

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年3月17日 (17.03.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/052368 A1

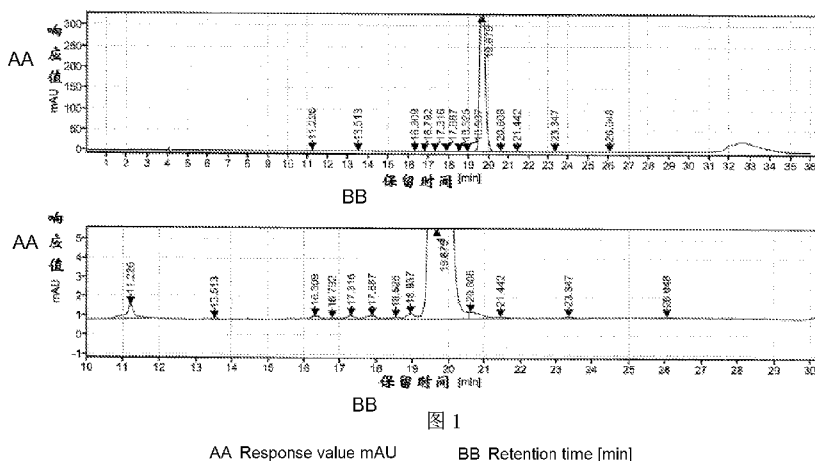
- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/62 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/138950
- (22) 国际申请日: 2020年12月24日 (24.12.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202010952921.3 2020年9月11日 (11.09.2020) CN
- (71) 申请人: 美药星(南京)制药有限公司 (AMPHASTAR NANJING PHARMACEUTICALS, INC.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市南京经济技术开发区兴和路5号, Jiangsu 210038 (CN)。
- (72) 发明人: 汤传根 (TANG, Chuangen); 中国江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋, Jiangsu 210046 (CN)。 王璟 (WANG, Jing);

中国江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋, Jiangsu 210046 (CN)。 潘尚书 (PAN, Shangshu); 中国江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋, Jiangsu 210046 (CN)。 范晓阳 (FAN, Xiaoyang); 中国江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋, Jiangsu 210046 (CN)。 刘晓锐 (LIU, Xiaorui); 中国江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋, Jiangsu 210046 (CN)。 陈松 (CHEN, Song); 中国江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋, Jiangsu 210046 (CN)。 张昊宁 (ZHANG, Haoning); 中国江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋, Jiangsu 210046 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) Title: NOVEL PROINSULIN GLARGINE AND METHOD FOR PREPARING INSULIN GLARGINE THEREFROM

(54) 发明名称: 一种新甘精胰岛素原及其制备甘精胰岛素的方法



(57) Abstract: The present invention belongs to the technical field of recombinant protein preparation, and discloses a novel proinsulin glargine and a method for preparing insulin glargine therefrom. In the present invention, a sequence of proinsulin glargine containing an SOD fusion peptide that has undergone site-directed mutation and "0C peptide" is designed, a recombinant E. coli engineered bacteria expressing insulin glargine is constructed, and the engineered bacteria is induced to express an insulin glargine fusion protein in the form of inclusion bodies, then same undergoes denaturation, renaturation, modification, enzyme cleavage, separation, and purification to obtain a mature insulin glargine active ingredient. In the present invention, by means of mutating an SOD fusion peptide sequence, the fermentation yield of insulin glargine is increased by 75%. By means of adopting a "0C peptide" strategy, the remnants of C-peptide residues is avoided, and the quality loss and mis-cutting impurities of enzyme cleavage conversion are reduced. The purity of the insulin glargine active ingredient prepared by the invention is up to 99.9%, and the maximum single impurities are controlled at 0.05%.



WO 2022/052368 A1

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明公开了一种新甘精胰岛素原及其制备甘精胰岛素的方法, 属于重组蛋白制备技术领域。本发明设计了包含定点突变的SOD融合肽和"0C肽"的甘精胰岛素原的序列, 构建了表达甘精胰岛素的重组大肠杆菌工程菌, 并通过诱导工程菌表达以包涵体形式甘精胰岛素融合蛋白, 再经过变性、复性、修饰、酶切和分离纯化得到成熟的甘精胰岛素原料药。本发明通过突变SOD融合肽序列将甘精胰岛素的发酵产率提高了75%; 通过采用"0C肽"策略, 避免C-肽残基的残留, 减少酶切转化的质量损失和错切杂质。本发明制备的甘精胰岛素原料药的纯度高达99.9%, 最大单杂控制在0.05%。

一种新甘精胰岛素原及其制备甘精胰岛素的方法

技术领域

本发明涉及一种新甘精胰岛素原及其制备甘精胰岛素的方法，属于重组蛋白制备技术领域。

背景技术

胰岛素是一种调节动物体内葡萄糖代谢的激素。这种激素是由 A 链和 B 链 2 条肽链组成，A 链有 21 个氨基酸和 B 链有 30 个氨基酸，共 51 个氨基酸。其中 A₇ (Cys)-B₇ (Cys), A₂₀ (Cys)-B₁₉ (Cys) 4 个半胱氨酸形成 2 个二硫键，连接 A 链和 B 链。在 A 链中有 A₆ (Cys)和 A₁₁ (Cys)形成的链内二硫键。糖尿病的特点是由于胰岛素缺乏和/或肝葡萄糖产量的增加而导致血糖水平升高，胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素。

胰岛素类似物发展的总体目标是模拟生理性的胰岛素分泌，从而改善 1 型和 2 型糖尿病患者血糖控制 (Berger M. *A comment. Diabetes Res Clin Pract.* 6: S25 – S31, 1989; Sanlioglu AD 等人, *Clinical utility of insulin and insulin analogs. Islets* 5(2): 67-78, 2013)。近期的胰岛素类似物 (天然胰岛素的类似物) 包括由基因工程或生物化学反应在天然胰岛素分子上额外附加氨基酸残基或者替换氨基酸残基，或对其他功能组的修饰。这些修饰通过改变胰岛素分子的药理学、药代动力学和药效动力学特性，改变了生物药效率的速度，如门冬胰岛素、甘精胰岛素、赖脯胰岛素等。甘精胰岛素 (美国专利 US5656722) 是一种长效作用的胰岛素类似物。在 A₂₁ 处用甘氨酸取代门冬氨酸，在 B 链的 C 末端添加两个精氨酸残基，是为了让甘精胰岛素在注射时形成沉淀物 (六聚体-微晶体)。甘精胰岛素的等电点从 pH5.4 提高至 pH6.7，使分子在酸性 pH 下是水溶性的，最终导致甘精胰岛素六聚体缓慢地解离成单体。在中性 pH 皮下区域，六聚体的形成导致胰岛素从注射部位缓慢，无峰值溶解和吸收，提供持续 24-26 小时长的持续作用时间。甘精胰岛素的延长作用降低了峰值效应，降低了低血糖的风险。与 NPH 中性精蛋白锌胰岛素相比，甘精胰岛素显示出较低的严重低血糖发生率 (Sanlioglu AD et al., *Clinical utility of insulin and insulin analogs. Islets* 5(2): 67-78, 2013)。

人胰岛素是重组 DNA 技术产生的第一个蛋白类药物。1978 年，人胰岛素在实验室中首次成功表达；1982 年，重组人胰岛素被批准作为治疗药物。重组人胰岛素的前体蛋白由遗传修饰的生物合成，并通过蛋白酶水解切割生成活性胰岛素。几乎所有在公开销售的胰岛素类似物都是用基因工程技术从胰岛素人类基因中改良出来的，并在大肠杆菌或酵母中产生。

对于使用转基因大肠杆菌的方法，有一种方法是在大肠杆菌中分别表达胰岛素的 A 链和

B 链，然后在体外混合磺化的 A 链和 B 链形成链间二硫键(Rich, D.H.等人, *Pierce Chemical Company, Rockford*. Pp. 721-728,1981.和 Frank, B.H.等人, *Pierce Chemical Company, Rockford*. Pp. 729-738, 1981)。然而，该方法存在缺点，因为它需要两个单独的发酵过程并形成正确的二硫键。磺化的 A 链和 B 链之间形成的不正确的二硫键会导致胰岛素的低产率。

专利 CN103981242A 中涉及了一种使用铜/锌超氧化物歧化酶 SOD 作为融合肽生产胰岛素的方法。该融合肽由 64 个氨基酸组成，其中第一位氨基酸为 Met，最后一位氨基酸为 Arg；同时，融合肽链中的半胱氨酸残基均被丝氨酸残基取代。该专利中 SOD 融合肽片段的氨基酸序列如下所示：MATKAVSVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGSTSAGPR(SEQ ID NO: 1)。该 SOD 片段中有 5 个 Lys 残基，为胰蛋白酶的天然切割位点。在后续的酶切过程中，容易产生错切杂质，导致产率和纯度较低。

一种在 C-肽区域中不具有保守的二元基氨基酸末端序列的胰岛素原的使用方法也被报道。例如，美国专利 US6777207 所涉及的胰岛素原肽结构体，它是由缩短的 C-肽（长度不超过 15 个氨基酸残基）组成，其具有作为甘氨酸-精氨酸或甘氨酸-赖氨酸的两个末端氨基酸，其连接至 A-羧基末端的链。与天然人胰岛素的全长 30 个氨基酸的 B 链相反，所述胰岛素原构建体含有 29 个氨基酸的 B 链。这种缩短的 B 链和缩短的 C-肽在人胰岛素生产中的潜在影响尚不清楚，但是需要通过收率较低的转肽反应将 B30 位置的氨基酸连接上去。该专利中讲述的宿主细胞是酵母，没有证据表明该构建体可用于大肠杆菌。由于酵母表达体系的发酵周期较长会使其表达效率降低且成本升高，现在急需设计一种更高效和更完善的新型甘精胰岛素原的结构序列，以及由该结构序列制备甘精胰岛素的工艺，解决现有技术中存在的上述问题。

发明内容

本发明公开一种能够有效改善重组甘精胰岛素制备工艺的新甘精胰岛素原及其制备甘精胰岛素的方法。本发明设计的甘精胰岛素原的结构包括一个 N 末端融合肽序列（定点突变后的 SOD）和具有 A₂₁ 修饰的胰岛素 A 链以及含两个精氨酸残基的全长人胰岛素 B 链。与天然人胰岛素相比，甘精胰岛素 A 链的 A₂₁ 位氨基酸用甘氨酸取代天冬酰胺，并且在 B 链的羧基末端添加两个精氨酸残基。所述甘精胰岛素原的结构采用“0 C 肽”策略，即 B 链和 A 链之间没有 C 肽序列。将该甘精胰岛素原在大肠杆菌中表达，再与融合肽一起在正确的复性条件下进行复性，再通过用胰蛋白酶酶切实现融合肽与甘精胰岛素分子的分离，从而得到甘精胰岛素。

本发明设计的甘精胰岛素原在有定点突变后的 SOD 片段融合肽存在的情况下，可以有效地折叠成其天然结构，提高甘精胰岛素的发酵产量。甘精胰岛素原在有合适的蛋白酶酶切位

点存在时，增加 C 肽序列可能会导致酶切后 C 肽残留，并影响纯化及收率。本发明中，新发明的甘精胰岛素原采用“0 C 肽”策略，可有效避免酶切后 C 肽的残留，并使酶切转化步骤中的质量损失最小化。

本发明的第一个目的是提供一种新的甘精胰岛素原，其氨基酸序列具有如下结构：

$R-R_1-(B_1-B_{32})-(A_1-A_{20})-A_{21}$

其中：

$R-R_1$ 为融合肽序列，R 的氨基酸序列为：
MATX₁AVSVLKGDGPVQGIINFEQX₂ESNGPVKVVWGSIX₃GLTEGLHGFHVHEFGDNTAGST
SAGP；

X₁ 为脯氨酸 Pro(P)或组氨酸 His(H)；X₂ 为脯氨酸 Pro(P)或组氨酸 His(H)；X₃ 为脯氨酸 Pro(P)或组氨酸 His(H)；

R₁ 为精氨酸 Arg(R)或赖氨酸 Lys(K)；

B₁-B₃₂ 为在天然人胰岛素的 B 链 B₁-B₃₀ 的 B₃₀ 位 C-末端后增加了两个精氨酸 Arg 残基(R)；

A₁-A₂₀ 为具有 20 个氨基酸的胰岛素 A 链；

A₂₁ 是甘氨酸 (G)。

在一种实施方式中，R 的氨基酸序列如
MATPAVSVLKGDGPVQGIINFEQPESNGPVKVVWGSIPGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGSTSA
P(SEQ ID NO: 2)；或
MATHAVSVLKGDGPVQGIINFEQHESENGPVKVVWGSIHGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGSTSA
GP (SEQ ID NO: 3)所示。

在一种实施方式中，融合肽序列的 C 端通过一个赖氨酸残基或者精氨酸残基与 B₁-B₃₂ 相连接。

在一种实施方式中，A₁-A₂₀ 的氨基酸序列为 GIVEQCCTSICSLYQLENYC (SEQ ID NO: 4)。

在一种实施方式中，B₁-B₃₀ 的氨基酸序列为 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 5)。

