

(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1月27日 (27.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/017309 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/00 (2006.01) C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/107040

(22) 国际申请日: 2021年7月19日 (19.07.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010723972.9 2020年7月24日 (24.07.2020) CN

(71) 申请人: 江苏晟斯生物制药有限公司(JIANGSU GENSCIENCES INC.) [CN/CN]; 中国江苏省南通市南通经济技术开发区广贤路西、新兴路南, Jiangsu 226000 (CN)。

(72) 发明人: 王亚里(WANG, Yali); 中国江苏省南通市南通经济技术开发区广贤路西、新兴路南, Jiangsu 226000 (CN)。 陈宪(CHEN, Xian); 中国北京市北京经济技术开发区荣昌东街7号B幢5层东503室, Beijing 100176 (CN)。 朱鹿燕(ZHU, Luyan); 中国北京市北京经济技术开发区荣昌东街7号B幢5层东503室, Beijing 100176 (CN)。 周婷婷(ZHOU, Tingting); 中国北京市北京经济技术开发区

荣昌东街7号B幢5层东503室, Beijing 100176 (CN)。 莫炜川(MO, Weichuan); 中国北京市北京经济技术开发区荣昌东街7号B幢5层东503室, Beijing 100176 (CN)。 刘成亮(LIU, Chengliang); 中国北京市北京经济技术开发区荣昌东街7号B幢5层东503室, Beijing 100176 (CN)。 郝维维(HAO, Weiwei); 中国北京市北京经济技术开发区荣昌东街7号B幢5层东503室, Beijing 100176 (CN)。 王淑亚(WANG, Shuya); 中国河南省郑州市郑州航空港经济综合实验区海路与生物科技二街交叉口东北角郑州临空生物医药园20号楼, Henan 451162 (CN)。 姜召菊(JIANG, Zhaoju); 中国北京市北京经济技术开发区荣昌东街7号B幢5层东503室, Beijing 100176 (CN)。 任子甲(REN, Zijia); 中国河南省郑州市郑州航空港经济综合实验区海路与生物科技二街交叉口东北角郑州临空生物医药园20号楼, Henan 451162 (CN)。 苏鸿声(SU, Hongsheng); 中国北京市大兴区金地格林小镇608栋1-402, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街22号赛特广场7层, Beijing 100004 (CN)。

(54) Title: INSULIN-FC FUSION PROTEIN AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 胰岛素-Fc融合蛋白及其应用

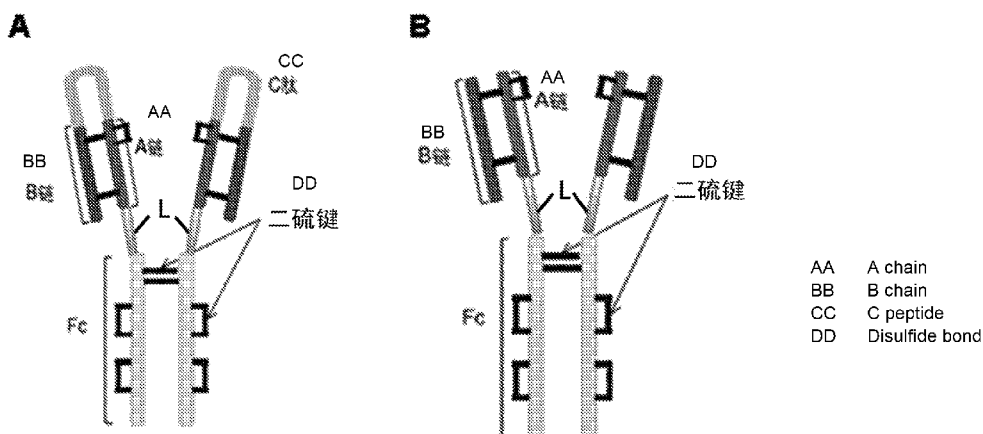


图 3

(57) Abstract: Provided is a fusion protein of insulin and an immunoglobulin Fc region. Specifically, the present invention relates to an insulin fusion protein having a prolonged in vivo half-life and stability, a preparation that contains the fusion protein, a preparation method therefor and an application thereof.

(57) 摘要: 提供一种胰岛素与免疫球蛋白Fc区的融合蛋白。具体地, 涉及具有延长的体内半衰期和稳定性的胰岛素融合蛋白、包含该融合蛋白的制剂及其制备方法和应用。

[见续页]



WO 2022/017309 A1

(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, 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))。

胰岛素-Fc 融合蛋白及其应用

本申请要求于 2020 年 7 月 24 日提交到中国专利局的发明名称为“胰岛素-Fc 融合蛋白及其应用”的中国专利申请 202010723972.9 的优先权，其内容通过引用以整体并入本文。

5 技术领域

[01] 本发明涉及多肽类药物领域，尤其涉及一种在经过位点特异性蛋白酶切割后具有增强的胰岛素活性和延长的体内半衰期的胰岛素-Fc 融合蛋白、其制备方法和应用。

背景技术

10 [02] 近年来，糖尿病的发病率呈逐年升高趋势，1 型糖尿病主要依赖外源性的胰岛素控制血糖；2 型糖尿病随着病情的恶化发展，胰岛素也成为其控制血糖的主要药物。因此，利用胰岛素治疗糖尿病已成为较有效的方式。

[03] 胰岛素疗法对于具有异常胰岛素分泌（I 型）或胰岛素抗性（II 型）的患者是必需的，而且通过胰岛素施用能正常调节血液葡萄糖水平。然而，像其它蛋白质和肽激素一样，胰岛素具有很短的体内半衰期，因而具有反复施用的缺点。此类频繁施用对患者引起严重的疼痛和不适。出于这个原因，为了通过延长蛋白质的体内半衰期及降低施用频率来改善生活质量，已经对蛋白质配制剂和化学缀合（脂肪酸缀合物，聚乙烯聚合物缀合物）进行了许多研究。商品化的长效胰岛素包括由 Sanofi Aventis 制造的甘精胰岛素（lantus，持续约 20 小时至 22 小时），和由 Novo Nordisk 制造的地特胰岛素（levemir，持续约 18 小时至 22 小时）和 tresiba（德谷胰岛素，持续约 40 小时）。这些长效胰岛素配制剂不产生血液胰岛素浓度峰，因而它们适合作为基础胰岛素。然而，因为这些配制剂不具有足够长的半衰期，所以仍然存在每天或者两到三天注射一次的缺点。因而，在实现每周一次给药频率，以改善需要长期施用胰岛素的糖尿病患者的便利性的预定目标方面存在限制。

25 [04] 专利公开 CN103509118B 中公开了一种与抗体 Fc 区融合的单链胰岛素，虽然体外实验中证明该胰岛素-Fc 融合蛋白具有改善的半衰期，但是该融合胰岛素的体内降糖活性较低，不适于作为临床施用。

