组、HEC-G127组曲线下面积;

[0036] 图5显示了本发明实施例的HEC-G20在db/db小鼠模型中的体内降血糖效果;

[0037] 图6显示了本发明实施例的HEC-G20在db/db小鼠模型中的糖化血红蛋白值;

[0038] 图7显示了本发明实施例的HEC-G115及HEC-G124长期重复给药对DIO模型的肥胖小鼠体重影响;

[0039] 图8显示了本发明实施例的HEC-G115及HEC-G124长期重复给药对DIO模型的肥胖小鼠累计摄食量影响;

[0040] 图9显示了本发明实施例的融合蛋白的结构图,其中,融合蛋白包括三个结构域,从N端到C端依次为:GLP-1/GIP双受体激动剂(GLP-1/GIP双靶多肽)、连接肽和Fc片段。

具体实施方式

[0041] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0042] 此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本发明的描述中,“多个”的含义是至少两个,例如两个,三个等,除非另有明确具体的限定。

[0043] 需要注意的是,在文中,术语“受体激动剂”是指作用于受体,能引起受体激活,从而引起生物效应的物质,这种效应可能是细胞活性某一特定表现的增强或减弱。

[0044] 需要注意的是,在本文中,术语“GLP-1/GIP双受体激动剂”、“GLP-1/GIP双靶多肽”或“重组多肽”均指,野生型GLP-1、GIP蛋白分子经过定点突变后获得的多肽,本发明中对野生型GLP-1、GIP蛋白分子经过定点突变后获得的可以同时激活GLP-1受体和GIP受体的多肽的氨基酸序列如表1所示。

[0045] 需要说明的是,在文中,术语“核酸分子”可以是任何包含脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸的聚合物,包括但不限于经过修饰的或者未经修饰的DNA、RNA,其长度不受任何特别限制。对于用于构建重组细胞的构建体,优选所述核酸为DNA,因为DNA相对于RNA而言,其更稳定,并且易于操作。本申请所述的“核酸”实际包括互补双链的任意一条,或者两条。本领域技术人员还可以理解,利用一条链可以检测另一条链,反之亦然。

[0046] 需要说明的是,本申请所述的“构建体”是指这样的一种遗传载体,其包含特定核酸序列,并且能够将目的核酸序列转入宿主细胞中,以获得重组细胞。根据本发明的实施例,构建体的形式不受特别限制。根据本发明的实施例,其可以为质粒、噬菌体、人工染色体、粘粒(Cosmid)、病毒的至少一种,优选质粒。质粒作为遗传载体,具有操作简单,可以携带较大片段的性质,便于操作和处理。质粒的形式也不受特别限制,既可以是环形质粒,也可以是线性质粒,即可以是单链的,也可以是双链的。本领域技术人员可以根据需要进行选择。

[0047] 本发明提供一种GLP-1/GIP双靶多肽,包含第一多肽,所述第一多肽具有如下氨基酸序列: $X_1X_2X_3GTFX_4SDYSX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}FX_{15}X_{16}WLX_{17}X_{18}X_{19}$,其中, X_1 为Y或H, X_2 为A或G或S, X_3 为E或Q, X_4 为I或T, X_5 为I或K, X_6 为A或Y或L或I, X_7 为M或L, X_8 为D或E, X_9 为K或E, X_{10} 为I或Q或K或E或L, X_{11} 为H或A或R, X_{12} 为A或Q或V, X_{13} 为K或Q或R或H, X_{14} 为D或E或A或L, X_{15} 为V或I, X_{16} 为N或E或D或Q, X_{17} 为L或I或K或V, X_{18} 为A或E或K, X_{19} 为Q或G; $X_1 \sim X_{13}$ 不同时满足 X_1 为Y, X_2 为A, X_3 为E, X_4 为I, X_5 为I, X_6 为A, X_7 为M, X_8 为D, X_9 为K, X_{10} 为I, X_{11} 为H, X_{12} 为Q, X_{13} 为Q, X_{14} 为D, X_{15} 为V, X_{16} 为N, X_{17} 为L, X_{18} 为A, X_{19} 为Q。发明人将野生型GLP-1和GIP进行定点突变,获得的GLP-1/GIP双靶多肽与GLP-1和/或GIP受体均具有一定的结合活性。

[0048] 根据本发明一个具体的实施例,所述GLP-1/GIP双靶多肽包含第一多肽,所述第一多肽具有如下氨基酸序列: $X_1X_2EGTFTSDYSIX_6LDKX_{10}AQX_{13}X_{14}FX_{15}X_{16}WLX_{17}AX_{19}$,其中, X_1 为Y或H, X_2 为A或G或S, X_6 为A或Y或L, X_{10} 为I或Q或K或L, X_{13} 为Q或R, X_{14} 为D或E或A, X_{15} 为V或I, X_{16} 为E或D或Q, X_{17} 为L或I或K, X_{19} 为Q或G;其中,所述第一多肽不包含YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQ(SEQ IDNO:122)氨基酸序列。发明人将野生型GLP-1和GIP进行定点突变,获得的GLP-1/GIP双靶多肽可分别激活GLP-1受体与GIP受体,所述GLP-1/GIP双靶多肽具有减重和降糖的双重功能。

[0049] 根据本发明的一个具体的实施例,所述GLP-1/GIP双靶多肽进一步包含第二多肽,所述第二多肽具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。SEQ ID NO:1具体氨基酸序列为:GPSSGAPPPS。

[0050] 根据本发明的一个具体的实施例,所述第一多肽的C末端氨基酸与所述第二多肽的N末端氨基酸相连。

[0051] 根据本发明的一个具体的实施例,所述GLP-1/GIP双靶多肽具有表1所示氨基酸序列中的至少之一。

[0052] 表1:

[0053]

序号	多肽名称	GLP-1/GIP 双靶多肽的氨基酸序列
1	CG01	YAEGT FTSDY SIYLD KQAAK EFVNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2)
2	CG02	YGEGT FTSDY SIYLD KQAAK EFVNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 3)
3	CG03	YGEGT FTSDY SIALD KQAAK EFVNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 4)
6	CG06	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 5)
7	CG07	YGEGT FTSDY SIALD KIAQK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 6)
8	CG08	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 7)
9	CG09	YGEGT FTSDY SIALD KIAAK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 8)
10	CG10	YGEGT FTSDY SIALD KQAAK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 9)
11	CG11	YGEGT FTSDY SIALD KQRAK DFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 10)

[0054]

13	CG13	YSEGT FTSDY SKLLE EEA VR LFIEW LLAG (SEQ ID NO: 11)
14	CG14	YSEGT FTSDY SKLLE EEA VR LFIEW LVKG (SEQ ID NO: 12)
15	CG20	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 13)
16	CG21	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 14)
17	CG22	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LVKG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 15)
18	CG23	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 16)
19	CG24	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 17)
20	CG25	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 18)
21	CG26	YGEGT FISDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 19)
23	CG28	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVQW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 20)
24	CG29	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 21)
26	CG31	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR LFIEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 22)
27	CG32	YGQGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 23)
28	CG33	YAEGT FTSDY SKLLE EEA VR LFIEW LLAG (SEQ ID NO: 24)
29	CG34	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 25)
30	CG35	YAEGT FTSDY SIYLD KLAQQ EFIDW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 26)
32	CG37	YAEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFIEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 27)
33	CG38	YAEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 28)
34	CG39	YAEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 29)
35	CG40	HGEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 30)
36	CG41	HGQGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 31)
38	CG43	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG (SEQ ID NO: 32)
39	CG44	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 33)
40	CG45	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LIAG (SEQ ID NO: 34)
41	CG46	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 35)
42	CG47	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36)
43	CG48	YAEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 37)
47	CG52	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG (SEQ ID NO: 38)
48	CG53	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 39)
49	CG54	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR AFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 40)
50	CG55	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 41)
51	CG56	YGEGT FTSDY SIALD KLAQQ DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 42)
52	CG57	YGEGT FTSDY SIALD KKAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 43)
54	CG59	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFIEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 44)
55	CG60	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ EFIDW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 45)
56	CG61	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 46)
58	CG63	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 47)
59	CG64	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 48)
60	CG65	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 49)
61	CG66	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 50)
62	CG67	YSEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 51)
63	CG68	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LVAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 52)
64	CG69	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 53)
65	CG70	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR EFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 54)
66	CG71	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR EFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 55)
67	CG72	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 56)

[0055]