在一种实施方式中，用两个精氨酸残基延长 B 链，使 B₁-B₃₂ 的氨基酸序列为 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR。

在一种实施方式中，甘精胰岛素原中(B₁-B₃₂)-(A₁-A₂₀)-A₂₁ 的氨基酸序列为：

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG (SEQ ID NO: 6)

在一种实施方式中，甘精胰岛素原 R-R₁-(B₁-B₃₂)-(A₁-A₂₀)-A₂₁ 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:

7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 中的任意一种:

MATPAVSVLKGDGPVQGIINFEQPESNGPVKVVWGSIPGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGST
SAGPKFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG (SEQ
ID NO: 7);

MATPAVSVLKGDGPVQGIINFEQPESNGPVKVVWGSIPGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGST
SAGPRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG (SEQ
ID NO: 8);

MATHAVSVLKGDGPVQGIINFEQHESNGPVKVVWGSIHGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGS
TSAGPKFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG
(SEQ ID NO: 9);

MATHAVSVLKGDGPVQGIINFEQHESNGPVKVVWGSIHGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGS
TSAGPRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG
(SEQ ID NO: 10)。

本发明的第二个目的是提供编码甘精胰岛素原的 DNA。

在一种实施方式中, 所述 DNA 具有 SEQ ID NO:11~14 任一所示的核苷酸序列。

在一种实施方式中, 所述 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID
NO:14 分别编码 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO:10 所示的氨基
酸序列。

本发明第三方面提供含有所述 DNA 的表达载体。

在一种实施方式中, 所述表达载体包括但不限于 pET 系列质粒。

本发明的第四个目的是提供表达所述甘精胰岛素原的非植物细胞, 包括但不限于真核细
胞或原核细胞。

在一种实施方式中, 所述细胞表达所述编码甘精胰岛素原的 DNA, 或引入了所述表达载
体。

在一种实施方式中, 所述微生物细胞包括但不限于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母
细胞。

在一种实施方式中, 所述细胞包括哺乳动物细胞或昆虫细胞。

在一种实施方式中, 所述细胞为原核细胞, 包括但不限于大肠杆菌、枯草杆菌, 或者是
任何更适合重组蛋白表达的改良品种, 如大肠杆菌 DH5a、K12JM107、W3110、BL21(DE3)、
Rosetta 或其它菌株。

在一种实施方式中, 所述细胞为重组大肠杆菌, 含有携带甘精胰岛素原编码基因的
pET28a 质粒。

本发明的第四方面是提供一种生产甘精胰岛素的方法，利用所述重组大肠杆菌发酵生产甘精胰岛素。

在一种实施方式中，所述方法是将重组大肠杆菌接种于 BFM 培养基中，于 35~37°C 下发酵至少 20 h。

在一种实施方式中，所述 BFM 培养基含有磷酸氢二铵、氯化铵、磷酸二氢钾、七水硫酸镁、一水柠檬酸、葡萄糖、酵母粉和微量元素。

在一种实施方式中，所述接种是接种重组大肠杆菌种子液。

在一种实施方式中，所述种子液经过两级发酵；第一级发酵是在 LB 培养基中，于 35~37°C 发酵 6~10 h 获得一级种子液；再将一级种子液以 0.2% 的接种量转接至 BFM 培养基中，培养 6~10 h 获得二级种子液。

在一种实施方式中，所述方法还对发酵后的甘精胰岛素酶切、复性和纯化。

在一种实施方式中，所述方法包括如下步骤：

- (1) 将所述重组大肠杆菌培养、发酵，表达甘精胰岛素原；
- (2) 包涵体释放和溶解，以及甘精胰岛素原的复性；
- (3) 用柠康酞修饰重折叠的甘精胰岛素原；
- (4) 采用胰蛋白酶酶切步骤 (3) 修饰后的甘精胰岛素原，通过酸性水解得到甘精胰岛素；
- (5) 甘精胰岛素的纯化；
- (6) 甘精胰岛素的沉淀、洗涤、溶解、过滤和冻干。

在一种实施方式中，所述步骤 (2) 采用溶菌酶处理和高压均质。

在一种实施方式中，所述步骤 (2) 在 15-25°C 和 pH10.0-11.6 条件下稀释复性。

在一种实施方式中，所述步骤 (3) 向复性的甘精胰岛素原中加入柠康酞。

在一种实施方式中，所述步骤 (4) 通过胰蛋白酶酶切转化修饰后的含有权利要求 1 所述序列的甘精胰岛素原，去除所述的融合肽，得到 B₂₉ 位赖氨酸被柠康酞残基修饰的甘精胰岛素。

在一种实施方式中，所述步骤 (4) 在 pH1.5~2.5 酸性水解除去柠康酞残基，得到甘精胰岛素。

在一种实施方式中，所述步骤 (5) 使用离子交换色谱法纯化甘精胰岛素，以获得高纯度的甘精胰岛素；

在一种实施方式中，所述步骤 (5) 使用制备型 HPLC 色谱进一步纯化甘精胰岛素以获得更高纯度的甘精胰岛素；

在一种实施方式中，还对高纯度的甘精胰岛素经过结晶和干燥形成最终的甘精胰岛素原料药。

在一种实施方式中，将上述优化的基因连接到合适的载体，如 pTAC 表达质粒系列、pGEX 系列或 pET 系列，优选 pET 系列质粒，更优选质粒 pET-28a；该质粒可转染 K12 JM109 工程菌或 K12 W110 工程菌以形成表达克隆。在另一个优选的实施方式中，表达质粒转染到 BL21(DE3)工程菌中。

在一种实施方式中，所述重组大肠杆菌通过摇瓶或发酵罐培养至适当浓度，然后诱导甘精胰岛素原的表达。

在一种实施方式中，将含有甘精胰岛素原的包涵体的细胞通过溶菌酶处理和高压均质化进行裂解；分离的包涵体由含有洗涤剂或低浓度离液剂的溶液洗涤，并用高 pH 缓冲溶液溶解。

在一个实施方式中，溶解缓冲液的 pH 值为 11.6-12.4，溶解缓冲液含有 Tris、EDTA 和 L-半胱氨酸；所述 Tris 的浓度为 10-50mM，EDTA 的浓度为 0.05-1.0 mM，L-半胱氨酸的浓度为 0.25-5.0mM。

在一个实施方式中，Tris 的浓度为 20-30mM；EDTA 的浓度为 0.05-0.25mM，L-半胱氨酸的浓度为 0.25-1.0mM；pH 为 11.8-12.2。

在一种实施方式中，溶解缓冲液的温度为 10-30℃，或 15-25℃；包涵体溶解时间为 10-120min，或 10-60min。

在一个实施方式中，溶解缓冲液的 pH 值为 10.0-11.6，或为 10.8-11.4；溶液的温度约 10-25℃，或 15-20℃；总蛋白的浓度为 1-10g/L，或 1-7g/L；复性持续时间为 12-48h，或为 24-36h。

在一种实施方式中，酶切前采用保护试剂修饰甘精胰岛素原；所述保护试剂可以是易于与 B29-Lys 的 γ -NH₂ 基团反应的亲电试剂，例如酸酐，包括但不限于乙酸酐，柠檬酸酐或柠康酐。

在一个实施方式中，向甘精胰岛素原中加入过量摩尔比的柠康酐；可选地，对于甘精胰岛素原，加入 10 倍或更多摩尔量的柠康酐；或加入 20 倍或更多摩尔量的柠康酐。

在一个实施方式中，加入保护试剂修饰的反应温度为 15-25℃，pH 为 8.0-9.0，持续时间 2-8 h。

在一种实施方式中，修饰完成后可加入乙醇胺中和过量的柠康酐，乙醇胺的体积为柠康酐的 40%-80%，终止时间为 10-30min。

在一个实施方式中，将复性溶液的蛋白浓度调节为 1-7g/L。向复性溶液中加入按体积计

0.2%柠康酞并将 pH 调节至 8.5, 在 20℃下反应 4 小时; 修饰完成后, 加入修饰所用柠康酞体积 60%的乙醇胺进行中和, pH 调节为 9.0, 中和 30min。将终浓度为 220U/g 蛋白的胰蛋白酶(优选牛胰蛋白酶)加入到柠康酸修饰的甘精胰岛素原中, 将 pH 调节至 9.0, 并在 20℃下消化 24 小时以获得具有柠康酸残基的甘精胰岛素。通过 HPLC-RP (C18) 监测该过程。一旦酶切反应结束, 通过加入盐酸并调节 pH 2.0-2.5 可以终止酶切反应。让溶液在该低 pH 值下保持 24 小时, 以水解 B29-Lys 上的柠康酸残基, 得到甘精胰岛素。

在一种实施方式中, 将复性液的蛋白浓度调节为 4g/L 后, 直接向复性的蛋白质溶液中加入按体积计 0.05%柠康酞, 将 pH 调节至 8.5, 在 20℃下反应 2 小时。修饰完成后, 加入修饰所用柠康酞体积的 60%的乙醇胺进行中和, pH 调节为 9.4, 中和 15min。然后将终浓度为 0.063mg/g 蛋白的胰蛋白酶加入到柠康酸修饰的甘精胰岛素中, 将 pH 调节至 9.0, 并在 20℃下反应 24 小时以获得具有柠康酸残基的甘精胰岛素。通过 HPLC-RP (C18) 监测该过程。一旦酶切反应完成, 通过加入盐酸并调节 pH 2.0-2.5 以终止反应。让溶液在该低 pH 值下保持 12 小时, 通过水解去除 B29-Lys 上的柠康酸残基, 得到甘精胰岛素。

在一种实施方式中, 在胰蛋白酶酶解后, 加入终浓度为 1-10mM 的锌离子, 并且调节 pH 为 5.5-6.5, 使得甘精胰岛素形成沉淀并析出, 通过适当的方法对甘精胰岛素进行纯化, 从而获得最终甘精胰岛素产品。

在一种实施方式中, 使用制备的 RP-HPLC 与磷酸二氢铵缓冲体系进行一步纯化, 其中磷酸氢二铵的浓度为 0.05-0.3M, 或 0.05-0.2M; pH 值在 2.0-5.0 的范围内; 有机改性剂可以是乙醇, 甲醇或乙腈; 在有机溶剂的线性浓度梯度中, 甘精胰岛素被洗脱。

在一种实施方式中, 使用制备的 RP-HPLC 和 Tris-HCl 缓冲体系进行最终纯化, 其中 Tris 浓度为 0.02-0.3M, 或 0.02-0.2M; pH 值在 7.0-9.0 的范围内; 有机改性剂可以是乙醇, 甲醇或乙腈; 在有机溶剂的线性浓度梯度中, 甘精胰岛素被洗脱。

在一种实施方式中, 从 RP-HPLC 洗脱的甘精胰岛素利用等电点沉淀法进行沉淀, 收集沉淀。收集到的沉淀用 0-1.5%的氯化钠溶液进行重悬洗涤, 并将洗涤后离心得到的湿固体用 40-200 mM 的盐酸溶液进行溶解, 并且将甘精胰岛素的浓度调节为 20-40 mg/mL, 调节 pH 至 3.0-5.0, 过滤后滤液冷冻干燥, 制备获得以晶体或固化的 API 形式存在的甘精胰岛素原料药。

本发明还要求保护所述方法在制备甘精胰岛素或含甘精胰岛素的药物中的应用。

有益效果:

本发明以定点突变后的 SOD 片段为融合肽并采用“0 C 肽”策略, 可以获得较高发酵产量, 将甘精胰岛素的发酵产率提高了 75%及以上, 最高提高了 78%;

本发明通过“0 C 肽”策略, 避免了 C 肽残基的残留, 减少酶转化步骤的质量损失, 本专

利申请中减少错误的重折叠和错误的酶切过程造成的杂质，提高最终产品的产量和纯度，主峰色谱纯度达到 99.4 以上，最大单杂 $\leq 0.16\%$ ，其中较佳实施例中主峰色谱纯度高达 99.9%，最大单杂控制在 0.05% 以下；主峰色谱纯度相对对比例提高了 7%，最大单杂含量相对对比例由 2.15% 降低到 $\leq 0.16\%$ ，明显降低一个数量级。

本发明的制备方法中通过牛胰蛋白酶进行酶切处理，相比于猪胰蛋白酶，酶切转化率可以提高 16%。因此，制备高质量甘精胰岛素的生产成本可以大大降低。

附图说明

图 1 是根据本发明的具体实例 6 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 11 构建后的菌株纯化液相色谱图。

图 2 是根据本发明的具体实例 7 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 12 构建后的菌株纯化液相色谱图。

图 3 是根据本发明的具体实例 8 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 13 构建后的菌株纯化液相色谱图。

图 4A、4B 和 4C 是根据本发明的具体实例 1-3 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 10 构建后的菌株 WCB01 复性后的液相色谱图谱。

图 5A、5B 和 5C 是根据本发明的具体实例 1-3 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 15 构建后的菌株 WCB02 复性后的液相色谱图谱。

