(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118434758 A
(43)申请公布日 2024.08.02

(21)申请号 202280082853.7
(22)申请日 2022.12.15
(30)优先权数据
63/361399 2021.12.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2022/000815 2022.12.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/131811 EN 2023.07.13
(71)申请人 梅里特斯英国第二有限公司
地址 英国伦敦
(72)发明人 郭雪翠 A·福布斯
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
A61K 35/761(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
C07K 14/605(2006.01)
C12N 15/00(2006.01)
C12N 15/861(2006.01)

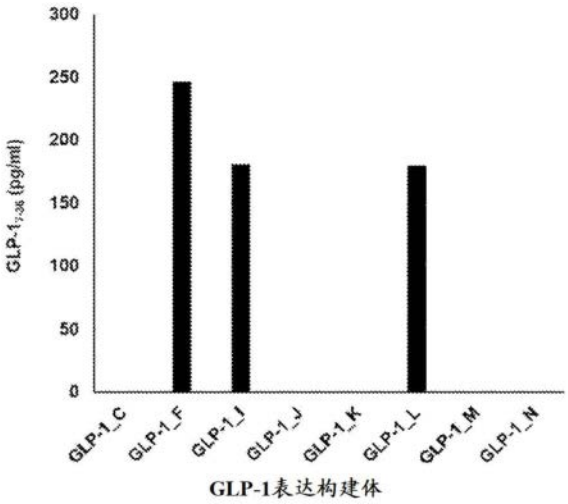
权利要求书5页 说明书52页
序列表（电子公布） 附图14页

(54)发明名称

肠肽的多顺反子表达

(57)摘要

本文提供了用于表达肠肽的单顺反子、双顺反子和多顺反子表达构建体以及包含此类表达构建体的药物组合物。还提供了使用此类表达构建体的方法，例如用于在有需要的受试者中诱导饱腹感或用于治疗有需要的受试者的肥胖症。



CN 118434758 A

1.一种编码多蛋白的双顺反子表达构建体,其中:

a.所述多蛋白包含信号肽、第一肠肽和第二肠肽;并且

b.多蛋白编码序列包含:

i.编码所述信号肽的序列;

ii.编码所述第一肠肽的序列;以及

iii.编码所述第二肠肽的序列。

2.一种编码多蛋白的三顺反子表达构建体,其中:

a.所述多蛋白包含信号肽、第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽;并且

b.多蛋白编码序列包含:

i.编码所述信号肽的序列;

ii.编码所述第一肠肽的序列;

iii.编码所述第二肠肽的序列;以及

iv.编码所述第三肠肽的序列。

3.如权利要求1所述的双顺反子表达构建体或如权利要求2所述的三顺反子表达构建体,其中所述信号肽选自由以下项组成的组:免疫球蛋白M(IgM)信号肽、人胰岛素(hInsul)信号肽、鼠Igh蛋白(Igh)信号肽、人生长激素(hGH)信号肽、鼠促红细胞生成素(mEpo)信号肽、鼠生长激素释放激素(mGHRH)信号肽、人白蛋白信号肽和人因子IX(FIX)信号肽。

4.如权利要求3所述的双顺反子表达或三顺反子表达构建体,其中所述信号肽包含与SEQ ID NO:13-20中的任一者至少80%同一的序列。

5.如权利要求4所述的双顺反子表达或三顺反子表达构建体,其中所述信号肽包含与SEQ ID NO:13-20中的任一者至少90%同一的序列。

6.如权利要求5所述的双顺反子表达或三顺反子表达构建体,其中所述信号肽包含选自SEQ ID NO:13-20的序列。

7.如权利要求3-6所述的双顺反子表达或三顺反子表达构建体,其中所述编码所述信号肽的序列包含与SEQ ID NO:21-28中的任一者至少80%同一的序列。

8.如权利要求7所述的双顺反子表达或三顺反子表达构建体,其中所述编码所述信号肽的序列包含与SEQ ID NO:21-28中的任一者至少90%同一的序列。

9.如权利要求8所述的双顺反子表达或三顺反子表达构建体,其中所述编码所述信号肽的序列包含选自SEQ ID NO:21-28的序列。

10.如权利要求1或3-9中任一项所述的双顺反子表达构建体或如权利要求2-9中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和/或所述第二肠肽包含选自由以下项组成的组的序列:人蛋白glp-1(hGLP-1)、人葡萄糖依赖性促胰岛素肽(hGIP)、人胃泌酸调节素(hOXM)、肽YY(PYY)、人胰高血糖素和淀粉素。

11.如权利要求10所述的双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和/或所述第二肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少80%同一的序列。

12.如权利要求11所述的双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和/或所述第二肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少90%同一的序列。

13.如权利要求12所述的双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和/或第二肠肽包含选自SEQ ID NO:1-5的序列。

14.如权利要求10-13中任一项所述的双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽和/或所述第二肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少80%同一的序列。

15.如权利要求14所述的双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽和/或所述第二肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少90%同一的序列。

16.如权利要求15所述的双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽和/或所述第二肠肽的序列包含选自SEQ ID NO:6-12的序列。

17.如权利要求2-16中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述第三肠肽包含选自由以下项组成的组的序列:人蛋白glp-1(hGLP-1)、人葡萄糖依赖性促胰岛素肽(hGIP)、人胃泌酸调节素(hOXM)、肽YY(PYY)、人胰高血糖素和淀粉素。

18.如权利要求17所述的三顺反子表达构建体,其中所述第三肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少80%同一的序列。

19.如权利要求18所述的三顺反子表达构建体,其中所述第三肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少90%同一的序列。

20.如权利要求19所述的三顺反子表达构建体,其中所述第三肠肽包含选自SEQ ID NO:1-5的序列。

21.如权利要求17-20中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第三肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少80%同一的序列。

22.如权利要求21所述的三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第三肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少90%同一的序列。

23.如权利要求22所述的三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第三肠肽的序列包含选自SEQ ID NO:6-12的序列。

24.如权利要求1或3-16中任一项所述的双顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽是相同的肠肽。

25.如权利要求24所述的双顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽的序列和所述编码所述第二肠肽的序列是不同的。

26.如权利要求25所述的双顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽的序列和所述编码所述第二肠肽的序列中的至少一者是密码子优化的。

27.如权利要求26所述的双顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽的序列和所述编码所述第二肠肽的序列是密码子优化的。

28.如权利要求24-27中任一项所述的双顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽是hGLP-1。

29.如权利要求28所述的双顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽各自包含与SEQ ID NO:1至少80%同一的序列。

30.如权利要求29所述的双顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽各自包含与SEQ ID NO:1至少90%同一的序列。

31.如权利要求30所述的双顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽各自包含SEQ ID NO:1。

32.如权利要求28所述的双顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽和所述第二肠肽的序列各自包含与选自SEQ ID NO:6-8的序列至少80%同一的序列。

33.如权利要求32所述的双顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽和所述第二肠肽的序列各自包含与选自SEQ ID NO:6-8的序列至少90%同一的序列。

34.如权利要求33所述的双顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽和所述第二肠肽的序列选自SEQ ID NO:6-8。

35.如权利要求28所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含编码与SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55至少80%同一的多肽的序列。

36.如权利要求35所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含编码与SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55至少90%同一的多肽的序列。

37.如权利要求36所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55的序列。

38.如权利要求28所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57至少80%同一的序列。

39.如权利要求38所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57至少90%同一的序列。

40.如权利要求39所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57。

41.如权利要求1或3-16中任一项所述的双顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽是不同的肠肽。

42.如权利要求41所述的双顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽选自由hGLP-1和hGIP组成的组。

43.如权利要求42所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者至少80%同一的序列的序列。

44.如权利要求43所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者至少90%同一的序列的序列。

45.如权利要求44所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者的序列。

46.如权利要求42所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58中的任一者至少80%同一的序列。

47.如权利要求46所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58中的任一者至少90%同一的序列。

48.如权利要求47所述的双顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体包含选自SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58的序列。

49.如权利要求2-23中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽和所述第二肠肽是不同的肠肽。

50.如权利要求49所述的三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽、所述第二肠肽和所述第三肠肽是不同的肠肽。

51.如权利要求50所述的三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽、所述第二肠肽和所

述第三肠肽选自由以下项组成的组：

a.hGLP-1、hOXM和PYY;或者

b.hGLP-1、hGlucagon和hGIP。

52.如权利要求51所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者至少80%同一的序列的序列。

53.如权利要求52所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者至少90%同一的序列的序列。

54.如权利要求53所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者的序列。

55.如权利要求51所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者至少80%同一的序列。

56.如权利要求55所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者至少90%同一的序列。

57.如权利要求56所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体包含SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NOS:79-80中的任一者。

58.如权利要求2-23中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽、所述第二肠肽和所述第三肠肽是相同的肠肽。

59.如权利要求58所述的三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽的序列、所述编码所述第二肠肽的序列和所述编码所述第三肠肽的序列是不同的。

60.如权利要求59所述的三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽的序列、所述编码所述第二肠肽的序列和所述编码所述第三肠肽的序列中的至少一者是密码子优化的。

61.如权利要求60所述的三顺反子表达构建体,其中所述编码所述第一肠肽的序列、所述编码所述第二肠肽的序列和所述编码所述第三肠肽的序列是密码子优化的。

62.如权利要求58-61中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述第一肠肽、所述第二肠肽和所述第三肠肽是hGLP-1。

63.如权利要求62所述的三顺反子表达构建体,其中三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75中的任一者至少80%同一的序列的序列。

64.如权利要求63所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75中的任一者至少90%同一的序列的序列。

65.如权利要求64所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体编码包含选自SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75的序列的序列。

66.如权利要求62所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78中的任一者至少80%同一的序列。

67.如权利要求66所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78中的任一者至少90%同一的序列。

68.如权利要求67所述的三顺反子表达构建体,其中所述三顺反子表达构建体包含选自SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78的序列。

69.如权利要求1、3-16或24-48中任一项所述的双顺反子表达构建体或如权利要求2-

23或49-68中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述双顺反子表达构建体或所述三顺反子表达构建体还包含启动子序列。

70.如权利要求69所述的双顺反子表达构建体或所述三顺反子表达构建体,其中所述启动子是CMV启动子或CASI启动子。

71.如权利要求1、3-16、24-48或69-70中任一项所述的双顺反子表达构建体,其中所述多蛋白还包含允许释放所述第一肠肽和所述第二肠肽的蛋白酶切割位点。

72.如权利要求2-23或49-70中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述多蛋白还包含允许释放所述第一肠肽、所述第二肠肽和所述第三肠肽的两个蛋白酶切割位点。

73.如权利要求71所述的双顺反子表达构建体或如权利要求72所述的三顺反子表达构建体,其中所述蛋白酶切割位点中的至少一个是弗林蛋白酶切割位点。

74.如权利要求1、3-16、24-48、69-71或73中任一项所述的双顺反子表达构建体或如权利要求2-23、49-70或72-73中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述多蛋白编码序列包含含有适体的核糖开关,其中所述适体结合至小分子。

75.如权利要求1、3-16、24-48、69-71或73中任一项所述的双顺反子表达构建体或如权利要求2-23、49-70或72-73中任一项所述的三顺反子表达构建体,其中所述多蛋白编码序列包含含适体的基因调控盒,其中所述适体结合至小分子。

76.一种载体,其包含如权利要求1、3-16、24-48、69-71或73-75中任一项所述的双顺反子表达构建体或如权利要求2-23、49-70或72-75中任一项所述的三顺反子表达构建体。

77.如权利要求76所述的载体,其中所述载体是AAV载体。

78.一种药物组合物,其包含如权利要求76-77中任一项所述的载体以及药学上可接受的赋形剂。

79.一种在有需要的受试者中诱导饱腹感的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求78所述的药物组合物。

80.一种治疗有需要的受试者的肥胖症的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求78所述的药物组合物。

81.一种抑制有需要的受试者的食欲的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求78的药物组合物。

82.一种减少有需要的受试者的体重增加的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求78所述的药物组合物。

83.一种改善有需要的受试者的葡萄糖耐受性的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求78所述的药物组合物。

肠肽的多顺反子表达

技术领域

[0001] 本公开涉及分子生物学领域中的组合物和方法。具体地,本公开涉及用于表达肽的多顺反子表达构建体以及使用这些多顺反子表达构建体的方法。

背景技术

[0002] 目前对肥胖症的治疗涉及温和有效并且可能具有有害的副作用(特别是在长期使用的情况下)的兴奋剂药物。目前的其他治疗方法包括侵入性减肥手术,其虽然有时有效,但可能涉及多种严重并发症。最近,饱食肠肽(也称为饱食肽或肠肽)已被研究作为肥胖症的潜在治疗。

[0003] 饱食肠肽是调节胃肠(GI)功能诸如分泌、动力、吸收、消化和细胞增殖的化学信使。这些多肽由胃、胰腺或肠中的内分泌细胞产生,并且通过自分泌或旁分泌机制局部起作用,或者以经典的内分泌方式在远处部位起作用。从血浆穿透血脑屏障,它们通过激活下丘脑饱食中枢的特异性受体而起作用,从而诱导饱腹感。

[0004] 用饱食肠肽的急性补充疗法减少了肥胖动物模型以及瘦和肥胖人类受试者的食物摄取和体重。

[0005] 普遍认为饱食肠肽通过经口摄入施用将是无效的,因为肠中的酶和酸在到达血液之前会降解它们。因此,迫切需要表达饱食肠肽的新机制。

发明内容

[0006] 本文提供了用于肠肽表达的表达构建体和使用此类表达构建体的方法。

[0007] 在一方面,提供了一种编码多蛋白的双顺反子表达构建体,其中:

[0008] a.所述多蛋白包含信号肽、第一肠肽和第二肠肽;并且

[0009] b.多蛋白编码序列包含:

[0010] i.编码所述信号肽的序列;

[0011] ii.编码所述第一肠肽的序列;以及

[0012] iii.编码所述第二肠肽的序列。

[0013] 在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含选自人胰高血糖素样肽1(hGLP-1)肽、人葡萄糖依赖性促胰岛素(hGIP)肽、人胃泌酸调节素(hOXM)肽、肽YY(PYY)、人胰高血糖素(hGlucagon)肽和淀粉素肽的序列。在实施方案中,hGLP-1肽是hGLP-1_{7-37}肽。在实施方案中,hGIP肽是hGIP$_{1-42}$肽。在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含选自SEQ ID NO:1-5的序列。

[0014] 在一些实施方案中,编码第一肠肽和/或第二肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽和/或第二肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠

肽和/或第二肠肽的序列包含选自SEQ ID NO:6-12的序列。

[0015] 在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是相同的肠肽。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列是不同的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列中的至少一者是密码子优化的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列是密码子优化的。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是hGLP-1。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽各自包含与SEQ ID NO:1至少80%同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽各自包含与SEQ ID NO:1至少90%同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽各自包含SEQ ID NO:1。

[0016] 在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列各自包含与选自SEQ ID NO:6-8的序列至少80%同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列各自包含与选自SEQ ID NO:6-8的序列至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽和第二肠肽的序列选自SEQ ID NO:6-8。

[0017] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含编码与SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55至少80%同一的多肽的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含编码与SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55至少90%同一的多肽的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55的多肽。

[0018] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57至少80%同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57至少90%同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57。

[0019] 在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是不同的肠肽。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽选自由hGLP-1和hGIP组成的组。在实施方案中,hGLP-1肽是$hGLP\text{-}1_{7\text{-}37}$肽。在实施方案中,hGIP肽是$hGIP_{1\text{-}42}$肽。

[0020] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者至少80%同一的序列的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者至少90%同一的序列的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者的序列。

[0021] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含选自SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58的序列。

[0022] 在一方面,提供了一种编码多蛋白的三顺反子表达构建体,其中:

[0023] a.所述多蛋白包含信号肽、第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽;并且

[0024] b.多蛋白编码序列包含:

[0025] i.编码所述信号肽的序列;

[0026] ii.编码所述第一肠肽的序列;

[0027] iii.编码所述第二肠肽的序列;以及

[0028] iv.编码所述第三肠肽的序列。

[0029] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含选自由hGLP-1肽、hGIP肽、hOXM肽、肽YY(PYY)、hGlucagon肽和淀粉素肽组成的组的序列。在实施方案中,hGLP-1肽是hGLP-1_{7-37}肽。在实施方案中,hGIP肽是hGIP$_{1-42}$肽。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含与SEQ ID NO:1-4中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含选自SEQ ID NO:1-5的序列。

[0030] 在一些实施方案中,编码第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽的序列包含选自SEQ ID NO:6-12的序列。

[0031] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽是相同的肠肽。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列、编码第二肠肽的序列和编码第三肠肽的序列是不同的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列、编码第二肠肽的序列和编码第三肠肽的序列中的至少一者是密码子优化的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列、编码第二肠肽的序列和编码第三肠肽的序列是密码子优化的。

[0032] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽是hGLP-1。

[0033] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75中的任一者至少80%同一的序列的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75中的任一者至少90%同一的序列的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含选自SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75的序列的序列。

[0034] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含选自SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78的序列。

[0035] 在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是不同的肠肽。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽是不同的肠肽。

[0036] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽选自(1)hGLP-1肽、hOXM肽和PYY,或者(2)hGLP-1肽、hGlucagon肽和hGIP肽。在实施方案中,hGLP-1肽是hGLP-1_{7-37}肽。在实施方案中,hGIP肽是hGIP$_{1-42}$肽。

[0037] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者至少80%同一的序列的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者至少90%同一的序列的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者的序列。

[0038] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案

中,三顺反子表达构建体包含SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者。

[0039] 在一些实施方案中,双顺反子或三顺反子表达构建体编码多蛋白,其中该多蛋白包含信号肽。在一些实施方案中,信号肽选自由以下项组成的组:免疫球蛋白M(IgM)信号肽、人胰岛素(hInsul)信号肽、鼠Igh蛋白(mIgh)蛋白信号肽、人生长激素(hGH)信号肽、鼠促红细胞生成素(mEpo)信号肽、鼠生长激素释放激素(mGHRH)信号肽、人白蛋白信号肽和人因子IX(FIX)信号肽。在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:13-20中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:13-20中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含选自SEQ ID NO:13-20的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:21-28中的任一者至少80%同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:21-28中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含选自SEQ ID NO:21-28的序列。

[0040] 在一些实施方案中,双顺反子或三顺反子表达构建体还包含启动子序列。在一些实施方案中,启动子是CMV或CASI启动子。

[0041] 在一些实施方案中,双顺反子或三顺反子表达构建体编码包含位于第一肠肽与第二肠肽之间的蛋白酶切割位点的多蛋白。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码多蛋白,其中该多蛋白还包含蛋白酶切割位点,该蛋白酶切割位点允许第一肠肽、第二肠肽和/或第三肽从多蛋白释放。

[0042] 在一些实施方案中,至少一个蛋白酶切割位点是弗林蛋白酶切割位点。

[0043] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体包含含有适体的核糖开关,其中适体结合小分子。

[0044] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体或三顺反子表达构建体包含含有适体的基因调控盒,其中适体结合小分子。

[0045] 本文提供了一种包含本文所公开的双顺反子表达或三顺反子表达构建体的载体。在一些实施方案中,载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0046] 本文提供了一种包含本文所公开的载体的细胞。在一些实施方案中,细胞是分离的。

[0047] 本文提供了一种包含本文所公开的载体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0048] 在一方面,提供了一种在有需要的受试者中诱导饱腹感的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0049] 在一方面,提供了一种治疗有需要的受试者的肥胖症的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0050] 在一方面,提供了一种抑制有需要的受试者的食欲的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0051] 在一方面,提供了一种在有需要的受试者中减少体重或减少体重增加的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0052] 在一方面,提供了一种改善有需要的受试者的葡萄糖耐受性的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0053] 在一方面,提供了一种在有需要的受试者中诱导胰岛素释放的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

附图说明

[0054] 图1A、图1B和图1C示出了使用单顺反子表达构建体表达肠肽。图1A.如通过ELISA测定的hGLP-1_{7-37}肽(肠肽)的表达。有关hGLP-1表达构建体的命名,参见表5和6。图1B.如通过ELISA测定的hGLP-1_{7-37}肽(肠肽)的表达。有关hGLP-1表达构建体的命名,参见表5和6。图1C.如通过ELISA测定的hGIP$_{1-42}$肽(肠肽)的表达。有关hGIP表达构建体的命名,参见表5和6。

[0055] 图2A、图2B和图2C示出了使用单顺反子、双顺反子和三顺反子表达构建体表达肠肽。图2A.示例性双顺反子和三顺反子表达构建体。图2B.如通过ELISA测定的GLP-1_{7-37}肽的单顺反子(GLP-1M)、双顺反子(2xGLP-12xB)或三顺反子(3xGLP-13xB)表达的比较。所用的ELISA试剂盒被设计用于检测GLP-1_{7-36}。有关表达构建体的命名,参见表5-10。图2C.编码GLP1_{7-37}肽的某些单顺反子和三顺反子构建体的比较。通过ELISA测定表达。有关表达构建体的命名,参见表5-6和9-10。

[0056] 图3A、图3B、图3C、图3D和图3E示出了使用单顺反子和三顺反子表达构建体表达肠肽。图3A.由编码包含GLP-1_{7-37}肽和hGIP$_{1-42}$肽的多蛋白的双顺反子表达构建体表达GLP-1_{7-37}肽。有关表达构建体的命名,参见表7和8。图3B.由编码包含GLP-1_{7-37}肽和hGIP$_{1-42}$肽的多蛋白的双顺反子表达构建体表达hGIP$_{1-42}$肽。有关表达构建体的命名,参见表7和8。图3C.由编码GLP-1_{7-37}肽(GLP1_J和GLP-1_L)或hGIP$_{1-42}$肽(GIP_G)的单顺反子表达构建体以及由表达GLP-1_{7-36}肽、hGIP$_{1-42}$肽和hGlucagon肽(GGG_A)的三顺反子表达构建体表达GLP-1_{7-37}肽。有关表达构建体的命名,参见表5、6、9和10。图3D.由编码GLP-1_{7-37}肽(GLP-1_J和GLP-1_L)或hGIP$_{1-42}$肽(GIP_G)的单顺反子表达构建体以及由表达GLP1_{7-37}肽、hGIP$_{1-42}$肽和hGlucagon肽(GGG_A)的三顺反子表达构建体表达hGIP$_{1-42}$肽。有关表达构建体的命名,参见表5、6、9和10。图3E.通过所示的三顺反子表达构建体(表达GLP-1_{7-37}肽、OXM肽和PYY)表达GLP-1_{7-37}肽。有关表达构建体的命名,参见表9和10。所用的ELISA试剂盒被设计用于检测GLP-1_{7-36}。