68	CG73	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR AFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 57)
69	CG74	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 58)
70	CG75	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 59)
71	CG76	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVQW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 60)
72	CG77	YGEGT FTSDY SIILD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 61)
73	CG78	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 62)
74	CG79	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEW LLAG (SEQ ID NO: 63)
75	CG80	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEY LLAG (SEQ ID NO: 64)
76	CG81	YGEGT FTSDY SIALD KQAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 65)
77	CG82	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 66)
78	CG83	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 67)
79	CG84	YGEGT FTSDY SIYLD KQHQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 68)
80	CG85	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFINW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 69)
81	CG86	YGEGT FTSDY SIYLD KKHQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 70)
82	CG87	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 71)
83	CG88	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 72)
84	CG89	YGEGT FTSDY SIALD KQAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 73)
85	CG90	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 74)
86	CG91	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 75)
87	CG92	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQR DFVNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 76)
88	CG93	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 77)
89	CG94	YGEGT FTSDY SIYMD KLAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 78)
90	CG95	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFVNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 79)
91	CG96	YSEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 80)
92	CG97	YSEGT FTSDY SIALD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 81)
93	CG98	YSEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 82)
94	CG99	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 83)
95	CG100	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFINW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 84)
96	CG101	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 85)
97	CG102	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFINW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 86)
98	CG103	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 87)
99	CG104	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 88)
100	CG105	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 89)
101	CG106	YGEGT FTSDY SILLD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 90)
102	CG107	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQH DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 91)
107	CG112	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQH AFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 92)
108	CG113	HSEGT FTSDY SILLD KIAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 93)
109	CG114	HSEGT FTSDY SILLD KIAQH DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 94)
110	CG115	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95)
111	CG116	HSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96)
112	CG117	HSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLEG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 97)
113	CG118	HSEGT FTSDY SILLD KIAQK EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 98)
114	CG119	YSEGT FTSDY SILLD KIAQK EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 99)
115	CG120	HSEGT FTSDY SILLD KIAQK EFIEW LLEG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 100)
116	CG121	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 101)
117	CG122	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 102)

[0056]

118	CG123	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFVQW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 103)
119	CG124	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 104)
120	CG125	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 105)
121	CG126	YEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 106)
122	CG127	YSEGT FTSDY SILLD KKAQR DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 107)
123	CG128	YEGT FTSDY SILLD KKAQR DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 108)
124	CG129	YSEGT FTSDY SILLD KKAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 109)
125	CG130	YSEGT FTSDY SILLD KKAQR DFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110)
126	CG131	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 111)
127	CG132	YEGT FTSDY SILLD KIAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112)
128	CG133	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 117)
129	CG134	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 118)
130	CG135	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ EFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 119)
131	CG136	YSEGT FTSDY SILLD KKAQQ DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 120)
132	CG137	YSEGT FTSDY SILLD KKAQQ DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 121)

[0057] 根据本发明的一个具体的实施例,所述的GLP-1/GIP双靶多肽具有如下所示的氨基酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:25-28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:50-51、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:101-107、SEQ ID NO:110-112。

[0058] 本发明提供一种融合蛋白,包括:(1)前面所述的GLP-1/GIP双靶多肽;(2)Fc片段,所述GLP-1/GIP双靶多肽的C端与所述Fc片段的N端相连,根据本发明的具体实施例的融合蛋白同样具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,能有效控制或降低体重和血糖水平。

[0059] 根据本发明的一个具体的实施例,所述Fc片段为人源IgG₄的Fc片段或其突变体。在GLP-1/GIP双靶多肽上融合免疫球蛋白的Fc片段可以延长融合蛋白在体内循环半衰期。

[0060] 根据本发明的一个具体的实施例,所述Fc片段包括SEQ ID NO:113所示的氨基酸序列。

[0061] GluSerLysTyrGlyProProCysProProCysProAlaProGluAlaAlaGlyGlyProSerValPheLeuPheProProLysProLysAspThrLeuMetIleSerArgThrProGluValThrCysValValValAspValSerGlnGluAspProGluValGlnPheAsnTrpTyrValAspGlyValGluValHisAsnAlaLysThrLysProArgGluGluGlnPheAsnSerThrTyrArgValValSerValLeuThrValLeuHisGlnAspTrpLeuAsnGlyLysGluTyrLysCysLysValSerAsnLysGlyLeuProSerSerIleGluLysThrIleSerLysAlaLysGlyGlnProArgGluProGlnValTyrThrLeuProProSerGlnGluGluMetThrLysAsnGlnValSerLeuThrCysLeuValLysGlyPheTyrProSerAspIleAlaValGluTrpGluSerAsnGlyGlnProGluAsnAsnTyrLysThrThrProProValLeuAspSerAspGlySerPhePheLeuTyrSerArgLeuThrValAspLysSerArgTrpGlnGluGlyAsnValPheSerCysSerValMetHisGluAlaLeuHisAsnHisTyrThrGlnLysSerLeuSerLeuSerLeuGly (SEQ ID NO:113)。

[0062] 根据本发明的一个具体的实施例,进一步包括连接肽,所述连接肽具有SEQ ID NO:114所示的氨基酸序列。

[0063] GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerAla (SEQ ID NO:114)。

[0064] 根据本发明的一个具体的实施例,所述连接肽的N端与所述GLP-1/GIP双靶多肽的C端相连,所述连接肽的C端与所述Fc片段的N端相连。

[0065] 本发明提供一种核酸分子,所述核酸分子编码前面所述的GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白。根据本发明具体实施例的核酸分子编码的GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白同样具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,能有效控制或降低体重和血糖水平。

[0066] 本发明提供一种表达载体。根据本发明的实施例,包含前面所述编码GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白的核酸分子。在将上述核酸分子连接到载体上时,可以将核酸分子与载体上的控制元件直接或者间接相连,只要这些控制元件能够控制核酸分子的翻译和表达等即可。当然这些控制元件可以直接来自于载体本身,也可以是外源性的,即并非来自于载体本身。当然,核酸分子与控制元件进行可操作地连接即可。本文中“可操作地连接”是指将外源基因连接到载体上,使得载体内的控制元件,例如转录控制序列和翻译控制序列等等,能够发挥其预期的调节外源基因的转录和翻译的功能。

[0067] 根据本发明的一个具体的实施例,所述表达载体为真核表达载体。

[0068] 本发明提供一种重组细胞。根据本发明的实施例,携带前面所述编码GLP-1/GIP双靶多肽的核酸分子或融合蛋白的核酸分子或前面所述的表达载体。根据本发明具体实施例的重组细胞可表达所述GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白,所述GLP-1/GIP双靶多肽和融合蛋白具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,能有效控制或降低体重和血糖水平。

[0069] 根据本发明的一个具体的实施例,所述重组细胞为哺乳动物细胞,如:CHO细胞。

[0070] 根据本发明的一个具体实施例,所述重组细胞不包括动物生殖细胞、受精卵或胚胎干细胞。

[0071] 本发明提供一种药物组合物,包含前面所述的GLP-1/GIP双靶多肽、前面所述的融合蛋白、前面所述编码GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白的核酸分子、前面所述的表达载体、或前面所述的重组细胞。所述药物组合物可包括:药学上可接受的辅剂,所述药学上可接受的辅剂包括稳定剂、湿润剂、乳化剂、粘合剂、等渗剂的至少之一;所述药物组合物呈片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂、溶液剂、悬浮剂、冻干制剂的至少一种。根据本发明具体实施例的药物组合物用于治疗糖尿病、肥胖症、脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝疾病、非酒精性脂肪性肝炎、血脂异常和代谢综合征等疾病,具有长效的发挥减重和/或降糖的功能,能有效的控制或降低体重和血糖水平。

[0072] 本发明提供前面所述的GLP-1/GIP双靶多肽、前面所述的融合蛋白、前面所述编码GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白的核酸分子、前面所述的表达载体、前面所述的重组细胞在制备药物中的用途。根据本发明具体的实施例,所述药物用于控制或降低血糖和体重。

[0073] 本发明提供一种制备前面所述的融合蛋白的方法,所述方法包括:1) 构建前面所述的表达载体;2) 将所述表达载体导入宿主细胞中,获得重组细胞,以表达所述融合蛋白。根据本发明具体实施例的方法制备的融合蛋白具有优良的与GLP-1和/或GIP受体的结合活性,具有减重和降糖的双重功能,可有效控制或降低体重和血糖水平。

[0074] 进一步地,本发明所述的“GLP-1/GIP双靶多肽”或“重组多肽”,不仅可以通过重组表达制备得到,还可以通过化学合成的方法制备,而无论通过何种制备方法得到,只要具有本发明所述的降糖或减重活性之一,均在本发明的保护范围内。

[0075] 根据本发明的一个具体实施例,所述重组细胞不包括动物生殖细胞、受精卵或胚

胎干细胞。

[0076] 本发明提供一种降低患者血糖和/或体重的方法,包括向患者施用以下中的至少之一:1)前面所述的GLP-1/GIP双靶多肽;2)前面所述的融合蛋白;3)前面所述编码GLP-1/GIP双靶多肽或融合蛋白的核酸分子;4)前面所述的表达载体;5)前面所述的重组细胞;以及6)前面所述的药物组合物。根据本发明具体实施例的方法可以有效且长效的控制或降低患者的体重和/或血糖水平、治疗脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝疾病、非酒精性脂肪性肝炎、血脂异常和代谢综合征等疾病。本发明所述的“Fc片段”,可以是人IgG4 Fc片段,也可以是IgG4 Fc片段的变体,所述的突变体相比野生型的IgG4 Fc存在一个或多个氨基酸位点的突变。

[0077] 本发明的GLP-1/GIP双靶多肽的名称以“CG”开头,比如“CG01”、“CG02”等,GLP-1/GIP双靶融合蛋白的名称以“HEC-G”开头,比如“HEC-G01”、“HEC-G02”等。

[0078] 下面参考具体实施例,对本发明进行描述,需要说明的是,下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到,这些实施例仅仅是描述性的,而不以任何方式限制本发明。