图 6 是根据本发明的具体实例 1-3 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 16 构建后的菌株 WCB03 复性后的液相色谱图谱。

图 7 是根据本发明的具体实例 1-3 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 17 构建后的菌株 WCB04 复性后的液相色谱图谱。

图 8 是根据本发明的具体实例 1-3 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 18 构建后的菌株 WCB05 复性后的液相色谱图谱。

图 9A 是根据本发明的具体实例 1-5 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 10 构建后的菌株 WCB01 纯化后的液相色谱图谱。

图 9B 是根据本发明的具体对比例 1-3 中，采用基因序列 SEQ ID NO: 15 构建后的菌株 WCB02 纯化后的液相色谱图谱。

图 10A 是根据本发明的具体实例 4 中，采用牛胰蛋白酶对甘精胰岛素原的酶切效果的液相色谱图谱。

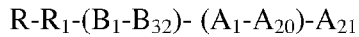
图 10B 是根据本发明的具体对比例 4 中，采用猪胰蛋白酶对甘精胰岛素原的酶切效果的液相色谱图谱。

具体实施方式

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。

实施例 1：新甘精胰岛素原的结构设计

设计如式 I 所示的甘精胰岛素原蛋白序列：



改良后的甘精胰岛素原的序列采用“0 C 肽”策略，即 B 链和 A 链间没有氨基酸序列。N 端先导氨基酸序列可以增强表达，保护甘精胰岛素原，防止被大肠杆菌降解。其中，融合肽 R-R₁ 中 R 的氨基酸序列为

MATHAVSVLKGDGPVQGIINFEQHESENGPDKVWGSIHGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGSTSA GP (如 SEQ ID NO: 3 所示)。该融合肽氨基酸序列的 C 端通过精氨酸或赖氨酸残基连接到甘精胰岛素的 B 链，最终融合肽通过胰蛋白酶裂解被除去。

实施例 2：构建含有新甘精胰岛素原编码基因的重组质粒

按照实施例 1 的方法设计新甘精胰岛素原的序列：新甘精胰岛素原中(B₁-B₃₂)-(A₁-A₂₀)-A₂₁ 的序列为 SEQ ID NO: 6。其中，甘精胰岛素原带融合肽的全序列为 SEQ ID NO: 10。为了确保在大肠杆菌中有效表达 SEQ ID NO: 10 所示的融合蛋白质，对遗传密码子进行了优化。优化后的基因序列如 SEQ ID NO: 14 所示，其含有一个 5' NcoI 位点 (CCATGG) 和 1 个 3' Hind III 位点 (AAGCTT)。

通过商业 CRO 公司化学合成 SEQ ID NO: 14 的 DNA 片段，将该 DNA 片段用 NcoI 和 Hind III 限制酶裂解，插入到用相同的限制性内切酶裂解的 pET-28a 表达载体中，通过连接酶连接，形成 pET-PIG-1 表达载体。

实施例 3：构建表达新甘精胰岛素原的重组大肠杆菌

将实施例 2 构建的的重组表达载体 pET-PIG-1 转染到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中。通过卡那霉素抗性筛选阳性克隆并用 DNA 测序进行确认。对阳性克隆在 37 °C 温度条件下进行培养和扩增，然后无菌培养基和甘油加入细胞中。将 1mL 的细胞培养液转入无菌的安瓿中，并在-80 °C 进行保存，形成甘精胰岛素原工作种子库(WCB01)。

实施例 4：甘精胰岛素原融合蛋白的表达

将实施例 3 得到的 WCB01 按 0.2% 的接种量接种于 MLB 培养基(含 15 g/L 酵母粉和 5 g/L 氯化钠)中，37 °C、250 rpm 条件下培养 6-14 h，得到一级种子液。将一级种子液按 0.2% 的接种量接种于 BFM 培养基(含 6 g/L 磷酸氢二铵，4 g/L 氯化铵，13.5 g/L 磷酸二氢钾，1.39 g/L 七水硫酸镁，2.8 g/L 一水柠檬酸，8 g/L 葡萄糖，3 g/L 酵母粉和 1 mL/L 微量元素溶液(含 10 g/L 七水合硫酸亚铁，1.1 g/L 氯化锌，1.0 g/L 五水合硫酸铜，0.4 g/L 四水合氯化

锰, 0.2 g/L 硼酸, 2.7 g/L 氯化钙和 0.2 g/L 钼酸钠) 进一步培养 8-16 h 得到二级种子液。然后按照体积比 1: 10 接种到发酵罐 BFM 培养基中, 生长温度 30-39°C、生长溶氧 10-50% 和生长 pH6.0-7.3 条件下连续培养 12-18 h, 直到发酵液的 OD₆₀₀ 为 100-200, 往发酵罐中加入终浓度为 0.1-1.0 mM IPTG 诱导甘精胰岛素原进行表达, 其他生长条件不变。连续诱导 8-16 h, 通过离心机收集菌体。

将含有甘精胰岛素原的包涵体的菌体用 25mM Tris, 10mM EDTA, pH 为 8.0 的缓冲液进行重悬, 控制菌体浓度为 200g/L。菌体通过溶菌酶处理和高压均质进行裂解, 对菌体裂解液进行离心收集包涵体沉淀, 去除上清。

用 25 mM Tris, 1M 尿素, 1% 吐温 20, pH 为 8.0 的洗涤液对包涵体进行洗涤。洗涤完成后, 用 25 mM Tris, 0.1 mM EDTA 和 0.5 mM L-半胱氨酸缓冲液重悬包涵体, 调节 pH 为 12.0, 在 15°C 下溶解 50min。溶解后的溶液命名为包涵体溶解液。

实施例 5: 甘精胰岛素原的复性

将实施例 4 制备的 WCB01 的包涵体溶解液用 1 μ m 的 PP 滤芯过滤, 将温度控制为 20°C, 调节 pH 为 11.0, 然后进行复性 32h 得到复性的甘精胰岛素原。

实施例 6: 酶切转化和纯化制备甘精胰岛素

(一) 酶切制备甘精胰岛素

复性完成后, 加入复性液按体积计 0.2% 的柠康酞进行修饰。调节复性液的 pH 为 8.5, 搅拌修饰 2h。修饰完成后, 添加修饰所用的柠康酞量 60% 的乙醇胺中和过量的柠康酞, pH 调节为 9.4, 中和 15min。然后直接加入终浓度为 0.063mg 牛胰蛋白酶/g 蛋白的牛胰蛋白酶, 调节 pH 为 9.0, 在 20°C 下酶切 24h。去除融合肽, 获得带柠康酞修饰的甘精胰岛素。酶切工程用 RP-HPLC (C18) 进行监控。当酶切结束后, 通过盐酸调节 pH 为 2.0 终止酶切反应。并在 pH2.0 下保持 12h, 水解 B₂₉ 位被柠康酞修饰的赖氨酸, 获得甘精胰岛素。水解完成后, 加入终浓度为 3mM 的氯化锌, 调节 pH 为 6.0, 使甘精胰岛素形成絮状沉淀。

(2) 甘精胰岛素的纯化

将步骤 (1) 酶切和水解后的甘精胰岛素沉淀用体积分数为 3% 的乙酸进行溶解, 溶解 pH 值为 3.5。溶解的甘精胰岛素作为样品加载到阳离子层析柱上, 用缓冲液平衡。甘精胰岛素可以被 30% 的异丙醇, 1.0 M 氯化钠线性梯度洗脱。阳离子层析纯化后, 用终浓度为 3 mM 的氯化锌, 调节 pH 7.3, 使甘精胰岛素形成絮状沉淀。再重复上述操作 2 次。

将阳离子层析纯化的甘精胰岛素加载到反相制备层析柱上。用 0.1 M 磷酸二氢铵与乙腈按照 9:1 混合后调节 pH 为 3.5 得到的溶液平衡层析柱。洗脱缓冲液是 pH 为 3.5 的 0.1 M 磷酸氢二铵和 10% 乙腈的混合溶液与 60% 的乙腈按照不同比例混合后得到的溶液。甘精胰岛素通

过洗脱缓冲液的线性梯度洗脱下来。获得的甘精胰岛素洗脱液中的甘精胰岛素的纯度为 97%。第一次反相层析纯化后，用终浓度为 3 mM 的氯化锌，调节 pH 7.3，使甘精胰岛素形成絮凝沉淀。甘精胰岛素沉淀用 3% 的乙酸进行溶解，溶解 pH 值为 3.5。溶解的甘精胰岛素作为样品加载到反相制备层析柱上。用 0.05 M Tris 与乙腈按照 9:1 混合后调节 pH 为 8.5 得到的溶液平衡层析柱。洗脱缓冲液是 pH 为 8.5 的 0.05 M Tris 和 10% 乙腈的混合溶液与 60% 乙腈按照不同比例混合得到的溶液。甘精胰岛素通过洗脱缓冲液的线性梯度洗脱下来，经测定，甘精胰岛素洗脱液中的甘精胰岛素纯度为 99.9%。第二次反相层析纯化后，用 100 mM 的盐酸溶液调节 pH 7.3，甘精胰岛素形成絮凝沉淀。将收集的沉淀物用 0.3% 氯化钠溶液 (pH 7.0) 重悬洗涤 3 次，离心得到甘精胰岛素湿固体。

实施例 7 甘精胰岛素原料药的制备

用 100 mM 盐酸水溶液溶解实施例 6 制备的甘精胰岛素湿固体，直至浓度为 30 mg/mL，调节 pH 4.0，用 0.22 μm PES 滤膜过滤，将过滤后的甘精胰岛素溶液转移至冷冻干燥机中，冷冻干燥程序的设定参数如下：

- 1) 进料前搁板制冷：设定温度 -30 °C；
- 2) 制冷控制：设定温度 -30 °C，设定时间 240 min，持续时间 240 min；
- 3) 捕水器制冷：设定温度 -50 °C，持续时间为 10 min；
- 4) 预抽真空：预抽真空 0.2000 mbar，设定报警真空 0.5000 mbar，报警真空持续时间 10 s；
- 5) 一次干燥：设定温度 -10 °C，设定时间 240 min，持续时间 3600 min，设定真空 0.1800 mbar；
- 6) 解析干燥：设定温度 25 °C，设定时间 480 min，持续时间 240 min，设定真空 0.1800 mbar。

经上述处理后得到最终的甘精胰岛素原料药，纯度为 99.9% 以上。

实施例 8 甘精胰岛素的制备

具体实施方式同实施例 2~6，区别在于，甘精胰岛素原带融合肽的全序列如 SEQ ID NO: 7 所示，编码该甘精胰岛素原带融合肽的基因序列如 SEQ ID NO: 11 所示。构建的重组大肠杆菌在相同条件下发酵生产的甘精胰岛素原融合蛋白表达量为 5.8 g/L，纯化后的产品经 HPLC 检测，获得 99.42% 的高主峰色谱纯度以及 0.16% 的最大单杂色谱纯度（具体见图 1 和表 1）。

表 1 为色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
---	------	-----	------

1	11.226	12.93	0.16
2	13.513	0.79	0.01
3	16.309	3.22	0.04
4	16.792	1.10	0.01
5	17.316	3.26	0.04
6	17.887	4.05	0.05
7	18.525	2.18	0.03
8	18.937	4.83	0.06
9	19.675	7828.73	99.42

实施例 9 甘精胰岛素的制备

具体实施方式同实施例 2~6，区别在于，甘精胰岛素原带融合肽的全序列如 SEQ ID NO: 8 所示，编码该甘精胰岛素原带融合肽的基因序列如 SEQ ID NO: 12 所示。构建的重组大肠杆菌就在相同条件下发酵生产的甘精胰岛素原融合蛋白表达量为 6.1 g/L，纯化后的产品经 HPLC 检测，获得 99.59% 的高主峰色谱纯度以及 0.14% 的最大单杂色谱纯度（具体见图 2 和表 2）。

表 2 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	20.927	1134	0.02
2	21.789	6077592	99.59
3	22.388	4444	0.07
4	23.208	1540	0.03
5	25.206	8487	0.14
6	28.111	1759	0.03
7	28.604	2850	0.05
8	28.897	321	0.01
9	29.017	318	0.01
10	29.091	1534	0.03
11	29.392	1147	0.02
12	29.877	1119	0.02
13	30.001	602	0.01

实施例 10 甘精胰岛素的制备

具体实施方式同实施例 2~6，区别在于，甘精胰岛素原带融合肽的全序列如 SEQ ID NO: 9 所示，编码该甘精胰岛素原带融合肽的基因序列如 SEQ ID NO: 13 所示。构建的重组大肠杆菌就在相同条件下发酵生产的甘精胰岛素原融合蛋白表达量为 6.0 g/L，纯化后的产品经 HPLC 检测，获得 99.80% 的高主峰色谱纯度以及 0.09% 的最大单杂色谱纯度（具体见图 3 和表 3）。