[0057] 图4A、图4B、图4C、图4D和图4E示出了核糖开关调控的肠肽表达。图4A.通过实施例4中所述的基于GG_L的所示的、可调控的双顺反子表达构建体(表达hGLP-1_{7-37}肽和hGIP$_{1-42}$肽)表达GLP-1肽。小分子诱导剂的浓度以μM示出。图4B.通过实施例4中所述的所示的、可调控的双顺反子表达构建体(表达hGLP-1_{7-37}肽和hGIP$_{1-42}$肽)表达hGIP$_{1-42}$肽。对于0mM的小分子诱导剂,未观察到显著的表达。小分子诱导剂的浓度以μM示出。图4C.通过实施例4中所述的所示的可调控的三顺反子表达构建体3xGLP-1_3xC(包含三个hGLP-1_{7-37}肽编码序列)表达hGLP-1_{7-37}肽。图4C.通过实施例4中所述的所示的可调控的双顺反子和三顺反子表达构建体表达hGLP-1_{7-37}肽。MX-001是小分子诱导剂。图4D.通过实施例4中所述的基于GG_F的所示的可调控的双顺反子表达构建体(表达hGLP-1_{7-36}肽和hGIP$_{1-42}$肽)表达hGLP-1_{7-37}肽。图4E.由表达包含表达PYY的GLP-1、hOXM和PYY的多蛋白的可调控的三顺反子表达构建体表达PYY。所用的ELISA试剂盒被设计用于检测GLP-1_{7-36}。

[0058] 图5A和图5B示出了由本文所公开的多顺反子表达构建体表达的肠肽是生物活性的。图5A.由所示的单顺反子、双顺反子和三顺反子表达构建体表达的hGLP-1_{7-37}肽的生物活性。图5B.由所示的单顺反子、双顺反子和三顺反子表达构建体表达的hGIP$_{1-42}$肽的生物活性。图5C.从6周龄开始用高脂肪饮食(HFD)喂养雄性C57B1/6小鼠。在第八周,向小鼠注射

含有GG_F的PBS或AAV8载体。向进行低脂肪饮食(LFD)的小鼠注射PBS并将其作为对照组。每周在AAV注射之前和之后监测动物体重。

[0059] 图6A和图6B示出了由AAV8.GG_F_7-GLP-1载体表达的GLP-1肽和GIP肽改善体内葡萄糖耐受性。图6A.实验设置。图6B.由AAV8.GG_F_7-GLP-1载体表达的GLP-1肽和GIP肽改善体内葡萄糖耐受性。

具体实施方式

[0060] 本文提供了编码一种或多种肠肽的表达构建体以及使用这些表达构建体的方法。在实施方案中,肠肽被表达为多蛋白,其被切割以产生期望的肠肽。如本文所用,多蛋白是被指定用于加工以产生两种或更多种多肽产物的蛋白质。

[0061] 表达构建体

[0062] 本文提供了用于表达肠肽的单顺反子、双顺反子、三顺反子和其他多顺反子表达构建体。

[0063] 在实施方案中,表达构建体是用于表达单一多肽的单顺反子表达构建体。

[0064] 在实施方案中,表达构建体是用于表达两种多肽的双顺反子表达构建体。这两种多肽可被表达为多蛋白,并且在蛋白水解裂解后,各个多肽可以从多蛋白中释放。

[0065] 在实施方案中,表达构建体是用于表达三种多肽的三顺反子表达构建体。这三种多肽可被表达为多蛋白,并且在蛋白水解裂解后,各个多肽可以从多蛋白中释放。

[0066] 在实施方案中,表达构建体是用于表达两种或更多种多肽的多顺反子表达构建体。这两种或更多种多肽可被表达为多蛋白,并且在蛋白水解裂解后,各个多肽可以从多蛋白中释放。在一些实施方案中,多顺反子表达构建体表达两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种多肽。两种或更多种多肽可以是相同或不同的多肽。

[0067] 在一方面,本文所提供的表达构建体编码一种或多种肠肽。

[0068] 单顺反子表达构建体

[0069] 在一些实施方案中,肠肽是人胰高血糖素样肽1(hGLP-1)肽、人胃抑制肽(hGIP)肽、人胃泌酸调节素(hOXM)肽、肽YY或肽酪氨酸酪氨酸(PYY)、人胰高血糖素(hGlucagon)肽或淀粉素肽(也称为胰岛瘤淀粉样多肽(IAPP))。在实施方案中,hGLP-1肽是hGLP-1_{7-36}肽。在实施方案中,hGIP肽是hGIP$_{1-42}$肽。在一些实施方案中,肠肽是表1中公开的肠肽或表1中公开的肠肽之一的一部分。

[0070] 在一些实施方案中,提供了一种表达构建体,该表达构建体编码包含与SEQ ID NO:1至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列的多肽。在一些实施方案中,表达构建体编码包含SEQ ID NO:1的多肽。

[0071] 在一些实施方案中,提供了一种表达构建体,该表达构建体编码包含与SEQ ID NO:2至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列的多肽。在一些实施方案中,表达构建体编码包含SEQ ID NO:2的多肽。

[0072] 在一些实施方案中,提供了一种表达构建体,该表达构建体编码包含与SEQ ID NO:3至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、

至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列的多肽。在一些实施方案中,表达构建体编码包含SEQ ID NO:3的多肽。

[0073] 在一些实施方案中,提供了一种表达构建体,该表达构建体编码包含与SEQ ID NO:4至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列的多肽。在一些实施方案中,表达构建体编码包含SEQ ID NO:4的多肽。

[0074] 在一些实施方案中,提供了一种表达构建体,该表达构建体编码包含与SEQ ID NO:5至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列的多肽。在一些实施方案中,表达构建体编码包含SEQ ID NO:5的多肽。

[0075] 表1.所选的肠肽氨基酸序列。

[0076]

SEQ ID NO	肠肽	序列
1	hGLP-1$_{7-37}$	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
2	hGIP$_{1-42}$	YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKN

[0077]

SEQ ID NO	肠肽	序列
		DWKHNITQ
3	hOXM	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNR NNIA
4	PYY$_{3-36}$	IKPEAPREDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY
5	hGlucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

[0078] 在一些实施方案中,表达构建体包含表2中公开的序列或表2中公开的序列的一部分。

[0079] 在一些实施方案中,表达构建体包含与SEQ ID NO:6至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含SEQ ID NO:6。

[0080] 在一些实施方案中,表达构建体包含与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含SEQ ID NO:7。

[0081] 在一些实施方案中,表达构建体包含与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含SEQ ID NO:8。

[0082] 在一些实施方案中,表达构建体包含与SEQ ID NO:9至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含SEQ ID NO:9。

[0083] 在一些实施方案中,表达构建体包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含SEQ ID NO:10。

[0084] 在一些实施方案中,表达构建体包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少

90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含SEQ ID NO:11。

[0085] 在一些实施方案中,表达构建体包含与SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含SEQ ID NO:12。

[0086] 表2.所选的肠肽核酸序列。

[0087]

SEQ ID NO	编码的肠肽	序列
6	hGLP-1 (编码序列变体 1)	CATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTA AGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAG GAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGA GGA
7	hGLP-1 变体(编码序列变体 2)	CATGCAGAGGGAACATTTACTAGTGATGTC AGTTCATATCTTGAGGGACAAGCTGCTAAA GAATTTATTGCTTGGCTTGTGAAGGGAAGA GGA
8	hGLP-1 变体(编码序列变体 3)	CATGCTGAAGGGACATTTACCTCAGATGTT TCTTCATACCTGGAAGGACAGGCTGCCAAG GAATTTATTGCATGGCTTGTGAAAGGCAGG GGC
9	hGIP	TACGCGGAAGGGACTTTCATCAGTGACTAC AGTATTGCCATGGACAAGATTCACCAACAA GACTTTGTGAACTGGCTGCTGGCCCAAAAG GGGAAGAAGAATGACTGGAAACACAACAT CACCCAG
10	hOXM	CATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTAC AGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGCCCAA GATTTTGTGCAGTGGTTGATGAATACCAAG AGGAACAGGAATAACATTGCC
11	PYY	ATCAAACCCGAGGCTCCCCGCGAAGACGCC TCGCCGGAGGAGCTGAACCGCTACTACGCC TCCCTGCGCCACTACCTCAACCTGGTCACCC GGCAGCGGTAT
12	hGlucagon	CATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTAC AGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGCCCAA GATTTTGTGCAGTGGTTGATGAATACC

[0088] 在一些实施方案中,表达构建体编码肠肽,其中肠肽与信号肽融合。在一些实施方案中,信号肽是免疫球蛋白M(IgM)信号肽、人胰岛素(hInsul)信号肽、鼠Igh蛋白(mIgh)信号肽、人生长激素(hGH)信号肽、鼠促红细胞生成素(mEpo)信号肽、鼠生长激素释放激素(mGHRH)信号肽、人白蛋白(hAlbumin)信号肽或人因子IX(hFIX)信号肽。在一些实施方案中,信号肽是表3中公开的信号肽或表3中公开的信号肽的一部分。

[0089] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:13至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:13。

[0090] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:14至少80%、至少85%、至少90%、

至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:14。

[0091] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:15至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:15。

[0092] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:16至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:16。

[0093] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:17至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:17。

[0094] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:18至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:18。

[0095] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:19至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:19。

[0096] 在一些实施方案中,信号肽包含与SEQ ID NO:20至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:20。

[0097] 表3.所选的信号肽氨基酸序列。

[0098]

SEQ ID NO	信号肽	序列
13	IgM	MGWSCIILFLVATATGAHSA
14	hInsul	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA
15	mIgh	MAWVWTLLFLMAAAQSIQA
16	hGH	MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA
17	mEpo	MGVPERPTLLLLLSLLLIPLGLPVLC
18	mGHRH	MLLWVLFVILILTSGSHCS
19	hAlbumin	MKWVTFISLLFLFSSAYS
20	hFIX	MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAEC

[0099] 在一些实施方案中,表达构建体包含编码信号肽的序列,其中信号肽与肠肽融合。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含表4中公开的序列或表4中公开的序列的一部分。

[0100] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:21至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:21。

[0101] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:22至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少

97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:22。

[0102] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:23至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:23。

[0103] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:24至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:24。

[0104] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:25至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:25。

[0105] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:26至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:26。

[0106] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:27至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:27。

[0107] 在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含与SEQ ID NO:28至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码信号肽的序列包含SEQ ID NO:28。

[0108] 表4.所选的信号肽核酸序列。

[0109]

SEQ ID NO	编码的信号肽	序列
21	IgM	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAG CAACAGCTACAGGCGCGCACAGTGCA
22	hInsul	ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGG CGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGC AGCC
23	mIgh	ATGGCCTGGGTCTGGACACTCCTGTTTCTGATGG CTGCTGCCCAGTCCATTCAGGCC
24	hGH	ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGG CTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGA GGGCAGTGCC
25	mEpo	ATGGGGGTGCCCGAACGTCCCACCCTGCTGCTTT TACTCTCCTTGCTACTGATTCCTCTGGGCCTCCCA GTCCTCTGT
26	mGHRH	ATGCTGCTCTGGGTGCTCTTTGTGATCCTCATCCT CACCAGTGGCTCCCACTGCTCA
27	hAlbumin	ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCT CTTTAGCTCGGCTTATTCC
28	hFIX	ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCA CCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTTAGGATATC TACTCAGTGCTGAATGT

[0110] 提供了一种编码多肽的表达构建体,该多肽包含与序列SEQ ID NO:29-36中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。提供了一种编码包含SEQ ID NO:29-36中的任一者的多肽的表达构建体。

[0111] 提供了一种编码多肽的表达构建体,该多肽包含与序列SEQ ID NO:30、21或34中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。提供了一种编码包含SEQ ID NO:30、21或34中的任一者的多肽的表达构建体。

[0112] 提供了编码包含表5中公开的任一序列或表5中公开的序列的一部分的多肽的表达构建体。

[0113] 表5.示例性单顺反子表达构建体的氨基酸序列。hGLP-1(SEQ ID NO:1)以粗体示出。hGIP(SEQ ID NO:2)加下划线。信号肽编码序列以斜体字母示出。弗林蛋白酶切割在其中发生的位置用*标记。构建体GLP-1C、N、M和J分别具有与构建体GIP C、E、F和G相同的前导序列。

[0114]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	编码的肠肽	序列
29	GLP-1_C	IgM SP	hGLP-1	*MGWSCIILFLVATATGAHSA*YPYDV PDYARKKR*HAEGTFTSDVSSYL EGQAAKEFIAWLVKGRG
30	GLP-1_F	hInsul	hGLP-1	*MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA* YPYDVPDYARKKR*HAEGTFTSD VSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
31	GLP-1_I	mIgh	hGLP-1	*MAWVWTLLFLMAAAQSIQA*YPYDV PDYARKKR*HAEGTFTSDVSSYL EGQAAKEFIAWLVKGRG
32	GLP-1_J	hGH	hGLP-1	*MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGS A*FPTIPLSRLFDNAMLRARKKR*H AEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIA WLVKGRG
33	GLP-1_K	mEpo	hGLP-1	*MGVPERPTLLLLLSLLLIPLGLPVLC* APPRLICDSRVLERYRKKR*HAEG TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLV KGRG
34	GLP-1_L	mGHRH	hGLP-1	*MLLWVLFVILILTSGSHCS*LPPSPPFR

[0115]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	编码的肠肽	序列
				MQR*HAEGTFTSDVSSYLEGQA AKEFIAWLVKGRG
35	GLP-1_M	hAlbumin	hGLP-1	*MKWVTFISLLFLFSSAYS*RGVFRR*H AEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIA WLVKGRG
36	GLP-1_N	hFIX9	hGLP-1	*MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSA EC*TVFLDHENANKILNRPKR*HAE GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWL VKGRG
111	GIP_C	IgM SP	hGIP	*MGWSCIILFLVATATGAHSA*YPYDV PDYARKKR*YAEGTFISDYSIAMD KIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWK HNITQ
112	GIP_E	hFIX9	hGIP	*MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSA EC*TVFLDHENANKILNRPKR*YAE GTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLL AQKGKKNDWKHNITQ
113	GIP_F	hAlbumin	hGIP	*MKWVTFISLLFLFSSAYS*RGVFRR*Y AEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNW LLAQKGKKNDWKHNITQ
114	GIP_G	hGH	hGIP	*MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGS A*FPTIPLSRLFDNAMLRARKKR*Y AEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNW LLAQKGKKNDWKHNITQ

[0116] 提供了一种表达构建体,该表达构建体包含与序列SEQ ID NO:37-44中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。提供了一种编码包含SEQ ID NO:37-44中的任一者的多肽的表达构建体。

[0117] 提供了一种表达构建体,该表达构建体包含与序列SEQ ID NO:38、39或42中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。提供了一种编码包含SEQ ID NO:38、39或42中的任一者的多肽的表达构建体。

[0118] 提供了包含表6中公开的任一序列或表6中公开的序列的一部分的表达。

[0119] 表6.示例性单顺反子表达构建体的核酸序列。所有序列包含hGLP-1编码序列变体1(SEQ ID NO:6)。信号肽编码序列以斜体大写字母示出。弗林蛋白酶切割位点编码序列以小写字母示出。肠肽编码序列以大写字母(非斜体)示出。

[0120]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	编码的肠肽	序列
37	GLP-1_C	IgM	hGLP-1	*ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTC TTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGC GCGCACAGTGCA*tacccatacgatgttcca gattacgctagaaaaaagagaCATGCTGAA GGGACCTTTACCAGTGATGTAA GTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCT GCCAAGGAATTCATTGCTTGGCT GGTGAAAGGCCGAGGATGA
38	GLP-1_F	hInsul	hGLP-1	*ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCT GCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCC TCTGGGGACCTGACCCAGCCGCA GCC*tacccatacgatgttccagattacgctagaaa aaagagaCATGCTGAAGGGACCTTT ACCAGTGATGTAAGTTCTTATTT GGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAA TTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGG CCGAGGATGA
39	GLP-1_I	mIgh	hGLP-1	*ATGGCCTGGGTCTGGACACTCCTG TTTCTGATGGCTGCTGCCCAGTCC ATTCAGGCC*tacccatacgatgttccagattac gctagaaaaaagagaCATGCTGAAGGG ACCTTTACCAGTGATGTAAGTTC TTATTTGGAAGGCCAAGCTGCC AAGGAATTCATTGCTTGGCTGGT GAAAGGCCGAGGATGA
40	GLP-1_J	hGH	hGLP-1	*ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTC CCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCT CTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGG GCAGTGCC*ttcccaaccattcccttatccaggc tttttgacaacgctatgctccgcgccagaaaaaagag aCATGCTGAAGGGACCTTTACCA GTGATGTAAGTTCTTATTTGGAA GGCCAAGCTGCCAAGGAATTCA TTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCG AGGATGA
41	GLP-1_K	mEpo	hGLP-1	*ATGGGGGTGCCCGAACGTCCCAC CCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTA CTGATTCCTCTGGGCCTCCCAGTC CTCTGT*gctcccccacgcctcatctgcgacagtc gagttctggagaggtacagaaaaaagagaCATG

[0121]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	编码的肠肽	序列
				CTGAAGGGACCTTTACCAGTGA TGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCC AAGCTGCCAAGGAATTCATTGC TTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGA TGA
42	GLP-1_L	mGHRH	hGLP-1	*ATGCTGCTCTGGGTGCTCTTTGTG ATCCTCATCCTCACCAGTGGCTCC CACTGCTCA*ctgccccctcacctcccttcag gatgcagcgaCATGCTGAAGGGACCT TTACCAGTGATGTAAGTTCTTAT TTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGG AATTCATTGCTTGGCTGGTGAAA GGCCGAGGATGA
43	GLP-1_M	hAlbumin	hGLP-1	*ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCC TTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTA TTCC*aggggtgtgtttcgtcgaCATGCTGA AGGGACCTTTACCAGTGATGTA AGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGC TGCCAAGGAATTCATTGCTTGGC TGGTGAAAGGCCGAGGATGA
44	GLP-1_N	hFIX9	hGLP-1	*ATGCAGCGCGTGAACATGATCATG GCAGAATCACCAGGCCTCATCACC ATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCA GTGCTGAATGT*acagtttttcttgatcatgaaa acgccaacaaaattctgaatcggccaaagaggCA TGCTGAAGGGACCTTTACCAGT GATGTAAGTTCTTATTTGGAAGG CCAAGCTGCCAAGGAATTCATT GCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAG GATGA

[0122] 双顺反子表达构建体

[0123] 在一方面,提供了一种编码多蛋白的双顺反子表达构建体,其中:

[0124] a.所述多蛋白包含信号肽、第一肠肽和第二肠肽;并且

[0125] b.多蛋白编码序列包含:

[0126] i.编码所述信号肽的序列;

[0127] ii.编码所述第一肠肽的序列;以及

[0128] iii.编码所述第二肠肽的序列。

[0129] 在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含选自由hGLP-1肽、hGIP肽、hOXM肽、PYY、hGlucagon肽和淀粉素肽组成的组的序列。在实施方案中,hGLP-1肽是hGLP-1_{7-37}肽。在实施方案中,hGIP肽是hGIP$_{1-42}$肽。在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少

90％同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和/或第二肠肽包含选自SEQ ID NO:1-5的序列。

[0130] 在一些实施方案中,编码第一肠肽和/或第二肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽和/或第二肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少90％同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽和/或第二肠肽的序列包含选自SEQ ID NO:6-12的序列。

[0131] 在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是相同的肠肽。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是相同的肠肽,但编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列是不同的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列中的至少一者是密码子优化的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列是密码子优化的。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是hGLP-1。

[0132] 在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽包含与SEQ ID NO:1至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽包含与SEQ ID NO:1至少90％同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽包含SEQ ID NO:1。

[0133] 在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列包含与选自SEQ ID NO:6-8的序列至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列和编码第二肠肽的序列包含与选自SEQ ID NO:6-8的序列至少90％同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽和第二肠肽的序列选自SEQ ID NO:6-8。

[0134] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含表7中公开的序列或表7中公开的序列的一部分。

[0135] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含编码与SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的多肽的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含编码与SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55至少90％同一的多肽的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:55的多肽。

[0136] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者至少90％同一的序列的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:46-49或SEQ ID NO:56中的任一者的序列。

[0137] 表7.示例性双顺反子表达构建体的奠基酸序列。hGLP-1(SEQ ID NO:1)以粗体示

出。hGIP(SEQ ID NO:2)加下划线。弗林蛋白酶切割在其中发生的位置用*标记。

[0138]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
45	2xGLP-1_2xB	hAlbumin	hGLP-1，hGLP-1	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR*HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRKKR*HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
46	GG_J	hGH	hGLP-1，hGIP	MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRARKKR*HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRKKR*YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ
47	GG_F	hInsul	hGLP-1，hGIP	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAYPYDVPDYARKKR*HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRKKR*YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ
48	GG_L	mGHRH	hGLP-1，hGIP	MLLWVLFVILILTSGSHCSLPPSPPFRMQR*HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRKKR*YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ
49	GG_M	hAlbumin	hGLP-1，hGIP	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR*HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRKKR*YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ
55	无信号肽的2xGLP-1	n/a	hGLP-1，hGLP-1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRKKR*HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
56	无信号肽的GG	n/a	hGLP-1，hGIP	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRKKR*YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

[0139] 在一些实施方案中,双顺反子表达包含表8中公开的序列或表8中公开的序列的一部分。

[0140] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57至少90%同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:57。

[0141] 在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:

58中的任一者至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58中的任一者至少90％同一的序列。在一些实施方案中,双顺反子表达构建体包含选自SEQ ID NO:51-54或SEQ ID NO:58的序列。

[0142] 表8.示例性双顺反子表达构建体的核酸序列。所有序列包含hGLP-1编码序列变体1(SEQ ID NO:6)。信号肽编码序列以斜体大写字母示出。弗林蛋白酶切割位点编码序列以小写字母示出。肠肽编码序列以大写字母(非斜体)示出。

[0143]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
50	2xGLP-1_2xB	hAlbumin	hGLP-1, hGLP-1	*ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCC TTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTAT TCC*aggggtgtgtttcgtcgaCATGCTGAA GGGACCTTTACCAGTGATGTAAG TTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTG CCAAGGAATTCATTGCTTGGCTG GTGAAAGGCCGAGGAagaaaaaagag aCATGCAGAGGGAACATTTACTA GTGATGTCAGTTCATATCTTGAG GGACAAGCTGCTAAAGAATTTAT TGCTTGGCTTGTGAAGGGAAGA GGAtga

[0144]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
51	GG_J	hGH	hGLP-1，hGIP	*ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCC CTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTC TGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGC AGTGCC*ttcccaaccattcccttatccaggcttttt gacaacgctatgctccgcgccagaaaaaagagaC ATGCTGAAGGGACCTTTACCAGT GATGTAAGTTCTTATTTGGAAGG CCAAGCTGCCAAGGAATTCATTG CTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGG AagaaaaaagagaTACGCGGAAGGGA CTTTCATCAGTGACTACAGTATT GCCATGGACAAGATTCACCAAC AAGACTTTGTGAACTGGCTGCTG GCCCAAAAGGGGAAGAAGAATG ACTGGAAACACAACATCACCCA GTGA
52	GG_F	hInsul	hGLP-1，hGIP	*ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTG CCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCT CTGGGGACCTGACCCAGCCGCAG CC*tacccatacgatgttccagattacgctagaaaaaa gagaCATGCTGAAGGGACCTTTAC CAGTGATGTAAGTTCTTATTTGG AAGGCCAAGCTGCCAAGGAATT CATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCC GAGGAagaaaaaagagaTACGCGGAA GGGACTTTCATCAGTGACTACAG TATTGCCATGGACAAGATTCACC AACAAGACTTTGTGAACTGGCTG CTGGCCCAAAAGGGGAAGAAGA ATGACTGGAAACACAACATCAC CCAGTGA
53	GG_L	mGHRH	hGLP-1，hGIP	*ATGCTGCTCTGGGTGCTCTTTGTG ATCCTCATCCTCACCAGTGGCTCC CACTGCTCA*ctgccccctcacctcccttcagg atgcagcgaCATGCTGAAGGGACCTT TACCAGTGATGTAAGTTCTTATT TGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGA ATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAG GCCGAGGAagaaaaaagagaTACGCG GAAGGGACTTTCATCAGTGACTA CAGTATTGCCATGGACAAGATTC ACCAACAAGACTTTGTGAACTGG CTGCTGGCCCAAAAGGGGAAGA AGAATGACTGGAAACACAACAT CACCCAGTGA
54	GG_M	hAlbumin	hGLP-1，hGIP	*ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCC TTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTAT*

[0145]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
				*TCC*aggggtgtgtttcgtcgaCATGCTGAA GGGACCTTTACCAGTGATGTAAG TTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTG CCAAGGAATTCATTGCTTGGCTG GTGAAAGGCCGAGGAagaaaaaagag aTACGCGGAAGGGACTTTCATCA GTGACTACAGTATTGCCATGGAC AAGATTCACCAACAAGACTTTGT GAACTGGCTGCTGGCCCAAAAG GGGAAGAAGAATGACTGGAAAC ACAACATCACCCAGTGA
57	无信号肽编码序列的2xGLP-1	n/a	hGLP-1，hGLP-1	CATGCTGAAGGGACCTTTACCAG TGATGTAAGTTCTTATTTGGAAG GCCAAGCTGCCAAGGAATTCATT GCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAG GAagaaaaaagagaCATGCAGAGGGA ACATTTACTAGTGATGTCAGTTC ATATCTTGAGGGACAAGCTGCTA AAGAATTTATTGCTTGGCTTGTG AAGGGAAGAGGAtga
58	GG 无信号肽编码序列	n/a	hGLP-1，hGIP	CATGCTGAAGGGACCTTTACCAG TGATGTAAGTTCTTATTTGGAAG GCCAAGCTGCCAAGGAATTCATT GCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAG GAagaaaaaagagaTACGCGGAAGGG ACTTTCATCAGTGACTACAGTAT TGCCATGGACAAGATTCACCAAC AAGACTTTGTGAACTGGCTGCTG GCCCAAAAGGGGAAGAAGAATG ACTGGAAACACAACATCACCCA GTGA

[0146] 三顺反子表达构建体

[0147] 在一方面,提供了一种编码多蛋白的三顺反子表达构建体,其中:

[0148] a.所述多蛋白包含信号肽、第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽;并且

[0149] b.多蛋白编码序列包含:

[0150] i.编码所述信号肽的序列;

[0151] ii.编码所述第一肠肽的序列;

[0152] iii.编码所述第二肠肽的序列;以及

[0153] iv.编码所述第三肠肽的序列。

[0154] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含选自由hGLP-1肽、hGIP肽、hOXM肽、PYY、hGlucagon肽和淀粉素肽组成的组的序列。在实施方案中,hGLP-1肽是$hGLP\text{-}1_{7\text{-}37}$肽。在实施方案中,hGIP肽是$hGIP_{1\text{-}42}$肽。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少

91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含与SEQ ID NO:1-5中的任一者至少90％同一的序列。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽包含选自SEQ ID NO:1-5的序列。

[0155] 在一些实施方案中,编码第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽的序列包含与SEQ ID NO:6-12中的任一者至少90％同一的序列。在一些实施方案中,编码第一肠肽、第二肠肽和/或第三肠肽的序列包含选自SEQ ID NO:6-12的序列。

[0156] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含表9中公开的序列或表9中公开的序列的一部分的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含表10中公开的序列或表10中公开的序列的一部分。

[0157] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽是相同的肠肽。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽是相同的肠肽,但编码第一肠肽的序列、编码第二肠肽的序列和编码第三肠肽的序列是不同的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列、编码第二肠肽的序列和编码第三肠肽的序列中的至少一者是密码子优化的。在一些实施方案中,编码第一肠肽的序列、编码第二肠肽的序列和编码第三肠肽的序列是密码子优化的。

[0158] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽是hGLP-1。

[0159] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75中的任一者至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75中的任一者至少90％同一的序列的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含选自SEQ ID NO:59-61或SEQ ID NO:75的序列的序列。

[0160] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78中的任一者至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78中的任一者至少90％同一的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含选自SEQ ID NO:67-69或SEQ ID NO:78的序列。

[0161] 在一些实施方案中,第一肠肽和第二肠肽是不同的肠肽。在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽是不同的肠肽。

[0162] 在一些实施方案中,第一肠肽、第二肠肽和第三肠肽选自(1)hGLP-1肽、hOXM肽和PYY,或者(2)hGLP-1肽、hGlucagon肽和hGIP肽。在实施方案中,hGLP-1肽是$hGLP\text{-}1_{7\text{-}37}$肽。在实施方案中,hGIP肽是$hGIP_{1\text{-}42}$肽。

[0163] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少91％、至少97％、至少98％或至少99％同一的序列的序列。

在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含与SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者至少90%同一的序列的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体编码包含SEQ ID NO:62-66或SEQ ID NO:76-77中的任一者的序列。

[0164] 在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含与SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者至少90%同一的序列。在一些实施方案中,三顺反子表达构建体包含SEQ ID NO:70-74或SEQ ID NO:79-80中的任一者。

[0165]

表 9. 示例性三顺反子表达构建体的氨基酸序列。 hGLP-1 (SEQ ID NO:1)以粗体示出。hOXM (SEQ ID NO:3)加下划线。PYY (SEQ ID NO:4)为粗体、加下划线和斜体。

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
59	3xGLP-1_3xB	hAlbumin	hGLP-1, hGLP-1, hGLP-1,	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**
60	3xGLP-1_3xC	hInsul	hGLP-1, hGLP-1, hGLP-1,	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAYPYDVPDYARKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**
61	3xGLP-1_3xD	mGHRH	hGLP-1, hGLP-1, hGLP-1,	MLLWVLFVILILTSGSHCSLPPSPPFRMQR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**
62	GOP_J	hGH	hGLP-1, hOXM, PYY	MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRARK**KRHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RRKRRHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIARKKR***IKPEAPRED ASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY***
63	GOP_F	hInsul	hGLP-1, hOXM, PYY	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAYPYDVPDYARKKR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RRKRRHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIARKKR***IKPEAPREDASPEELN***

[0166]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
				RYYASLRHYLNLVTRQRY
64	GOP_L	mGHRH	hGLP-1, hOXM, PYY	MLLWVLFVILILTSGSHCSLPPSPPFRMQR**HAEGTFTSDVSSYLEG QAAKEFIAWLVKGRG**RRKRHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQ WLMNTKRNRNNIARKKR***IKPEAPREDASPEELNRYYASLRHYLNL VTRQRY***
65	GOP_M	hAlbumin	hGLP-1, hOXM, PYY	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK EFIAWLVKGRG**RRKRHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMN TKRNRNNIARKKR***IKPEAPREDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQ RY***
66	GGG_A	hGH	hGLP-1, hGlucagon, hGIP	MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRARK KR**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RRKRHSQGTF TSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRKKRYAEGTFISDYSIAMDKI HQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ
75	无信号肽的 3xGLP-1	n/a	hGLP-1, hGLP-1, hGLP-1,	**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFT SDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RKKR**HAEGTFTSDVSSYLE GQAAKEFIAWLVKGRG**
76	hGLP-1, hOXM, 无信号肽的 PYY	n/a	hGLP-1, hOXM, PYY	**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RRKRHSQGTFTS DYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIARKKR***IKPEAPREDAS PEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY***
77	hGLP-1,	n/a	hGLP-1,	**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG**RRKRHSQGTFTS

[0167]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
	hGlucagon，无信号肽的 hGIP		hGlucagon，hGIP	DYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRKKRYAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

表 10. 示例性三顺反子表达构建体的核酸序列。信号肽编码序列以斜体大写字母示出。弗林蛋白酶切割位点编码序列以小写字母示出。肠肽编码序列以大写字母(非斜体)示出。

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
67	3xGLP-1_3xB	hAlbumin	hGLP-1，hGLP-1，hGLP-1，	*ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCT**TATTCC*agggggtgtgtttcgtcgaCATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGAagaaaaaagagaCATGCAGAGGGAACATTTACTAGTGATGTCAGTTCATATCTTGAGGGACAAGCTGCTAAAGAATTTATTGCTTGGCTTGTGAAGGGAAGAGGAaagaaagaagagaCATGCTGAAGGGACATTTACCTCAGATGTTTCTTCATACCTGGAAGGACAGGCTGCCAAGGAATTTATTGCATGGCTTGTGAAAGGCAGGGGCtga
68	3xGLP-1_3xC	hInsul	hGLP-1，hGLP-1，	*ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCC**CTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCC*tacccatacgatgttccagattacgctag

[0168]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
			hGLP-1,	aaaaaagagaCATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTT ATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGT GAAAGGCCGAGGAagaaaaaagagaCATGCAGAGGGAACATTTACT AGTGATGTCAGTTCATATCTTGAGGGACAAGCTGCTAAAGAAT TTATTGCTTGGCTTGTGAAGGGAAGAGGAagaaaagaaagagaCATGCT GAAGGGACATTTACCTCAGATGTTTCTTCATACCTGGAAGGAC AGGCTGCCAAGGAATTTATTGCATGGCTTGTGAAAGGCAGGGG Ctga
69	3xGLP-1_3xD	mGHRH	hGLP-1, hGLP-1, hGLP-1,	*ATGCTGCTCTGGGTGCTCTTTGTGATCCTCATCCTCACCAGTGGCT* *CCCACTGCTCA*ctgccccctcacctccttcaggatgcagcgaCATGCTGAAGGG ACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGC CAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGAagaaaaaag agaCATGCAGAGGGAACATTTACTAGTGATGTCAGTTCATATCT TGAGGGACAAGCTGCTAAAGAATTTATTGCTTGGCTTGTGAAG GGAAGAGGAagaaaagaagagaCATGCTGAAGGGACATTTACCTCAG ATGTTTCTTCATACCTGGAAGGACAGGCTGCCAAGGAATTTAT TGCATGGCTTGTGAAAGGCAGGGGGCtga
70	GOP_J	hGH	hGLP-1, hOXM, PYY	*ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTG* *CTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCC*Ttcccaaccattccctttatcc aggcttttgacaacgctatgctccgcgccagaaaaaagagaCATGCTGAAGGGACCTT TACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAG GAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGAagacgtaagaggCA

[0169]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
				TTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGAC TCCAGGCGTGCCCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAATACCA AGAGGAACAGGAATAACATTGCCagaaaaaagagaATCAAACCCGA GGCTCCCCGCGAAGACGCCTCGCCGGAGGAGCTGAACCGCTAC TACGCCTCCCTGCGCCACTACCTCAACCTGGTCACCCGGCAGC GGTATTGA
71	GOP_F	hInsul	hGLP-1, hOXM, PYY	*ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCC* *CTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAGCC*taccatacgatgttccagattacgctag aaaaaagagaCATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTT ATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGT GAAAGGCCGAGGAagacgtaagaggCATTCACAGGGCACATTCACCA GTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGCCCAAGATTT TGTGCAGTGGTTGATGAATACCAAGAGGAACAGGAATAACATT GCCagaaaaaagagaATCAAACCCGAGGCTCCCCGCGAAGACGCCTC GCCGGAGGAGCTGAACCGCTACTACGCCTCCCTGCGCCACTAC CTCAACCTGGTCACCCGGCAGCGGTATTGA
72	GOP_L	mGHRH	hGLP-1, hOXM, PYY	*ATGCTGCTCTGGGTGCTCTTTGTGATCCTCATCCTCACCAGTGGCT* *CCCACTGCTCA*ctgccccccctcacctccttcaggatgcagcgaCATGCTGAAGGG ACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGC CAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGAagacgtaag aggCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCT GGACTCCAGGCGTGCCCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAAT

[0170]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
				ACCAAGAGGAACAGGAATAACATTGCCagaaaaaagagaATCAAAC CCGAGGCTCCCCGCGAAGACGCCTCGCCGGAGGAGCTGAACC GCTACTACGCCTCCCTGCGCCACTACCTCAACCTGGTCACCCGG CAGCGGTATTGA
73	GOP_M	hAlbumin	hGLP-1, hOXM, PYY	*ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCT* *TATTCC*agggggtgtgtttcgtcgaCATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGAT GTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTG CTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGAagacgtaagaggCATTCACAGGGC ACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTG CCCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAATACCAAGAGGAACAG GAATAACATTGCCagaaaaaagagaATCAAACCCGAGGCTCCCCGCG AAGACGCCTCGCCGGAGGAGCTGAACCGCTACTACGCCTCCCT GCGCCACTACCTCAACCTGGTCACCCGGCAGCGGTATTGA
74	GGG_A	hGH	hGLP-1, hGlucagon, hGIP	*ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTG* *CTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCC*ttcccaaccattcccttatcc aggcttttgacaacgctatgctccgcgccagaaaaaaagagaCATGCTGAAGGGACCTT TACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGGCCAAGCTGCCAAG GAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCCGAGGAagacgtaagaggCA TTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGAC TCCAGGCGTGCCCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAATACCag aaaaaagagaTACGCGGAAGGGACTTTCATCAGTGACTACAGTATT GCCATGGACAAGATTCACCAACAAGACTTTGTGAACTGGCTGC

[0171]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
				TGGCCCAAAAGGGGGAAGAAGAATGACTGGAAACACAACATCA CCCAGTGA
78	无信号肽的 3xGLP-1	n/a	hGLP-1, hGLP-1, hGLP-1,	CATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGA AGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGC CGAGGAagaaaaaagagaCATGCAGAGGGAACATTTACTAGTGATGT CAGTTCATATCTTGAGGGACAAGCTGCTAAAGAATTTATTGCTT GGCTTGTGAAGGGAAGAGGA agaaagaagagaCATGCTGAAGGGACATTTACCTCAGATGTTTCTTC ATACCTGGAAGGACAGGCTGCCAAGGAATTTATTGCATGGCTT GTGAAAGGCAGGGGCtga
79	hGLP-1, hOXM, 无信号肽的 PYY	n/a	hGLP-1, hOXM, PYY	CATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGA AGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGC CGAGGAagacgtaagaggCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTA CAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGCCCAAGATTTTGTGCAG TGGTTGATGAATACCAAGAGGAACAGGAATAACATTGCCagaaaa aagagaATCAAACCCGAGGCTCCCCGCGAAGACGCCTCGGCCGGAG GAGCTGAACCGCTACTACGCCTCCCTGCGCCACTACCTCAACC TGGTCACCCGGCAGCGGTATTGA
80	hGLP-1, hGlucagon, 无信号肽的 hGIP	n/a	hGLP-1, hGlucagon, hGIP	CATGCTGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGA AGGCCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGC CGAGGAagacgtaagaggCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTA CAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGCCCAAGATTTTGTGCAG

[0172]

SEQ ID NO	构建体名称	信号肽	肠肽	序列
				TGGTTGATGAATACCagaaaaaagagaTACGCGGAAGGGACTTTCAT CAGTGACTACAGTATTGCCATGGACAAGATTCACCAACAAGAC TTTGTGAACTGGCTGCTGGCCCAAAAGGGGAAGAAGAATGACT GGAAACACAACATCACCCAGTGA

[0173] 弗林蛋白酶识别和切割序列

[0174] 本文提供了编码一种或多种被蛋白酶识别的序列的表达构建体。在实施方案中，

蛋白酶是弗林蛋白酶。弗林蛋白酶恰好在碱性氨基酸最小弗林蛋白酶切割位点的下游切割蛋白质。在实施方案中,该最小弗林蛋白酶切割位点是Arg-X-X-Arg(优选地,Arg-X-(Arg/Lys)-Arg)。然而,除了最小弗林蛋白酶切割位点之外,弗林蛋白酶还可以识别靶多肽内的较长序列。该较长序列(包含最小弗林蛋白酶切割位点)在本文中称为“弗林蛋白酶识别和切割序列”。包含弗林蛋白酶识别和切割序列可以促进表达的多肽(诸如肠肽或包含一种或多种肠肽的多蛋白)的功能性N端在非内分泌细胞中被完全加工和生成。

[0175] 在一些实施方案中,弗林蛋白酶识别和切割序列包含:(1)SEQ ID NO:89、92-96中的任一者,或者(2)与SEQ ID NO:89、92-96中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,弗林蛋白酶识别和切割序列包含以下的一部分:(1)SEQ ID NO:89、92-96中的任一者,或者(2)与SEQ ID NO:89、92-96中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0176] 在实施方案中,提供了一种表达构建体,该表达构建体包含编码SEQ ID NO:89、92-96中的任一者的序列,或者与SEQ ID NO:89、92-96中的任一者至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。

[0177] 在实施方案中,提供了一种表达构建体,该表达构建体包含编码序列RKKR(SEQ ID NO:97)、RMQR(SEQ ID NO:98)、VFRR(SEQ ID NO:99)或RKKR(SEQ ID NO:100)中的任一者的序列。

[0178] 在实施方案中,单顺反子、双顺反子或三顺反子表达构建体包含表11中公开的序列或表11中公开的序列的一部分。在实施方案中,单顺反子、双顺反子或三顺反子表达构建体包含编码表11中公开的序列或表11中公开的序列的一部分的序列。

[0179] 本文提供了表达构建体,该表达构建体包含与本文所公开的任一序列至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的一个或多个序列。本文提供了包含一个或多个序列的表达构建体,所述一个或多个序列包含本文所公开的任一序列的一部分。

[0180] 本文提供了表达构建体,该表达构建体编码与本文所公开的任一序列至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少91%、至少97%、至少98%或至少99%同一的一个或多个序列。本文提供了编码一个或多个序列的表达构建体,所述一个或多个序列包含本文所公开的任一序列的一部分。

[0181] 表11.促进弗林蛋白酶切割的所选序列。

[0182]

SEQ ID NO	核酸序列	SEQ ID NO	氨基酸序列
81	TACCCATACGATGTTCCAGAT TACGCTAGAAAAAAGAGA	89	YPYDVPDYARKKR
84	TTCCCAACCATTCCCTTATCCA GGCTTTTTGACAACGCTATGC TCCGCGCCAGAAAAAAGAGA	92	FPTIPLSRLFDNAMLR ARKKR
85	GCTCCCCCACGCCTCATCTGC GACAGTCGAGTTCTGGAGAGG TACAGAAAAAAGAGA	93	APPRLICDSRVLERYR KKR
86	CTGCCCCCCTCACCTCCCTTCA GGATGCAGCGA	94	LPPSPPFRMQR
87	AGGGGTGTGTTTCGTCGA	95	RGVFRR
88	ACAGTTTTTCTTGATCATGAA AACGCCAACAAAATTCTGAAT CGGCCAAAGAGG	96	TVFLDHENANKILNR PKR
		97	RKKR

[0183]

SEQ ID NO	核酸序列	SEQ ID NO	氨基酸序列
		98	RMQR
		99	VFRR
		100	RPKR

[0184] 前导序列

[0185] 在实施方案中,本文所公开的表达构建体包含前导序列。如本文所用,“前导序列”是包含以下的序列:(1)信号肽和蛋白酶识别和切割序列,和/或(2)信号肽和最小蛋白酶切割位点。在实施方案中,前导序列包含:(1)信号肽和弗林蛋白酶识别和切割序列,和/或(2)信号肽和最小弗林蛋白酶切割位点。在前导序列中包含弗林蛋白酶识别和切割序列可以促进表达的多肽(诸如肠肽或包含一种或多种肠肽的多蛋白)的功能性N端在非内分泌细胞中被完全加工和生成。