[0079] 实施例1

[0080] 本实施例提供一种合成本发明多肽的方法。

[0081] 1、在肽合成仪上进行固相肽合成:将树脂放入150ml反应器中,并加入50ml二氯甲烷(DCM)浸泡2小时。用N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤树脂,然后抽干,如此重复四次,将树脂抽干。称取Fmoc-C端第一个氨基酸(带保护)+DCM+N,N-二异丙基乙胺(DIEA)加入到反应器中,然后将反应器置于30℃的摇床中反应2小时。用甲醇溶液封闭(甲醇:DIEA:DCM=1:1:2)半小时,然后用DMF洗涤四次,抽干。向反应器中加入20%哌啶溶液,脱去Fmoc保护基团。脱保护后用DMF洗涤四次,然后抽干。

[0082] 2、称取Fmoc-C端第二个氨基酸(带保护)+1-羟基苯并三唑(HOBT)+N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)加入到反应器中,然后将反应器置于30℃的摇床中反应1小时。取少量树脂检测,用茚三酮法检测,若树脂有颜色,说明缩合不完全,继续反应;待反应完全后,用DMF洗涤树脂四次,然后抽干。向反应器中加入一定量的20%哌啶(哌啶/DMF=1:4),放在脱色摇床上摇晃20min,以此脱去树脂上的Fmoc保护基团。脱完保护后用DMF洗涤四次,然后抽干检测保护是否脱去。

[0083] 3、按照步骤2依次连接氨基酸,最后用切割试剂将多肽保护基团全部切除,并从树脂上切割下来,送纯化。

[0084] 4、合成得到目标肽后,通过反相液相色谱纯化将目标肽段与杂质分离,将所收集的目标肽冻干成粉末,并送QC质检并进行纯度与质谱鉴定。经HPLC检测,纯度均大于95%。质谱鉴定多肽分子量都与理论分子量一致。表2为所合成的多肽化合物。

[0085] 表2:

[0086]

多肽的名称	GLP-1/GIP双靶多肽序列
CG113	HSEGT FTSDY SILLD KIAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:93)
CG115	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:95)
CG121	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:101)
CG122	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:102)

CG123	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR Efvqw LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:103)
CG124	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR Efvqw LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:104)
CG125	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:105)
CG126	YEGGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:106)
CG127	YSEGT FTSDY SILLD KKAQR DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:107)
CG133	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:117)
CG134	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:118)
CG135	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ EFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:119)
CG136	YSEGT FTSDY SILLD KKAQQ DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:120)
CG137	YSEGT FTSDY SILLD KKAQQ DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:121)

[0087] 实施例2测定多肽的体外活性

[0088] 通过将多肽样品、人GLP-1 (购买) 和人GIP (购买) 分别作用于表达GLP-1R或GIPR的HEK293细胞,具体操作为:

[0089] 1) 在金唯智公司优化并常规合成基因GIPR和GLP-1R,将基因克隆至载体pUC57-Amp,制备mini-scale重组质粒DNA和含有该重组质粒的穿刺菌;

[0090] 2) 取pUC57-GIPR重组质粒DNA用HindIII与EcoRI双酶切,取pUC57-GLP-1R用HindIII与XhoI双酶切,酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,用洁净刀片切下目标条带,使用胶回收试剂盒回收目的片段,具体实验操作按照试剂盒说明书进行;

[0091] 3) 目标片段酶切回收产物与载体质粒pcDNA3.1片段经T4 ligase连接后转化DH5 α 感受态细胞,涂布平板分离单菌落,挑取转化子扩培进行酶切验证及测序验证。

[0092] 4) 接种步骤3) 获得的经测序后验证含目标产物融合蛋白的菌液200mL用于质粒大提,使用试剂盒为:PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit,按说明书进行操作。质粒经PCR验证及酶切验证无误后,使用PvuI限制性内切酶进行线性化。最后采用乙醇沉淀法回收质粒。

[0093] 5) 宿主细胞为HEK293,转染前一天,将细胞按照 2×10^6 cells/孔的密度铺6孔板,添加量为1mL/孔。使用Lipofectamine 3000脂质体转染法将回收的线性化质粒转染至HEK293细胞中,加G418筛选得到混合株后,进行有限稀释分离得到单克隆,进行活性检测验证。

[0094] 用cAMP检测试剂盒 (Cisbio,62AM6PEC)、依据操作说明书所述步骤检测受体细胞所产生cAMP,具体步骤如下:

[0095] 1) 配制Assay buffer:取完全培养液 (DMEM培养基+10%FBS),再加入4/1000的500mM IBMX母液,cAMP-d2工作液和anti-cAMP-crytate工作液按试剂盒说明书进行配制;

[0096] 2) 将待测样品及对照样品人源GLP-1 (购买) 和GIP (购买),稀释至初始浓度为500nM的母液,然后按20 μ L加入到80 μ L Assay buffer (稀释5倍) 的梯度逐步稀释,包括母液共计8个化合物梯度;

[0097] 3) 细胞悬液制备:液氮罐中取出细胞HEK293-GLP-1R及HEK293-GIPR后,立即37 $^{\circ}$ C水浴,1.5min内未完全融化后,于超净台将细胞逐滴加入至装有8mL温热培养基的15mL离心管中,900rpm离心5min,弃上清,1mL完全培养液将细胞重悬后 (吹打15次),立即取20 μ L悬液与等体积的台盼蓝混合,取20 μ L计算活细胞数后,将细胞稀释至 4×10^5 cells/mL;

[0098] 4) 将384孔板划分为GLP-1R细胞、GIPR细胞区域,用12道变道可调分液器按每孔5 μ L将细胞悬液加入相应区域的孔中,再用12道变道可调分液器将供试品和阳性对照品梯度稀释液加入对应细胞的384孔板中,每孔5 μ L(相同浓度样品平行2个复孔);阴性对照:10 μ L assay buffer/每孔,每块384孔板设置3个孔,盖上白色封板膜,放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱,半小时后取出;

[0099] 5) 临用前用Hi-range试剂盒中lysis buffer将cAMP-d2工作液和anti-cAMP-crytate工作液稀释20倍后1:1混合均匀配成cAMP检测试剂混合溶液,样品组每孔加入10 μ L cAMP检测试剂混合溶液,阴性对照每孔加入5 μ L lysis buffer和5 μ L稀释后的anti-cAMP-crytate工作液,盖上白色盖子,于室温避光放置1h;

[0100] 6) 于多功能酶标仪中检测665nm、620nm的荧光值;

[0101] 7) 以此建立量效曲线,并计算EC50值、进行相互比较。

[0102] 具体结果如表3所示,所有多肽都表现出较强的GIPR激动活性,而在GLP-1R激动活性方面存在一定差异,其中CG133与CG134的GLP-1R激动活性较弱。

[0103] 表3:

GLP-1/GIP 多肽名称	多肽的 Ec50(nM)	
	GLP-1R	GIPR
CG113	0.164	0.067
CG115	0.291	0.005
CG121	0.322	0.018
CG122	0.191	0.016
CG123	0.879	0.044
CG124	0.232	0.041
CG125	0.205	0.073
CG126	0.918	0.027
CG127	0.364	0.084
CG133	8.181	0.017
CG134	2.146	0.012
CG135	0.558	0.015
CG136	1.107	0.050
CG137	0.250	0.061
人 GLP-1	0.082	N/A
人 GIP	N/A	0.119

[0105] 实施例3表达载体的构建

[0106] 本实施例采用分子克隆的方法,将GLP-1/GIP双受体激动剂多肽与带有连接肽Fc片段进行融合。其中,GLP-1野生型氨基酸序列为:HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFWAW LKGRG (SEQ ID NO:115),GIP野生型氨基酸序列为:YAEGT FISDY SIAMD KIHQQ DFNW LLAQ (SEQ ID NO:116),将GLP-1、GIP野生型氨基酸序列突变后获得所述GLP-1/GIP双受体激动剂多肽;所合成序列经双酶切后,插入到哺乳动物细胞表达载体的相同酶切位点之间;或者在已有载体的基础上设计定点突变引物,通过聚合酶链式反应(PCR)构建一系列突变载体,送测序公司经测序验证正确后,采用OMEGA公司的去内毒素质粒抽提试剂盒(Endo-free Plasmid Mini kit II)提取质粒载体,货号D6950-01,并将质粒载体于-20 $^{\circ}$ C进行保藏备用。表4为GLP-1/GIP双靶融合蛋白中GLP-1/GIP双靶多肽序列。

[0107] 表4:

序号	融合蛋白名称	融合蛋白中的双靶多肽的氨基酸序列
1	HEC-G01	YAEGT FTSDY SIYLD KQAAK EFNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2)
2	HEC-G02	YGEGT FTSDY SIYLD KQAAK EFNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 3)
3	HEC-G03	YGEGT FTSDY SIALD KQAAK EFNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 4)
6	HEC-G06	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 5)
7	HEC-G07	YGEGT FTSDY SIALD KIAQK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 6)
8	HEC-G08	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 7)
9	HEC-G09	YGEGT FTSDY SIALD KIAQK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 8)
10	HEC-G10	YGEGT FTSDY SIALD KQAAK AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 9)
11	HEC-G11	YGEGT FTSDY SIALD KQRAK DFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 10)
13	HEC-G13	YSEGT FTSDY SKLLE EEA VR LFIEW LLAG (SEQ ID NO: 11)
14	HEC-G14	YSEGT FTSDY SKLLE EEA VR LFIEW LVKG (SEQ ID NO: 12)
15	HEC-G20	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 13)
16	HEC-G21	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 14)
17	HEC-G22	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LVKG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 15)
18	HEC-G23	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 16)
19	HEC-G24	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 17)
20	HEC-G25	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 18)
21	HEC-G26	YGEGT FISDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 19)
23	HEC-G28	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVQW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 20)
24	HEC-G29	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIQW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 21)
26	HEC-G31	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR LFIEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 22)
27	HEC-G32	YGQGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 23)
28	HEC-G33	YAEGT FTSDY SKLLE EEA VR LFIEW LLAG (SEQ ID NO: 24)
29	HEC-G34	YGEGT FTSDY SIYLD KQQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 25)
30	HEC-G35	YAEGT FTSDY SIYLD KLAQQ EFIDW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 26)
32	HEC-G37	YAEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFIEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 27)
33	HEC-G38	YAEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 28)
34	HEC-G39	YAEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 29)
35	HEC-G40	HGEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 30)
36	HEC-G41	HGQGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 31)
38	HEC-G43	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG (SEQ ID NO: 32)
39	HEC-G44	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 33)
40	HEC-G45	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LIAG (SEQ ID NO: 34)
41	HEC-G46	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 35)
42	HEC-G47	YGEGT FTSDY SIYLD KQQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36)
43	HEC-G48	YAEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 37)
47	HEC-G52	YGEGT FTSDY SIYLD KQQR DFVEW LLAG (SEQ ID NO: 38)
48	HEC-G53	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 39)
49	HEC-G54	YGEGT FTSDY SIYLD KQQR AFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 40)
50	HEC-G55	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 41)
51	HEC-G56	YGEGT FTSDY SIALD KLAQQ DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 42)
52	HEC-G57	YGEGT FTSDY SIALD KKAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 43)

[0108]

[0109]

54	HEC-G59	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFIEW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 44)
55	HEC-G60	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ EFIDW LKAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 45)
56	HEC-G61	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 46)
58	HEC-G63	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 47)
59	HEC-G64	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 48)
60	HEC-G65	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 49)
61	HEC-G66	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 50)
62	HEC-G67	YSEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 51)
63	HEC-G68	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LVAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 52)
64	HEC-G69	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 53)
65	HEC-G70	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR EFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 54)
66	HEC-G71	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR EFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 55)
67	HEC-G72	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 56)
68	HEC-G73	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR AFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 57)
69	HEC-G74	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 58)
70	HEC-G75	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 59)
71	HEC-G76	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFVQW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 60)
72	HEC-G77	YGEGT FTSDY SIILK KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 61)
73	HEC-G78	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 62)
74	HEC-G79	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEW LLAG (SEQ ID NO: 63)
75	HEC-G80	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFIEY LLAG (SEQ ID NO: 64)
76	HEC-G81	YGEGT FTSDY SIALD KQAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 65)
77	HEC-G82	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQR DFVEW LLAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 66)
78	HEC-G83	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 67)
79	HEC-G84	YGEGT FTSDY SIYLD KQHQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 68)
80	HEC-G85	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFINW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 69)
81	HEC-G86	YGEGT FTSDY SIYLD KKHQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 70)
82	HEC-G87	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 71)
83	HEC-G88	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 72)
84	HEC-G89	YGEGT FTSDY SIALD KQAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 73)
85	HEC-G90	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 74)
86	HEC-G91	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 75)
87	HEC-G92	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQR DFVNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 76)
88	HEC-G93	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 77)
89	HEC-G94	YGEGT FTSDY SIYMD KLAQQ AFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 78)
90	HEC-G95	YGEGT FTSDY SIYLD KLAQQ AFVNW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 79)
91	HEC-G96	YSEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 80)
92	HEC-G97	YSEGT FTSDY SIALD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 81)
93	HEC-G98	YSEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 82)
94	HEC-G99	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 83)
95	HEC-G100	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFINW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 84)
96	HEC-G101	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFIDW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 85)
97	HEC-G102	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQR DFINW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 86)
98	HEC-G103	YGEGT FTSDY SIALD KKAQR DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 87)
99	HEC-G104	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQQ DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 88)
100	HEC-G105	YGEGT FTSDY SIYLD KIAQR DFIEW LIAQ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 89)
101	HEC-G106	YGEGT FTSDY SILLD KKAQR DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 90)
102	HEC-G107	YGEGT FTSDY SIYLD KKAQH DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 91)

107	HEC-G112	YGEGT FTSDY SIYLD KQAQH AFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 92)
108	HEC-G113	HSEGT FTSDY SILLD KIAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 93)
109	HEC-G114	HSEGT FTSDY SILLD KIAQH DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 94)
110	HEC-G115	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95)
111	HEC-G116	HSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96)
112	HEC-G117	HSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLEG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 97)
113	HEC-G118	HSEGT FTSDY SILLD KIAQK EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 98)
114	HEC-G119	YSEGT FTSDY SILLD KIAQK EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 99)
115	HEC-G120	HSEGT FTSDY SILLD KIAQK EFIEW LLEG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 100)
116	HEC-G121	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR AFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 101)
117	HEC-G122	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 102)
118	HEC-G123	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFVQW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 103)
119	HEC-G124	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR EFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 104)
120	HEC-G125	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR AFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 105)
121	HEC-G126	YGEGT FTSDY SILLD KIAQR EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 106)
122	HEC-G127	YSEGT FTSDY SILLD KKAQR DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 107)
123	HEC-G128	YGEGT FTSDY SILLD KKAQR DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 108)
124	HEC-G129	YSEGT FTSDY SILLD KKAQR DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 109)
125	HEC-G130	YSEGT FTSDY SILLD KKAQR DFVQW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110)
126	HEC-G131	YSEGT FTSDY SILLD KIAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 111)
127	HEC-G132	YGEGT FTSDY SILLD KIAQR DFVEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112)
128	HEC-G133	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ DFVEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 117)
129	HEC-G134	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ EFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 118)
130	HEC-G135	YSEGT FTSDY SILLD KIAQQ EFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 119)
131	HEC-G136	YSEGT FTSDY SILLD KKAQQ DFIEW LLAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 120)
132	HEC-G137	YSEGT FTSDY SILLD KKAQQ DFIEW LIAG GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 121)

[0110]

[0111] 实施例4载体转染及在细胞中表达

[0112] 本实施例将CHO-S细胞复苏后传代培养,将细胞密度稀释约为 6×10^6 个/mL,采用 ExpiCHO Fectamine™ CHO Transfection Kit(ThermoFisher Scientific)进行转染,以50mL表达体系为例,具体实验操作如下:

[0113] 1)取2mL OptiPRO™ SFM Complexation Medium稀释质粒,质粒需要过滤除菌,终浓度为1 μ g/mL;

[0114] 2)取1.84mL OptiPRO™ SFM Complexation Medium加入160 μ L ExpiFectamine™ CHO Reagent;

[0115] 3)将步骤1和2溶液混合均匀的试剂加入细胞中,分别作好标记,置于摇床中,37℃,8%CO₂,140rpm培养18-22h;

[0116] 4)培养结束后,向转染细胞中分别补加ExpiFectamine™ CHO Enhancer 300 μ L及 ExpiCHO™ Feed 12mL;

[0117] 5)将步骤4)获得的转染细胞置于摇床中,37℃,8%CO₂,140rpm培养六天后收集细胞发酵液用于后续纯化。

[0118] 实施例5融合蛋白纯化及鉴定

[0119] 将细胞培养液离心收集上层清液,并用0.22 μ m滤膜过滤除去残余细胞碎片。对收集的细胞培养液采用Protein A层析柱进行纯化,收集目标峰,再用阴离子交换层析进一步精纯,蛋白最终用0.02M PBS洗脱收集,具体操作步骤如下:

[0120] 1)将细胞发酵液用50mL离心管收集,1000rpm低速离心10min;

[0121] 2)与此同时,用超纯水冲洗柱子和纯化系统5-10个柱体积;