表 3 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	18.410	6105	0.09
2	17.715	1916	0.03
3	21.611	6832023	99.80
4	28.367	1690	0.02
5	29.131	2405	0.04
6	29.849	813	0.01
7	29.999	737	0.01

对比例 1: 构建未经优化的甘精胰岛素原的重组大肠杆菌

具体实施方式同实施例 2~3，区别在于，将融合肽 R-R₁ 中的氨基酸序列替换为 MATKAVSVLKGDGPVQGIINFEQKESNGPVKVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGSTSA GPR(SEQ ID NO: 1)，编码 SEQ ID NO: 1 的整个氨基酸序列的 DNA 片段相应调整为：

5'-ATGGCGACGAAAGCCGTGAGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCAGTGCAGGGCAT
CATCAATTTTCGAGCAGAAAGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATTAAA
GGACTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATGAGTTTGGAGATAATACAGCTGGC
TCTACCAGTGCAGGTCCGAAATTTGTGAACCAGCATCTGTGCGGCAGCCATCTGGTGA
AGCGCTGTATCTGGTGTGCGGCGAACGCGGCTTCTTTTATACCCCGAAAACCCGCCGCG
GCATTGTGGAACAGTGCTGCACCAGCATTTCGAGCCTGTATCAGCTGGAAAATTATTGCG
GCTAA-3' (SEQ ID NO: 22)。

使甘精胰岛素原带融合肽的全序列为 MATKAVSVLKGDGPVQGIINFEQKESNGPVKVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGSTSA GPKFVNQHLCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG(SEQ ID NO: 15)；

然后用 NcoI 和 Hind III 限制酶将编码上述氨基酸序列的核苷序列与质粒 pET-28a 酶切处

理，将酶切后的片段与载体连接，获得重组表达载体 pET-PIG-2。

将重组表达载体 pET-PIG-2 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中。通过卡那霉素抗性筛选阳性克隆并用 DNA 测序进行确认。对阳性克隆进行培养和扩增，然后无菌培养基和甘油加入细胞中。将 1mL 的细胞培养液转入无菌的安瓿中，并在-80℃进行保存，形成甘精胰岛素原工作种子库(WCB02)。

对比例 2：甘精胰岛素原融合蛋白的表达

将对比例 1 得到的重组菌 WCB02 按照实施例 4 所述方法进行三批次的培养，并处理得到包涵体溶解液，随后按照实施例 5 所述方法进行复性。利用 HPLC 分别检测通过发酵 WCB01 和 WCB02 得到的甘精胰岛素原复性前体的产量，三组平行实验的结果如表 4 所示。WCB01 复性液相色谱图谱如图 4A、4B 和 4C 所示，相关数据如表 4A、4B 和 4C 所示；WCB02 复性液相色谱图谱如图 5A、5B 和 5C 所示，相关数据如表 5A、5B 和 5C 所示。

表 4 不同甘精胰岛素序列表达后甘精胰岛素原复性前体产量

#	利用 WCB01 的产量 (g/L)	利用 WCB02 的产量 (g/L)	WCB01 相对 WCB02 的 增幅
1	6.2	3.5	77%
2	6.3	3.6	75%
3	6.6	3.7	78%

表 1 结果显示，使用定点突变的 SOD 片段作为融合肽以及采用“0 C 肽”策略的优选序列 SEQ ID NO: 10，可以获得更有效的表达以及更为稳定的高发酵产量，具体是将甘精胰岛素的发酵产率提高了 75%及以上，最高提高了 78%。

表 4A 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	5.981	3728	0.02
2	6.670	2863	0.02
3	7.336	96294	0.62
4	8.800	30923	0.20
5	9.653	63346	0.41
6	9.981	14592	0.09
7	10.447	15349	0.10
8	11.440	95758	0.62
9	11.877	132292	0.86

10	12.207	217422	1.41
11	13.066	6246235	40.40
12	13.486	2272194	14.69
13	14.046	2436344	15.76
14	14.868	472685	3.06
15	15.527	370660	2.40
16	16.669	658939	4.26
17	17.230	168242	1.09
18	17.739	917577	5.93
19	18.501	735984	4.76
20	19.546	270981	1.75
21	20.324	141662	0.92
22	21.023	98337	0.64

表 4B 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.295	2536	0.02
2	7.619	1584	0.01
3	7.643	1159	0.01
4	8.441	24235	0.20
5	8.945	1332	0.01
6	9.322	46100	0.37
7	9.671	18693	0.15
8	10.116	12874	0.10
9	10.464	6401	0.05
10	11.134	100618	0.82
11	11.542	107712	0.87
12	11.924	84129	0.68
13	12.079	72595	0.59
14	12.838	6335431	51.42
15	13.381	1267742	10.29

16	13.822	1891466	15.35
17	14.168	547291	4.44
18	14.719	330588	2.68
19	15.360	275838	2.24
20	15.856	33956	0.28
21	16.134	93890	0.76
22	16.482	398809	3.24
23	16.969	95196	0.77
24	17.577	397227	3.22
25	18.013	54857	0.45
26	18.401	119467	0.97

表 4C 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.290	2542	0.02
2	7.614	1385	0.01
3	7.642	1119	0.01
4	8.405	26003	0.20
5	8.947	1558	0.01
6	9.338	49743	0.38
7	9.676	21486	0.16
8	10.137	11248	0.09
9	10.509	6231	0.05
10	11.161	80814	0.62
11	11.552	115175	0.88
12	11.919	201458	1.54
13	12.833	6554868	50.05
14	13.352	1500343	11.46
15	13.827	2051646	15.67
16	14.165	580765	4.43
17	14.695	409681	3.13
18	15.405	186479	1.42

19	15.716	133971	1.02
20	16.110	89273	0.68
21	16.466	367821	2.81
22	16.971	120239	0.92
23	17.569	353694	2.70
24	17.854	50995	0.39
25	17.973	54941	0.42
26	18.382	121957	0.93

表 5A 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.153	43402	0.50
2	8.547	10401	0.12
3	9.409	28985	0.34
4	10.141	3161	0.04
5	11.207	31408	0.37
6	11.584	59171	0.69
7	11.962	47234	0.55
8	12.828	3525420	40.98
9	13.249	1256739	14.61
10	13.820	1511732	17.57
11	14.646	279064	3.24
12	15.240	205973	2.39
13	16.454	370498	4.31
14	17.510	552834	6.43
15	18.300	264290	3.07
16	18.893	119583	1.39
17	19.338	137776	1.60
18	20.046	88628	1.03
19	20.821	42519	0.49
20	21.517	23344	0.27

表 5B 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.105	44323	0.44
2	8.487	12383	0.12
3	9.382	25154	0.25
4	9.738	4008	0.04
5	10.096	5892	0.06
6	10.462	3146	0.03
7	11.132	39277	0.39
8	11.532	51520	0.51
9	11.867	48987	0.49
10	12.749	3568760	35.41
11	13.174	1772217	17.58
12	13.732	1090494	10.82
13	14.101	417898	4.15
14	14.555	277829	2.76
15	15.211	175373	1.74
16	16.366	535098	5.31
17	17.420	472387	4.69
18	17.448	387633	3.85
19	18.199	539587	5.35
20	19.199	410304	4.07
21	20.267	87937	0.87
22	20.763	109568	1.09

表 5C 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.197	2058	0.03
2	7.586	960	0.01
3	7.627	1039	0.01
4	8.390	17399	0.22

5	8.935	1431	0.02
6	9.296	30156	0.38
7	9.673	23883	0.30
8	10.159	6689	0.09
9	10.513	4025	0.05
10	10.864	2450	0.03
11	11.120	39285	0.50
12	11.560	64445	0.82
13	11.918	141948	1.81
14	12.827	3726812	47.46
15	13.260	1169681	14.90
16	13.830	1192710	15.19
17	14.172	363760	4.63
18	14.667	241046	3.07
19	15.381	102318	1.30
20	15.673	45485	0.58
21	15.927	4970	0.06
22	16.170	36141	0.46
23	16.509	215523	2.74
24	16.941	45912	0.58
25	17.322	32154	0.41
26	17.582	166907	2.13
27	17.837	67783	0.86
28	18.439	104829	1.34

对比例 3 含有 1 个突变的融合肽序列的甘精胰岛素原的表达

调整实施例 1 的策略设计编码甘精胰岛素的序列，并在宿主细胞中表达，使甘精胰岛素原含有在 SEQ ID NO: 15 的基础上进行了 1 个定点突变的融合肽 R 序列，氨基酸序列设计为：
 MATKAVSVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVGSIHGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGS
 TSAGPRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG
 (SEQ ID NO: 16)；编码该氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:19 所示；

按照实施例 5 中所述方法进行复性。利用 HPLC 检测菌株发酵得到的甘精胰岛素原复性

前体的产量，结果显示，相同条件下的甘精胰岛素原复性前体产量为 1.9 g/L。复性液相色谱图谱分别如图 6 所示，相关数据如表 6 所示。

表 6 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.100	31530	0.58
2	8.481	6966	0.13
3	9.372	14681	0.27
4	9.756	2109	0.04
5	10.125	3795	0.07
6	10.475	3608	0.07
7	11.172	25035	0.46
8	11.546	42006	0.77
9	11.889	77271	1.42
10	12.789	1939000	35.64
11	13.211	814935	14.98
12	13.775	613260	11.27
13	14.144	231346	4.25
14	14.573	160525	2.95
15	15.227	96528	1.77
16	16.406	305068	5.61
17	17.445	459176	8.44
18	18.186	286812	5.27
19	19.207	180833	3.32
20	19.945	50905	0.94
21	20.343	48036	0.88
22	20.867	30012	0.55
23	21.435	15293	0.28
24	22.233	1649	0.03

对比例 4 含有 2 个突变的融合肽序列的甘精胰岛素原的表达

调整实施例 1 的策略设计编码甘精胰岛素的序列，并在宿主细胞中表达，使甘精胰岛素原含有在 SEQ ID NO: 15 的基础上进行了 2 个定点突变的融合肽 R 序列，氨基酸序列分别设计为：

MATKAVSVLKGDGPVQGIINFEQHESNGPVKVWGSIHGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGS
TSAGPRFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLENYCG

(SEQ ID NO: 17); 编码该氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:20 所示;

按照实施例 5 中所述方法进行复性。利用 HPLC 分别检测菌株发酵得到的甘精胰岛素原复性前体的产量, 结果显示, 相同条件下的甘精胰岛素原复性前体产量为 2.2 g/L。复性液相色谱图谱如图 7 所示, 相关数据分别如表 7 所示。

表 7 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.080	32442	0.54
2	8.429	7111	0.12
3	9.337	17594	0.29
4	10.104	1634	0.03
5	11.042	10294	0.17
6	11.485	36434	0.61
7	11.850	108086	1.80
8	12.720	2197231	36.59
9	13.132	1050997	17.50
10	13.712	931607	15.51
11	14.506	172841	2.88
12	15.214	174204	2.90
13	16.344	273268	4.55
14	17.415	359878	5.99
15	17.744	148993	2.48
16	18.227	137118	2.28
17	18.752	106493	1.77
18	19.230	109246	1.82
19	19.905	82369	1.37
20	20.807	25772	0.43
21	21.341	21575	0.36

对比例 5 含有 C 肽的甘精胰岛素原的表达

调整实施例 1 的策略设计编码甘精胰岛素的序列, 并在宿主细胞中表达, 使甘精胰岛素原含有“C 肽”(EAR), 氨基酸序列设计为:

MATHAVSVLKGDPVQGIINFEQHESNGPVKVGSIHGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGS
TSAGPRFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREARGIVEQCCTSICSLYQLENYCG
(SEQ ID NO: 18); 编码该氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:21 所示。

按照实施例 5 中所述方法进行复性。利用 HPLC 检测菌株发酵得到的甘精胰岛素原复性前体的产量，结果如下表 8 所示。复性液相色谱图谱如图 8 所示，相关数据如表 9 所示。

表 8 不同甘精胰岛素序列表达后甘精胰岛素原复性前体产量

利用 WCB01 的产量 (g/L)	表达 SEQ ID NO:19 的菌株产量 (g/L)	表达 SEQ ID NO:20 的菌株的产量 (g/L)	表达 SEQ ID NO:21 的菌株的产量 (g/L)
6.2	1.9	2.2	1.8

表 6 结果显示，使用定点突变 1 个或者 2 个位点的融合肽序列以及采用“C 肽”（REA）策略的融合肽序列获得的发酵产量远远低于 WCB01 的产量

表 9 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	7.094	30377	0.57
2	8.487	7761	0.15
3	9.382	14594	0.27
4	9.743	2603	0.05
5	10.105	4467	0.08
6	10.482	3140	0.06
7	11.115	25287	0.48
8	11.541	33463	0.63
9	11.862	75536	1.42
10	12.763	1878930	35.33
11	13.179	848037	15.95
12	13.740	611936	11.51
13	14.113	245888	4.62
14	14.557	172803	3.25
15	15.205	112415	2.11
16	16.377	259256	4.87
17	17.439	418883	7.88
18	18.243	305379	5.74