[0186] 前导序列可源自天然存在的分泌性多肽或天然存在的分泌性多肽的变体。在实施方案中,前导序列或其一部分源自流感病毒血凝素、人生长激素、鼠生长激素释放激素或人白蛋白。

[0187] 启动子

[0188] 在本文所公开的表达构建体中可以使用任何合适的启动子。在一些实施方案中,启动子是CMV或CASI启动子。

[0189] 基因表达的调控

[0190] 在一些实施方案中,本文所公开的表达构建体提供了本文所公开的多肽的组成型表达。

[0191] 在一些实施方案中,本文所公开的表达构建体提供了本文所公开的多肽的可调控表达。

[0192] 在实施方案中,编码本文所公开的多肽的序列包含含有适体的核糖开关,其中核

糖开关可操作地连接到编码多肽的序列。在实施方案中,编码本文所公开的多肽的序列包含基因调控盒,其中基因调控盒包含适体。在实施方案中,多肽是本文所公开的多蛋白。

[0193] 适体是单链核酸分子,其通过折叠成三维结构以高亲和力和特异性非共价结合特异性配体。适体配体包括离子、小分子、蛋白质、病毒和细胞。适体配体可以是例如有机化合物、氨基酸、类固醇、碳水化合物或核苷酸。小分子适体配体的非限制性实例包括抗生素、治疗剂、染料、辅因子、代谢物、分子标志物、神经递质、污染物、毒素、食物掺杂物、致癌物、滥用药物。因此,适体可用于检测小分子。通过适体进行的小分子检测的应用包括环境监测、食品安全、医学(包括诊断学)、微生物学、分析化学、法医科学、农业和基础生物学研究。如本文所用的术语"适体"是指特异性结合一类配体的RNA多核苷酸(或编码RNA多核苷酸的DNA序列)。术语"配体"是指通过适体特异性结合的分子。适体具有能够与目标靶分子(即,配体)形成复合物的结合区。适体的长度通常将介于约15个和约200个核苷酸之间。更通常地,适体的长度将介于约30个和约100个核苷酸之间,例如长度为70个至90个核苷酸。适体通常包含多个配对(P)区,其中适体形成茎和未配对区,其中适体形成接合(J)区或环(L)区。配对区可以从5端开始顺序编号(P1),并顺序编号每个茎(P2、P3等)。基于相邻的配对区对环(L1、L2等)进行编号,并且根据它们连接的配对区对接合区进行编号。适体是以高亲和力和特异性结合靶配体的寡核苷酸。

[0194] 在实施方案中,与不存在小分子时编码本文所公开的多肽的序列的表达相比,结合适体的小分子的存在导致编码本文所公开的多肽的序列的表达增加。在此类实施方案中,适体构成"打开"开关。在实施方案中,与不存在小分子时相比,在存在结合适体的小分子时,编码本文所公开的多肽的序列的表达增加至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或至少10,000倍。在实施方案中,与不存在小分子时相比,在存在结合适体的小分子时,编码本文所公开的多肽的序列的表达增加2倍至10倍、5倍至10倍、5倍至15倍、5倍至20倍、5倍至25倍、5倍至30倍、10倍至20倍、10倍至30倍、10倍至40倍、10倍至50倍、10倍至100倍、10倍至500倍、10倍至1,000倍、50倍至100倍、50倍至500倍、50倍至100倍、50倍至1,000倍、100倍至1,000倍或100倍至10,000倍。

[0195] 在实施方案中,与不存在小分子时编码本文所公开的多肽的序列的表达相比,结合适体的小分子的存在导致编码本文所公开的多肽的序列的表达减少。在此类实施方案中,适体构成"关闭"开关。在实施方案中,与不存在小分子时相比,在存在结合适体的小分子时,编码本文所公开的多肽的序列的表达减少至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或至少10,000倍。在一个实施方案中,与不存在小分子时相比,在存在结合适体的小分子时,编码本文所公开的多肽的序列的表达减少2倍至10倍、5倍至10倍、5倍至15倍、5倍至20倍、5倍至25倍、5倍至30倍、10倍至20倍、10倍至30倍、10倍至40倍、10倍至50倍、10倍至100倍、10倍至500倍、10倍至1,000倍、50倍至100倍、50倍至500倍、50倍至100倍、50倍至1,000倍、100倍至1,000倍或100倍至10,000倍。

[0196] 在实施方案中,适体是核糖开关的一部分。核糖开关是RNA多核苷酸的调控片段,其响应于适体特异性配体分子的存在或不存在而调控RNA多核苷酸的稳定性和/或调控蛋白质从RNA多核苷酸的产生。在实施方案中,核糖开关包括传感区(例如,适体区)和效应区,

它们一起负责感测配体(例如,小分子)的存在并引起导致编码本文所公开的多肽的序列的表达增加或减少的效应。本文所述的核糖开关是重组的,利用来自两种或更多种来源的多核苷酸。在实施方案中,传感区和效应区通过多核苷酸接头接合。在实施方案中,多核苷酸接头形成RNA茎或配对区(即,RNA多核苷酸的双链区)。在实施方案中,将适体连接到效应区的配对区包含适体茎部的全部或一些(例如,适体P1茎部的全部或一些)。

[0197] 包含适体序列的核糖开关可用于例如控制导致过早转录终止的不依赖rho的转录终止发夹的形成。包含适体序列的核糖开关也可以诱导RNA的结构变化,导致核糖体结合位点的螯合和翻译的抑制。包含本文所公开的适体序列的另选核糖开关结构可响应于小分子配体的存在而进一步影响mRNA的剪接。

[0198] 可变剪接核糖开关

[0199] 在一个实施方案中,本文所述的核糖开关被编码为基因调控盒的一部分,该基因调控盒用于通过所得RNA(例如,前mRNA)的适体/配体介导的可变剪接来调控编码本文所公开的多肽的序列。在该上下文中,基因调控盒包含核糖开关,该核糖开关包含传感区(例如,本文所述的适体)和效应区,它们一起负责感测小分子配体的存在并改变对可变外显子的剪接。剪接是指从新生前信使RNA(前mRNA)中去除内含子序列并将外显子接合在一起形成mRNA的过程。剪接位点是外显子与内含子之间的连接,并且由内含子的5′端和3′端处的不同剪接位点共有序列(即,分别为剪接供体位点和剪接受体位点)限定。剪接由称为剪接体的大的多组分结构进行,该剪接体是小核核糖核蛋白(snRNP)和各种辅助蛋白阵列的集合。通过识别各种顺式调节序列,剪接体限定外显子/内含子边界,去除内含子序列,并且将外显子一起剪接成最终信息(例如,mRNA)。就可变剪接而言,可包含或排除某些外显子以改变最终的编码信息,从而改变所得的表达蛋白质。

[0200] 在一个实施方案中,通过使用PCT专利公布WO2016/126747中公开的任一DNA构建体来实现对编码本文所公开的多肽的序列的表达的调控,该专利公布全文据此以引用方式并入。在本公开的实施方案中,PCT专利公布WO2016/126747中公开的核糖开关和多核苷酸盒包含本文所述的适体序列以代替PCT专利公布WO2016/126747中公开的适体序列。

[0201] 在一个实施方案中,多核苷酸盒包含(a)核糖开关和(b)侧接5′内含子和3′内含子的可变剪接外显子,其中核糖开关包含(i)包含茎形成序列的效应区和(ii)适体,所述茎形成序列包含3′内含子的5′剪接位点序列和与3′内含子的5′剪接位点序列互补的序列。在实施方案中,效应区包含紧邻可变外显子3′的内含子的内含子5′剪接位点(“5′ss”)序列,以及与3′内含子的5′ss序列互补的序列。当适体结合其配体时,效应区形成茎并且因此防止剪接至可变外显子的3′端的剪接供体位点。在某些条件下(例如,当适体不与其配体结合时),效应区处于提供对可变外显子的3′端的剪接供体位点的接近的背景中,导致在编码本文所公开的多肽的序列的mRNA中包含可变外显子。在一些实施方案中,多核苷酸盒被置于编码本文所公开的多肽的序列中,以响应于配体而调控编码本文所公开的多肽的序列的表达。在一个实施方案中,可变剪接外显子包含终止密码子,当可变剪接外显子被剪接成编码本文所公开的多肽的序列的mRNA时,该终止密码子与编码本文所公开的多肽的序列符合读框。

[0202] 在一个实施方案中,基因调控盒包含SEQ ID NO:101的序列,其中-X-表示适体序列。小写字母表示将适体连接到核糖开关的其余部分的配对茎序列。在一个实施方案中,可

变外显子(下面的SEQ ID NO:101中的加下划线部分)被另一个可变外显子序列替代。

SEQ ID NO:101-

[0203] GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTT
CTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGG
GTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTT
TAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATCTTAT
TTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGAT
ACAATGTATCATGCCGAGTAACGCTGTTTCTCTAACTTGTAGG
AATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAG
TAGAAGgtaatgt-X-acattacGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATA
ATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATT
TCTGCATATAAATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTA
[0204] ATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGT
TGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAG。

[0205] 可变外显子侧接5′和3′内含子序列。可用于本文所公开的基因调控盒中的5′和3′内含子序列可以是可从编码本文所公开的多肽的序列剪接出的任何序列,产生编码本文所公开的多肽的序列的mRNA或编码本文所公开的多肽的序列(该序列包含mRNA中的可变外显子),具体取决于结合适体的配体的存在与否。5′和3′内含子序列各自具有发生剪接所必需的序列,即剪接供体、剪接受体和分支点序列。在一个实施方案中,基因调控盒的5′和3′内含子序列源自一个或多个天然存在的内含子或其部分。在一个实施方案中,5′和3′内含子序列源自截短的人β-球蛋白内含子2(IVS2Δ)、人β-球蛋白基因的内含子2、SV40 mRNA内含子(用于得自Clontech Laboratories,Inc.的pCMV-LacZ载体中)、人磷酸丙糖异构酶(TPI)基因的内含子6(Nott Ajit等人,RNA.2003,9:6070617)、来自人因子IX的内含子(Sumiko Kurachi等人,J.Bio.Chem.1995,270(10),5276)或含有足以调控剪接的元件(Thomas A.Cooper,Methods 2005(37):331)的任何基因组片段或合成内含子(Yilai等人,Hum Gene Ther.2006:17(10):1036)。

[0206] 可变剪接基因调控盒中的剪接供体位点和剪接受体位点可被修饰以增强或减弱。也就是说,剪接位点序列可通过标准克隆方法、定点诱变等被修饰为更接近剪接供体或受体的共有序列。与剪接共有序列更相似的剪接位点序列倾向于促进剪接并因此被增强。与剪接共有序列较不相似的剪接位点序列倾向于阻碍剪接并因此被减弱。最常见的一类内含子(U2)的剪接供体的共有序列是A/C A G||G T A/G A G T(SEQ ID NO:102,其中||表示外显子/内含子边界)。剪接受体的共有序列是C A G||G(其中||表示外显子/内含子边界)。剪接供体和受体位点处的特定核苷酸的频率在本领域中有所描述(参见例如Zhang,M.Q.,Hum

Mol Genet.1988.7(5):919-932)。可调整5′和3′剪接位点的强度以调节可变外显子的剪接。

[0207] 可用于调节剪接的可变剪接基因调控盒中存在的5′和3′内含子的附加修饰包括修饰、缺失和/或添加内含子剪接增强子元件、内含子剪接抑制子元件和/或剪接位点,并且/或者修饰分支位点序列。

[0208] 在一个实施方案中,5′内含子已被修饰以含有终止密码子,该终止密码子将与编码本文所公开的多肽的序列符合读框。还可修饰5′和3′内含子序列以去除隐蔽剪接位点,这可以用公众可获得的软件来鉴定(参见例如Kapustin,Y等人,Nucl.Acids Res.2011.1-8)。

[0209] 可调整5′和3′内含子序列的长度以便例如满足病毒表达构建体的大小要求。在一个实施方案中,5′和/或3′内含子序列的长度为约50个至约300个核苷酸。在一个实施方案中,5′和/或3′内含子序列的长度为约125个至约240个核苷酸。

[0210] 效应区的茎部分应具有足够的长度(和GC含量),以在配体结合适体时基本上防止可变外显子的可变剪接,同时当配体不以足够的量存在时也允许接近剪接位点。在实施方案中,效应区的茎部分包含除了3′内含子的5′剪接位点序列和5′剪接位点序列的互补序列之外的茎序列。在实施方案中,该附加茎序列包含来自适体茎的序列。可使用已知技术修饰茎部分的长度和序列,以便鉴定在不存在配体时允许编码本文所公开的多肽的序列的可接受的背景表达和在存在配体时允许编码本文所公开的多肽的序列的可接受的表达水平的茎。在一个实施方案中,核糖开关的效应区茎的长度为约7个至约20个碱基对。在一个实施方案中,效应区茎的长度为8个至11个碱基对。除了茎的长度之外,还可改变茎的GC碱基对含量以修改茎的稳定性。

[0211] 在一个实施方案中,作为本文所公开的可变剪接基因调控盒的一部分的可变外显子是能够被转录成前mRNA并可变剪接成编码本文所公开的多肽的序列的mRNA的多核苷酸序列。在一个实施方案中,可变外显子含有至少一个抑制翻译的序列,使得当可变外显子包含在编码本文所公开的多肽的序列的mRNA中时,阻止或减少编码本文所公开的多肽的序列从该mRNA的表达。在一个优选的实施方案中,可变外显子含有终止密码子(TGA、TAA、TAG),当可变外显子通过剪接被包含在编码本文所公开的多肽的序列的mRNA中时,该终止密码子与编码本文所公开的多肽的序列符合读框。在实施方案中,除了终止密码子之外,或作为终止密码子的替代,可变外显子包含另一序列,当可变外显子通过剪接成编码本文所公开的多肽的序列的mRNA而并入时,该另一序列减少或基本上阻止翻译,所述序列包含例如导致mRNA降解的微小RNA结合位点。在一个实施方案中,可变外显子包含导致mRNA降解的miRNA结合序列。在一个实施方案中,可变外显子编码降低含有该多肽序列的蛋白质的稳定性的多肽序列。在一个实施方案中,可变外显子编码引导含有该多肽序列的蛋白质降解的多肽序列。

[0212] 可通过改变外显子剪接增强子(ESE)序列和外显子剪接抑制子(ESS)序列并且/或者通过将ESE或ESS序列引入可变外显子中来优化可变外显子的剪接的基础或背景水平。可使用本领域已知的方法实现对可变外显子序列的这种改变,所述方法包括但不限于定点诱变。另选地,可从商业来源获得期望序列的寡核苷酸(例如,包含可变外显子的全部或部分),并将其克隆到基因调控盒中。ESS和ESE序列的鉴定可通过本领域已知的方法完成,包

括例如使用ESEfinder 3.0(Cartegni,L.等人,ESEfinder:a web resource to identify exonic splicing enhancers.Nucleic Acid Research,2003,31(13):3568-3571)和/或其他可用资源。

[0213] 在一个实施方案中,可变外显子是天然存在的外显子。在另一个实施方案中,可变外显子源自已知外显子的全部或一部分。在该上下文中,“衍生”是指含有与天然存在的外显子或其部分基本上同源的序列的可变外显子,但可包含各种突变,诸如通过改变外显子剪接增强子(ESE)序列和外显子剪接抑制子(ESS)序列和/或通过将ESE或ESS序列引入可变外显子中而产生的突变。如本文所用的“同源性”和“同源的”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽序列之间的同一性百分比。一个序列与另一个序列之间的对应性可通过本领域已知的技术来确定。例如,可通过比对两个多肽分子的序列并使用容易获得的计算机程序直接比较这两个多肽分子来确定同源性。另选地,可通过在同源区之间形成稳定双链体的条件下杂交多核苷酸,然后用单链特异性核酸酶消化,并测定消化片段的大小来确定同源性。当在与适当的插入或缺失最佳比对之后,如使用上述方法所测定,至少约80%、至少约85%、至少约90%和至少约95%的核苷酸或氨基酸分别在分子的限定长度上匹配时,两个多核苷酸或两个多肽序列彼此“基本上同源”。

[0214] 在一个实施方案中,可变外显子对于编码本文所公开的多肽的序列是外源的,尽管它可以源自将表达编码本文所公开的多肽的序列的生物体的序列。如本文所用,“外源的”意指源自在基因型上与被比较或被引入或并入的实体的其余部分不同的实体。例如,通过基因工程技术被引入不同细胞类型的多核苷酸是异源多核苷酸(并且当表达时,可以编码异源多肽)。在一个实施方案中,可变剪接外显子源自人二氢叶酸还原酶基因(DHFR)的外显子2、突变的人Wilms肿瘤1外显子5、小鼠钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II δ外显子16或SIRT1外显子6。在实施方案中,可变剪接外显子是或包含SEQ ID NO:103(GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAG)中的经修饰的DHFR外显子2。在实施方案中,可变剪接外显子是或包含SEQ ID NO:104(GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAATCTTCAGTAGAAG)中的经修饰的DHFR外显子2。

[0215] 适体介导的自切割核酶切割

[0216] 在一个实施方案中,编码本文所公开的多肽的序列的适体介导的表达通过适体介导的小核酸内切核酶调节来调控。核酶是催化化学反应的RNA酶。在本文所公开的核酸和方法中,核酶可以是在靶细胞类型中将自切割的任何小核酸内切核酶,包括但不限于锤头型、发夹型、丁型肝炎病毒、Varkud卫星、twister、twister sister、手枪或hatchet核酶。因此,在一个实施方案中,提供了核糖开关和包含含有与适体连接的核酶的核糖开关的基因表达盒。WO2017/136608描述了在适体配体的存在下激活核酶自切割的核糖开关(“关闭”开关)或在适体的存在下抑制核酶自切割的核糖开关(“打开”开关),该文献全文以引用方式并入本文。

[0217] 在“关闭”开关场景中,适体/配体结合增加了核酶的核糖核酸酶功能,导致含有多核苷酸盒的编码本文所公开的多肽的序列的RNA的切割,从而减少编码本文所公开的多肽的序列的表达。这种关闭开关的实例包括用于调控包含核糖开关的编码本文所公开的多肽的序列的表达的多核苷酸盒,该核糖开关包含通过茎连接到适体的twister核酶,其中将twister核酶连接到适体的茎在twister核酶的P3茎的位置处连接到核酶,并且其中编码本

文所公开的多肽的序列连接到twister核酶的P1茎(参见例如WO2017/136608的图1a、图1b或图3a以及相关文本,其以引用方式并入本文)。

[0218] 在“打开”开关场景中,适体/配体结合抑制核酶的核糖核酸酶功能,减少含有多核苷酸盒的编码本文所公开的多肽的序列的RNA的切割,从而增加编码本文所公开的多肽的序列在配体的存在下的表达。打开开关的实例包括包含连接到适体的twister核酶的核糖开关,其中适体连接到twister核酶P1茎的3′端或5′端,其中当适体连接到twister核酶P1茎的3′端时,twister核酶P1茎的3′臂的一部分另选地为适体P1茎的5′臂,并且其中当所述适体连接到twister核酶P1茎的5′端时,twister核酶P1茎的5′臂的一部分另选地为适体P1茎的3′臂(参见例如WO2017/136608的图6a至图6b以及相关文本,其以引用方式并入本文)。

[0219] 聚腺苷酸化的适体调节

[0220] 在实施方案中,编码本文所公开的多肽的序列的表达由适体调节的聚腺苷酸化调控。几乎所有真核mRNA的3′端包含聚(A)尾,即20至250个腺苷残基的均聚物。因为将聚(A)尾添加到mRNA能保护其免于降解,所以可通过调节对应mRNA的聚腺苷酸化来影响基因的表达。

[0221] 在一个实施方案中,编码本文所公开的多肽的序列的表达通过适体调节的聚腺苷酸化信号的可接近性来调控,如WO2018/156658中所述,其全文以引用方式并入本文。在此类实施方案中,核糖开关包含效应子茎-环和适体,其中效应子茎-环包含聚腺苷酸化信号,并且其中适体和效应子茎-环通过交替共享的茎臂连接,该茎臂包含与适体茎的非共享臂和效应子茎环的非共享臂互补的序列(参见例如WO2018/156658的图1a、图1b、图2a和图5a以及相关文本,其以引用方式并入本文)。在一个实施方案中,效应子茎-环位于适体的3′处,使得交替共享的茎臂包含效应子茎的3′适体茎臂的全部或一部分和5′臂的全部或一部分。在一个实施方案中,效应子茎-环位于适体的5′处,使得交替共享的茎臂包含效应子茎的5′适体茎臂的全部或一部分和3′臂的全部或一部分。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号是AATAAA(SEQ ID NO:105)或ATTAAA(SEQ ID NO:106)。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号是下游元件(DSE)。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号是上游序列元件(USE)。在一个实施方案中,多核苷酸盒包含两个核糖开关,其中第一核糖开关的效应子茎环包含聚腺苷酸化信号AATAAA(SEQ ID NO:105)或ATTAAA(SEQ ID NO:106)的全部或一部分,并且第二核糖开关的效应子茎环包含下游元件(DSE)的全部或一部分。在一个实施方案中,两个核糖开关各自包含结合相同配体的适体。在一个实施方案中,两个核糖开关包含结合不同配体的不同适体。

[0222] 在一些实施方案中,核糖开关包含感测区(例如,适体)和效应区,该效应区包含作为剪接体的一部分的小核核糖核蛋白(snRNP)U1的结合位点。WO2017/136591描述了其中效应区包含U1 snRNP结合位点的核糖开关,并且其全文以引用方式并入本文。当适体结合其配体时,效应区形成茎并且隔离U1 snRNP结合位点,以免结合U1 snRNP。在某些条件下(例如,当适体不与其配体结合时),效应区处于提供对U1 snRNP结合位点的接近的背景中,允许U1 snRNP结合mRNA并抑制导致信使降解的聚腺苷酸化。U1 snRNP结合位点可以是能够结合U1 snRNP的任何多核苷酸序列,从而将U1 snRNP募集到编码本文所公开的多肽的序列的3′UTR并且抑制编码本文所公开的多肽的序列的mRNA的聚腺苷酸化。在一个实施方案中,U1 snRNP结合位点是共有位点CAGGTAAGTA(SEQ ID NO:107)(当在mRNA中时为CAGGUAAGUA,SEQ