[05] 控制血糖病症的成功性与要治疗的患者的依从性高度相关，并且期望降低所需的注射频率。然而，现有的这些经修饰的胰岛素分子要么活性很低，不适于临床使用；要么活性很高，施用于患者后有快速降糖效应，导致低血糖的副作用。因此本领域迫切需要一种适合于临床施用的新型长效胰岛素。

30

发明内容

[06] 经过大量研究，发明人提供了一种胰岛素-Fc 融合蛋白，该融合蛋白经过位点特异性蛋白酶切割后获得增强的胰岛素活性和延长的体内半衰期，并且令人惊奇地发现，所述融合蛋白的体内降血糖效应更为平坦和稳定，能够提高临床用药的安全性和患者依从性，从而更好地实现血糖管理并提供更好的生活质量。

[07] 在一个方面，本发明提供一种胰岛素-Fc 融合蛋白，其经过位点特异性蛋白酶切割后具有增强的胰岛素活性和延长的体内半衰期，其具有式 (I) 的结构：

[08] X-E1-Y-E2-Z-L-Fc (I)，

[09] 其中，

[10] X 和 Z 分别是胰岛素的 B 链和 A 链，并且如果 X 是 B 链，则 Z 是 A 链；如果 X 是 A 链，则 Z 是 B 链。

[11] Y 为任意的连接肽；Y 的长度可以为 1-100 个或更多个氨基酸，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90、100 个或以上任意两个数值之间的值；例如 Y 为胰岛素 C 肽或者其变体或片段。

[12] E1 和 E2 中的一个存在或两个都存在，是包含位点特异性蛋白酶切割位点的一段氨基酸；E1 和 E2 的长度可以是 1-10 个或更多个氨基酸，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸；如果同时存在，E1 和 E2 可被相同或不同的位点特异性蛋白酶切割，例如可被相同的位点特异性蛋白酶切割；如果 Y 存在，则优选地 E1 和 E2 两个都存在；如果 Y 不存在，则优选地 E1 和 E2 中存在一个；所述位点特异性蛋白酶切割位点可以是 Kex2 和/或弗林 (Furin) 蛋白酶的切割位点，例如是 Kex2 蛋白酶的切割位点。

[13] L 为连接 Z 与 Fc 的接头 (Linker)；L 可以是多肽片段，例如，L 包含选自 Ala、Thr、Gly 和 Ser 中一个、两个或更多个氨基酸的柔性单元 (本文中也称柔性肽段)，更例如一段由 G 和 S 构成的柔性单元；L 也可以是包含刚性单元 (本文中也称刚性肽段) 的多肽片段。

[14] 在一些实施方案中，所述刚性单元包含或主要由刚性氨基酸构成，所述刚性氨基酸包括但不限于 V、P、I、K 和 L。

[15] 在一些实施例中，所述刚性单元包含一个或更多个 PPPX1LP (SEQ ID NO: 125)，其中 X1 为任意氨基酸；

[16] 在另一些实施例中,所述刚性单元包含一个或更多个 X2APPPX1LP (SEQ ID NO: 126), 其中 X1 为任意氨基酸, X2 为 K 或 V。

[17] 在另一些实施例中,所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段:

[18] PPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 127);

5 [19] PPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 128);和

[20] PPPALPAVAPPALP (SEQ ID NO: 129)。

[21] 在另一些实施例中,所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段:

[22] KAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 130);

[23] VAPPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 131);和

10 [24] VAPPPALPAVAPPALP (SEQ ID NO: 132)。

[25] 在一些实施方案中, L 既包含刚性单元, 也包含柔性单元, 可以是多于两个单元。

[26] Fc 是免疫球蛋白的 Fc 区;所述 Fc 可以来自人免疫球蛋白;所述 Fc 区可以是来自 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 的 Fc 区;优选地,所述 Fc 区是来自 IgG 的 Fc 区,例如来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区;再优选地,所述 Fc 区是来自 IgG2 的 Fc 区;其中与其来源序列相比,所述 Fc 区可以带有一个或更多个替换、添加和/或缺失,同时仍保留延长半衰期的能力,例如来自人 IgG 的 Fc 区并带有降低或消除与 Fc γ R 结合的突变和/或增强与 FcRn 结合的一个或更多个突变,所述突变可以选自: N297A、G236R/L328R、L234A/L235A、N434A、M252Y/S254T/T256E、M428L/N434S、T250R/M428L;所述 Fc 区可以是糖基化的或未糖基化的。

20 [27] 在一些实施方案中,对于本发明的融合蛋白来说,所述胰岛素选自人胰岛素、牛胰岛素或猪胰岛素,优选地是人胰岛素;例如所述胰岛素的 A 链和 B 链源自人胰岛素。

[28] 在一些实施例中, Y、E1 和 E2 都存在,或者其中 Y 不存在, E1 和 E2 中存在一个。

[29] 在另一些实施例中,所述融合蛋白具有选自 SEQ ID NO: 47-72 的氨基酸序列。

25 [30] 在第二个方面中,本发明提供一种胰岛素-Fc 融合蛋白,其具有 Ins-L-Fc 结构。在一些实施方案中,本发明第一个方面的融合蛋白在特异性蛋白酶的作用下,可以去除 C 链,产生本发明第二个方面所述的融合蛋白。在一些实施方案中,所述胰岛素-Fc 融合蛋白以同源二聚体的形式存在,其结构示意图如图 3 所示。在一些实施方案中,所述胰岛素-Fc 融合蛋白具有与天然胰岛素类似的二级及三级结构。

[31] 其中, Ins 是提供胰岛素活性的胰岛素部分, 其包括通过共价键连接的胰岛素 A 链和 B 链, 但 A 链和 B 链位于不同的肽链中; 所述共价键优选地是二硫键。

[32] L 为连接 Z 与 Fc 的接头; L 可以是多肽片段(在本文一些实施方案中也可称为连接肽), 例如, L 包含选自 Ala、Thr、Gly 和 Ser 中一个、两个或更多个氨基酸的柔性单元; L 还可以是包含刚性单元的多肽片段。

[33] 在一些实施例中, 所述 L 包含一个或更多个刚性单元, 所述刚性单元包含或主要由刚性氨基酸构成, 所述刚性氨基酸包括但不限于 V、P、I、K 和 L。

[34] 在另一些实施例中, 所述刚性单元包含一个或更多个 PPPX1LP (SEQ ID NO: 125), 其中 X1 为任意氨基酸。

[35] 在另一些实施例中, 所述刚性单元包含一个或更多个 X2APPPX1LP (SEQ ID NO: 126), 其中 X1 为任意氨基酸, X2 为 K 或 V。

[36] 在另一些实施例中, 所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段:

[37] PPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 127);

[38] PPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 128);和

[39] PPPALPAVAPPPALP (SEQ ID NO: 129)。

[40] 在另一些实施例中, 所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段:

[41] KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 130);