19	19.245	131360	2.47
20	20.040	73644	1.44
21	20.787	59947	1.13

对比例 6: 复性、酶切转化和纯化

将对比例 2 制备的包涵体溶解液分别按照实施例 5 的条件进行复性。然后按照实施例 6 中的方法对复性后的样品进行修饰、酶切以及纯化。重组菌 WCB01 和对比例 2 的重组菌 WCB02 的样品纯化后的液相色谱图谱分别如图 9A 和图 9B 所示, 相关数据分别如表 10A 和 10B 所示。结果显示, 使用定点突变 3 个氨基酸的 SOD 片段作为融合肽以及采用“0 C 肽”策略的菌株 (WCB01), 可以获得 99.93% 的高主峰色谱纯度以及 0.05% 的最大单杂色谱纯度。与此同时, 使用未突变的 SOD 片段作为融合肽的菌株 (WCB02) 的主峰和最大单杂的色谱纯度分别为 92.25% 和 2.15%。使用突变的 SOD 片段以及采用“0 C 肽”策略, 虽然主峰纯度提高了一点, 但是最大单杂含量明显降低一个数量级, 避免 C-肽残基的残留, 减少酶切转化的质量损失和错切杂质。

表 10A 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	19.960	6005658	99.93
2	21.681	3011	0.05
3	29.279	1181	0.02

表 10B 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	6.450	753	0.01
2	7.657	420	0.01
3	8.0184	609	0.01
4	8.438	538	0.01
5	8.510	268	0.00
6	8.576	256	0.00
7	8.709	792	0.01
8	8.816	316	0.00
9	8.879	360	0.00
10	8.972	987	0.01
11	9.162	449	0.01

12	9.186	268	0.00
13	9.304	365	0.00
14	9.410	1019	0.01
15	9.598	450	0.01
16	9.694	625	0.01
17	9.804	741	0.01
18	9.880	559	0.01
19	10.156	2983	0.04
20	10.475	739	0.01
21	11.001	119807	1.49
22	11.531	2151	0.03
23	12.047	1591	0.02
24	12.292	1474	0.02
25	12.465	2309	0.03
26	12.752	14885	0.18
27	12.949	15308	0.19
28	13.220	17592	0.22
29	13.536	52838	0.66
30	13.878	85586	1.06
31	14.381	8191	0.10
32	15.065	10546	0.13
33	16.135	8074	0.10
34	16.763	173201	2.15
35	17.114	21542	0.27
36	17.819	1731	0.02
37	19.010	20447	0.25
38	19.736	7428281	92.25
39	20.859	50936	0.63
40	22.476	53	0.00
41	22.666	1348	0.02
42	23.631	109	0.00
43	23.721	434	0.01

44	29.584	191	0.00
----	--------	-----	------

对比例 7: 利用猪胰蛋白酶的酶切转化

按照实施例 4 中的酶切方法利用猪胰蛋白酶对实施例 3 制备的 WCB01 复性后的溶液进行酶切转化。分别利用猪胰蛋白酶和牛胰蛋白酶的酶切转化的液相色谱图谱分别如图 10A 和图 10B 所示, 相关数据分别如表 11A 和 11B 所示。图 10A 中出峰时间为 20.447min 的主峰面积为 9569627 mAU*min, 图 10B 中出峰时间为 20.730min 的主峰面积为 11142487 mAU*min。结果显示, 使用牛胰蛋白酶相对猪胰蛋白酶, 酶切转化率可以提高 16%; 因为产物浓度与峰面积存在正比关系, 转化率根据如下公式计算得到 $(11142487-9569627)/9569627=16\%$ 。

表 11A 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	6.123	25974	0.09
2	6.576	32496	0.12
3	7.150	18545	0.07
4	7.344	2774	0.01
5	7.593	36611	0.13
6	7.897	26753	0.10
7	8.428	65286	0.23
8	8.607	16521	0.06
9	8.825	15502	0.06
10	9.011	92535	0.33
11	9.435	27660	0.10
12	9.628	10516	0.04
13	9.787	5496	0.02
14	9.894	5612	0.02
15	10.066	9195	0.03
16	10.212	16404	0.06
17	10.423	6520	0.02
18	10.570	39115	0.14
19	10.880	29368	0.10
20	11.451	70108	0.25
21	12.002	3610530	12.83

22	12.403	98065	0.35
23	12.783	20620	0.07
24	130.84	125933	0.45
25	13.728	31204	0.11
26	14.421	134964	0.48
27	15.341	58382	0.21
28	15.609	18801	0.07
29	16.793	115174	0.41
30	17.311	2486	0.04
31	17.509	12968	0.05
32	18.124	111013	0.39
33	18.809	115239	0.41
34	19.372	70992	0.25
35	20.447	9569327	34.00
36	21.527	2327425	8.27
37	22.216	5483055	19.48
38	23.270	395684	1.41
39	24.581	2141960	7.61
40	24.992	611732	2.17
41	26.320	440323	1.56
42	26.819	2029210	7.21
43	28.805	61812	0.22
44	29.604	4203	0.01

表 11B 色谱检测到的主要峰面积及保留时间

#	保留时间	峰面积	%峰面积
1	6.141	96963	0.29
2	6.648	41805	0.13
3	7.202	38587	0.12
4	7.374	14189	0.04
5	7.629	21517	0.06

6	7.928	54454	0.16
7	8.446	73781	0.22
8	8.653	45482	0.14
9	8.868	21845	0.07
10	9.061	100605	0.30
11	9.229	18851	0.06
12	9.486	30588	0.09
13	9.675	14226	0.04
14	9.821	7601	0.02
15	9.973	11309	0.03
16	10.093	8934	0.03
17	10.252	18843	0.06
18	10.435	6463	0.02
19	10.618	37421	0.11
20	10.929	24440	0.07
21	11.504	79186	0.24
22	12.104	475734	1.42
23	12.472	78628	0.24
24	12.870	33249	0.10
25	13.180	160861	0.48
26	13.862	35587	0.11
27	14.570	76881	0.23
28	14.817	73991	0.22
29	15.508	75852	0.23
30	16.301	20875	0.06
31	17.032	106983	0.32
32	17.735	29030	0.09
33	18.272	198861	0.60
34	18.860	131756	0.39
35	19.604	78034	0.23
36	20.730	11142487	33.37
37	21.832	2758566	8.26

38	22.481	9109465	27.28
39	23.599	505312	1.51
40	24.919	2404115	7.20
41	25.339	1005576	3.01
42	27.172	4038121	12.09
43	29.079	87112	0.26

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权利要求书

1、一种甘精胰岛素原，其特征在于，含有如下所示结构的氨基酸序列：

$(B_1-B_{32})-(A_1-A_{20})-A_{21}$ ；

其中：

B_1-B_{32} 为在天然人胰岛素的 B 链 B_1-B_{30} 的 B_{30} 位 C 端后连接了两个精氨酸 Arg 残基；

A_1-A_{20} 为具有 20 个氨基酸的胰岛素 A 链；

A_{21} 是甘氨酸。

2、根据权利要求 1 所述的甘精胰岛素原，其特征在于，氨基酸序列的结构为：

$R-R_1-(B_1-B_{32})-(A_1-A_{20})-A_{21}$ ；其中：

$R-R_1$ 为融合肽序列，R 的氨基酸序列为：
 $MATX_1AVSVLKGDPVQGIINFEQX_2ESNGPVKVGWSIX_3GLTEGLHGFHVHEFGDNTAGST$
 $SAGP$ ； X_1 为脯氨酸或组氨酸； X_2 为脯氨酸或组氨酸； X_3 为脯氨酸或组氨酸；

R_1 为精氨酸或赖氨酸。

3、根据权利要求 1 所述的甘精胰岛素原，其特征在于，R 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所示。

4、编码权利要求 1~3 任一所示甘精胰岛素原的 DNA。

5、含有权利要求 4 所述 DNA 的表达载体。

6、表达权利要求 1~3 任一所述甘精胰岛素原或含有权利要求 5 所述表达载体的非植物细胞。

7、一种生产甘精胰岛素的方法，其特征在于，将表达权利要求 1~3 任一所述甘精胰岛素原的重组大肠杆菌于 35~37℃ 下发酵至少 20 h，生产甘精胰岛素。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，还对发酵后的甘精胰岛素酶切、修饰、复性和纯化。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述酶切采用胰蛋白酶进行酶切；所述修饰采用柠康酐。