ID NO:108)。在一些实施方案中,U1 snRNP结合位点是该共有序列的变体,包括例如比共有序列更短或具有一个或多个核苷酸变化的序列。在一个实施方案中,U1 snRNP结合位点含有序列CAGGTAAG(SEQ ID NO:109)。在一些实施方案中,结合位点由选自CAGGTAAGTA(SEQ ID NO:107)、CAGGTAAGT(SEQ ID NO:110)和CAGGTAAG(SEQ ID NO:109)的序列编码。U1 snRNP结合位点可以是来自基因的任何5′剪接位点,例如来自人DHFR外显子2的5′剪接位点。

[0223] 适体介导的核糖核酸酶切割的调节

[0224] 在一个实施方案中,编码本文所公开的多肽的序列的表达通过适体调节的核糖核酸酶切割来调控。核糖核酸酶(RNA酶)识别并切割特异性核糖核酸酶底物序列。本文提供了重组DNA构建体,其在并入编码本文所公开的多肽的序列的DNA中时,提供通过对所得RNA的适体/配体介导的核糖核酸酶切割来调控编码本文所公开的多肽的序列的表达的能力。在一些实施方案中,本文所述的适体编码序列是含有或编码核糖核酸酶底物序列和核糖开关的构建体的一部分,所述核糖开关包含效应区和适体,使得当适体结合配体时,发生编码本文所公开的多肽的序列的表达(如WO2018/161053中所述,该文献全文以引用方式并入本文)。在实施方案中,RNA酶P底物序列连接到核糖开关,其中核糖开关包含效应区和适体,其中效应区包含与RNA酶P底物序列的一部分互补的序列。合适的配体与适体的结合诱导适体和效应区的结构变化,从而改变核糖核酸酶底物序列的可接近性以被核糖核酸酶切割。

[0225] 在一个实施方案中,适体序列位于RNA酶P底物序列的5′,并且效应区包含RNA酶P底物序列的前导序列的全部或一部分和5′受体茎序列的全部或一部分。参见例如WO2018/161053的图1a、图1b和图3b以及相关文本,其以引用方式并入本文。在另外的实施方案中,RNA酶P底物的受体茎和核糖开关效应区被0个、1个、2个、3个或4个核苷酸分开。在其他实施方案中,除了前导序列(及其互补序列)之外,效应区茎还包含RNA酶P底物的受体茎的一个或多个核苷酸,以及与受体茎的一个或多个核苷酸互补的序列。

[0226] 在一个实施方案中,多核苷酸盒的适体序列位于RNA酶P底物序列的3′,并且效应区包含与RNA酶P底物序列的3′受体茎的全部或一部分互补的序列。参见例如WO2018/161053的图3a以及相关文本,其以引用方式并入本文。在其他实施方案中,与RNA酶P底物的3′受体茎互补的效应区序列是1个至7个核苷酸。换句话讲,效应区茎包含受体茎的1个至7个核苷酸,并且包含与受体茎的该1个至7个核苷酸互补的序列。在实施方案中,核糖开关位于RNA酶P底物的3′,因此RNA酶P底物的效应区茎和受体茎不重叠。在实施方案中,RNA酶P底物的效应区和受体茎直接相邻(即,不重叠)。在其他实施方案中,RNA酶P底物的效应区和受体茎被1个、2个、3个、4个、5个或更多个核苷酸分开。

[0227] 载体

[0228] 在一方面,提供了重组载体及其用于引入本文所公开的表达构建体的用途。在一些实施方案中,本文所公开的载体包含附加的DNA元件,包括提供DNA在宿主细胞中复制和/或编码本文所公开的多肽的序列在靶细胞中以适当水平表达的DNA片段。普通技术人员将会理解,基于表达控制序列(启动子、增强子等)促进编码本文所公开的多肽的序列在靶细胞中表达的能力来选择表达控制序列。“载体”意指重组质粒、酵母人工染色体(YAC)、微型染色体、DNA微型环或病毒(包括病毒衍生的序列),其包含要在体外或体内递送到宿主细胞中的多核苷酸。在一个实施方案中,重组载体是病毒载体或多个病毒载体的组合。

[0229] 用于在靶细胞、组织或生物体中表达编码本文所公开的多肽的序列的病毒载体是本领域已知的,并且包括腺病毒(AV)载体、腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒和慢病毒载体,以及1型单纯疱疹病毒(HSV1)载体。还包括包含编码本文所公开的多肽的核酸的病毒颗粒。在实施方案中,病毒颗粒为AAV颗粒。

[0230] 腺病毒载体包括例如基于人2型腺病毒和人5型腺病毒的那些,它们通过E1区和E3区中的缺失而复制缺陷。可将转录盒插入E1区中,从而产生重组E1/E3缺失AV载体。腺病毒载体还包括辅助物依赖性高容量腺病毒载体(也称为高容量"无内脏"或"去内脏"载体),所述载体不含病毒编码序列。这些载体含有病毒DNA复制和包装所需的顺式作用元件,主要为反向末端重复序列(ITR)和包装信号(CY)。这些辅助物依赖性AV载体基因组具有携带从几百个碱基对至约36kb的外来DNA的潜力。

[0231] 重组腺相关病毒"rAAV"载体包括源自任何腺相关病毒血清型的任何载体,包括但不限于AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-7和AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAVrh10和AAV2-retro(公开于PCT专利公布WO2017218842A1中,其全文并入本文)等。rAAV载体可具有一个或多个完整或部分缺失的AAV野生型基因,优选地Rep和/或Cap基因,但保留功能性侧翼ITR序列。功能性ITR序列被保留用于AAV基因组的拯救、复制、包装和潜在的染色体整合。ITR不必是野生型核苷酸序列,并且可被改变(例如,通过核苷酸的插入、缺失或取代),只要该序列提供功能性拯救、复制和包装。

[0232] 可替代地,可使用诸如慢病毒载体的其他系统。基于慢病毒的系统可转导非分裂以及分裂细胞,使它们可用于靶向例如CNS的非分裂细胞的应用。慢病毒载体来源于人类免疫缺陷病毒,并且像所述病毒一样,整合至宿主基因组中,从而提供非常长期的基因表达的潜力。

[0233] 携带含有基因调控盒的编码本文所公开的多肽的序列的多核苷酸(包括质粒、YAC、微染色体和微环)也可通过非病毒载体系统,使用例如阳离子脂质、聚合物或两者作为载剂引入细胞或生物体中。还可使用共轭聚L-赖氨酸(PLL)聚合物和聚乙烯亚胺(PEI)聚合物系统来将载体递送至细胞。针对细胞培养物与生物体,用于将载体递送至细胞的其他方法包括流体力学注射和电穿孔以及使用超声波。关于用于基因递送的病毒和非病毒递送系统的综述,参见以引用的方式并入本文的Nayerossadat,N.等人(Adv Biomed Res.2012;1:27)。

[0234] 药物组合物

[0235] 本文提供了包含本文所公开的任何表达构建体、载体或病毒颗粒和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。除了表达构建体、载体或病毒颗粒之外,这些组合物还可包含药学上和/或生理学上可接受的赋形剂、载剂、缓冲剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂或本领域技术人员熟知的其他添加剂。这些材料应当是无毒的并且不应干扰活性成分的功效。载剂或其他材料的精确性质可由技术人员根据施用途径来确定。药物组合物通常呈液体形式。液体药物组合物通常包含液体载剂,诸如水、石油、动物油或植物油、矿物油或合成油。另外的载剂提供于以引用的方式并入本文的国际专利公布号WO 00/15822中。可包含生理盐水溶液、氯化镁、右旋糖或其他糖溶液或二醇类如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。在一些情况下,可使用表面活性剂,诸如普朗尼克酸(PF68)0.001%。在一些情况下,使用林格氏注射液、乳酸林格氏注射液或哈特曼氏溶液。根据需要,可包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其

他添加剂。

[0236] 对于延迟释放,可将表达构建体、载体或病毒颗粒包含在被配制用于缓释的药物组合物中,诸如包含在由生物相容性聚合物形成的微胶囊中或根据本领域已知的方法包含在脂质体载剂系统中。

[0237] 如果表达构建体、载体或病毒颗粒要长期储存,可以在甘油或其他冷冻保存剂的存在下冷冻。

[0238] 方法

[0239] 在一方面,提供了一种在有需要的受试者中诱导饱腹感的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0240] 在一方面,提供了一种治疗有需要的受试者的肥胖症的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0241] 在一方面,提供了一种抑制有需要的受试者的食欲的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0242] 在一方面,提供了一种减少有需要的受试者的体重增加的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0243] 在一方面,提供了一种改善有需要的受试者的葡萄糖耐受性的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0244] 在一方面,提供了一种治疗有需要的受试者的糖尿病的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0245] 在一方面,提供了一种在有需要的受试者中诱导胰岛素释放的方法,该方法包括向受试者施用本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物。

[0246] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物,其用于在有需要的受试者中诱导饱腹感的方法。

[0247] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物,其用于在有需要的受试者中治疗肥胖症的方法。

[0248] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物,其用于抑制有需要的受试者的食欲的方法。

[0249] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物,其用于减少有需要的受试者的体重增加的方法。

[0250] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物,其用于改善有需要的受试者的葡萄糖耐受性的方法。

[0251] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物,其用于治疗有需要的受试者的糖尿病的方法。

[0252] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物,其用于在有需要的受试者中诱导胰岛素释放的方法。

[0253] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物在制造用于在有需要的受试者中诱导饱腹感的药物中的用途。

[0254] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物在制造用于治疗有需要的受试者的肥胖症的药物中的用途。

[0255] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物在制造用于抑制有需要的受试者的食欲的药物中的用途。

[0256] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物在制造用于减少有需要的受试者的体重增加的药物中的用途。

[0257] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物在制造用于改善有需要的受试者的葡萄糖耐受性的药物中的用途。

[0258] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物在制造用于治疗有需要的受试者的糖尿病的药物中的用途。

[0259] 本文提供了本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物在制造用于在有需要的受试者中诱导胰岛素释放的药物中的用途。

[0260] 本文提供了一种治疗需要增加本文所公开的多肽(包括多蛋白)表达的受试者的方法,所述多肽由编码该多肽的序列编码,该方法包括向患者施用包含配体的药物组合物,该配体与适体结合或以其他方式响应,其中患者先前已被施用包含编码多肽的序列的重组DNA,并且其中编码多肽的序列含有本文所公开的基因调控盒,该基因调控盒提供通过适体的配体调控靶基因表达的能力。

[0261] 如本文所用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其中目标是为了减慢(减少)不希望的生理疾患、病症或疾病,或为了获得有益或所需的临床结果。出于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻;疾患、病症或疾病的程度减小;疾患、病症或疾病的状态稳定(即,没有恶化);疾患、病症或疾病的发作延迟或疾患、病症或疾病的进展减慢;疾患、病症或疾病状态的改善(amelioration);以及疾患、病症或疾病的缓解(无论部分还是全部)或增强或改善。治疗包括引发临床上显著的响应,而无过度的副作用。

[0262] 在一方面,在本文所公开的方法中,表达构建体通过基因疗法递送。编码本文所公开的多肽的序列的细胞特异性可由载体内的启动子和/或其他元件和/或病毒载体的衣壳控制。含有编码本文所公开的多肽的序列的载体构建体的递送,以及导致编码本文所公开的多肽的调控序列的稳定转染的靶组织转染是产生多肽的第一步。

[0263] 在一些实施方案中,如果使用编码本文所公开的多肽的序列内的适体,则编码本文所公开的多肽的序列不以显著水平表达,即,在不存在结合调控盒核糖开关中所含适体的特异性配体的情况下,其处于“关闭状态”。仅当施用适体特异性配体时,编码所公开的多肽的序列的表达才被激活。含有编码本文所公开的多肽的序列的载体构建体的递送以及激活配体的递送通常在时间上是分开的。当编码本文所公开的多肽的序列被表达时,激活配体的递送将受到控制,以及蛋白质表达的水平也受到控制。

[0264] 本文所公开的表达构建体、载体或药物组合物(以及在适体介导的基因表达调控的情况下的配体)可通过多种途径递送,包括但不限于玻璃体内、眼内、吸入、皮下、肌内、皮内、病灶内、局部、腹膜内、静脉内(IV)、动脉内、血管周、脑内、脑室内、口服、舌下、唇下、颊、鼻、胸内、心内、鞘内、硬膜外、骨内或关节内。

[0265] 如果使用适体,可根据需要调整配体的递送时间。例如,口服小分子配体可以每天递送,或每天多次递送。另选地,诱导配体的给药频率可以较低,例如每周一次、每隔一周一次、每月一次。

[0266] 制品和药盒

[0267] 还提供了用于本文所述的方法中的药盒和制品。在一些方面,药盒在合适的包装中包含本文所述的组合物(例如,用于递送包含本文所公开的表达构建体的载体的组合物)。用于本文所述的组合物(诸如用于注射的眼用组合物)的合适包装是本领域已知的,并且包括例如小瓶(诸如密封小瓶)、器皿、安瓿、瓶、广口瓶、软包装(例如密封聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。可进一步对这些制品进行灭菌和/或密封。

[0268] 还提供了包含本文所述的组合物的药盒。这些药盒还可包含关于使用组合物的方法(诸如本文所述的用途)的说明书。本文所述的药盒还可包括从商业和用户观点来看理想的其他材料,包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器以及带有用于执行组合物的施用或执行如本文所述的任何方法的说明书的包装插页。例如,在一些实施方案中,药盒包括用于表达本文所公开的多肽的rAAV、适于注射的药学上可接受的载剂以及以下中的一种或多种:缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器以及带有用于执行注射的说明书的包装插页。在一些实施方案中,药盒适于眼内注射、肌内注射、静脉内注射等。

[0269] 可以理解和预期的是,本领域技术人员可以对本文所公开的物质组合物和方法进行改变,并且此类修改旨在包括在本公开的范围内。以下实施例进一步说明本发明,但不应视为以任何方式限制本发明的范围。

[0270] 本文引用的所有参考文献据此全文以引用方式并入。除非另有说明,否则本文提供的所有核苷酸序列均为5′至3′取向。序列表与本文一起提交,其内容全文以引用方式并入本文。

[0271] 本文所公开的序列的概述

[0272] 所选的肠肽(还参见表1和表2)

[0273]

肠肽	SEQ ID NO 氨基酸	SEQ ID NO 核酸序列
hGLP-1	1	6、7和8
hGIP	2	9
hOXM	3	10
PYY	4	11
hGlucagon	5	12

[0274] 所选的信号肽(还参见表3和表4)

[0275]

信号肽	SEQ ID NO 氨基酸	SEQ ID NO 核酸序列
IgM	13	21

hInsul	14	22
mIgh	15	23
hGH	16	24
mEpo	17	25
mGHRH	18	26
hAlbumin	19	27
hFIX	20	28

[0276]

[0277] 示例性单顺反子构建体(还参见表5和表6)

构建体名称	信号肽	编码的肠肽	SEQ ID NO	SEQ ID NO
			氨基酸	核酸
GLP-1_C	IgM SP	hGLP-1	29	37
GLP-1_F	hInsul	hGLP-1	30	38
GLP-1_I	mIgh	hGLP-1	31	39
GLP-1_J	hGH	hGLP-1	32	40
GLP-1_K	mEpo	hGLP-1	33	41
GLP-1_L	mGHRH	hGLP-1	34	42
GLP-1_M	hAlbumin	hGLP-1	35	43
GLP-1_N	hFIX9	hGLP-1	36	44
GIP_C	IgM SP	hGIP	111	
GIP_E	hFIX9	hGIP	112	
GIP_F	hAlbumin	hGIP	113	
GIP_G	hGH	hGIP	114	

[0278]

[0279] 示例性双顺反子构建体(还参见表7和表8)

构建体名称	信号肽	肠肽	SEQ ID NO	SEQ ID NO
			氨基酸	核酸
2xGLP-1_2xB	hAlbumin	hGLP-1，hGLP-1	45	50
GG_J	hGH	hGLP-1，hGIP	46	51
GG_F	hInsul	hGLP-1，hGIP	47	52
GG_L	mGHRH	hGLP-1，hGIP	48	53
GG_M	hAlbumin	hGLP-1，hGIP	49	54
无信号肽的2xGLP-1	n/a	hGLP-1，hGLP-1	55	57
无信号肽的GG	n/a	hGLP-1，hGIP	56	58

[0280]

[0281] 示例性三顺反子构建体(还参见表9和表10)

[0282]

构建体名称	信号肽	肠肽	SEQ ID NO 氨基酸	SEQ ID NO 核酸
3xGLP-1_3xB	hAlbumin	hGLP-1，hGLP-1，hGLP-1，	59	67
3xGLP-1_3xC	hInsul	hGLP-1，hGLP-1，hGLP-1，	60	68
3xGLP-1_3xD	mGHRH	hGLP-1，hGLP-1，hGLP-1，	61	69
GOP_J	hGH	hGLP-1，hOXM，PYY	62	70
GOP_F	hInsul	hGLP-1，hOXM，PYY	63	71
GOP_L	mGHRH	hGLP-1，hOXM，PYY	64	72
GOP_M	hAlbumin	hGLP-1，hOXM，PYY	65	73
GGG_A	hGH	hGLP-1，hGlucagon，hGIP	66	74
无信号肽的3xGLP-1	n/a	hGLP-1，hGLP-1，hGLP-1，	75	78
hGLP-1，hOXM，无信号肽的PYY	n/a	hGLP-1，hOXM，PYY	76	79
hGLP-1，hGlucagon，无信号肽的hGIP	n/a	hGLP-1，hGlucagon，hGIP	77	80

[0283] 其他序列

[0284]

SEQ ID NO	序列
81	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGAAAAAAGAGA
84	TTCCCAACCATTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCAGAAAAAAGAGA
85	GCTCCCCCACGCCTCATCTGCGACAGTCGAGTTCTGG

[0285]

	AGAGGTACAGAAAAAAGAGA
86	CTGCCCCCCTCACCTCCCTTCAGGATGCAGCGA
87	AGGGGTGTGTTTCGTCGA
88	ACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTC TGAATCGGCCAAAGAGG
89	YPYDVPDYARKKR
92	FPTIPLSRLFDNAMLRARKKR
93	APPRLICDSRVLERYRKKR
94	LPPSPPFRMQR
95	RGVFRR
96	TVFLDHENANKILNRPKR
97	RKKR
98	RMQR
99	VFRR
100	RPKR
101	GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCCTTC TTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGA AGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAA TTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTT AATATACTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCC CTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGT ATCATGCCGAGTAACGCTGTTTCTCTAACTTGTAGGA ATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAAT CTTCAGTAGAAGgtaatgt-**X**-acattacGCACCATTCTAAAG AATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCA ATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGT AACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCT ACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGG GATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCT TTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCAC AG
102	X_1AGGTX_2AGT X_1=A 或 C X_2=A 或 G
103	GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAA ATCTTCAGTAGAAG
104	GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAA TCTTCAGTAGAAG
105	AATAAA
106	ATTAAA
107	CAGGTAAGTA
108	CAGGUAAGUA

[0286]

109	CAGGTAAG
110	CAGGTAAGT
115	agaaagaagagaCATGCTGAAGGGACATTTACCTCAGATGT TTCTTCATACCTGGAAGGACAGGCTGCCAAGGAATTT ATTGCATGGCTTGTGAAAGGCAGGGGCTGA

[0287] 实施例

[0288] 实施例1:使用单顺反子表达构建体表达可分泌肠肽

[0289] 实验步骤:

[0290] 为了构建编码可分泌肽的表达载体,合成含有编码信号肽的DNA序列、促进弗林蛋白酶切割位点的序列和人GLP-1_{7-37}或hGIP的基因片段(IDT),并将其克隆到含有CMV启动子的表达构建体中。

[0291] 为进行转染,在转染前一天将$3.5x10^4$个人胚肾(HEK)293细胞铺板于96孔平底板中。将质粒DNA(500ng)添加到管或96孔U形底板中。将TransIT-293试剂(Mirus;1.4μL)单独添加到50μL Optimum I培养基(Life Technologies)中,并使其在室温(RT)下静置5分钟。然后,将50μL该稀释转染试剂添加到DNA中,混合,并在RT下孵育20分钟。最后,将7μL该溶液添加到96孔板的细胞孔中。在转染后48小时收集转染细胞的上清液,并测定其GLP-1或GIP肽。

[0292] 对于GLP-1的酶联免疫吸附测定(ELISA),使用TransIT-293转染试剂(Mirus Bio)用含有人GLP-1肽的活性形式的编码序列的构建体转染HEK293细胞。向培养物中添加200nM磷酸西他列汀一水合物(Sigma),以抑制培养基中的二肽基肽酶DPP-IV。在转染后48小时收集来自转染细胞的上清液,并按照制造商说明书(Abcam)进行一步ELISA以检测上清液中的人GLP-1_{7-36}。

[0293] 结果:

[0294] 为了产生可分泌的GLP-1肽表达构建体,生成编码前导序列(包含信号肽序列和弗林蛋白酶识别和切割序列)的序列,并将其融合至编码GLP-1_{7-37}肽的序列的5′端。选择来自各种分泌蛋白的信号肽序列,并测试其促进GLP-1分泌的能力。弗林蛋白酶识别和切割序列包括具有最小弗林蛋白酶切割位点(RXXR用于共有弗林蛋白酶切割位点)和促进弗林蛋白酶识别和切割的切割位点的序列N末端的序列。在前导序列中包含弗林蛋白酶识别和切割序列促进GLP-1肽的功能性N末端在非内分泌细胞中被完全加工并生成。

[0295] 使用对于活性GLP-1_{7-36}具有特异性的ELISA测定活性GLP-1肽的表达。如图1A所示,在被生成用于表达GLP-1的所有八个构建体(参见表5和表6)中,仅构建体GLP-1_F(具有人胰岛素信号肽)、GLP-1_I(具有小鼠Ig重链信号肽)和GLP-1_L(具有小鼠GHRH信号肽)产生可检测的活性GLP-1肽。