- [0122] 3) 用0.45 μ m的超滤膜过滤离心后的上清,除去细胞沉淀;
- [0123] 4) 用0.02M的PBS缓冲液冲洗柱子5-10个柱体积,平衡柱子;
- [0124] 5) 将过滤后的上清进行流穿过柱,待样品全部流穿过柱完毕;
- [0125] 6) 再用0.02M的PBS缓冲液冲洗柱子5-10个柱体积,直至样品基线冲至“0”;
- [0126] 7) 之后用0.1M的乙酸-乙酸钠溶液洗脱样品至含有pH 8.0的Tris-HCl溶液的2.5mL的50mL离心管中;
- [0127] 8) 用0.1M的NaOH溶液冲洗柱子(5-10个柱体积),再生填料,并除去柱子中的一些杂质蛋白;
- [0128] 9) 用超纯水冲洗柱子5-10个柱体积;
- [0129] 10) 重复上述操作4)~9),直至所有样品上样结束;
- [0130] 11) 用20%乙醇冲洗系统,最后将柱子保存在乙醇当中,卸下柱子;
- [0131] 12) 从纯化仪上取下protein A预装柱,换上阴离子交换层析Q柱;
- [0132] 13) 用超纯水冲洗柱子和纯化系统5-10个柱体积;
- [0133] 14) 用0.02M的PB缓冲液冲洗柱子5-10个柱体积进行平衡;
- [0134] 15) 将上述(7)操作中所得到的初纯样品将电导稀释至5ms/cm以下,进行上样;
- [0135] 16) 再用0.02M的PB缓冲液冲洗柱子5-10个柱体积;
- [0136] 17) 用0.02M的PBS缓冲液洗脱蛋白样品;
- [0137] 18) 用1.5M的NaCl溶液进行洗脱,去除柱子中的色素;
- [0138] 19) 用0.1M的NaOH溶液冲洗柱子(5-10个柱体积),除去柱子中的一些杂质蛋白;
- [0139] 20) 用超纯水冲洗柱子5-10个柱体积;
- [0140] 21) 重复上述操作14)~20),直至所有样品上样结束;
- [0141] 22) 用20%乙醇冲洗系统和柱子直至柱中只留乙醇。
- [0142] 样品采用微量核酸蛋白测定仪进行定量(NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer)后,然后经12%SDS-PAGE电泳检测,电泳结果显示为单一条带。
- [0143] 实施例6测定融合蛋白的体外活性
- [0144] 通过将表达制备的融合蛋白、人源GLP-1(购买)和GIP(购买)分别作用于表达GLP-1R或GIPR的HEK293细胞,具体操作为:
- [0145] 1) 在金唯智公司优化并常规合成基因GIPR和GLP-1R,将基因克隆至载体pUC57-Amp,制备mini-scale重组质粒DNA和含有该重组质粒的穿刺菌;
- [0146] 2) 取pUC57-GIPR重组质粒DNA用HindIII与EcoR I双酶切,取pUC57-GLP-1R用HindIII与XhoI双酶切,酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,用洁净刀片切下目标条带,使用胶回收试剂盒回收目的片段,具体实验操作按照试剂盒说明书进行;
- [0147] 3) 目标片段酶切回收产物与载体质粒pcDNA3.1片段经T4 ligase连接后转化DH5 α 感受态细胞,涂布平板分离单菌落,挑取转化子扩培进行酶切验证及测序验证。
- [0148] 4) 接种步骤3)获得的经测序后验证含目标产物融合蛋白的菌液200mL用于质粒大提,使用试剂盒为:PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit,按说明书进行操作。质粒经PCR验证及酶切验证无误后,使用pvuI限制性内切酶进行线性化。最后采用乙醇沉淀法回收质粒。
- [0149] 5) 宿主细胞为HEK293,转染前一天,将细胞按照 2×10^6 cells/孔的密度铺6孔板,

添加量为1mL/孔。使用Lipofectamine 3000脂质体转染法将回收的线性化质粒转染至HEK293细胞中,加G418筛选得到混合株后,进行有限稀释分离得到单克隆,进行活性检测验证。

[0150] 用cAMP检测试剂盒(Cisbio,62AM6PEC)、依据操作说明书所述步骤检测受体细胞所产生cAMP,具体步骤如下:

[0151] 1) 配制Assay buffer:取完全培养液(DMEM培养基+10%FBS),再加入4/1000的500mM IBMX母液,cAMP-d2工作液和anti-cAMP-crytate工作液按试剂盒说明书进行配制;

[0152] 2) 将待测样品及对照样品人源GLP-1(购买)和GIP(购买),稀释至初始浓度为500nM的母液,然后按20 μ L加入到80 μ L Assay buffer(稀释5倍)的梯度逐步稀释,包括母液共计8个化合物梯度;

[0153] 3) 细胞悬液制备:液氮罐中取出细胞HEK293-GLP-1R及HEK293-GIPR后,立即37 $^{\circ}$ C水浴,1.5min内未完全融化后,于超净台将细胞逐滴加入至装有8mL温热培养基的15mL离心管中,900rpm离心5min,弃上清,1mL完全培养液将细胞重悬后(吹打15次),立即取20 μ L悬液与等体积的台盼蓝混合,取20 μ L计算活细胞数后,将细胞稀释至 4×10^5 cells/mL;

[0154] 4) 将384孔板划分为GLP-1R细胞、GIPR细胞区域,用12道变道可调分液器按每孔5 μ L将细胞悬液加入相应区域的孔中,再用12道变道可调分液器将供试品和阳性对照品梯度稀释液加入对应细胞的384孔板中,每孔5 μ L(相同浓度样品平行2个复孔);阴性对照:10 μ L assay buffer/每孔,每块384孔板设置3个孔,盖上白色封板膜,放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱,半小时后取出;

[0155] 5) 临用前用Hi-range试剂盒中lysis buffer将cAMP-d2工作液和anti-cAMP-crytate工作液稀释20倍后1:1混合均匀配成cAMP检测试剂混合溶液,样品组每孔加入10 μ L cAMP检测试剂混合溶液,阴性对照每孔加入5 μ L lysis buffer和5 μ L稀释后的anti-cAMP-crytate工作液,盖上白色盖子,于室温避光放置1h;

[0156] 6) 于多功能酶标仪中检测665nm、620nm的荧光值;

[0157] 7) 以此建立量效曲线,并计算EC50值、进行相互比较。

[0158] 具体结果如表5所示,其中G04、G05、G12、G27、G28、G30、G42、G49~G51、G58、G62、G108~G111所示的融合蛋白未检测到激动活性,其它融合蛋白均检测到激动活性,其中,G06、G20、G23、G34、G35、G37、G38、G48、G66、G67、G72、G74、G99、G101、G113、G115、G121~G127、G130~G132体外活性较强。

[0159] 表5:

[0160]

序号	融合蛋白名称	融合蛋白 EC50 (nM)	
		GLP-1R	GIPR
	人 GLP-1	0.053	N/A
	人 GIP	N/A	0.121
1	HEC-G01	0.582	10.184
2	HEC-G02	0.451	16.143
3	HEC-G03	4.054	2.417
4	HEC-G04	N/A	N/A
5	HEC-G05	N/A	N/A
6	HEC-G06	1.594	0.585
7	HEC-G07	1.057	4.835
8	HEC-G08	1.578	15.835
9	HEC-G09	0.165	18.750
10	HEC-G10	0.264	15.453
11	HEC-G11	0.497	11.235
12	HEC-G12	N/A	N/A
13	HEC-G13	0.685	1.728
14	HEC-G14	0.114	10.054
15	HEC-G20	0.262	0.197
16	HEC-G21	0.134	22.773
17	HEC-G22	0.165	2.585
18	HEC-G23	0.054	0.301
19	HEC-G24	59.117	0.675
20	HEC-G25	3.751	0.134
21	HEC-G26	624470.711	0.064
22	HEC-G27	N/A	N/A
23	HEC-G28	1.971	0.295

[0161]

24	HEC-G29	2.731	0.163
25	HEC-G30	N/A	N/A
26	HEC-G31	2.557	2.852
27	HEC-G32	1.864	0.321
28	HEC-G33	0.391	2.234
29	HEC-G34	0.354	0.275
30	HEC-G35	2.862	1.241
31	HEC-G36	N/A	N/A
32	HEC-G37	0.745	0.563
33	HEC-G38	12.531	0.589
34	HEC-G39	0.675	1.342
35	HEC-G40	0.061	10.876
36	HEC-G41	1.574	6.022
37	HEC-G42	N/A	N/A
38	HEC-G43	0.961	4.992
39	HEC-G44	2.552	0.171
40	HEC-G45	0.140	2.416
41	HEC-G46	0.285	0.297
42	HEC-G47	0.995	0.651
43	HEC-G48	1.162	0.091
44	HEC-G49	N/A	N/A
45	HEC-G50	N/A	N/A
46	HEC-G51	N/A	N/A
47	HEC-G52	2.723	1.214
48	HEC-G53	0.772	0.518
49	HEC-G54	0.121	1.042
50	HEC-G55	3.980	0.278
51	HEC-G56	746490.000	0.154
52	HEC-G57	17.462	9.431
53	HEC-G58	N/A	N/A
54	HEC-G59	0.844	6.093
55	HEC-G60	8.751	3.052
56	HEC-G61	7.584	1.147
57	HEC-G62	N/A	N/A
58	HEC-G63	39.051	17.714
59	HEC-G64	6.324	0.875
60	HEC-G65	1.577	3.782
61	HEC-G66	7.031	0.324
62	HEC-G67	1.137	0.485
63	HEC-G68	0.272	10.171
64	HEC-G69	38.931	0.332
65	HEC-G70	0.684	3.885
66	HEC-G71	0.252	1.041
67	HEC-G72	0.281	0.372
68	HEC-G73	0.155	5.931
69	HEC-G74	1.997	0.552
70	HEC-G75	0.876	1.825

[0162]