[42] VAPPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 131);和

[43] VAPPPALPAVAPPPALP (SEQ ID NO: 132)。

[44] Fc 是免疫球蛋白的 Fc 区; 所述 Fc 可以来自人免疫球蛋白; 所述 Fc 区可以是来自 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 的 Fc 区; 优选地, 所述 Fc 区是来自 IgG 的 Fc 区, 例如来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区; 再优选地, 所述 Fc 区是来自 IgG2 的 Fc 区; 其中与其来源序列相比, 所述 Fc 区可以带有一个或更多个替换、添加和/或缺失, 同时仍保留延长半衰期的能力, 例如来自人 IgG 的 Fc 区并带有降低或消除与 FcγR 结合的突变和/或增强与 FcRn 结合的一个或更多个突变, 所述突变可以选自: N297A、G236R/L328R、L234A/L235A、N434A、M252Y/S254T/T256E、M428L/N434S、T250R/M428L; 所述 Fc 区可以是糖基化的或未糖基化的。

[45] 在一些实施方案中, 所述胰岛素选自人胰岛素、牛胰岛素或猪胰岛素, 优选地是人胰岛素; 例如所述胰岛素的 A 链和 B 链源自人胰岛素。

[46] 在另一些实施方案中，所述 L 包含 CTP，例如包含 1、2、3 个或更多个 CTP。

[47] 在第三个方面中，本发明提供一种生产具有增强胰岛素活性和延长半衰期的胰岛素-Fc 融合蛋白的方法，其包括将本发明第一方面中所述的融合蛋白与能切割所述位点的特异性蛋白酶接触，优选地所述位点特异性蛋白酶是 Kex2 和/或弗林（Furin）蛋白酶。

5 [48] 在一些实施方案中，本发明的具有增强胰岛素活性和延长体内半衰期的胰岛素-Fc 融合蛋白是由上述方法得到的。

[49] 在第四个方面中，本发明提供编码所述融合蛋白的多核苷酸，优选地所述多核苷酸是能表达所述融合蛋白的表达载体。

10 [50] 在第五个方面中，本发明提供能表达胰岛素-Fc 融合蛋白的细胞，其包含上述的多核苷酸。

[51] 在第六个方面中，本发明提供一种生产胰岛素-Fc 融合蛋白的方法，其包括在表达胰岛素-Fc 融合蛋白的条件下培养本发明第五个方面中所述的细胞；优选地还包括使所述胰岛素-Fc 融合蛋白与能切割所述位点的特异性蛋白酶相接触，其中所述培养步骤和接触酶切步骤可以同时进行或分开进行。所述方法还可包括蛋白纯化步骤，获得目的融合蛋白。

15 [52] 在第七个方面中，本发明提供能表征胰岛素-Fc 融合蛋白结构的方法，其包含融合蛋白脱糖分子量的检测和二硫键的表征。

[53] 在第八个方面中，本发明提供一种药物组合物，其包含以上第一和第三个方面中所述的融合蛋白、第四个方面中所述的多核苷酸或者第五个方面中所述的细胞。

20 [54] 在第九个方面中，本发明提供一种降低血糖和/或治疗糖尿病的方法，其包括将第一和第二个方面中所述的融合蛋白、第四个方面中所述的多核苷酸或者第五个方面中所述的细胞施予有此需要的对象，优选地所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。此外，当施用本发明第一个方面中所述的融合蛋白时，还可以考虑额外施用适当的位点特异性蛋白酶，或者利用体内存在的适当的位点特异性蛋白酶。

25 [55] 对应于以上降低血糖和/或治疗糖尿病的方法，本发明还提供所述融合蛋白、多核苷酸或细胞在制备用于降低血糖和/或治疗糖尿病的药物中的用途。本发明还提供用于降低血糖和/或治疗糖尿病的融合蛋白、多核苷酸或细胞。

附图说明

[56] 图 1 示本发明用于胰岛素前体融合蛋白表达的载体示意图；其中，图 1A 为稳定转染表达载体，图 1B 为瞬时转染表达载体。

[57] 图 2 示实施例 3 捕获的胰岛素-Fc 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳图；M 表示 marker，不同 P 为层析过程分段收集的目的蛋白，P+DTT 为蛋白还原后的目的条带。SS302-002 分子 SDS 图旁标注为 marker 大小，其它图谱中使用的 marker 相同。

[58] 图 3 示本发明胰岛素-Fc 融合蛋白酶切前（3A）和酶切后（3B）结构示意图。

[59] 图 4 示酶切前后的 SS 302-002 分子在正常昆明小鼠中的药效结果图。

[60] 图 5 示不同融合蛋白对正常 C57 小鼠的降糖药效结果图；5A 示 SS302-012M、SS302-019M、SS302-029M 和 SS302-035M 的结果，5B 示 SS302-008M、SS302-014M、SS302-015M 和 SS302-030M 的结果。

[61] 图 6 示 SS302-035M 在正常 C57 小鼠中的剂量效应图。

[62] 图 7 示 SS302-002M（7A）和 SS302-004M（7B）在 I 型糖尿病模型小鼠中的降糖效果。

[63] 图 8A 和 8B 示 SS302-008M、SS302-012M 和 SS302-035M 在 I 型糖尿病模型小鼠中的降糖效果。

[64] 图 9 示 SS302-008M 和 SS302-012M 在正常 SD 大鼠中的药效结果图。

[65] 图 10 示 SS302-008M 和 SS302-012M 在 SD 大鼠中的药代动力学结果。

[66] 图 11 示 SS302-008M 和 SS302-012M 在正常 SD 大鼠中的降糖效果（10A）和血药浓度曲线图（10B）。

20 具体实施方式

[67] 接下来将结合实施例中对本发明进行更详细的描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

25 术语

胰岛素

[68] 胰岛素是由胰腺 β 细胞分泌以促进葡萄糖吸收和抑制脂肪降解的激素，从而起控制血糖水平的作用。在 β 细胞的细胞核中，第 11 对染色体短臂上胰岛素基因区 DNA 向 mRNA

转录, mRNA 从细胞核移向细胞浆的内质网, 翻译成由 106 个氨基酸残基构成的前胰岛素原, 在其 N 末端有 20 个残基左右的信号肽。前胰岛素原通过内质网膜时, 被信号肽酶酶切去信号肽, 生成 86 个氨基酸组成的长肽链——胰岛素原。胰岛素在高尔基体中经蛋白水解酶的作用, 切去 31 位和 32 位两个精氨酸残基、64 位赖氨酸残基和 65 位精氨酸残基, 断链生成
5 作为连接部分的 C 肽, 同时生成胰岛素, 分泌到 β 细胞外, 进入血液循环中。未经过蛋白酶水解的胰岛素原, 一小部分随着胰岛素进入血液循环, 胰岛素原几乎没有生物活性, 其生物活性值仅有胰岛素的 5%-10%。

[69] 本发明所述的“胰岛素”除了包含天然存在的胰岛素之外, 还包括胰岛素的功能性变体, 所述功能性变体是指对胰岛素的天然序列和/或结构进行修饰, 比如添加、缺失和/或替换一个或更多个氨基酸, 得到的仍具有胰岛素活性(调节机体中血糖水平)的多肽。氨基酸的替
10 换、添加或缺失可以是天然存在的突变形式, 也可以是为了特定目的而进行人工修饰而导致的突变形式。本领域普通技术人员熟知, 实践中经常会将胰岛素功能性变体也称为胰岛素。又如 CN105636979 B 和 CN 201480006998 所公开的胰岛素类似物。参见本说明书, 在本文中也符合这种实践。