[0296] 第二个验证实验证实了来自构建体GLP-1_F、I和L的GLP1-$_{7-37}$表达(图1B)。构建体GLP-1_M(具有人白蛋白信号肽)表达非常低但可检测量的GLP-1。这些表达结果表明,来自不同分泌蛋白的信号肽在促进可分泌GLP-1表达方面具有不同的效率。另外,ELISA测定法检测到弗林蛋白酶切割的肽。因此,GLP-1_{7-37}的低且不可检测的表达可能是由于低效的弗林蛋白酶切割导致的。

[0297] 使用相同的策略生成用于表达可分泌的人葡萄糖依赖性促胰岛素肽(GIP$_{1-42}$)的

构建体。构建体GLP-1_C、N、M和J(参见表5和表6)中所用的相同前导序列分别用于构建GIP_C、E、F和G。使用检测总GIP(包括GIP_{1-42}和GIP_{3-42})的ELISA测定GIP肽的表达。含有导致非常低或不可检测的GLP-1分泌量的前导序列的GIP构建体表达显著量的GIP(图1C)。然而,此处使用的测定识别GIP的C末端,因此弗林蛋白酶切割的效率(在肽的N末端)在测定中没有反映出来。

[0298] 实施例2:使用双顺反子和三顺反子表达构建体表达可分泌肠肽

[0299] 为了提高肠肽的表达水平,生成编码包含两个或三个GLP-1肽的多蛋白的双顺反子和三顺反子表达构建体。通过最小弗林蛋白酶切割位点序列(RXXR)分离肽。非内分泌细胞中多蛋白的翻译后弗林蛋白酶加工导致单个肽的释放。

[0300] 首先,构建GLP-1表达载体,其构建在GLP-1_M构建体上(编码包含人白蛋白信号肽序列和包含信号肽下游弗林蛋白酶切割位点的序列的多肽,参见SEQ ID NO:35)。GLP-1编码序列可以是编码$GLP\text{-}1_{7-37}$肽的任何多核苷酸序列。

[0301] 由于GLP-1_M构建体(参见表5和表6)表达非常低量的GLP-1,因此测试GLP-1编码序列的两个拷贝(双顺反子构建体2xGLP-1_2xB,参见表7和表8)或三个拷贝(三顺反子构建体3xGLP-1_3xB,参见表9和表10)是否会提高肽的表达水平(图2A)。如图2B所示,GLP-1编码序列的两个拷贝确实增加了活性GLP-1表达,并且三个拷贝甚至进一步显著增加了GLP-1表达。

[0302] 接着,生成三顺反子表达构建体3xGLP-1_3xC和3xGLP-1_3xD(参见表9和表10)(分别含有如构建体GLP-1_F和GLP-1_L中的前导序列,参见表5和表6)。如图2C所示,与单顺反子构建体GL-1_F和GLP-1_L相比,三顺反子构建体表达的GLP-1的量超过100倍。由于在测定中仅可检测到弗林蛋白酶切割的GLP-1,因此这种增强的高水平$GLP\text{-}1_{7-37}$表达也是在连接各个单独肽的插入弗林蛋白酶位点处有效弗林蛋白酶切割和有效翻译后加工的指示。

[0303] 这些结果证明小肽表达可通过使用本文所公开的表达构建体来增强。

[0304] 实施例3:用于表达不同类型肠肽的双顺反子和三顺反子表达构建体

[0305] 实验步骤:

[0306] 为了构建编码可分泌的多种肽的表达载体,合成含有编码信号肽、弗林蛋白酶切割序列和人$GLP\text{-}1_{7-37}$、人葡萄糖依赖性促胰岛素肽(GIP_{1-42})和人肽酪氨酸酪氨酸(PYY_{3-36})和人胃泌酸调节素(OXM)的DNA序列的基因片段(IDT),并将其克隆到含有CMV启动子的表达构建体中。

[0307] 对于检测人葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)的ELISA,用含有可分泌人$GLP\text{-}1_{7-37}$和GIP_{1-42}肽的编码序列或含有$GLP\text{-}1_{7-37}$、胃泌酸调节素和肽酪氨酸酪氨酸(PYY_{3-36})的编码序列的构建体的TransIT-293转染试剂(Mirus Bio)转染HEK293细胞。向培养物中添加200nM磷酸西他列汀一水合物(Sigma),以抑制培养基中的二肽基肽酶DPP-IV。在转染后48小时收集来自转染细胞的上清液,并按照制造商说明书进行活性$GLP\text{-}1_{7-36}$(Abcam)和总GIP(EMD Millipore)和总PYY(EMD Millipore)的ELISA测定。

[0308] 结果:

[0309] 接着,使用实施例2中讨论的生成多蛋白序列的策略,设计编码包含不同肠肽的多蛋白的表达构建体。

[0310] 构建体GLP-1_J、F、L和M(参见表5和表6)中使用的前导序列分别用于构建GG_J、F、

L、M,以共表达GLP-1_{7-37}肽和GIP_{1-42}肽(GG)(参见表7和表8)。

[0311] 如图3A所示,与单顺反子GLP-1表达构建体相比,所有四种双顺反子GG表达构建体表达更高水平的GLP-1_{7-37}肽。编码具有人胰岛素信号序列的多肽的构建体表达最高量的GLP-1_{7-37}肽(参见图3A中的GG_F以及图1A和图1B中的GLP-1_F)。

[0312] 类似地,来自GG构建体的GIP表达高于来自具有单一GIP的构建体的GIP表达,并且GG_F表达最高量的GIP(图3B)。

[0313] 接着,生成编码包含GLP-1_{7-37}肽、胰高血糖素肽和GIP_{1-42}肽的多蛋白的三顺反子表达构建体。三顺反子构建体GGG_A(参见表9和10)具有与单顺反子构建体GLP-1_J和GIP_G(参见表5和表6)相同的前导序列,但与单顺反子构建体相比,显示出显著更高的GLP-1_{7-37}肽(图3C)和GIP_{1-42}肽两者(图3D)的表达。

[0314] 接着,构建体GLP-1_J、F、L和M(参见表5和表6)中使用的前导序列分别用于构建用于GOP_J、F、L和M(参见表9和表10),以共表达GLP-1_{7-37}肽、OXM肽和PYY(GOP)。如图3E所示,与单顺反子构建体相比,所有四种三顺反子GOP构建体表达更高水平的GLP-1肽。再次,GOP_F表达最高量的GLP-1_{7-37}肽。此外,GOP_F构建体表达约27,158pg/ml的PYY_{3-36}。

[0315] 这些结果证明,与单顺反子表达构建体相比,本文所公开的三顺反子表达构建体提供显著增加的表达,并构成共表达多个小肽的有效策略。

[0316] 实施例4:核糖开关调控的肠肽表达

[0317] 接着,研究了肠肽的受控表达是否可用于治疗糖尿病、肥胖症和其他代谢适应症的基因疗法。为此,将核糖开关N5-12G6盒

(GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCT
ATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGT
ACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTA
AAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATCTTATTT
CTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATAC
AATGTATCATGCCGAGTAACGCTGTTTCTCTAACTTGTAGGAAT
GAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCAGTAG
AAGGTAATGTCTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATG
GAAGCAATCGACCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGTATGTC
CCGGCGCAGGGAGACATTACGCACCATTCTAAAGAATAACAGT
GATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAA
ATATTTCTGCATATAAATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATAT
TGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTT
ATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCC
CTTTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAG)分别插入双顺反子表达构建体GG_L(表达hGLP-1_{7-37}肽和$hGIP_{1-42}$肽,参见表7和表8)的编码多肽序列的

核苷酸81和82之间、或101和102之间、或137和138之间、或151和152之间、或176和177之间、或206和207之间、或286和287之间(从起始密码子开始计数),从而生成可调控的含有核糖开关的双顺反子表达构建体GG_L_1至7。

[0318] 如图4A所示,在转染到HEK293细胞中之后,这些构建体响应于小分子诱导剂治疗以剂量依赖性方式表达hGLP-1_{7-37}肽。还测定了由相同构建体表达的其他肽hGIP$_{1-42}$的调控表达。构建体GG_1和GG_L_4以剂量依赖性方式表达hGIP$_{1-42}$肽(图4B)。

[0319] 接着,将核糖开关盒插入构建体三顺反子表达构建体3xGLP-1_3xC中(参见表9和表10)的第172和173位之间的核苷酸位置(从多肽编码序列的起始密码子计数),得到可调控的GLP-1_3xC_4构建体。如图4C所示,GLP-1_3xC_4构建体响应于小分子诱导剂治疗以剂量依赖性方式表达GLP-1_{7-37}肽。

[0320] 接着,将核糖开关盒分别插入双顺反子表达构建体GG_F(表达hGLP-1_{7-37}肽和hGIP$_{1-42}$肽,参见表7和表8)的核苷酸122和123之间、或158和159之间、或172和173之间、或197和198之间、或227和228之间、或307和308之间的核苷酸位置(从起始密码子计数),从而生成可调控的双顺反子构建体GG_F_2至7。如图4D所示,在转染到HEK293细胞中之后,这些构建体响应于小分子诱导剂治疗以剂量依赖性方式表达GLP-1_{7-37}肽。具体地,可调控的双顺反子表达构建体GG_F_7在小分子诱导剂的每个指定浓度下表达最高水平的GLP-1_{7-37}肽。

[0321] 接着,将编码附加的弗林蛋白酶切割位点和GLP-1_{7-37}肽(agaaagaagagaCATGCTGAAGGGACATTTACCTCAGATGTTTCTTC ATACCTGGAAGGACAGGCTGCCAAGGAATTTATTGCATGGCTT GTGAAAGGCAGGGGCTGA, SEQ ID NO:115)的附加拷贝的序列添加到编码GG_F_7构建体中的最后一个氨基酸密码子的核酸的3′,得到可调控的三顺反子GG_F_7-GLP-1表达构建体。该GG_F_GLP-1构建体(编码包含两个拷贝的hGLP-1_{7-37}肽和一个拷贝的hGIP$_{1-42}$肽的多蛋白)以剂量响应方式表达进一步提高水平的hGLP-1_{7-37}肽(图4D)。

[0322] 最后,表达包含GLP-1、hOXM和PYY的多蛋白的可调控的三顺反子表达构建体响应于诱导剂以剂量依赖性方式表达PYY(图4E)。

[0323] 实施例5:GLP-1和GIP肽在体外和体内具有生物活性

[0324] 实验程序:

[0325] 为进行转染,在转染前一天将$3.5x10^4$个人胚肾(HEK)293细胞铺板于96孔平底板中。将质粒DNA(500ng)添加到管或96孔U形底板中。将TransIT-293试剂(Mirus;1.4μL)单独添加到50μL Optimum I培养基(Life Technologies)中,并使其在室温(RT)下静置5分钟。然后,将50μL该稀释转染试剂添加到DNA中,混合,并在RT下孵育20分钟。最后,将7μL该溶液添加到96孔板的细胞孔中。在转染后48小时收集转染细胞的上清液,并将其用作表达GLP-1或GIP肽来源的条件培养基。

[0326] 对于GLP-1和GIP生物活性测定,通过用含有hGLP-1R cDNA或hGIPR cDNA(SinoBiological)的pCMV3质粒稳定转染HEK293细胞,生成稳定表达人GLP-1受体(HEK-293-hGLP-1R)或表达人GIP受体(HEK-293-hGIPR)的HEK293细胞。用pCRE Tluc16-DD(Thermo Scientific)转染建立的稳定细胞系,该pCRE Tluc16-DD含有在cAMP响应元件(CRE)启动子驱动下的TurboLuc荧光素酶基因。在转染后5小时,在添加含有GLP-1和/或GIP

肽的条件培养基前一天,将转染的细胞以每孔2x10^{4}个细胞涂铺于96孔板中。添加100μl条件培养基后1小时,使用TurboLuc荧光素酶一步发光测定试剂盒(Thermo Scientific)按照制造商说明书进行荧光素酶测定,并使用Tecan微孔读板仪测量发光。

[0327] 为了产生AAV2/8(AAV2基因组,AAV8衣壳)病毒颗粒,将编码hGLP-1和hGIP的表达构建体GG_F克隆到AAV2质粒载体中。hGLP-1和hGIP基因的表达由CASI启动子驱动,其包含CMV和泛素C增强子元件和鸡β-肌动蛋白启动子。将AAV质粒载体包装到AAV8衣壳中,生成AAV病毒载体AAV8.GG_F。

[0328] 对于动物研究,从6周龄开始用高脂肪饮食(HFD)喂养雄性C57B1/6小鼠(Jackson Laboratory)。在第八周,将含有GG_F基因的AAV8载体的PBS或2.5x10^{11}基因组拷贝(GC)注射到小鼠后肢的四头肌和腓肠肌中。用PBS注射八周龄的雄性小鼠(Jackson Laboratory)作为对照组,该小鼠已喂食低脂肪饮食(LFD)。每周在AAV注射之前和之后监测动物体重。

[0329] 结果:

[0330] 为了进一步测定本文的多顺反子表达构建体表达的GLP-1和GIP肽的生物活性,使用稳定表达GLP-1受体或GIP受体的HEK293细胞。GLP-1和GIP肽的活性如实验程序中所述进行测定。

[0331] 如图5A所示,由单顺反子表达构建体GLP-1_F(表达hGLP-1_{7-37}肽,参见表5和表6)、双顺反子表达构建体GG_F(表达hGLP-1_{7-37}肽和hGIP$_{1-42}$肽,参见表7和表8)和三顺反子表达构建体GLP-1_3xC(表达包含三个拷贝的hGLP-1_{7-37}肽的多蛋白,参见表9和表10)表达的hGLP-1_{7-37}肽在激活CRE启动子驱动的荧光素酶中显示出活性。来自不表达GLP-1肽的GIP构建体转染的培养物的上清液在表达GLP-1受体的HEK293细胞(阴性对照)中不显示活性。

[0332] 如图5B所示,由双顺反子表达构建体GG_F(表达hGLP-1_{7-37}肽和hGIP$_{1-42}$肽,参见表7和表8)和单顺反子表达构建体GIP_F(表达hGIP$_{1-42}$肽,参见表5和表6)表达的hGIP$_{1-42}$肽激活CRE启动子驱动的荧光素酶基因。来自不表达GIP的单顺反子表达构建体GLP-1F(表达hGLP-1_{7-37}肽,参见表5和表6)或三顺反子表达构建体GLP-1_3xC(表达包含三个拷贝的hGLP-1_{7-37}肽的多蛋白,参见表9和表10)的上清液不激活CRE启动子驱动的荧光素酶基因(阴性对照)。这些结果表明由本文所公开的多顺反子表达构建体表达的肠肽具有生物活性。

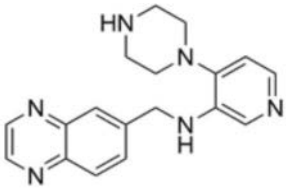
[0333] 为了进一步测试肠降血糖素肽hGLP-1和hGIP的生物活性及其抑制由于高脂肪饮食(HFD)导致的体重增加的潜力,使用AAV载体(包含表达构建体GG_F)在喂食高脂肪饮食的小鼠中表达hGLP-1和hGIP。与没有AAV.GG_F的小鼠相比,注射了表达hGLP-1和hGIP基因的AAV载体的小鼠体重增加减少(图5C)。该数据表明由本文的表达构建体表达的hGLP-1和hGIP具有生物活性,并且可用于治疗肥胖症的基因疗法中。

[0334] 实施例6:核糖开关调控的GLP-1和GIP表达增强葡萄糖耐受性

[0335] 实验程序:

[0336] 将肽编码序列克隆到含有AAV2 ITR、CSAI启动子和人β球蛋白聚A序列的AAV质粒主链中,并包装到AAV8衣壳中,从而生成AAV8.GG_F_7-GLP-1载体(参见实施例4)。

[0337] 对于动物研究(图6A),Balb/c小鼠接受肌内注射每只接受AAV8病毒颗粒的小鼠总共2.5x10^{11}个病毒基因组(VG)进入四头肌和腓肠肌两者。将具有化学结构



的化合物004配制在0.5％甲基纤维素(MC)中:用于口服施用的去离子(DI)水中的0.25％Tween®80。在AAV载体递送后30天,经由口服管饲法用300mg/kg化合物004口服处理小鼠4天。

[0338] 对于非禁食腹膜内葡萄糖耐受性测试(IPGTT),注射AAV载体的小鼠(N＝5)用300mg/kg化合物004处理4天,并在IPGTT之前5小时给予300mg/kg。用手持式血糖仪(CVS Health)测量尾静脉血中的血糖。在葡萄糖注射前(0min),然后在腹膜内注射葡萄糖(2g/kg)后15min、30min、60min和120min测量葡萄糖。

[0339] 结果:

[0340] 如图6B所示,用小分子诱导剂处理的小鼠显示出比接受给药载体的小鼠更好的葡萄糖耐受性。

[0341] 这表明注射载体表达的GLP-1和GIP肽增加了胰岛素释放,因此改善了葡萄糖耐受性。

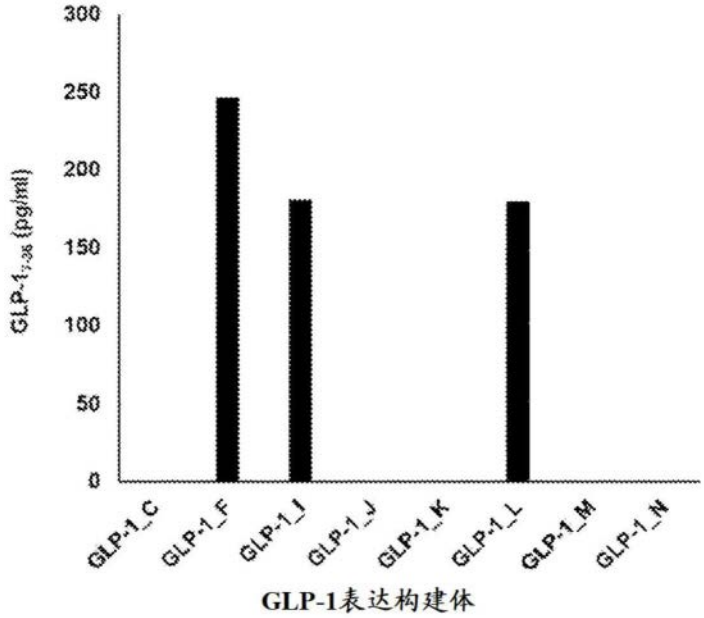

300
250
200
150
100
50
0
GLP-1$_{7-36}$ (pg/ml)
GLP-1_C
GLP-1_F
GLP-1_I
GLP-1_J
GLP-1_K
GLP-1_L
GLP-1_M
GLP-1_N
GLP-1表达构建体

图1A

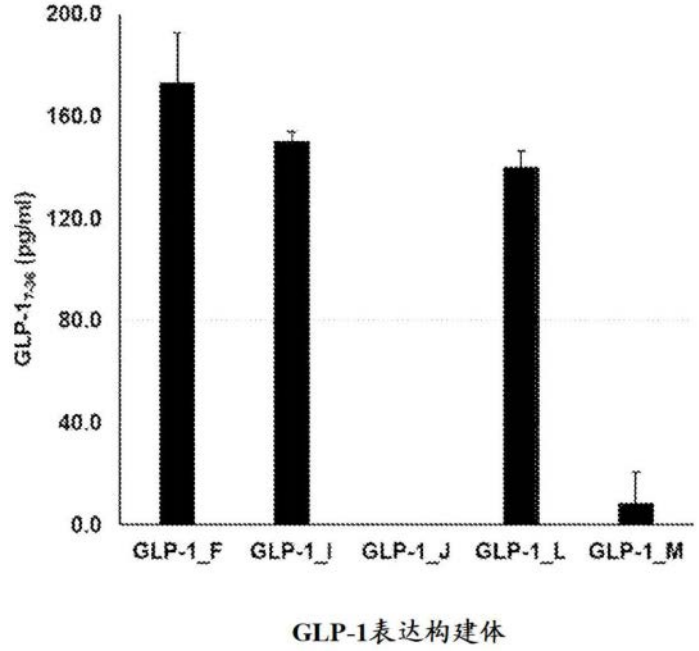

200.0
160.0
120.0
80.0
40.0
0.0
GLP-1$_{7-36}$ (pg/ml)
GLP-1_F
GLP-1_I
GLP-1_J
GLP-1_L
GLP-1_M
GLP-1表达构建体

图1B

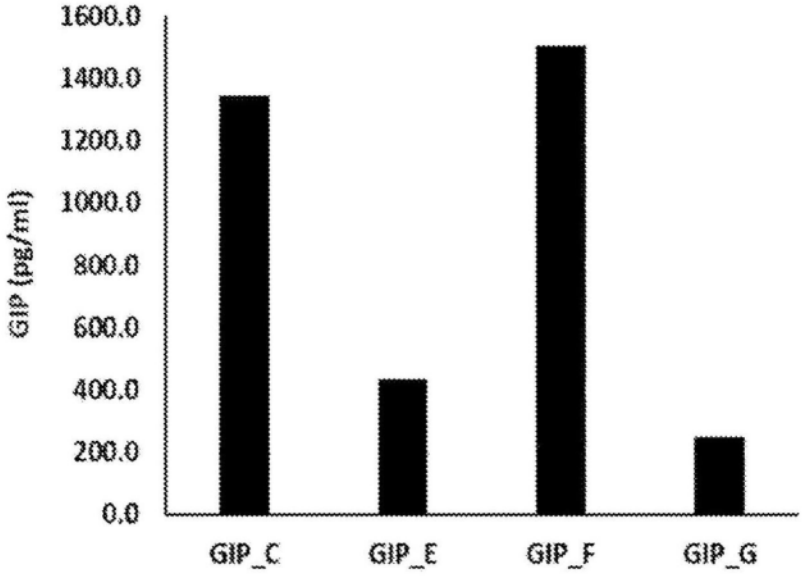

1600.0
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
GIP (pg/ml)
GIP_C
GIP_E
GIP_F
GIP_G