10、权利要求 7~9 任一所述方法在制备甘精胰岛素或含甘精胰岛素的药物中的应用。

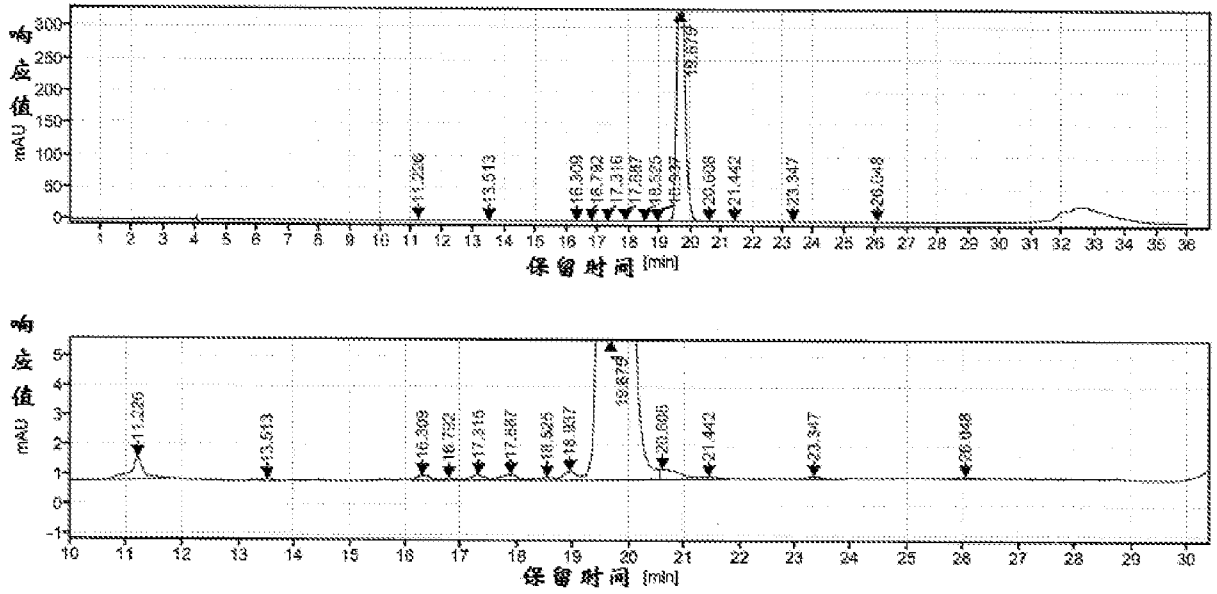


图 1

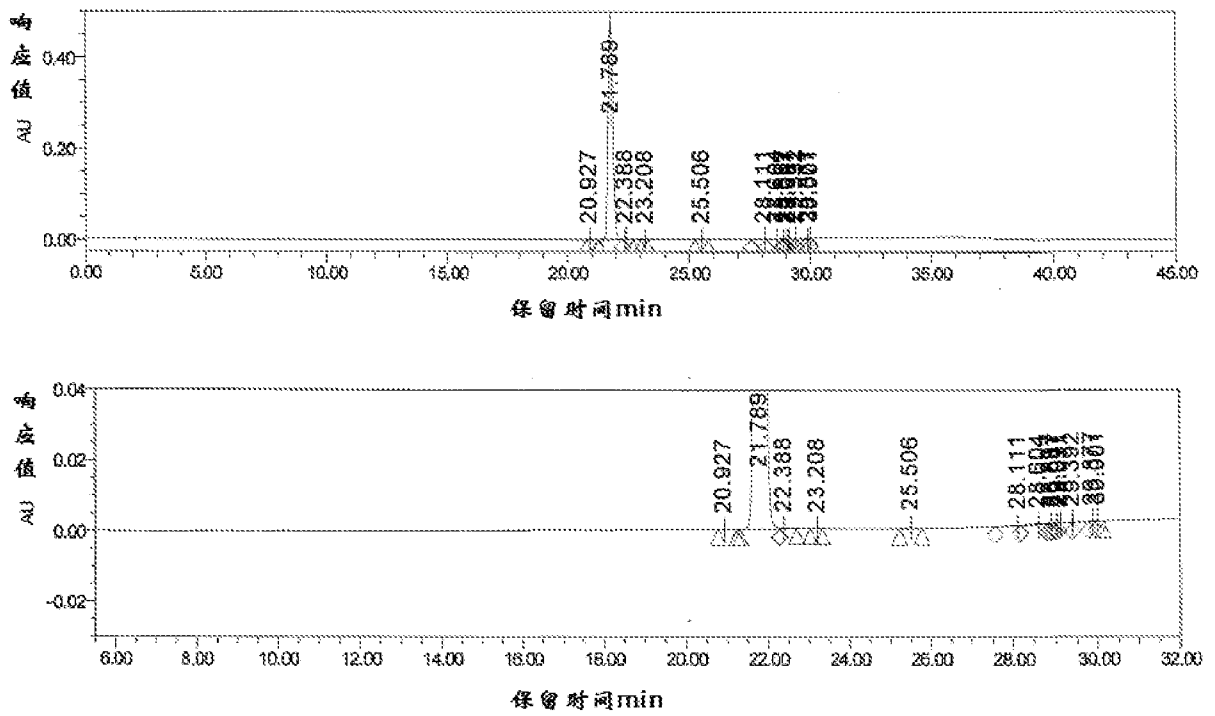


图 2

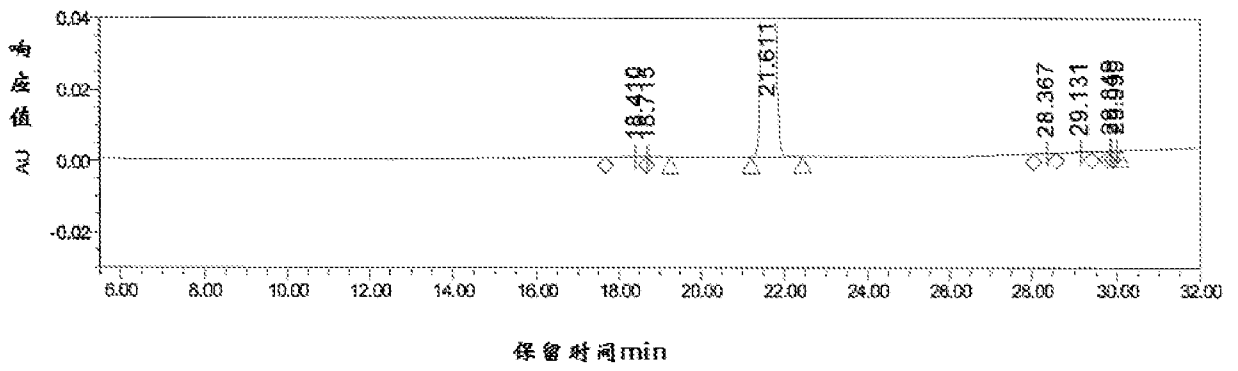
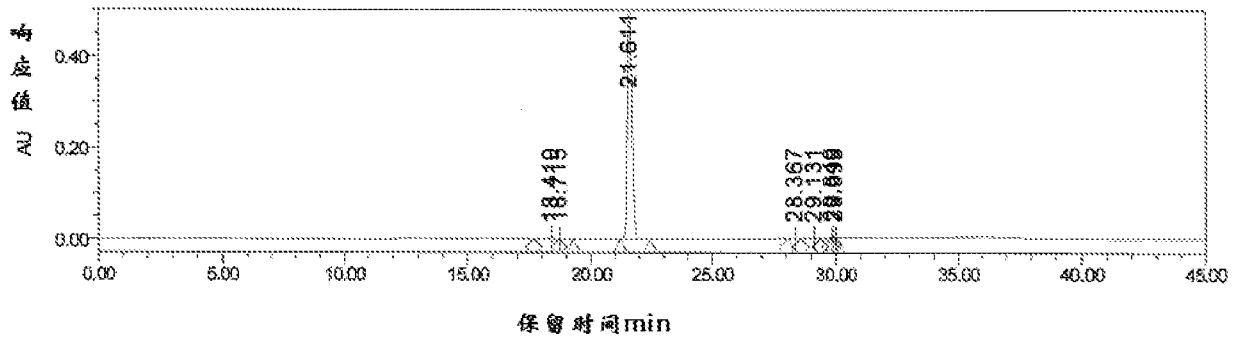


图 3

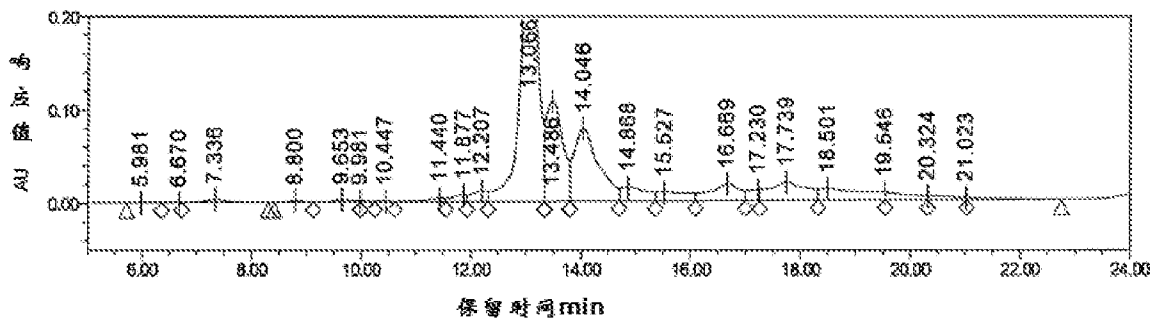
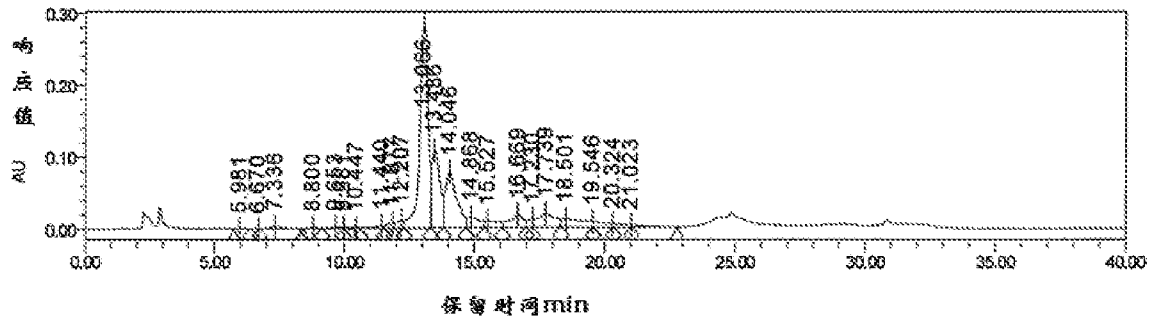


图 4A

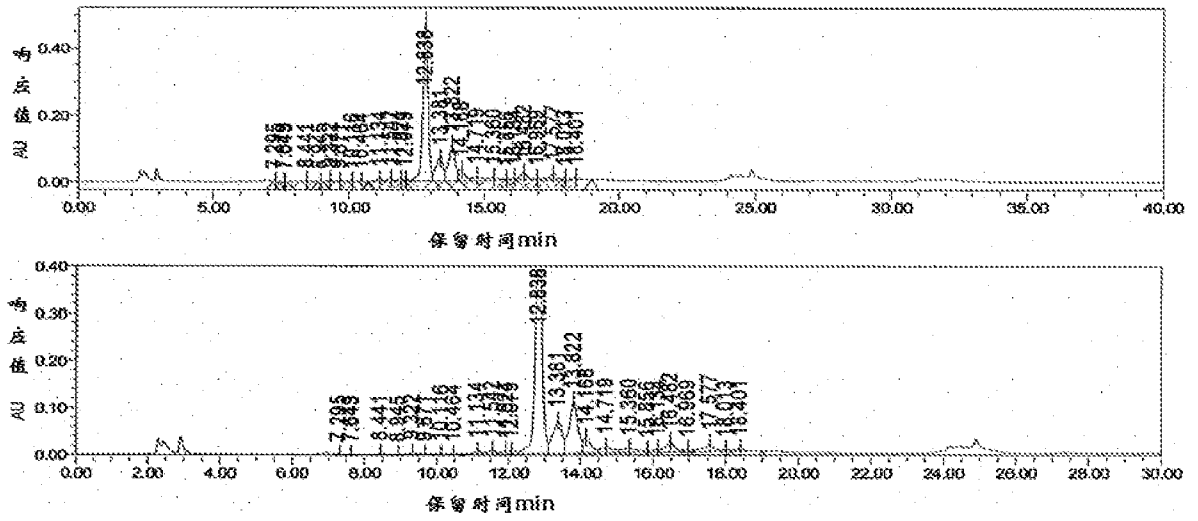


图 4B

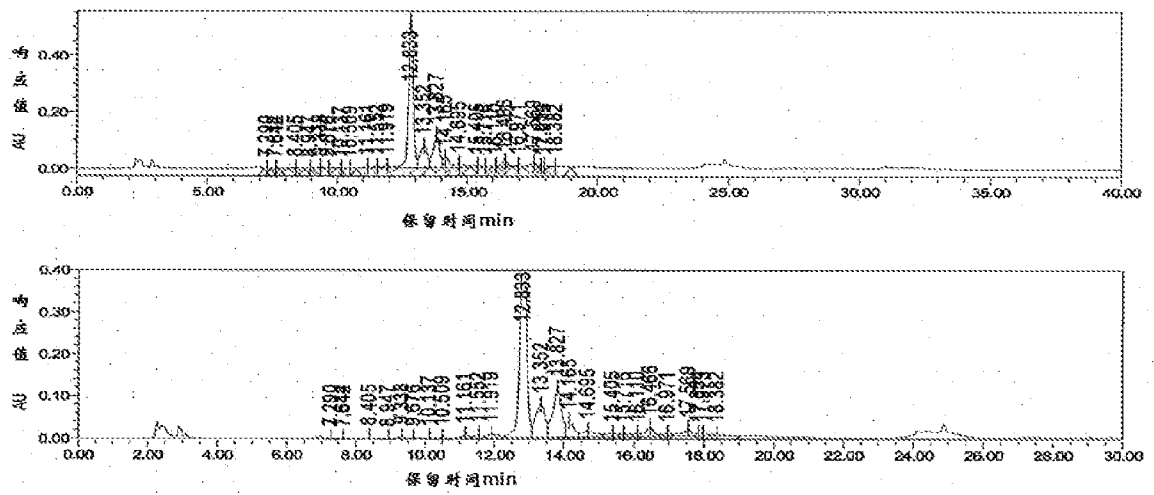


图 4C

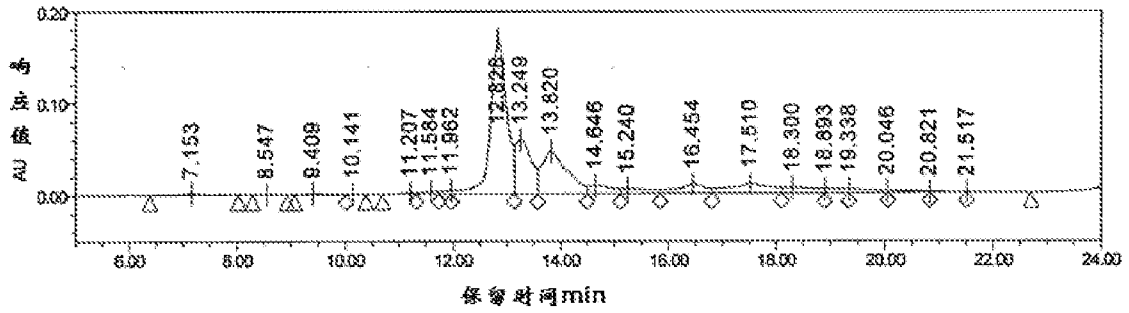
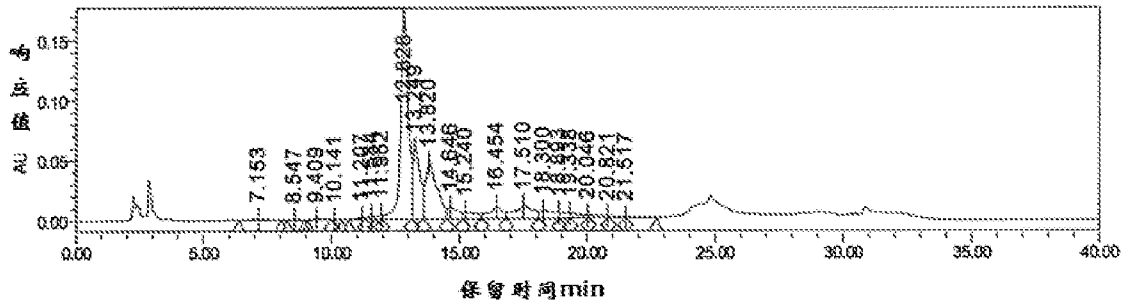