[70] 从另一方面来说, 胰岛素的功能性变体是指与天然胰岛素具有至少 80% (优选 85%、
15 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%) 的氨基酸序列同源性、并仍然具有胰岛素活性的多肽。对于一些功能性变体, 在特定氨基酸残基的一些基团上可以进行化学替换(例如, α -甲基化、 α -羟基化)、缺失(例如, 脱氨)或修饰(例如, N-甲基化)。

[71] 本领域技术人员熟知胰岛素功能性变体的制备方法和效果检验方法, 已经上市的胰岛素类似物例如赖脯胰岛素(礼来)、门冬胰岛素(诺和诺德)、赖谷胰岛素(Aventis)、甘精胰岛素(赛诺菲)、地特胰岛素(诺和诺德)和德谷胰岛素(诺和诺德)等。
20

[72] 赖脯胰岛素(insulin lispro)是将人胰岛素 B 链上的第 28 位的脯氨酸和第 29 位的赖氨酸位置互换, 其他的氨基酸序列和结构没有变化。两个氨基酸顺序颠倒的结果, 胰岛素的功能没有发生变化, 但原来容易形成二聚体和六聚体的胰岛素, 不再容易聚集成二聚体和六聚
25 体, 而是以单体的形式存在, 这样其在皮下注射后容易吸收, 从而实现快速起效。

[73] 门冬胰岛素(insulin aspart)同样是一种速效胰岛素, 是将人胰岛素 B28 位的脯氨酸被天冬氨酸所取代, 从而使该胰岛素类似物不易形成六聚体, 使其在皮下容易吸收, 迅速发挥作用。
30

[74] 赖谷胰岛素使用了用赖氨酸替代 B3 位的天冬酰胺, 谷氨酸替代 B29 位赖氨酸, 从而实现快速起效的作用。

[75] 甘精胰岛素 (insulin glargine, 来得时, Lantus), 与人胰岛素的区别在于:1) 在 A 链的第 21 位天冬氨酸被甘氨酸替代;2) B 链 C-末端加上 2 个精氨酸残基。这样改变的结果可以发生如下变化: A21 位被甘氨酸替换的结果使得六聚体的结合更加稳定, 在皮下组织中性环境下, 溶解度降低产生沉淀, 从而缓慢吸收, 类似于基础胰岛素的无峰值分泌, 适合长效治疗, 如果添加少量锌, 则其作用时间会进一步延长; B 链 C-末端加上 2 个精氨酸残基的结果改变了胰岛素的等电点, 由原来的 pH4.5 上升至 pH6.7, 使得在皮下组织中性环境中形成微沉淀物, 使胰岛素的分解、吸收及作用时间延长。

[76] 地特胰岛素 (insulin detemir, Levemir) 由诺和诺德公司研制生产, 结构上去除了 B30 位的氨基酸, 在 B29 位赖氨酸位点上连接上 1 个 N-16-烷酸基的 14 碳的游离脂肪酸链。在有锌离子存在的药液中, 胰岛素分子仍以六聚体形式存在, 脂肪酸链的修饰使其在皮下吸收缓慢, 血浆中的地特胰岛素由于脂肪酸的存在而会与血浆中的白蛋白结合, 而只有游离的地特胰岛素才能发挥降血糖作用, 也延长了胰岛素的作用时间。

[77] 德谷胰岛素去掉 B30 位的苏氨酸, 在 B29 位赖氨酸位点上, 通过一个谷氨酸连接子, 与 16 碳的脂肪二酸侧链相连。在苯酚和锌离子的作用下, 德谷胰岛素在制剂中聚合成双六聚体。皮下注射后, 随着苯酚的弥散和锌离子缓慢释放, 可缓慢而持续地释放出德谷胰岛素单体, 进而单体吸收入血。基于上述特征, 德谷胰岛素在糖尿病患者体内具有超长作用时间, 其半衰期为 25 小时左右。

融合蛋白

[78] 本文所述的融合蛋白, 既指由氨基酸通过肽键连接而成的蛋白, 也可以指由 2 条或更多条肽链通过二硫键连接而形成的蛋白。

[79] 本发明所述的“胰岛素-Fc 融合蛋白”是指胰岛素 (包括其功能性变体) 与免疫球蛋白 Fc 区形成的融合蛋白, 在本文中有时被直接简称为“融合蛋白”。此外, 为了区分酶切去除连接肽部分前后的胰岛素-Fc 融合蛋白, 有时会将经酶切前的所述融合蛋白称为“胰岛素前体-Fc 融合蛋白”, 相应地同时出现的“胰岛素-Fc 融合蛋白”则指经酶切去除连接肽部分后的所述融合蛋白。然而, 在本文中更常见的是不特别区分酶切前后的所述融合蛋白, 此时所述融合蛋白或胰岛素-Fc 融合蛋白涵盖其酶切前后的形式。另外, 当通过上下文就能理解所述融合蛋白是指哪种形式时, 也经常直接使用“融合蛋白”或“胰岛素-Fc 融合蛋白”来指代这种形式。

[80] 天然人胰岛素的 A 链序列为:

[81] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
(SEQ ID NO: 1)

[82] 天然人胰岛素的 B 链序列为:

[83] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO: 2)

[84] 本文所述的融合蛋白还可以包含延长体内半衰期的附加序列, 所述附加序列例如选自 Fc, CTP (C-terminal peptide)、XTEN、SABA (serum albumin binding adnectin) 和 PAS 中的一个或多个。所述附加序列可以位于融合蛋白中的末端、接头或其他位置。为了简化起见, 本文中使用的结构式 X-E1-Y-E2-Z-L-Fc 和 Ins-L-Fc 也涵盖了所述附加序列位于其他位置的这些情形。

10 连接肽 (Linking Peptide)

[85] 在胰岛素体内加工过程中, 连接胰岛素 A 链和 B 链的连接肽是 C 肽。所述 C 肽既包含其天然存在的序列, 也包括在所述天然存在的序列基础上进行一个或多个氨基酸的替换、缺失或添加而形成的具有相同功能的变体形式。

[86] 作为参考, 人胰岛素的天然形式 C 肽的序列为:

15 [87] Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln (SEQ ID NO: 3)

[88] 在本发明的胰岛素-Fc 融合蛋白中, 所述连接肽不限于天然胰岛素的 C 肽或其变体/片段, 还可以是起到连接胰岛素 A 链和 B 链作用的任何其他合适的多肽。在一些实施方案中, 所述连接肽的长度可以为 1-100 个或多个氨基酸, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90、100 个氨基酸或以上任意两个数值之间的值。

[89] 在一些实施例中, 连接肽的序列为:

[90] EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSL (SEQ ID NO: 4)

25 [91] Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser (SEQ ID NO: 5),

[92] Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), 或

[93] EAEDLQVGQVELSLQPLAL (SEQ ID NO: 7)。

[94] 在另一些实施例中, 连接肽可以是任意不同长度多肽的形式:

- [95] EAED (SEQ ID NO: 8),
[96] YPGDV (SEQ ID NO: 9),
[97] AA (SEQ ID NO: 10), 或
[98] EW (SEQ ID NO: 11)。

5

Fc 区/Fc 片段

[99] 人免疫球蛋白 IgG 由 4 个通过二硫键共价连接的多肽（轻链和重链的两个相同拷贝）组成。通过木瓜蛋白酶来蛋白水解 IgG 分子产生两个 Fab 片段和一个 Fc 片段。所述 Fc 片段由通过二硫键连接在一起的两个多肽组成。每个多肽，从 N 至 C 末端，由铰链区、CH2 结构域和 CH3 结构域组成。所述 Fc 片段结构在所有亚型的人免疫球蛋白中几乎相同。IgG 是人血液中最丰富的蛋白之一，其组成了人血清中总免疫球蛋白的 70 至 75%。

10

15

[100] 免疫球蛋白的 Fc 区用作药物载体是安全的，因为它是体内代谢的可生物降解多肽，此外，与整个免疫球蛋白分子相比，免疫球蛋白 Fc 区具有相对低的分子量，因此在融合蛋白的制备、纯化和生产上是有利的。由于免疫球蛋白 Fc 区不包含 Fab 片段（其氨基酸序列根据抗体亚类而不同并且因此是高度不均一的），因此可以预期免疫球蛋白 Fc 区可极大地增加物质的均一性并具有低抗原性。

20

25

[101] 本领域普通技术人员一般认为，术语“免疫球蛋白的 Fc 区”是指含有免疫球蛋白的重链恒定区 2 (CH2) 和重链恒定区 3 (CH3)，而不含免疫球蛋白的重链和轻链的可变区的蛋白质区段。它还可包含重链恒定区处的铰链区。此外，本发明的免疫球蛋白 Fc 区可含有包含除了重链和轻链的可变区以外的重链恒定区 1 (CH1) 和/或轻链恒定区 (CL) 的 Fc 区的一部分或全部，只要它具有与天然蛋白质基本相似或更好的生理功能即可。此外，它可以是在 CH2 和/或 CH3 的氨基酸序列的相对长的部分中具有缺失的片段。例如，本发明的免疫球蛋白 Fc 区可包含 1) CH1 结构域、CH2 结构域和 CH3 结构域；2) CH1 结构域和 CH2 结构域；3) CH1 结构域和 CH3 结构域；4) CH2 结构域和 CH3 结构域；5) CH1 结构域、CH2 结构域、CH3 或 CL 结构域；6) 一种或更多种恒定区结构域与免疫球蛋白铰链区（或其部分）的组合；或 7) 重链恒定区和轻链恒定区的各个结构域的二聚体。总之，本发明的免疫球蛋白 Fc 区是指具有一个或更多个重链/轻链恒定区结构域或其变体形式、能够赋予融合蛋白延长体内半衰期功能的任何形式的 Fc 或其变体/衍生物，例如单链 Fc、单体 Fc。

30

[102] 此外，本发明的免疫球蛋白 Fc 区可包括天然氨基酸序列及其序列变体（突变体）。由于一个或更多个氨基酸残基的缺失、插入、非保守或保守替换或其组合，氨基酸序列衍生物

具有与天然氨基酸序列不同的序列。例如，在 IgG Fc 中，第 214 至 238、297 至 299、318 至 322 或 327 至 331 位处的已知对于结合重要的氨基酸残基可用作修饰的适合靶点。此外，其它多种衍生物也可以，包括其中缺失了能够形成二硫键的区域的、缺失了天然 Fc 形式 N-端处数个氨基酸残基的或者向天然 Fc 形式的 N-端添加了甲硫氨酸残基的衍生物。此外，为了去除效应子功能，缺失可发生于补体结合位点，如 C1q 结合位点和 ADCC 位点。制备这样的免疫球蛋白 Fc 区的序列衍生物的技术公开于 WO97/34631 和 WO96/32478 中，其作为参考全文并入本文。此外，本领域普通技术人员熟知，对 Fc 区中一个或更多个氨基酸进行突变可以增强 Fc 与 FcRn 的亲合力，延长血清半衰期，比如 T250Q/ M428L 突变(CN 1798767 B)，这些突变体形式的 Fc 区也在本发明 Fc 区含义范围内。

10 [103] 蛋白质和肽中一般不改变分子活性的氨基酸替换是本领域已知的(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最常发生的替换是 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 和 Asp/Gly，双向皆可。

15 [104] 如果需要，Fc 区可以通过磷酸化、硫酸化、丙烯酸酯化、糖基化、甲基化、法尼基化(farnesylation)、乙酰化、酰胺化等进行修饰。

[105] 上述 Fc 衍生物是与本发明的 Fc 区具有相同生物活性或者改善的结构稳定性（例如对热、pH 等的结构稳定性）的衍生物。

20 [106] 此外，这些 Fc 区可以得自从人和包括牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠的其他动物中分离的天然形式，或者可以是得自转化的动物细胞或微生物的其重组体或衍生物。在本文中，它们可通过从人或动物有机体分离完整的免疫球蛋白并用蛋白水解酶对它们进行处理而从天然免疫球蛋白获得。木瓜蛋白酶将天然免疫球蛋白消化成 Fab 区和 Fc 区，而胃蛋白酶处理则导致产生 pFc' 和 F(ab')₂ 片段。例如，可对这些片段进行尺寸排阻层析以分离 Fc 或 pFc'。

25 [107] 此外，本发明的免疫球蛋白 Fc 区可以是具有天然糖链、与天然形式相比糖链增加或与天然形式相比糖链减少的形式，或者可以是去糖基化的形式。免疫球蛋白 Fc 糖链的增加、减少或去除可以通过本领域中常用方法完成，如化学法、酶促法、利用遗传工程方法，或者通过将 N297 糖基化位点突变的方法。从 Fc 片段去除糖链导致与补体 (C1q) 的结合亲和力明显降低和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或补体依赖性细胞毒性的降低或丧失，从而不会诱导不必要的体内免疫应答。鉴于此，去糖基化或未糖基化形式的免疫球蛋白 Fc 区可更适于本发明的目的以作为药物使用。

30

[108] 本发明所使用的术语“去糖基化”意指从 Fc 区酶促地去除糖部分，而术语“未糖基化”意指 Fc 区是以无糖基化形式由原核动物（优选大肠杆菌）产生，或者通过将 N297 糖基化位点突变为 G、A 或任意其它氨基酸的方法产生的。

[109] 此外，免疫球蛋白 Fc 区可以是衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE 和 IgM 的 Fc 区，或者通过其组合或杂合制备而成。优选地，其衍生自 IgG 或 IgM（它们是人类血液中最丰富的蛋白质之一），最优选衍生自 IgG（已知其延长配体结合蛋白质的半衰期）。