71	HEC-G76	0.714	5.012
72	HEC-G77	3.884	4.837
73	HEC-G78	0.226	1.077
74	HEC-G79	3.245	0.779
75	HEC-G80	1.252	3.184
76	HEC-G81	0.427	0.922
77	HEC-G82	6.534	0.172
78	HEC-G83	0.125	0.732
79	HEC-G84	6.034	8.970
80	HEC-G85	0.045	0.326
81	HEC-G86	0.651	5.495
82	HEC-G87	0.127	0.266
83	HEC-G88	0.155	0.258
84	HEC-G89	2.662	0.288
85	HEC-G90	105.400	0.945
86	HEC-G91	5.697	2.155
87	HEC-G92	1.637	0.677
88	HEC-G93	8.592	0.437
89	HEC-G94	8.284	0.255
90	HEC-G95	16.130	2.222
91	HEC-G96	3.664	0.547
92	HEC-G97	4.382	0.825
93	HEC-G98	18.094	0.321
94	HEC-G99	1.942	1.142
95	HEC-G100	0.211	0.464
96	HEC-G101	7.474	0.177
97	HEC-G102	0.378	0.545
98	HEC-G103	4.925	1.224
99	HEC-G104	14.932	0.762
100	HEC-G105	6.947	1.922
101	HEC-G106	0.945	0.477
102	HEC-G107	6.473	0.235
103	HEC-G108	N/A	N/A
104	HEC-G109	N/A	N/A
105	HEC-G110	N/A	N/A
106	HEC-G111	N/A	N/A
107	HEC-G112	0.268	0.564
108	HEC-G113	0.395	0.066
109	HEC-G114	0.047	0.034
110	HEC-G115	1.077	0.042
111	HEC-G116	0.042	0.034
112	HEC-G117	0.047	0.032
113	HEC-G118	0.076	0.039
114	HEC-G119	8.737	0.025
115	HEC-G120	0.092	0.071
116	HEC-G121	0.417	0.036
117	HEC-G122	0.155	0.023

[0163]	118	HEC-G123	1.046	0.012
	119	HEC-G124	0.168	0.024
	120	HEC-G125	0.354	0.057
	121	HEC-G126	0.965	0.015
	122	HEC-G127	0.477	0.042
	123	HEC-G128	0.394	0.112
	124	HEC-G129	0.066	0.059
	125	HEC-G130	0.052	0.318
	126	HEC-G131	0.277	0.028
	127	HEC-G132	0.285	0.027
	128	HEC-G133	63.245	0.006
	129	HEC-G134	16.277	0.004
	130	HEC-G135	1.268	0.033
	131	HEC-G136	8.223	0.018
	132	HEC-G137	0.357	0.021

[0164] 实施例7糖耐量评估

[0165] 本实施例评估HEC-G123、HEC-G128、HEC-G131、HEC-G132对正常C57BL/6小鼠糖耐量的影响。

[0166] 实验方法：正常C57BL/6小鼠按照血糖和体重随机分为6组（Vehicle组、Dulaglutide组、HEC-G123组、HEC-G128组、HEC-G131组、HEC-G132组），每组8只。对于Dulaglutide组、HEC-G123组、HEC-G128组、HEC-G131组及HEC-G132组，每组动物皮下注射给予相应的药物，给药剂量均为3nmol/kg；对于对照组，皮下注射相应的溶媒。

[0167] 单次给药60h后动物禁食12h、自由饮水。于尾静脉取血测定各组动物血糖基础值，随后腹腔注射给予2g/kg的葡萄糖溶液，并于给糖后15、30、60、0min的时间点进行血糖检测。根据不同时间点测定的血糖值绘制血糖浓度-时间曲线，计算各剂量组 $AUC_{0-90min}$ ，实验结果如表6和图1-2所示。

[0168] 表6：HEC-G123、HEC-G128、HEC-G131、HEC-G132单次给药72h后对正常C57小鼠糖耐量的影响

组别	血糖值 (mM)					$AUC_{0-90 min}$
	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	
Vehicle	4.2±0.4	20.1±3.2	21.5±3.1	13.5±3.2	9.0±2.1	1,355.8±220.8
Dulaglutide	4.4±0.8	15.7±2.2	12.7±2.4	8.1±1.0	6.8±0.6	899.0±105.4 ^a
HEC-G123	4.6±0.7	13.3±1.9	8.1±1.1	6.6±0.6	5.5±0.4	696.8±69.4 ^a
HEC-G128	4.2±1.1	11.9±2.0	9.1±1.7	6.2±0.9	5.6±0.6	686.1±79.5 ^a
HEC-G131	4.0±0.8	15.6±1.9	13.2±2.8	9.2±2.0	7.6±1.4	950.4±140.4 ^a
HEC-G132	4.3±0.9	15.7±2.2	12.3±4.1	8.4±1.2	7.6±0.7	911.1±160.5 ^a

[0170] 注：同列肩标小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

[0171] 实验结论：单次给药72h后，HEC-G123、HEC-G128、HEC-G131、HEC-G132均可显著降低正常C57小鼠血糖水平。与阳性对照Dulaglutide相比，HEC-G123与HEC-G128改善糖耐量的效果更为显著，HEC-G131与HEC-G132改善糖耐量效果则无明显差异。

[0172] 实施例8糖耐量评估

[0173] 本实施例评估HEC-G113、HEC-G122、HEC-G126、HEC-G127对正常C57BL/6小鼠糖耐量的影响。

[0174] 实验方法：正常C57BL/6小鼠按照血糖和体重随机分为6组（Vehicle组、

Dulaglutide组、HEC-G113组、HEC-G122组、HEC-G126组、HEC-G127组), 每组8只。对于Dulaglutide组 (Dulaglutide购自礼来、批号:D256504)、HEC-G113组、HEC-G122组、HEC-G126组、HEC-G127组, 每组动物皮下注射给予相应的药物, 给药剂量均为3nmol/kg; 对于对照组, 皮下注射相应的溶媒。

[0175] 单次给药60h后动物禁食12h、自由饮水。于尾静脉取血测定各组动物血糖基础值, 随后腹腔注射给予2g/kg的葡萄糖溶液, 并于给糖后15、30、60、90min的时间点进行血糖检测。根据不同时间点测定的血糖值绘制血糖浓度-时间曲线, 计算各剂量组AUC_{0~90min}, 实验结果如表7和图3-4所示。

[0176] 表7: HEC-G113、HEC-G122、HEC-G126、HEC-G127单次给药72h后对正常C57小鼠糖耐量的影响

组别	血糖值 (mM)					AUC _{0-90 min}
	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	
Vehicle	5.4±0.8	20.0±3.4	20.4±2.7	14.7±3.4	9.9±2.1	1,387.5±178.3
Dulaglutide	4.3±0.4	15.3±3.1	15.1±2.7	9.1±1.3	6.8±0.9	976.2±135.6 ^a
HEC-G113	5.4±0.7	13.8±2.7	13.0±2.3	8.3±1.0	6.2±0.7	882.8±115.2 ^a
HEC-G122	4.5±0.4	7.8±1.9	6.6±1.7	5.3±1.1	4.8±0.7	531.5±103.1 ^a
HEC-G126	4.0±0.4	7.3±1.0	6.7±0.7	5.4±0.7	4.5±1.0	520.1±54.2 ^a
HEC-G127	4.1±0.4	7.4±2.2	7.1±1.7	5.6±0.9	4.4±0.7	536.3±106.4 ^a

[0178] 注: 同列肩标小写字母表示差异显著 (P<0.05)

[0179] 实验结论: 单次给药72h后, HEC-G113、HEC-G122、HEC-G126、HEC-G127均可显著降低正常C57小鼠血糖水平。各组药物改善糖耐量的效果均优于阳性对照Dulaglutide。

[0180] 实施例9 db/db小鼠模型的体内药效评估

[0181] 本实施例评估HEC-G20对db/db小鼠模型的血糖影响。

[0182] 实验方法: 7-8周龄db/db小鼠根据血糖及体重值随机分为3组 (Model组、Semaglutide组、HEC-G20组), 每组9只。对于Semaglutide组 (Semaglutide购自诺和诺德, 批号: JP52092) 及HEC-G20组, 每组动物皮下注射给予相应的药物, 每次给药剂量均为10nmol/kg; 对于Model组, 皮下注射相应溶媒。Semaglutide组每天给药一次, HEC-G20组一周给药两次, 共给药4周; 于每次给药前进行动物血糖检测。

[0183] 实验结果: HEC-G20组在给药后能够明显降低血糖, 7h时血糖值达到最低水平, 效果近似于同剂量阳性对照Semaglutide。与Model相比, 长期重复给药HEC-G20组的小鼠血糖值明显降低, 并保持长期稳定, 其降糖作用近似于Semaglutide组, 具体数据见表8及图5-6。

[0184] 表8: HEC-G20长期给药对db/db小鼠血糖的影响

组别	随机血糖 (mM)										
	D0	1.5 h	5 h	7 h	D3	D7	D10	D14	D17	D21	D24
Model	26.6±3.0	28.6±3.3	30.3±3.8	27.4±3.3	26.3±3.8	25.7±5.4	27.6±2.8	27.7±3.2	27.3±3.6	27.6±3.7	27.5±5.3
Semaglutide	25.7±3.7	15.9±3.4	15.4±4.0	16.3±4.2	11.6±4.1	14.9±4.2	17.1±4.2	18.1±3.1	18.5±3.0	18.0±3.3	19.9±2.2 ^a
HEC-G20	26.0±4.7	20.9±3.3	14.8±3.4	14.2±3.8	18.8±4.0	17.3±4.2	17.2±3.0	20.0±4.0	18.5±5.2	19.4±5.2	18.4±4.8 ^a

[0186] 注: 同列肩标小写字母表示差异显著 (P<0.05)