图 5A

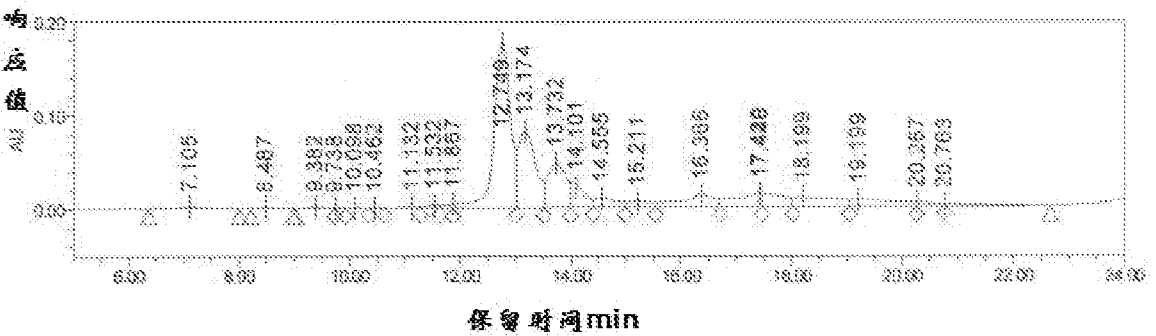
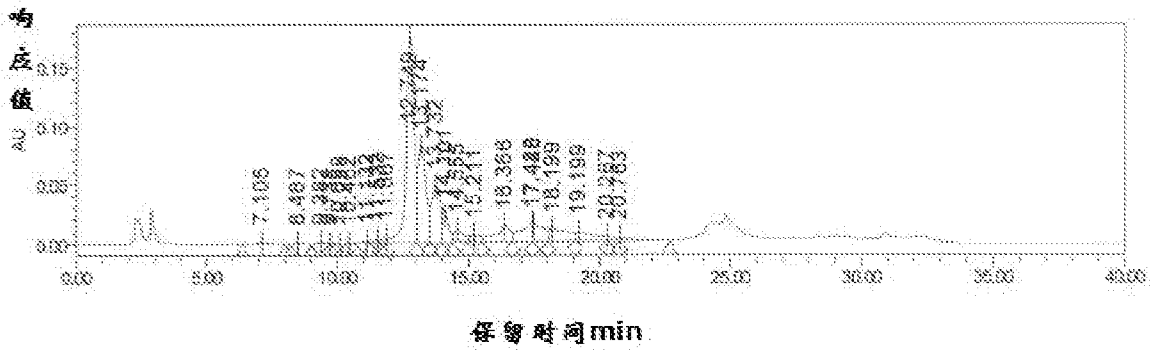


图 5B

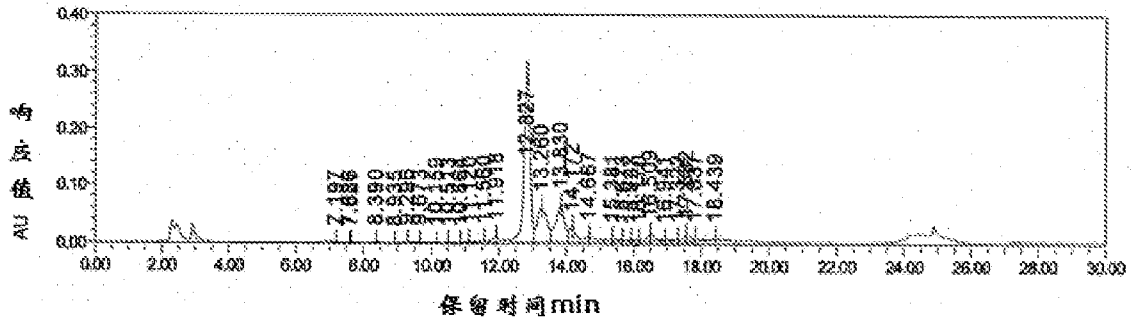
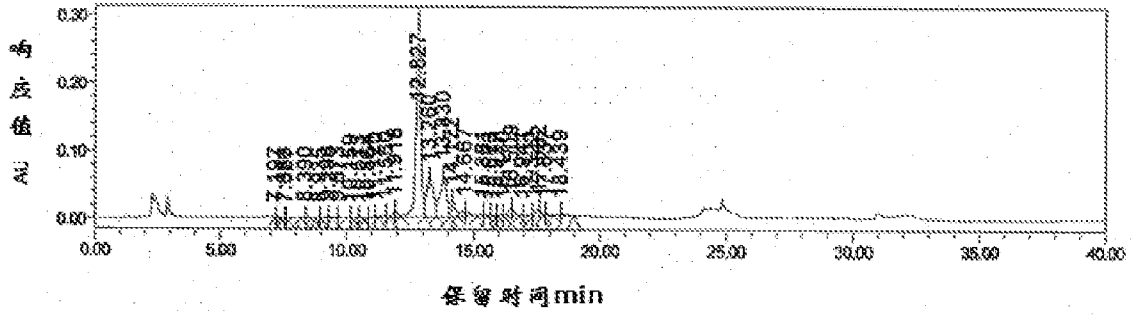


图 5C

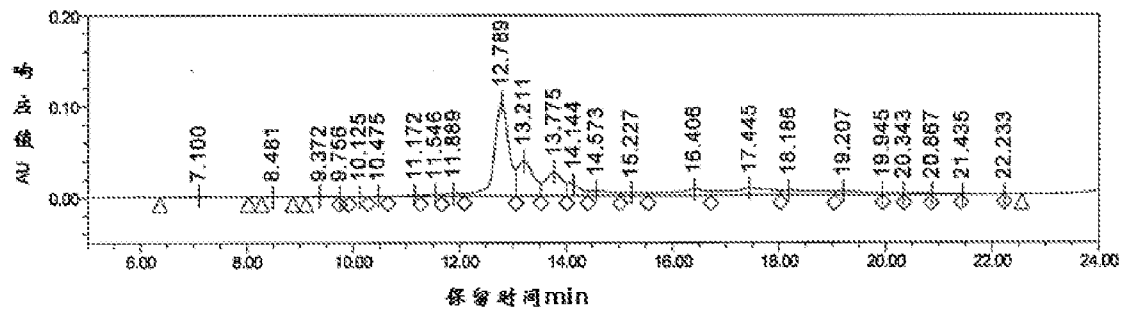
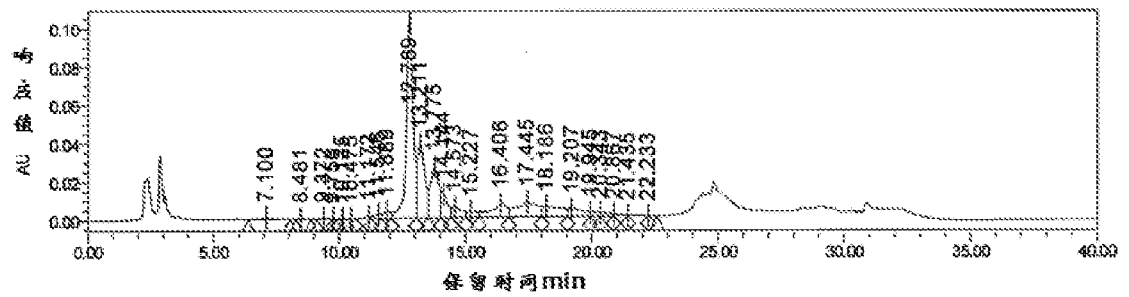


图 6

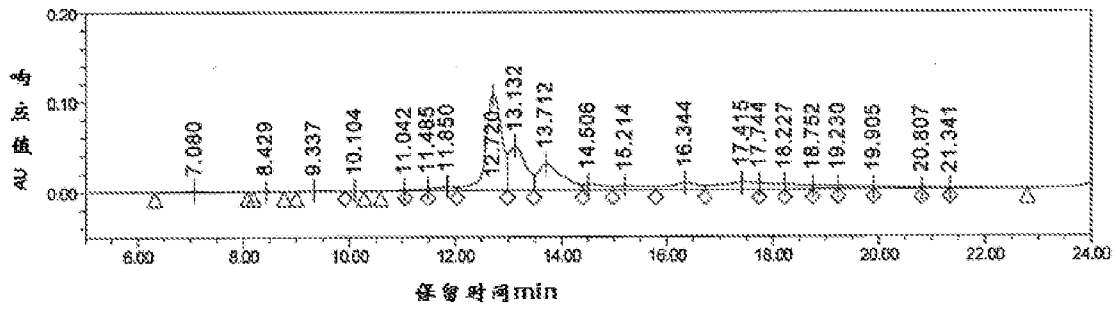
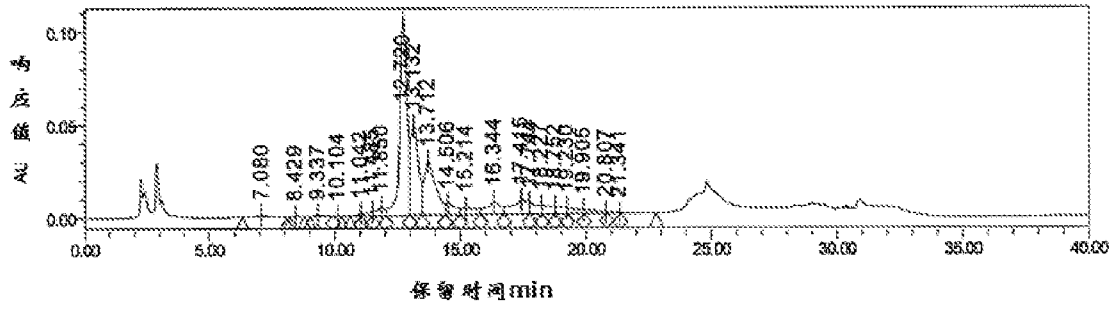


图 7

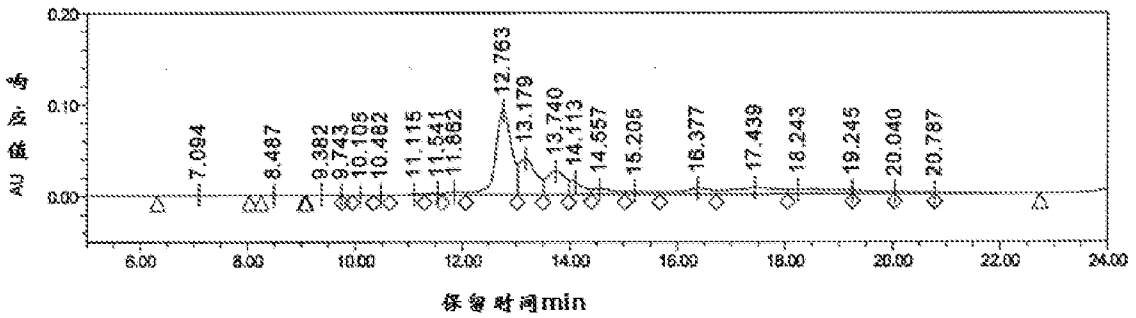
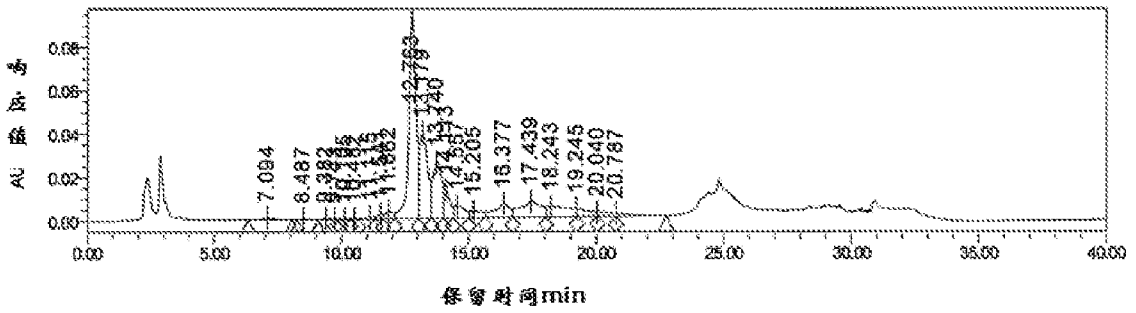