[110] 本发明所使用的术语“组合”意指编码相同来源的单链免疫球蛋白 Fc 区的多肽与不同来源的单链多肽连接从而形成二聚体或多聚体。即，二聚体或多聚体可以由选自以下的两种或更多种区段形成：IgG Fc 区段、IgA Fc 区段、IgM Fc 区段、IgD Fc 区段和 IgE Fc 区段。

10

蛋白酶酶解

[111] 胰岛素原是没有活性的或活性很低，现有技术中制备重组胰岛素的常规工艺是用大肠杆菌或酵母菌进行表达，然后用胰酶或胰酶加羧肽酶 B 来加工成活性分子。然而当使用抗体的 Fc 区与胰岛素形成缀合物时，常规制备工艺是不能使用的，这是因为 Fc 上有很多胰酶的酶切位点，在胰岛素原的加工成活性分子的过程中会被切割失效。现有技术中为了规避上述问题，直接将单链胰岛素与 Fc 区结合，不过发明人经过研究发现，上述胰岛素的体内活性非常低。

[112] 发明人意外的发现，如果能够模拟胰岛素体内的成熟机制，并制备出与天然胰岛素结构更加接近（成熟分子中的 A 链和 B 链通过二硫键连接）、同时连接有 Fc 区的胰岛素缀合物，则可以大大提高胰岛素的活性。申请人经过大量的筛选，发现如果制备本发明结构的融合多肽，其中引入 Kex2 蛋白酶或弗林蛋白酶（Furin）等酶切位点，利用所述蛋白酶进行加工即可获得有活性的长效的胰岛素缀合物分子。

[113] 本发明中所述的 Kex2 蛋白酶是一种钙离子依赖性蛋白水解酶，能特异性识别和切割 Arg-Arg、Lys-Arg 等双碱性氨基酸羧基端肽键。与胰蛋白酶不同，Kex2 不能识别和切割单一碱性氨基酸即精氨酸或赖氨酸的羧基端肽键。在酵母体内 Kex2 蛋白酶负责加工 killer toxin 和 α -factor 的前体。Kex2 蛋白酶活性不受常规的丝氨酸蛋白酶抑制剂如抑肽酶、PMSF、TPCK 所抑制。

[114] 本发明中所述的弗林蛋白酶（Furin）是真核生物细胞中一种重要的内切蛋白酶，定位于高尔基体外侧的网络中，是一种外泌途径中主要的蛋白质转化酶，其能够识别特定的氨基酸序列，在内质网-高尔基体中经两次自剪切活化后，对分泌途径中许多重要的多肽和蛋白

30

的前体进行剪切加工，使之具有生物活性。因其编码基因（fur）位于原癌基因 fes/feps 的上游而得名。具体而言，弗林蛋白酶催化切割原蛋白中的 Arg-Xaa-Yaa-Arg 羧基端肽键（Xaa 为任意一种氨基酸，Yaa 为 Arg 或 Lys）产生成熟的蛋白质。

[115] 本发明的融合多肽经过蛋白酶处理后，A 链和 B 链之间的连接肽被切除，于是 A 链和 B 链之间通过类似天然胰岛素的方式形成二硫键，例如在 A7(Cys)-B7(Cys)、A20(Cys)-B19(Cys) 四个半胱氨酸中的巯基形成两个二硫键，使 A、B 两链连接起来。另外 A 链内部的 A6(Cys) 与 A11(Cys) 之间也优选存在一个二硫键。发明人惊奇的发现，即使 A 链或 B 链与 Fc 区存在连接，并不影响 A 链和 B 链之间形成正确的二硫键连接和空间折叠，形成与 Fc 区融合的胰岛素，进而完成了本发明。

接头（Linker）

[116] 在本发明融合蛋白中，接头 L 的作用在于连接胰岛素 A 链或 B 链与 Fc 区可以是多肽，也可以是非肽链的化学结构。

[117] 在一些实施方案中，接头是多肽，所述多肽包含或主要由 A、T、G 和/或 S 构成的柔性单元（柔性肽段），更例如一段由 G 和 S 构成的柔性单元；所述柔性单元的长度可以是 2-50 个或更多个氨基酸，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45 或 50 个氨基酸。

[118] 在另一些实施方案中，接头是多肽，所述多肽包含主要由刚性氨基酸构成的刚性单元（刚性肽段），所述刚性氨基酸包括但不限于 V、P、I、K 和 L。

结构表征

[119] 胰岛素-Fc 融合蛋白由 CHO 细胞发酵分泌，融合蛋白在 CHO 细胞中转录翻译后又经历了一系列的加工，包括脯氨酸羟基化、O 糖、N 糖、C 端的赖氨酸缺失等翻译后修饰，这些修饰发生在胰岛素 B 链和 A 链之外的序列上。除此之外，胰岛素-Fc 融合蛋白在 CHO 细胞的细胞器中还形成了二硫键以稳定其结构。

[120] 胰岛素-Fc 融合蛋白的二硫键在两个半胱氨酸（Cys）残基间形成。其二硫键根据位置可分为两部分，一部分存在于胰岛素，一部分存在于 Fc。胰岛素的二硫键位于 B 链和 A 链，按照从 N 端到 C 端的顺序对 B 链和 A 链的氨基酸以位置（X）表示，分别为 BX 和 AX，在一些实施例中，二硫键为 CysA7-CysB7、CysA20-CysB19、CysA6-CysA11。Fc 区由两条氨

基酸序列一样的单链组成，在一些实施例中，每条单链内均有 2 对二硫键，两条单链之间有 2 对链间二硫键，Fc 上共有 6 对二硫键。

- [121] UPLC-QTOF 是一种解析生物大分子结构的常规仪器。其主要功能模块为 UPLC 和 QTOF，待测样品经 UPLC 分离后以溶液的状态进入离子源发生电离，变成带电离子，在加速电场的作用下，进入质量分析器 QTOF，在电场和磁场的作用下，经三重串联四级杆 (Q) 和飞行时间质谱 (TOF) 两种质量分析器捕获得到各种离子的 m/z ，软件计算出精确分子量，最终实现复杂生物大分子蛋白的结构解析。本发明采用了 UPLC-QTOF 这种常用的具有高分辨率、高灵敏度的仪器方法作为解析融合蛋白的理想手段，主要对融合蛋白的去糖及去糖还原分子量、二硫键及二硫键错配率进行了分析表征。
- 10 [122] 结果表明，在一些实施例中，胰岛素-Fc 融合蛋白的分子量和二硫键均与理论一致，错配率低，且存在脯氨酸羟基化、O 糖基化、N 糖基化、C 端的赖氨酸缺失等翻译后修饰。