图1C

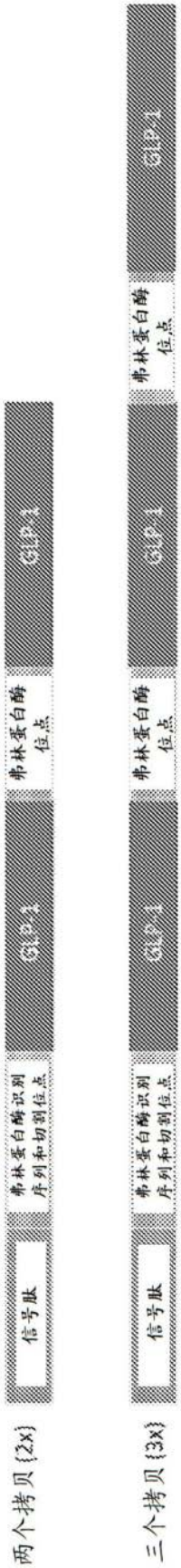

两个拷贝{2x}
信号肽
弗林蛋白酶识别序列和切割位点
GLP-1
弗林蛋白酶位点
GLP-1
三个拷贝{3x}
信号肽
弗林蛋白酶识别序列和切割位点
GLP-1
弗林蛋白酶位点
GLP-1
弗林蛋白酶位点
GLP-1

图2A

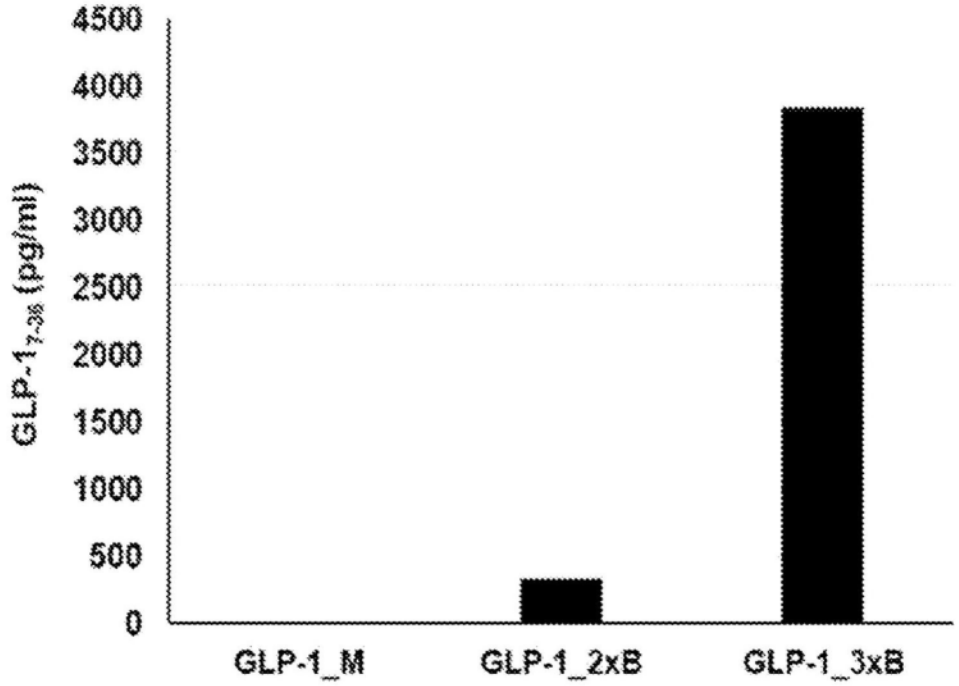

4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
GLP-1_M
GLP-1_2xB
GLP-1_3xB

图2B

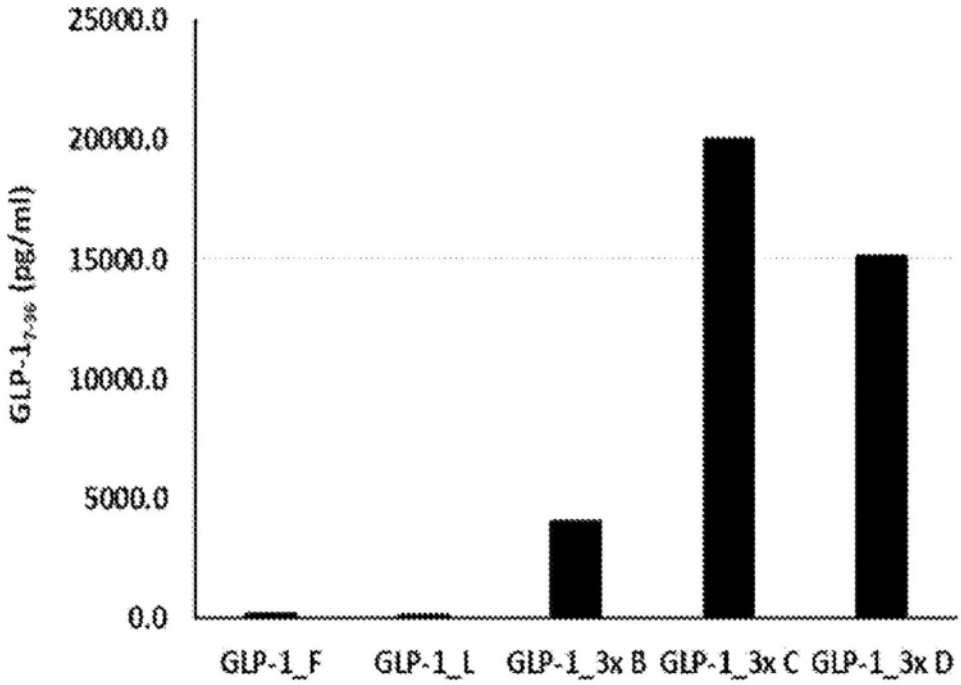

25000.0
20000.0
15000.0
10000.0
5000.0
0.0
GLP-1_F
GLP-1_L
GLP-1_3x B
GLP-1_3x C
GLP-1_3x D

图2C

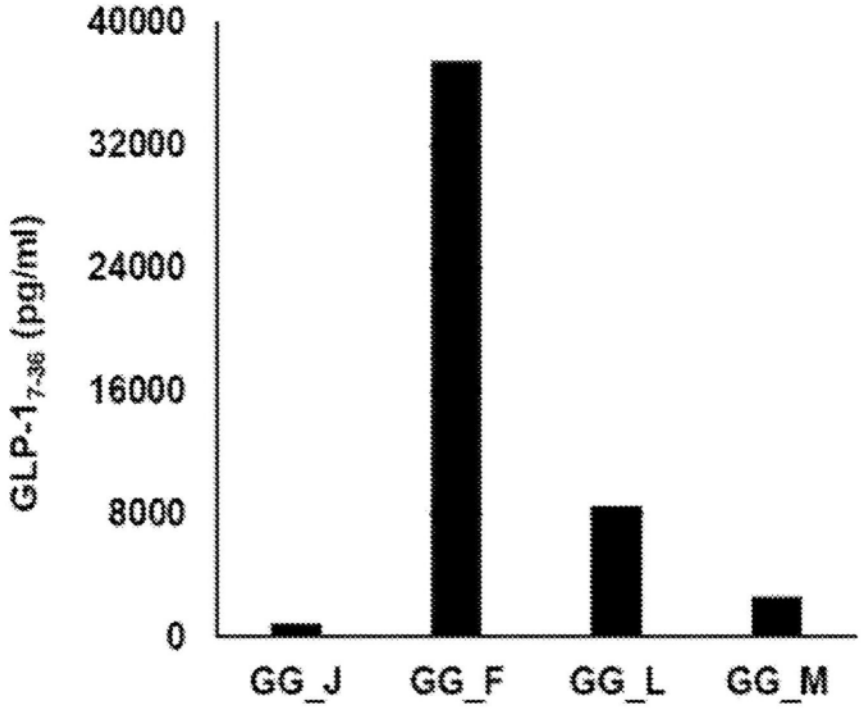

40000
32000
24000
16000
8000
0
GLP-1 7-36 (pg/ml)
GG_J
GG_F
GG_L
GG_M

图3A

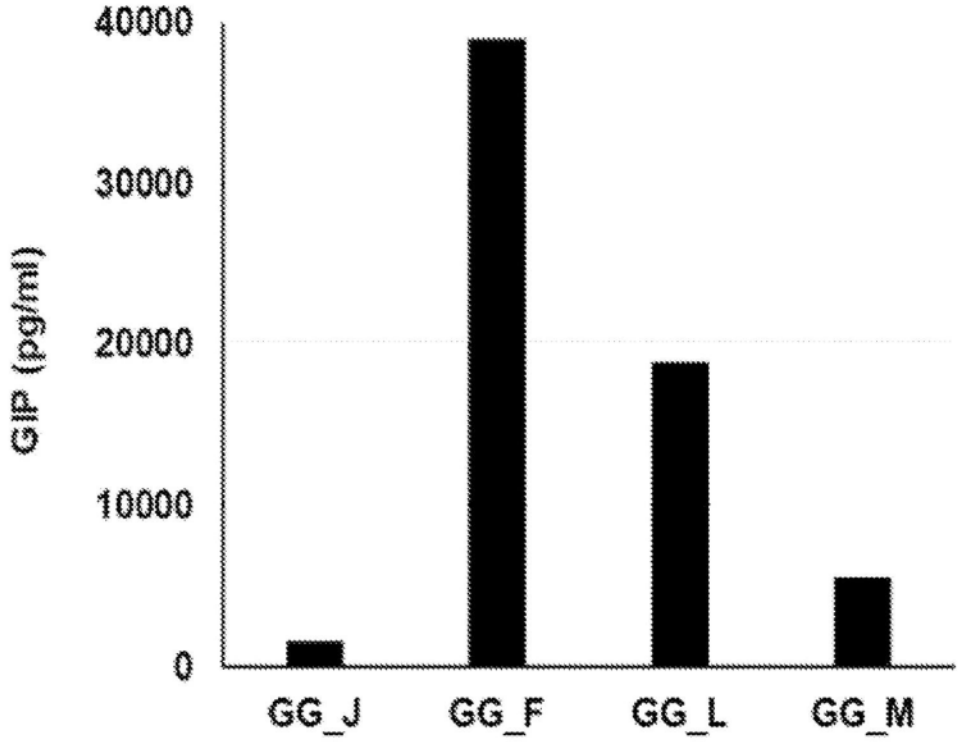

40000
30000
20000
10000
0
GIP (pg/ml)
GG_J
GG_F
GG_L
GG_M

图3B

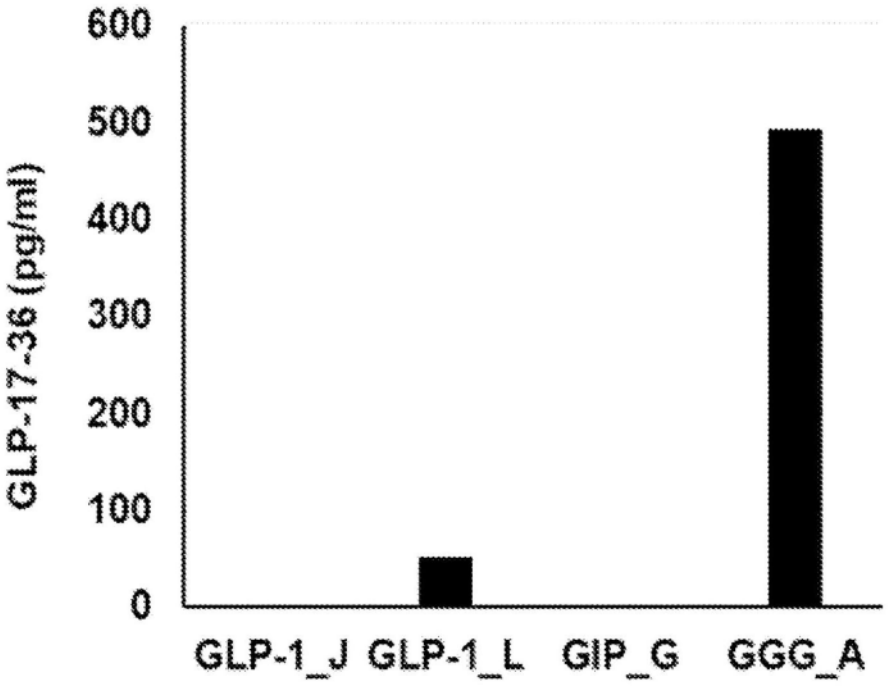

600
500
400
300
200
100
0
GLP-17-36 (pg/ml)
GLP-1_J
GLP-1_L
GIP_G
GGG_A

图3C

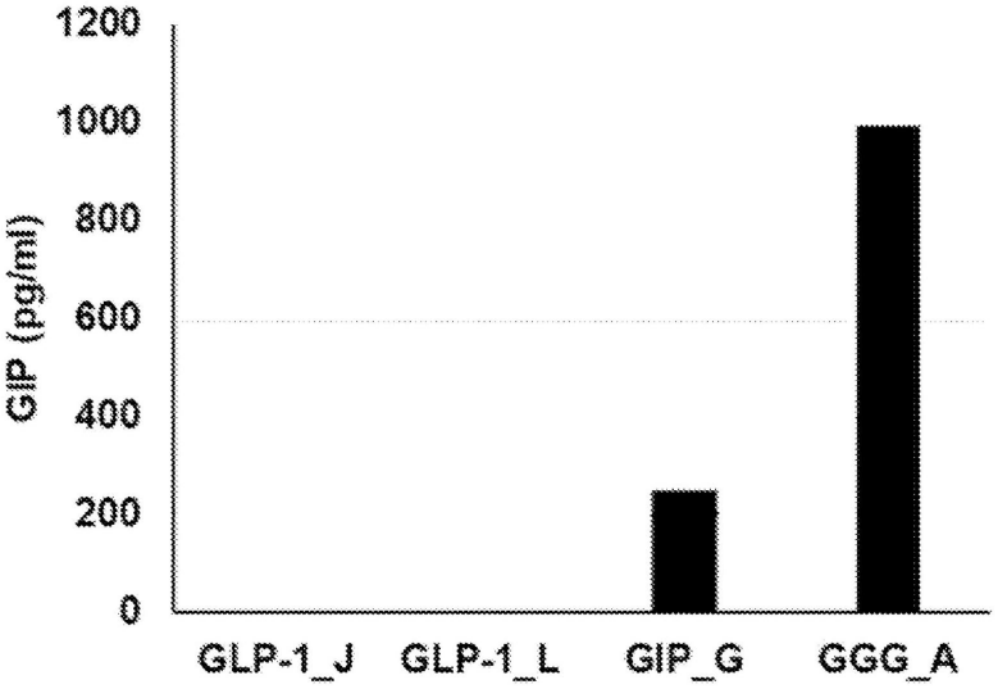

1200
1000
800
600
400
200
0
GIP (pg/ml)
GLP-1_J
GLP-1_L
GIP_G
GGG_A

图3D

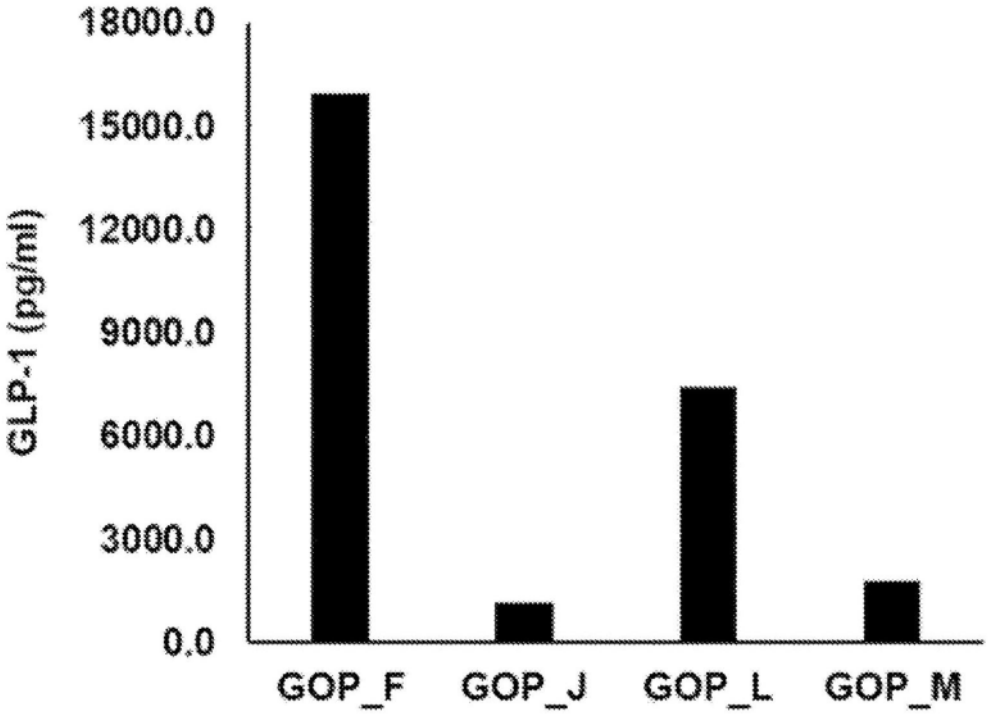

18000.0
15000.0
12000.0
9000.0
6000.0
3000.0
0.0
GLP-1 (pg/ml)
GOP_F
GOP_J
GOP_L
GOP_M

图3E

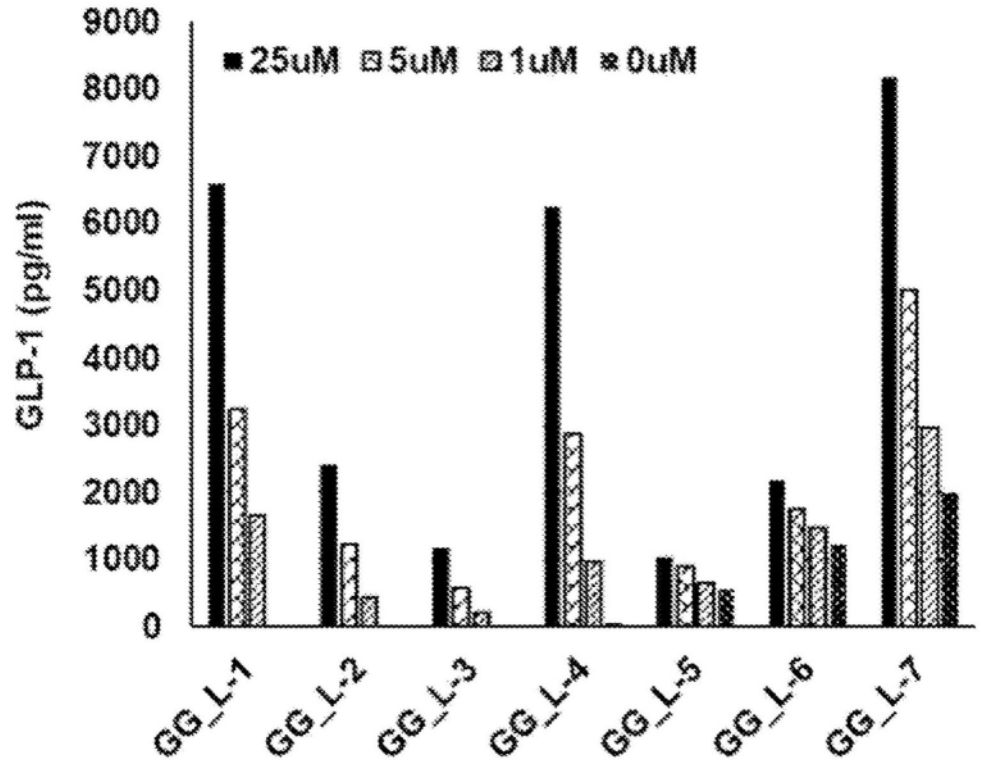

9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
GLP-1 (pg/ml)
25uM
5uM
1uM
0uM
GG_L-1
GG_L-2
GG_L-3
GG_L-4
GG_L-5
GG_L-6
GG_L-7

图4A

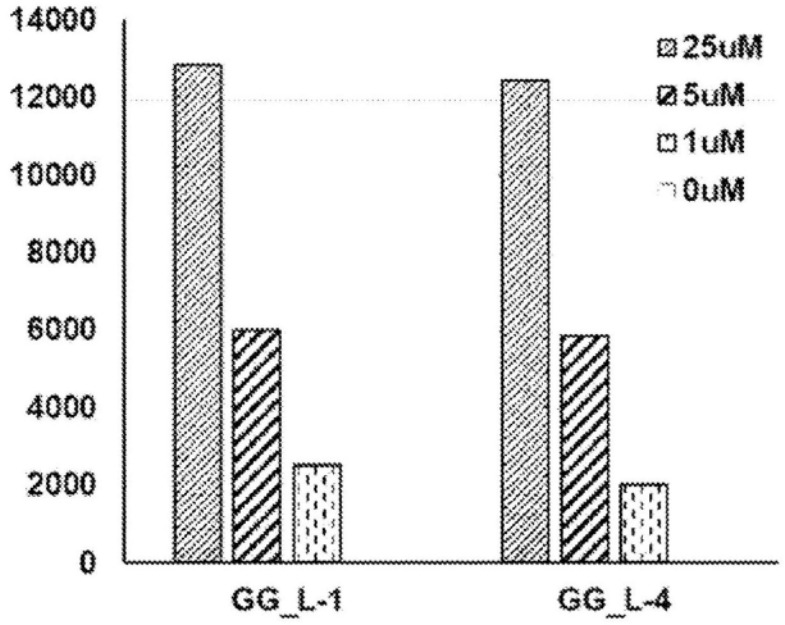

14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
25uM
5uM
1uM
0uM
GG_L-1
GG_L-4