[0187] 实验结论: HEC-G20长期给药可明显改善II型糖尿病模型db/db小鼠的血糖水平。

[0188] 实施例10 DIO模型体内药效评估

[0189] 本实施例评估HEC-G115及HEC-G124长期重复给药对DIO模型的肥胖小鼠体重和摄食影响。

[0190] 实验方法:将C57/BL6小鼠于第五周龄时随机分为正常组NFD、模型组HFD,正常组给予普通维持饲料喂养,而其他组均给予高脂饲料D12492饲养。每3周监测小鼠体质量和摄食量的变化。饲养16周后,模型组和正常组小鼠体量分别为(47.9±3.4)g、(29.6±1.5)g,两组比较差异有统计学意义。将正常组分Control组,造模成功的模型组小鼠分为Vehicle组、Semaglutide组、HEC-G115组及HEC-G124组,每组10只。对于Semaglutide组、HEC-G115组及HEC-G124组,每组动物皮下注射给予相应的药物;对于Vehicle组,皮下注射PBS。首次给药后观察7天,然后各组每3天给药一次,各组剂量均为10nmol/kg。每次给药前进行体重及摄食量的检测。给药3周后,进行腹腔糖耐量试验。末次给药72h后处理并收集样本,记录肝脏重量,检测各小组肝脏病理状况和血生化指标。检测结果见表9-12及图7-8。

[0191] 表9:HEC-G115、HEC-G124长期给药对DIO小鼠体重的影响

组别	体重增长率 (%)						
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Control	0.0±0.0	0.1±0.6	-1.1±0.8	0.8±1.0	0.5±1.1	-0.5±2.0	-1.2±1.9
Vehicle	0.0±0.0	0.4±0.9	-0.3±1.3	-0.9±1.6	-1.0±1.8	-1.2±2.0	-0.9±2.2
Semaglutide	0.0±0.0	-5.3±1.0	-7.2±1.2	-8.2±1.6	-7.4±2.8	-6.7±3.7	-8.2±3.8
HEC-G115	0.0±0.0	-5.5±0.7	-8.4±1.0	-9.7±1.1	-11.5±1.1	-12.7±1.7	-13.4±2.0
HEC-G124	0.0±0.0	-6.0±1.0	-8.9±1.2	-9.3±2.1	-8.8±3.0	-8.3±2.8	-8.4±2.6

[0192]

组别	体重增长率 (%)						
	D7	D10	D13	D16	D19	D22	D25
Control	0.0±1.2	0.0±2.8	1.7±2.8	0.6±3.2	2.2±4.0	1.5±2.9	2.8±3.1
Vehicle	-0.9±2.3	-2.1±2.6	-2.2±2.8	-0.3±2.5	0.2±3.0	2.8±3.3	1.3±4.0
Semaglutide	-8.1±4.7	-17.6±5.1	-21.3±5.8	-22.3±5.3	-21.6±5.6	-24.2±6.2	-23.2±6.0 ^a
HEC-G115	-13.4±2.6	-22.2±6.2	-24.3±8.5	-24.2±7.8	-23.9±7.7	-22.4±6.8	-20.4±6.8 ^a
HEC-G124	-7.1±2.9	-15.5±2.8	-18.8±3.9	-19.1±3.5	-19.9±4.4	-20.0±3.5	-19.2±5.3 ^a

[0193] 注:同列肩标小写字母a表示差异显著(P<0.05)

[0194] 表10:HEC-G115、HEC-G124长期给药对DIO小鼠摄食量的影响

组别	摄食量累计 (克/只)						
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Control	3.5	7.3	11.5	15.5	19.7	23.1	27.5
Vehicle	2.0	4.3	6.5	8.8	11.5	13.8	16.2
Semaglutide	0.7	1.8	3.2	5.3	8.2	10.2	12.5
HEC-G115	0.6	1.5	2.6	3.8	5.7	7.4	9.3
HEC-G124	0.4	1.2	2.6	4.8	7.2	8.7	11.4

[0195]

组别	摄食量累计 (克/只)					
	D7-10	D11-13	D14-16	D17-19	D20-22	D23-27
Control	38.8	51.3	62.8	75.1	86.1	103.5 ^a
Vehicle	22.9	30.0	38.5	46.2	54.2	67.1
Semaglutide	15.7	20.7	27.9	35.7	41.8	55.0 ^a
HEC-G115	13.3	19.2	25.7	33.7	42.2	55.5 ^a
HEC-G124	14.3	19.7	25.0	31.3	37.6	47.6 ^a

[0196] 注:同列肩标小写字母a表示差异显著(P<0.05)

[0197] 表11:HEC-G115、HEC-G124长期给药对DIO小鼠体质量和肝脏指数的影响

[0198]	组别	体质量/g	肝脏/g	肝脏指数/%
	Control	28.1±2.4 ^a	1.1±0.1 ^a	3.8±0.0 ^a
	Vehicle	46.5±5.2	1.9±0.4	4.1±0.0
	Semaglutide	33.0±2.7 ^a	1.0±0.2 ^a	3.0±0.0 ^a
	HEC-G115	32.4±2.1 ^a	1.0±0.1 ^a	3.0±0.0 ^a
	HEC-G124	32.8±2.9 ^a	0.9±0.1 ^a	2.8±0.0 ^a

[0199] 注:同列肩标小写字母表示差异显著 (P<0.05)

[0200] 表12:HEC-G115、HEC-G124长期给药对DIO小鼠肝功及血脂的影响

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TRIGL (mmol/L)	CHOL (mmol/L)
[0201] Control	31.9±6.4 ^a	127.6±31.9	1.0±0.2	2.2±1.1 ^a
Vehicle	126.4±12.5	204.5±78.8	1.0±0.1	5.4±0.7
Semaglutide	19.3±4.3 ^a	109.4±9.2 ^a	0.7±0.1	2.7±0.4 ^a
HEC-G115	20.7±3.1 ^a	107.3±11.9 ^a	0.8±0.2	2.9±0.3 ^a
[0202] HEC-G124	28.3±5.8 ^a	115.3±22.6 ^a	1.0±0.2	2.6±0.3 ^a

[0203] 注:同列肩标小写字母表示差异显著 (P<0.05)

[0204] 实验结果:经给药4周,三天给药一次的HEC-G115、HEC-G124的减重及抑制摄食效果与同剂量一天给药一次的对照组Semaglutide相当。HEC-G115、HEC-G124对DIO小鼠的肝功及血脂也有明显改善,作用效果近似于Semaglutide。

[0205] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0206] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