实施例 1：胰岛素前体融合蛋白表达载体的构建

- [123] 本实施例主要记载胰岛素前体融合蛋白分子构建方法，本文中，胰岛素前体融合蛋白有时也称为胰岛素融合蛋白。该胰岛素前体融合蛋白的分子形式为：proINS-L-Fc。可在酵母或真核细胞（如 CHO、HEK293 等）分泌表达，表达后的蛋白以同源二聚体的形式存在。为帮助蛋白分泌表达，可在蛋白的 N 端加入信号肽和/或前肽。信号肽包括但不限于如下表 1 所示序列。

表 1. 信号肽序列

信号肽名称	序列
NS	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA (SEQ ID NO: 12)
LS	MRSLGALLLLLSACLAVSA (SEQ ID NO: 13)
HMM+38	MWWRLWWLLLLLLLLLWPMVWA (SEQ ID NO: 14)
Exendin-4	MKILWLCVFGLFLATLFPISWQ (SEQ ID NO: 15)

[124] proINS 指来自人或其它天然胰岛素前体或其类似物。所述类似物包括插入、缺失、截短或是突变的胰岛素前体，例如 A14E\B16E\B25H\desB30 变体，A14E\B16H\B25H\desB30 变体或者 A14E\desB30 变体等。所述类似物可以是降低胰岛素的免疫原性、或者是降低蛋白酶解以提高胰岛素的稳定性、或者是降低胰岛素与胰岛素受体(IR)的亲合力以延长体内半衰期等。也可以是其它任何用途。

[125] 本实施例的胰岛素前体可通过蛋白酶如 Kex2、Furin、胰酶等加工成成熟胰岛素。本实施例的胰岛素前体也可通过优化的 C 肽，促进蛋白的正确折叠和加工。本实施例中选取的胰岛素前体类似物包括但不限于下表 3 所示。

表 3. 胰岛素前体或类似物序列

胰岛素编号	序列特征	序列
proINS-1	人胰岛素前体	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDL QVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 16)
proINS-2	人胰岛素前体， A14E/B16E/B25H	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTRREAEDL QVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLEQLENYCN (SEQ ID NO: 17)
proINS-3	人胰岛素前体，修 改的 C 肽(可通过 Furin 酶切除)	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTKRIKREAE DLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRIKRGIVEQ CCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 18)
proINS-4	人胰岛素前体，修 改的 C 肽(可通过 肠激酶切除)	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTDDDDKEA EDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRDDDDKG IVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 19)
proINS-6	人胰岛素前体， A14E/B16H/B25H/ desB30	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPKREAEDLQV GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSL EQLYQLENYCN (SEQ ID NO: 20)
proINS-7	人胰岛素前体， A14E/B16E/B25H/	FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKREAEDLQV GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLKRGIVEQCCTSICSL

	desB30	QLENYCN (SEQ ID NO: 21)
proINS-8	人胰岛素前体， A14E/desB30	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKREAEDLQV GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSL EQLENYCN (SEQ ID NO: 22)

[126] L 表示 proINS 和 Fc 之间的接头，可以是 0 到任意长度的氨基酸组成，既可以是柔性多肽，也可以是刚性多肽。L 可以帮助与 Fc 的同源二聚体相连的两个胰岛素分子各自形成正确的空间结构。优选的，所述 L 序列包括但不限于如表 4、表 5 所示的序列。

5

表 4. 柔性接头序列

L 名称	L 序列
GS-(G ₄ S) ₅	GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23)
(G ₄ S) ₅	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 24)
(G ₄ S) ₃	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 25)

表 5. 刚性接头序列

L 名称	序列
GS-CTP	GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDT PILPQ (SEQ ID NO: 26)
CA	SASSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 27)
CTP	SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 28)
2CTP	SASSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTP LPQ (SEQ ID NO: 29)
C1	VAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 30)
C1C	GGGSVAPPPALPAPVRLPGPASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 31)

2C1	GGGSVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 32)
C2C	GGGSVAPPPALPAVAPPPALPASSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 33)
3C1	GGAAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVR LPGPA (SEQ ID NO: 34)
2C1A	GGAAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 35)

[127] Fc 优选人的 IgG；更优选的是不含 ADCC 和 CDC 活性的人 IgG 及其变体，如 IgG2 和 IgG4；更优选的是突变后延长半衰期的人 IgG。Fc 也可以是 Fc 的片段或是 Fc 与其它蛋白/蛋白片段的融合。本发明所选择的 Fc 包括但不限于以下序列。

5 [128] Fc1: 人 IgG1 Fc

[129] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
10 NO: 36);

[130] Fc2: 人 IgG2 Fc, T250Q/P331S/M428L

[131] VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD
15 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37);

[132] Fc3: 人 IgG4 Fc, S228P

[133] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
20 VLSDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:
38);

[134] Fc4: 人 IgG2 Fc, T250Q/ N297A/P331S/M428L

[135] VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTISKTKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39);

5 [136] Fc5: 人 IgG2 Fc, M252Y/S254T/T256E/N297A

[137] VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40);

10 [138] Fc6: 人 IgG2 Fc, N297A/M428L/N434S

[139] VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41);

15 [140] Fc7: 人 IgG4 Fc, S228P/F234A/L235A

[141] ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:

20 42);

[142] Fc8: 人 IgG4 Fc, S228P/M252Y/S254T/T256E/N297A

[143] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:

25 43);

[144] Fc9: 人 IgG4 Fc, S228P/N297A/M428L/N434S

[145] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

30

VLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 44);

[146] Fc15: 人 IgG4 Fc, S228P/F234A/L235A

[147] ESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN
 5 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 VLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:
 45);

[148] Fc16: 人 IgG2 Fc

10 [149] VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 46)。

[150] 本发明所构建的部分胰岛素前体融合蛋白的氨基酸序列特征如表 6 所示。

15 表 6. 胰岛素前体融合蛋白 (proINS-L-Fc) 序列特征

蛋白名称	胰岛素前体 (proINS)	接头 (L)	Fc	SEQ ID NO:
SS302-001	proINS-1	GS-CTP	Fc1	47
SS302-002	proINS-1	GS-CTP	Fc2	48
SS302-003	proINS-1	GS-CTP	Fc3	49
SS302-004	proINS-1	GS-(G ₄ S) ₅	Fc2	50
SS302-005	proINS-1	(G ₄ S) ₅	Fc4	51
SS302-006	proINS-1	CA	Fc16	52
SS302-007	proINS-1	CTP	Fc16	53
SS302-008	proINS-1	2CTP	Fc16	54
SS302-009	proINS-1	C1C	Fc16	55
SS302-011	proINS-1	C2C	Fc16	56
SS302-012	proINS-1	2C1	Fc16	57

SS302-013	proINS-1	3C1	Fc16	58
SS302-014	proINS-1	3C1	Fc5	59
SS302-015	proINS-1	3C1	Fc6	60
SS302-016	proINS-1	3C1	Fc7	61
SS302-017	proINS-1	3C1	Fc8	62
SS302-018	proINS-1	3C1	Fc9	63
SS302-019	proINS-2	3C1	Fc7	64
SS302-022	proINS-3	2C1	Fc16	65
SS302-023	proINS-4	2C1	Fc16	66
SS302-029	proINS-2	3C1	Fc8	67
SS302-030	proINS-2	3C1	Fc9	68
SS302-035	proINS-6	2C1A	Fc15	69
SS302-036	proINS-7	2C1A	Fc15	70
SS302-037	proINS-8	2C1A	Fc15	71
SS302-038	proINS-1	2C1A	Fc15	72