图 8

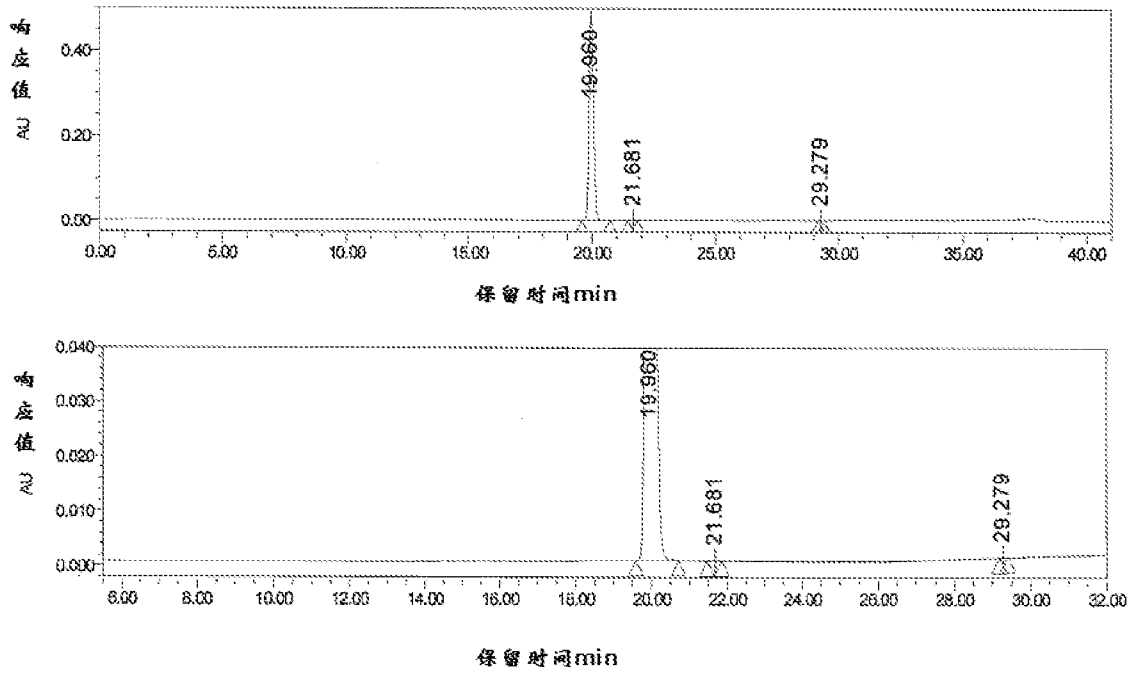


图 9A

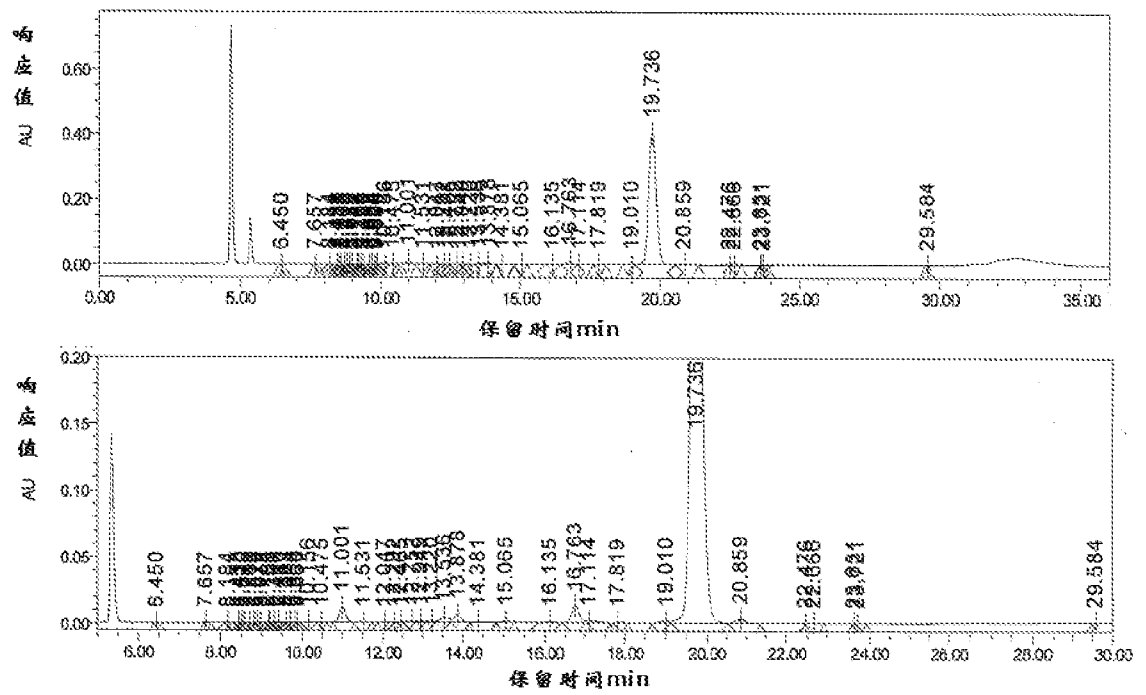


图 9B

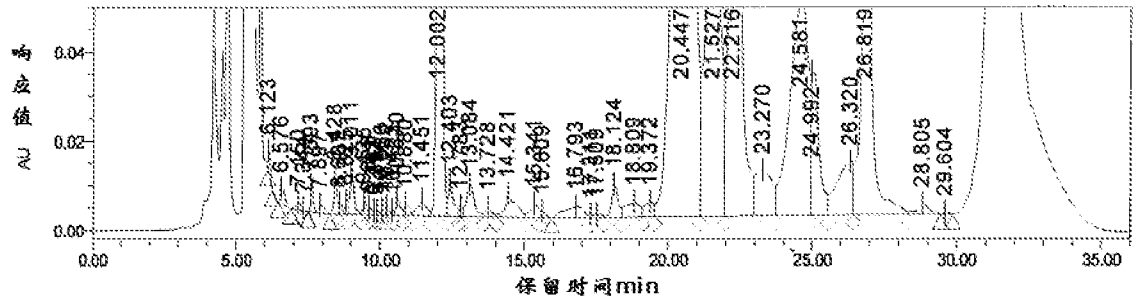
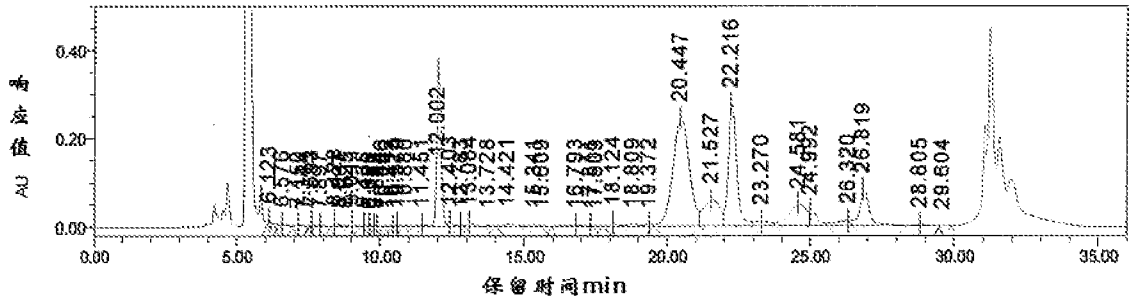


图 10A

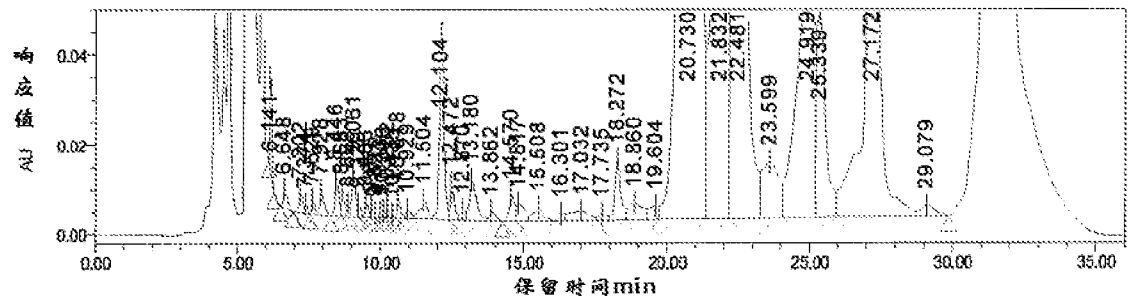
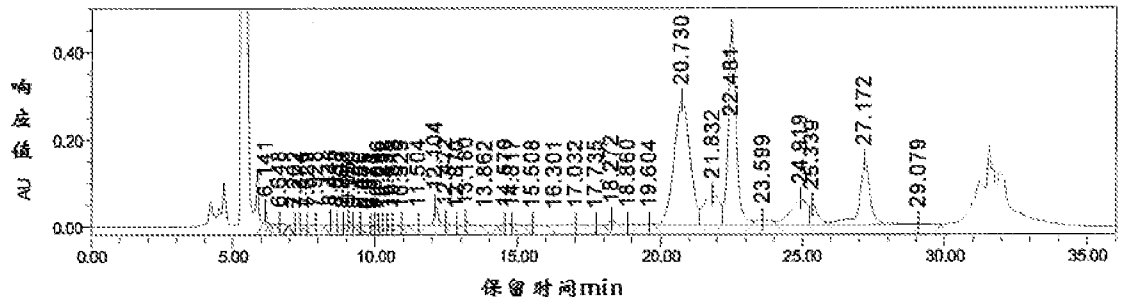


图 10B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/138950

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/62(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N, A61K, C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, China Patent Biological Sequence Search System: 胰岛素, 前导, insulin, precursor, complete sequences in claims 1 and 2 in the present application		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103981242 A (VALIN TECHNOLOGIES LTD.) 13 August 2014 (2014-08-13) entire document, in particular embodiment 1, SEQ ID NOs: 1, 2, and abstract	1, 4-10
X	CN 102015762 A (BIOCON LTD.) 13 April 2011 (2011-04-13) entire document, in particular embodiment 1, SEQ ID NOs: 1, 2, and abstract	1, 4-10
A	CN 103981242 A (VALIN TECHNOLOGIES LTD.) 13 August 2014 (2014-08-13) entire document, in particular embodiment 1, SEQ ID NOs: 1, 2, and abstract	2, 3
A	CN 102015762 A (BIOCON LTD.) 13 April 2011 (2011-04-13) entire document, in particular embodiment 1, SEQ ID NOs: 1, 2, and abstract	2, 3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 February 2021		Date of mailing of the international search report 28 May 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/138950

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103981242	A	13 August 2014	HK	1200874	A1	14 August 2015
CN	102015762	A	13 April 2011	JP	2015083019	A	30 April 2015
				KR	101556514	B1	02 October 2015
				RU	2010138656	A	27 March 2012
				IL	207646	A	31 August 2016
				RU	2495131	C2	10 October 2013
				WO	2009104199	A1	27 August 2009
				US	8802816	B2	12 August 2014
				KR	20100117612	A	03 November 2010
				EP	2242767	A4	06 April 2011
				JP	6077027	B2	08 February 2017
				EP	2242767	A1	27 October 2010
				MX	2010009033	A	21 December 2010
				IL	207646	D0	30 December 2010
				MY	161892	A	15 May 2017
				JP	2011514151	A	06 May 2011
				BR	PI0822775	A2	30 June 2015
				JP	5781308	B2	16 September 2015
				CN	102015762	B	18 March 2015
				US	2011236925	A1	29 September 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/138950

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 14/62(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N, A61K, C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统:胰岛素, 前导, insulin, precursor, 本申请权利要求1和2中的完整序列</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 103981242 A (华凌科技有限公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 尤其是实施例1、SEQ ID N0s: 1、2和摘要</td> <td>1, 4-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102015762 A (百康有限公司) 2011年 4月 13日 (2011 - 04 - 13) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID N0s: 1、2和摘要</td> <td>1, 4-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103981242 A (华凌科技有限公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 尤其是实施例1、SEQ ID N0s: 1、2和摘要</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102015762 A (百康有限公司) 2011年 4月 13日 (2011 - 04 - 13) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID N0s: 1、2和摘要</td> <td>2, 3</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 103981242 A (华凌科技有限公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 尤其是实施例1、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	1, 4-10	X	CN 102015762 A (百康有限公司) 2011年 4月 13日 (2011 - 04 - 13) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	1, 4-10	A	CN 103981242 A (华凌科技有限公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 尤其是实施例1、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	2, 3	A	CN 102015762 A (百康有限公司) 2011年 4月 13日 (2011 - 04 - 13) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	2, 3
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 103981242 A (华凌科技有限公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 尤其是实施例1、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	1, 4-10															
X	CN 102015762 A (百康有限公司) 2011年 4月 13日 (2011 - 04 - 13) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	1, 4-10															
A	CN 103981242 A (华凌科技有限公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 全文, 尤其是实施例1、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	2, 3															
A	CN 102015762 A (百康有限公司) 2011年 4月 13日 (2011 - 04 - 13) 全文, 尤其是权利要求书、SEQ ID N0s: 1、2和摘要	2, 3															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 2月 5日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 5月 28日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>吴永庆</p> <p>电话号码 +86-10-62089161</p>															

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/138950

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103981242	A	2014年 8月 13日	HK	1200874	A1	2015年 8月 14日
CN	102015762	A	2011年 4月 13日	JP	2015083019	A	2015年 4月 30日
				KR	101556514	B1	2015年 10月 2日
				RU	2010138656	A	2012年 3月 27日
				IL	207646	A	2016年 8月 31日
				RU	2495131	C2	2013年 10月 10日
				WO	2009104199	A1	2009年 8月 27日
				US	8802816	B2	2014年 8月 12日
				KR	20100117612	A	2010年 11月 3日
				EP	2242767	A4	2011年 4月 6日
				JP	6077027	B2	2017年 2月 8日
				EP	2242767	A1	2010年 10月 27日
				MX	2010009033	A	2010年 12月 21日
				IL	207646	D0	2010年 12月 30日
				MY	161892	A	2017年 5月 15日
				JP	2011514151	A	2011年 5月 6日
				BR	PI0822775	A2	2015年 6月 30日
				JP	5781308	B2	2015年 9月 16日
				CN	102015762	B	2015年 3月 18日
				US	2011236925	A1	2011年 9月 29日