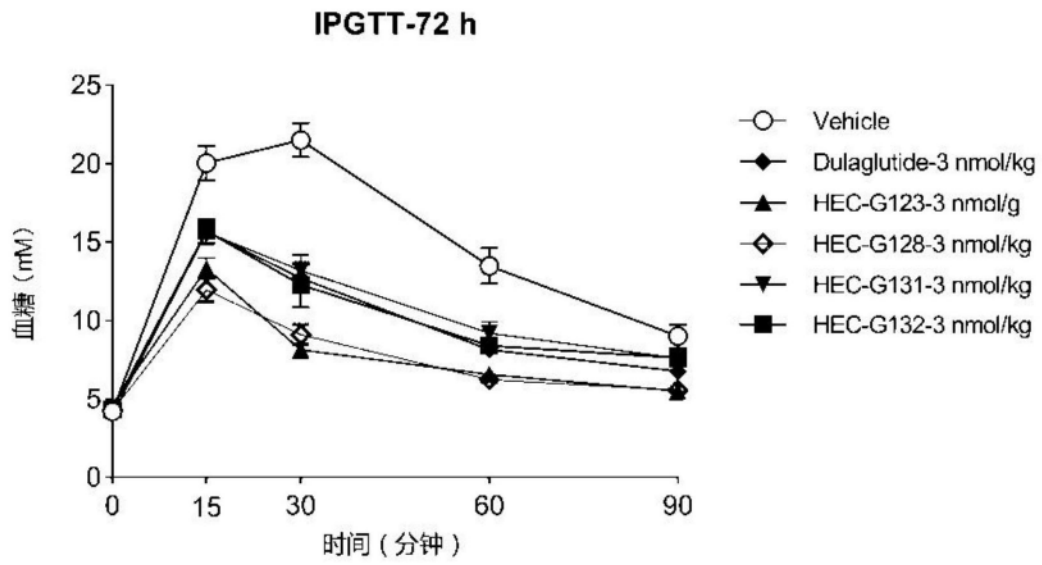


图1

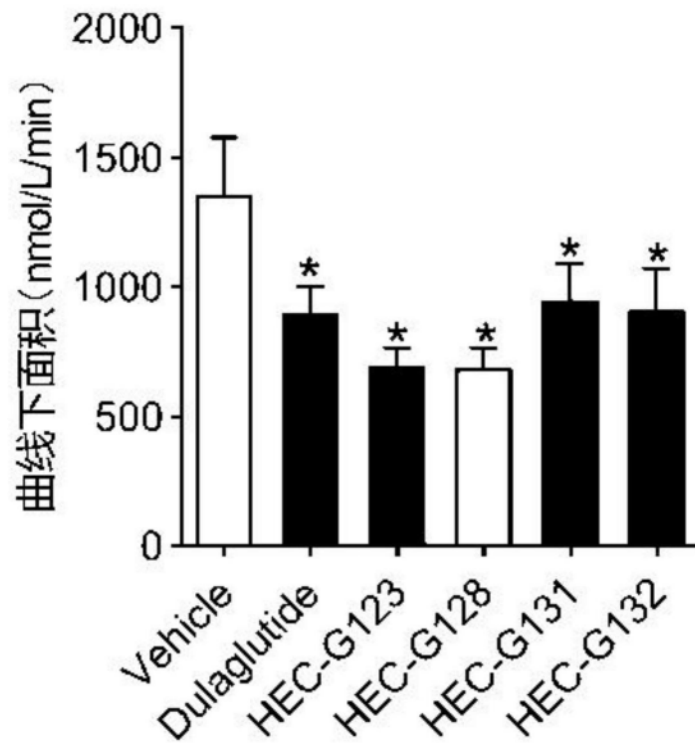


图2

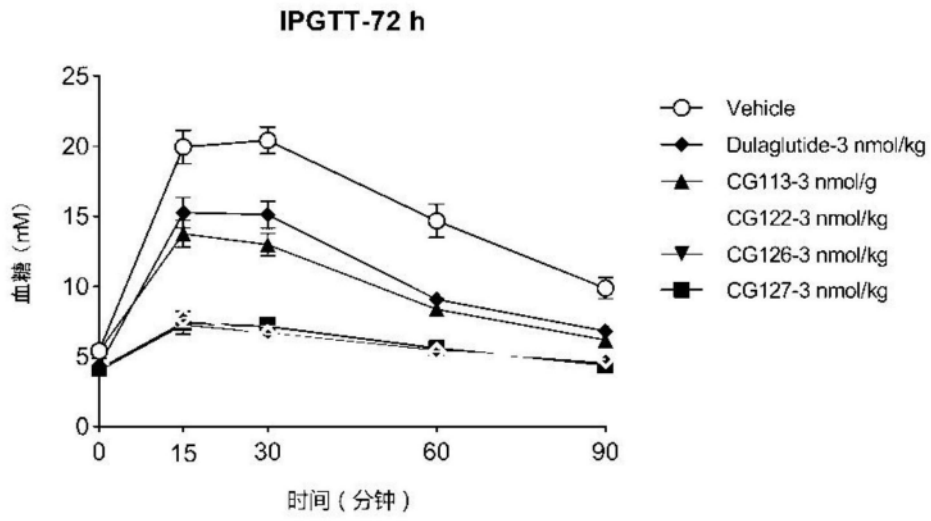


图3

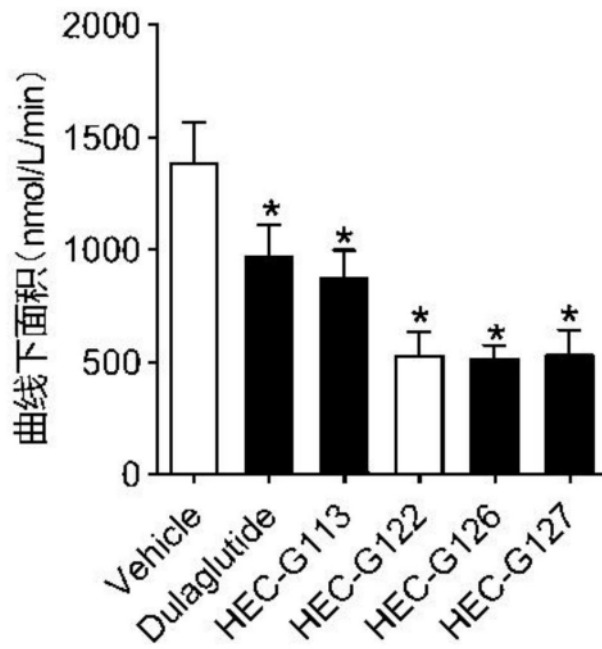


图4

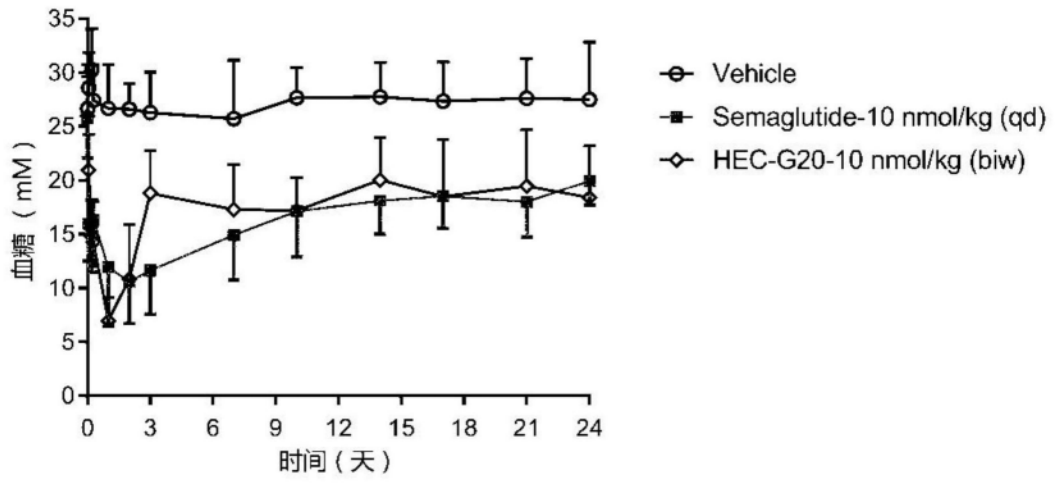


图5

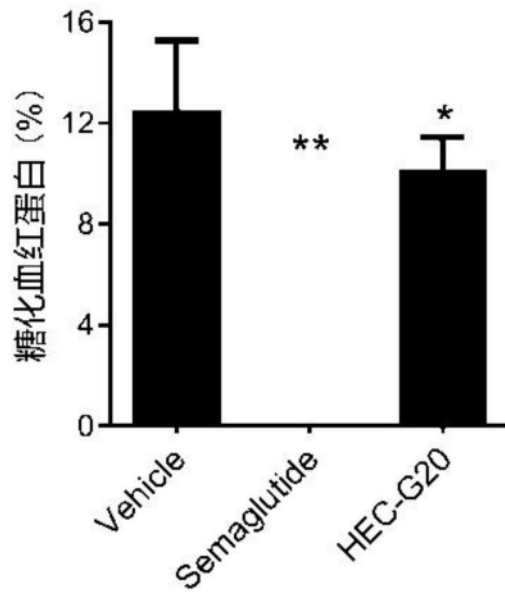


图6

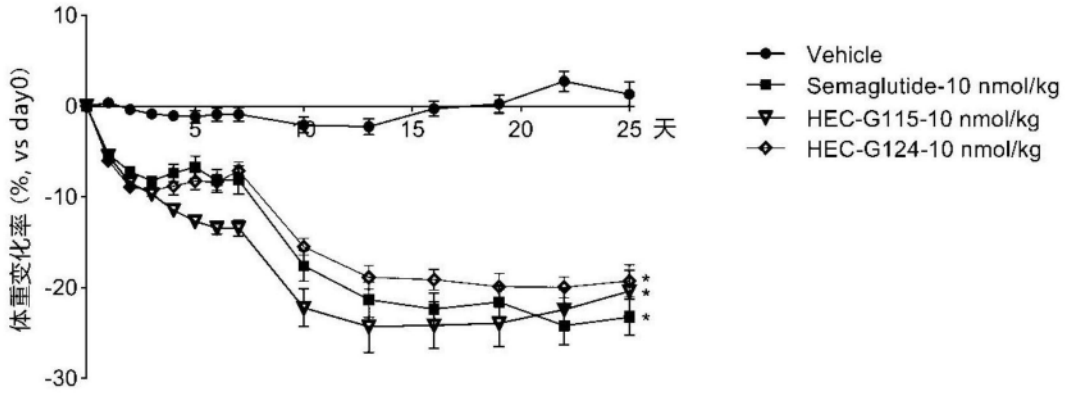


图7

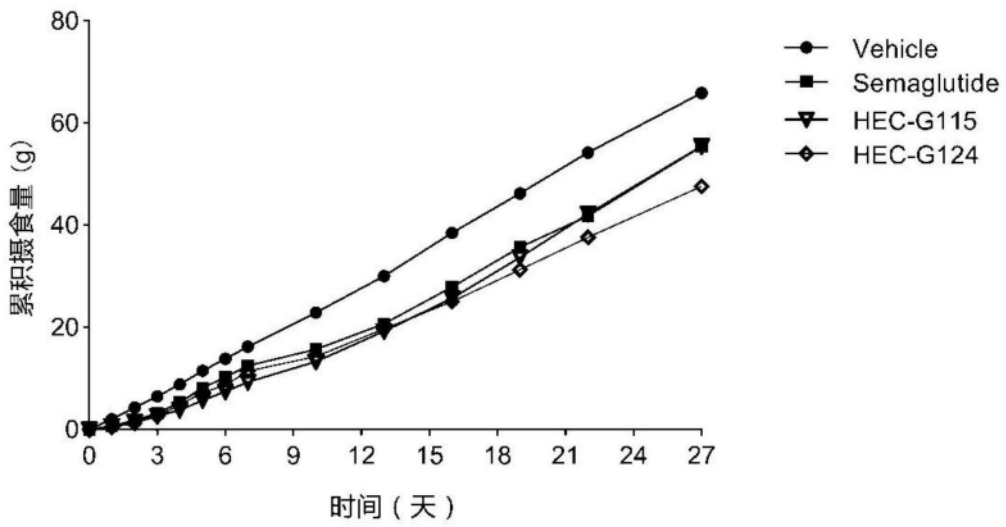


图8



图9