图4B

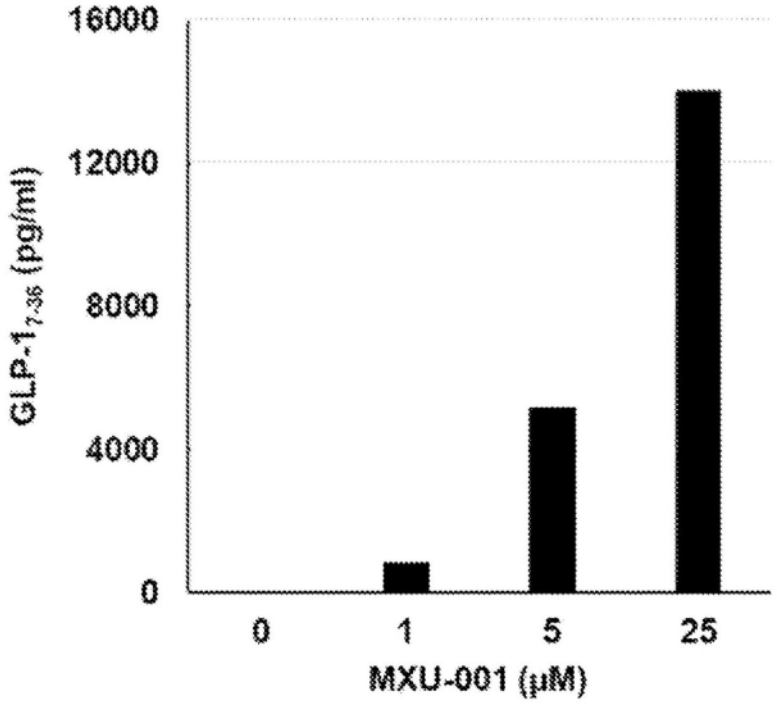

16000
12000
8000
4000
0
GLP-1$_{7-36}$ (pg/ml)
0
1
5
25
MXU-001 (μM)

图4C

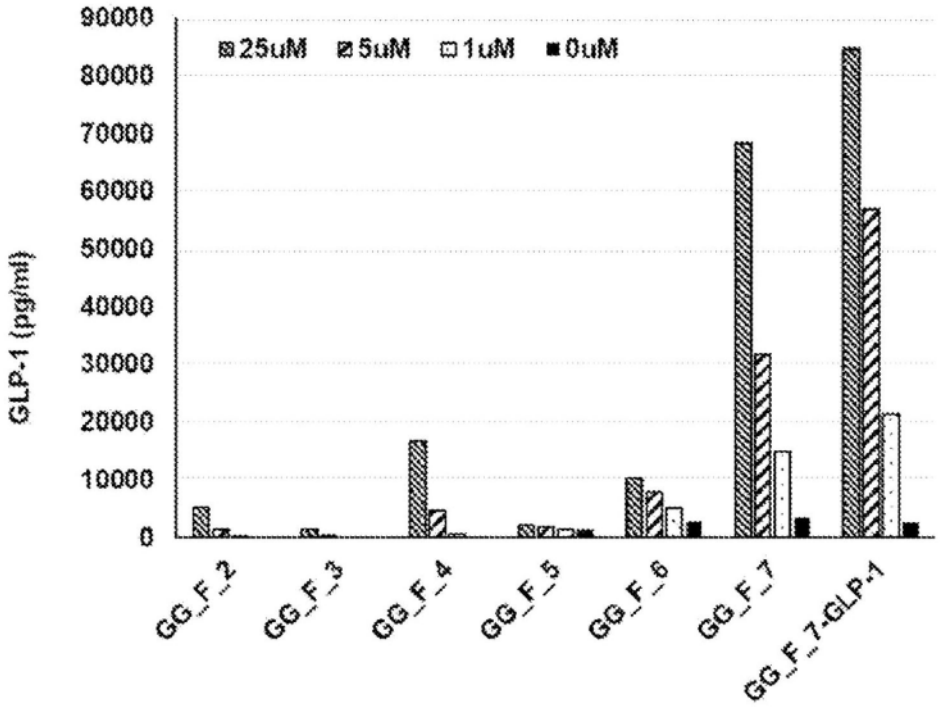

90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
GLP-1 (pg/ml)
25uM
5uM
1uM
0uM
GG_F_2
GG_F_3
GG_F_4
GG_F_5
GG_F_6
GG_F_7
GG_F_7-GLP-1

图4D

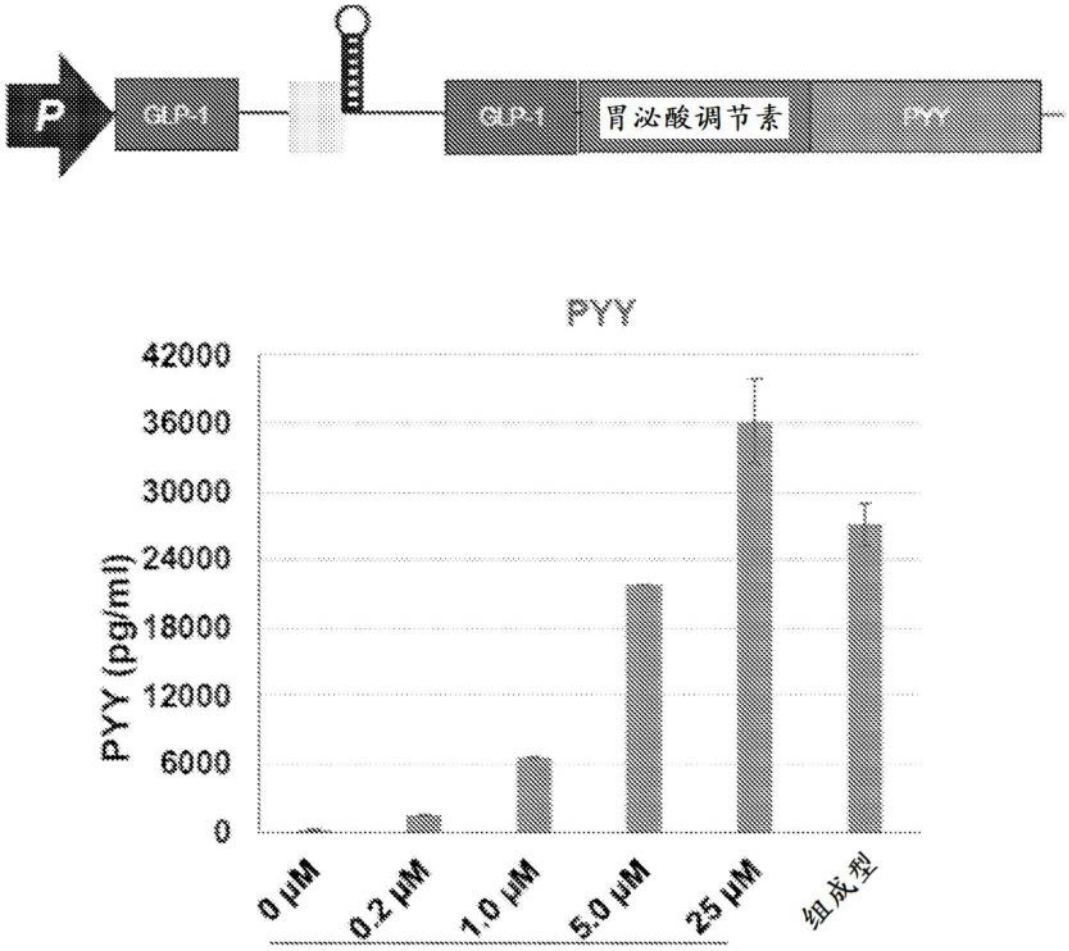

P
GLP-1
GLP-1
胃泌酸调节素
PYY
PYY
PYY (pg/ml)
42000
36000
30000
24000
18000
12000
6000
0
0 μM
0.2 μM
1.0 μM
5.0 μM
25 μM
组成型

图4E

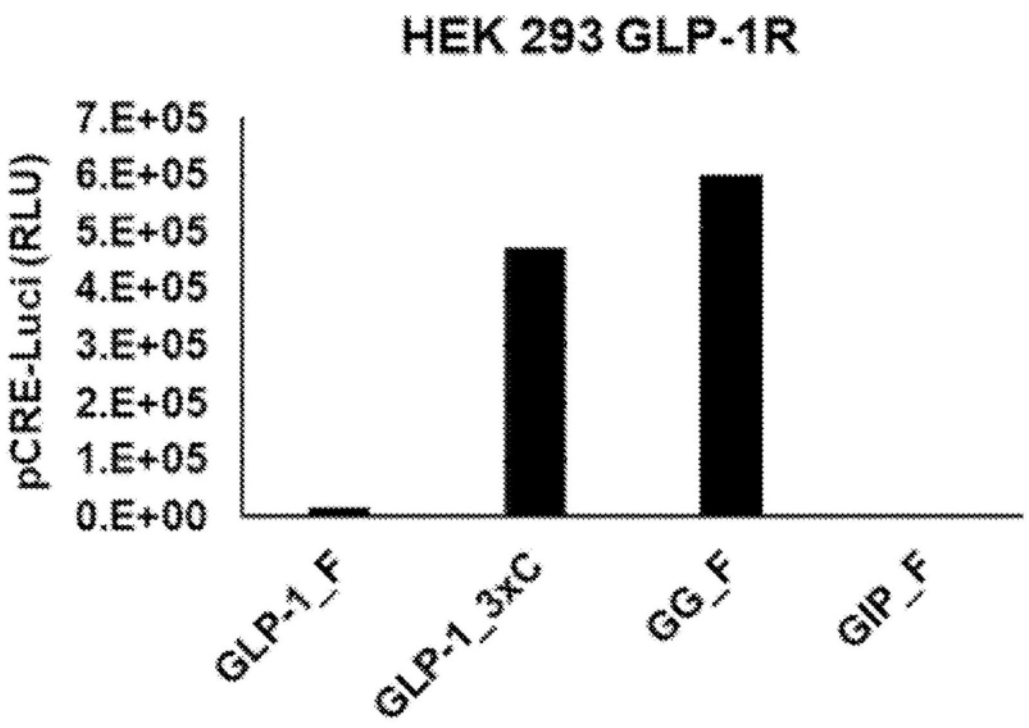

HEK 293 GLP-1R
pCRE-Luci (RLU)
7.E+05
6.E+05
5.E+05
4.E+05
3.E+05
2.E+05
1.E+05
0.E+00
GLP-1_F
GLP-1_3xC
GG_F
GIP_F

图5A

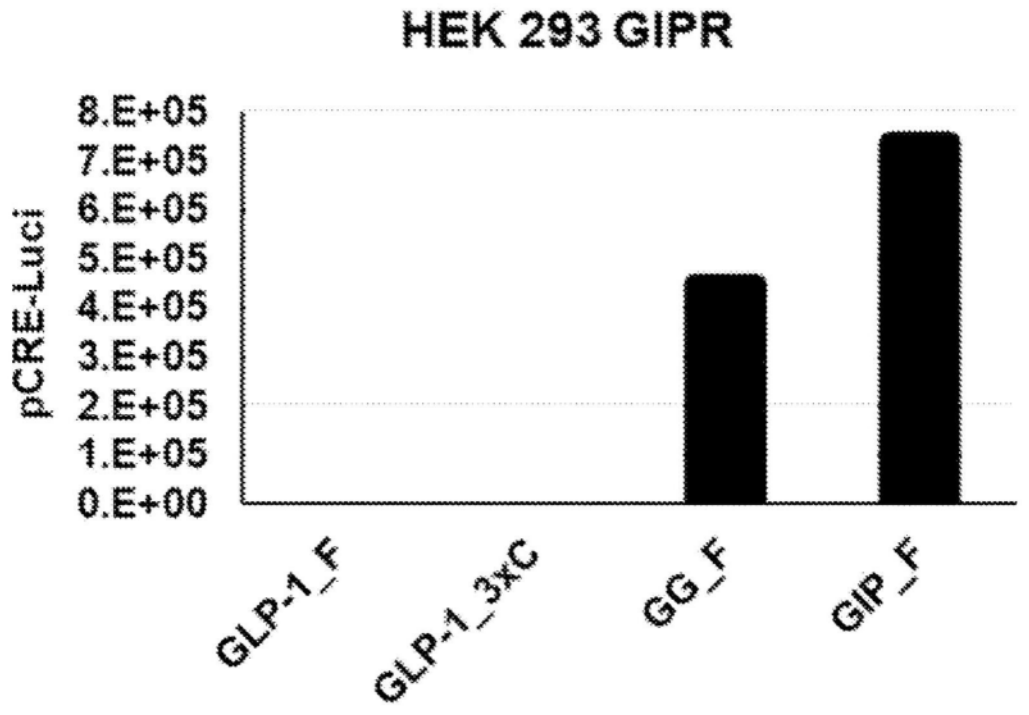

HEK 293 GIPR
pCRE-Luci
8.E+05
7.E+05
6.E+05
5.E+05
4.E+05
3.E+05
2.E+05
1.E+05
0.E+00
GLP-1_F
GLP-1_3xC
GG_F
GIP_F

图5B

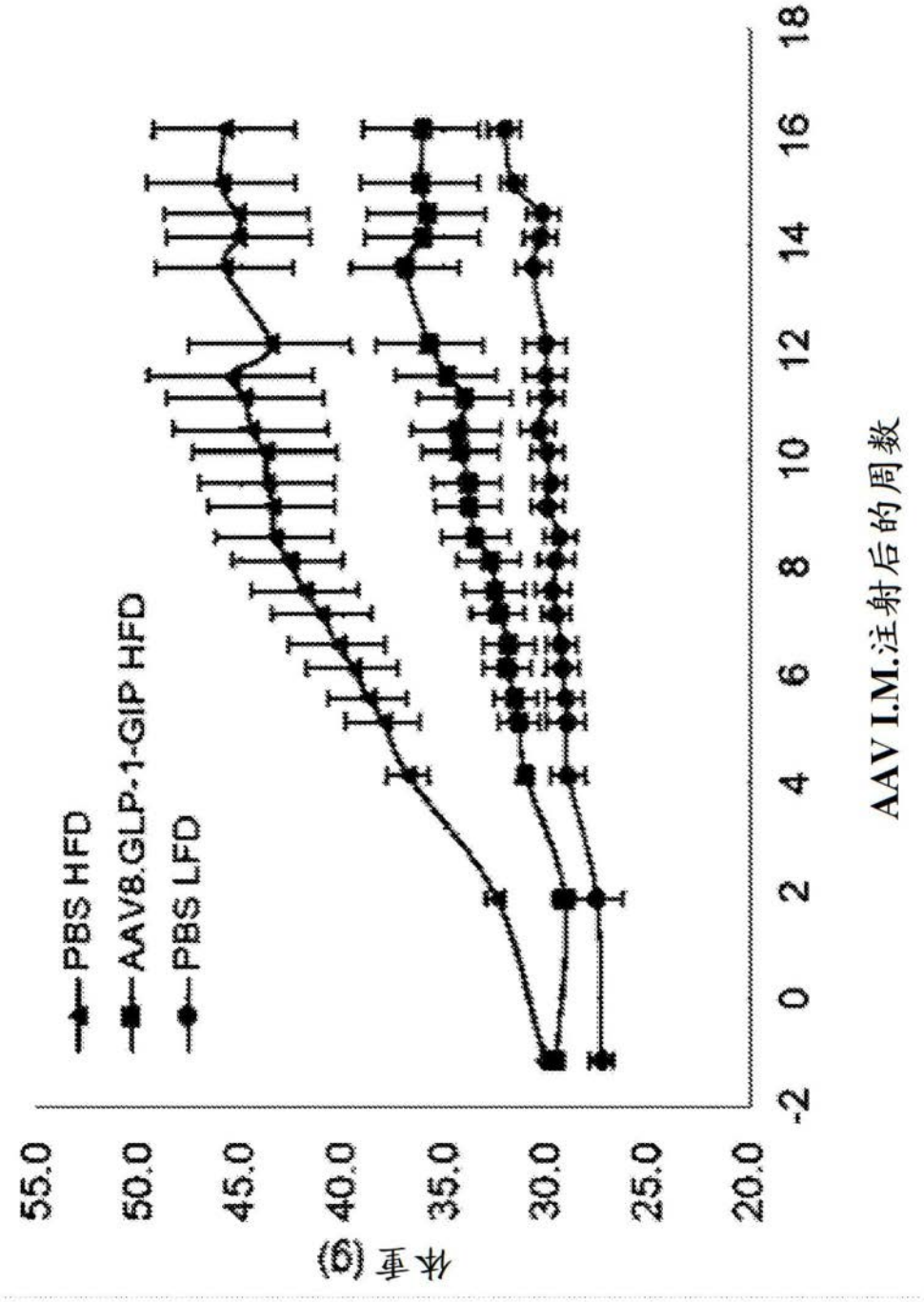

PBS HFD
AAV8.GLP-1-GIP HFD
PBS LFD
体重 (g)
55.0
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
AAV I.M.注射后的周数

图5C

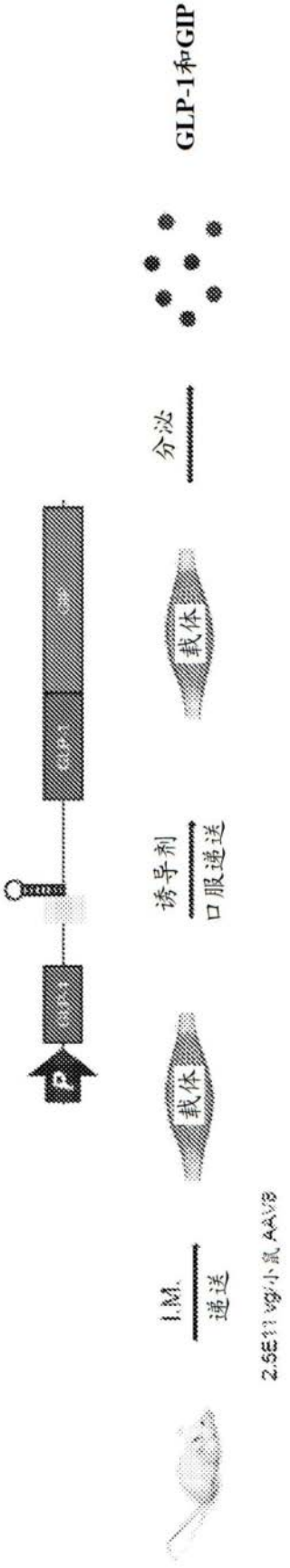


图6A

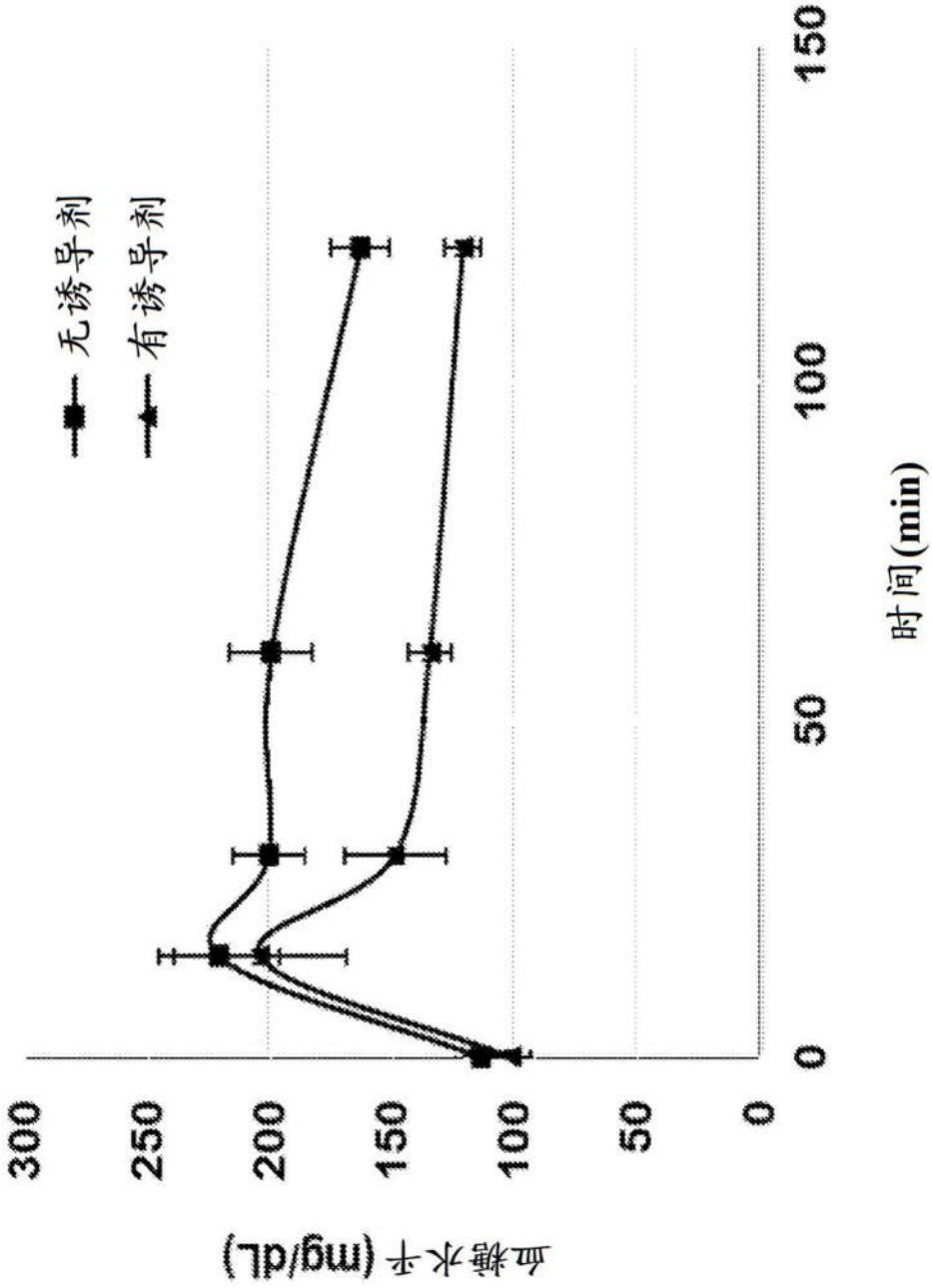


图6B