[151] 胰岛素前体融合蛋白可通过蛋白酶如 Kex2、Furin、胰酶等加工，去除 C 肽等序列，转变为成熟的胰岛素融合蛋白。在本专利的所有实施例中，酶切加工后蛋白的命名均为在前体蛋白名称的末端添加字母 M(mature)。例如胰岛素前体融合蛋白 SS302-002 通过蛋白酶 Kex2 加工后，成熟蛋白命名为 SS302-002M。本发明所示的一些胰岛素前体融合蛋白经蛋白酶加工后得到的成熟胰岛素融合蛋白的氨基酸序列如下。

[152] SS302-001M

[153] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 73);

[154] A 链-L-Fc1:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPPSLPS
 PSRLPGPSDTPILPQEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO: 74)。

[155] SS302-002M

[156] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 75);

[157] A 链-L-Fc2:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPSLPS
5 PSRLPGPSDTPILPQVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA
SIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 76)。

10 [158] SS302-003M

[159] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 77);

[160] A 链-L-Fc3:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPSLPS
PSRLPGPSDTPILPQESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
15 SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPG
G (SEQ ID NO: 78)。

[161] SS302-004M

20 [162] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 79);

[163] A 链-L-Fc2:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPSLPS
GPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE
25 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 80)。

[164] SS302-005M

[165] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 81);

[166] A 链-L-Fc4:

30 GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPSLPS

VFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFAST
FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)。

5 [167] SS302-006M

[168] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 83);

[169] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNSSASSKAPPSLSPSRLPGSDTPILPQVECPCPAPPVAGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
10 FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)。

[170] SS302-007M

[171] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 85);

15 [172] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNSSSSKAPPSLSPSRLPGSDTPILPQVECPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
20 NVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)。

[173] SS302-008M

[174] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 87);

[175] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNSSASSKAPPSLSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPSLSPSR
25 LPGSDTPILPQVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 88)。

30 [176] SS302-009M

[177] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 89);

[178] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAVRLPGPASSSSKAPPPSLSPSRLPGPSD
TPILPQVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
5 GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 90)。

[179] SS302-011M

[180] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 91);

10 [181] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAVAPPPALPASSSSKAPPPSLSPSRLPGPS
DTPILPQVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLD
15 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)。

[182] SS302-012M

[183] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 93);

[184] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAVRLPGPAVAPPPALPAVRLPGPAVECPP
20 CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
KPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS DGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)。

[185] SS302-013M

25 [186] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 95);

[187] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAVRLPGPAVAPPPALPAVRLPGPAVAPPP
ALPAVRLPGPAVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
30 KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP

PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 96)。

[188] SS302-014M

[189] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 97);

5 [190] A 链-L-Fc5:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
ALPAPVRLPGPAVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
10 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 98)。

[191] SS302-015M

[192] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 99);

[193] A 链-L-Fc6:

15 GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
ALPAPVRLPGPAVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHSHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
20 NO: 100)。

[194] SS302-016M

[195] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 101);

[196] A 链-L-Fc7:

25 GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
ALPAPVRLPGPAESKYGPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSLG
(SEQ ID NO: 102)。

30 [197] SS302-017M

[198] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 103);

[199] A 链-L-Fc8:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
ALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQE
5 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
(SEQ ID NO: 104)。

[200] SS302-018M

10 [201] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR (SEQ ID NO: 105);

[202] A 链-L-Fc9:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
ALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
15 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSLG
(SEQ ID NO: 106)。

[203] SS302-019M

[204] B 链: FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTRR (SEQ ID NO: 107);

20 [205] A 链-L-Fc7:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
ALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
25 NNYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
(SEQ ID NO: 108)。

[206] SS302-022M

[207] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTKRIKR (SEQ ID NO: 109);

[208] A 链-L-Fc16:

30 GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVECP

CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 110)。

5 [209] SS302-023M

[210] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTDDDDK (SEQ ID NO: 111);

[211] A 链-L-Fc16:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVECP
 CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 10 KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 112)。

[212] SS302-029M

[213] B 链: FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTRR (SEQ ID NO: 113);

15 [214] A 链-L-Fc8:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
 ALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 20 NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
 (SEQ ID NO: 114)。

[215] SS302-030M

[216] B 链: FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTRR (SEQ ID NO: 115);

[217] A 链-L-Fc9:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAVAPP
 25 ALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
 EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSLG
 30 (SEQ ID NO: 116)。

[218] SS302-035M

[219] B 链: FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPKR (SEQ ID NO: 117);

[220] A 链-L-Fc15:

GIVEQCCTSICSLEQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAESKY
5 GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 118)。

[221] SS302-036M

10 [222] B 链: FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKR (SEQ ID NO: 119);

[223] A 链-L-Fc15:

GIVEQCCTSICSLEQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAESKY
GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
15 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 120)。

[224] SS302-037M

[225] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFHYTPKR (SEQ ID NO: 121);

[226] A 链-L-Fc15:

GIVEQCCTSICSLEQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAESKY
GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 122)。

25 [227] SS302-038M

[228] B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFHYTPKTRR (SEQ ID NO: 123);

[229] A 链-L-Fc15:

GIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGAAVAPPALPAPVRLPGPAVAPPALPAPVRLPGPAESKY
GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
30 VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP

REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 124)。

[230] 根据《分子克隆实验指南（第三版）》记载的方法，进行胰岛素前体融合蛋白的表达载体构建。

5 [231] 根据 CHO 细胞密码子偏好性对各胰岛素前体融合蛋白序列进行密码子优化。

[232] 优化后的 DNA 序列经全基因合成后通过 HindIII 和 EcoRI 位点克隆到真核表达载体 pFRL3.0 或 pTS1 上。pFRL3.0 载体包含 dihydrofolatereductase (DHFR) 基因，可通过 DHFR 和目的基因的共扩增来实现蛋白的高水平表达，该载体转染 CHO 细胞后通过 MTX 加压筛选建立稳定表达细胞系。pTS1 为瞬时转染质粒，不含加压筛选标记，可以快速获得少量胰
10 胰岛素前体融合蛋白用于早期分子鉴定。胰岛素前体融合蛋白的表达载体示意图如图 1A 和 1B 所示。

实施例 2：胰岛素融合蛋白的表达

1. 瞬时转染制备目的蛋白

15 [233] 将实施例 1 制备的部分表达胰岛素前体-Fc 融合蛋白的质粒转入人胚胎肾细胞 HEK-293 中，瞬时表达目的蛋白。复苏 HEK-293 细胞，置于细胞培养摇瓶中传代培养，传代接种密度为 1.0×10^6 个细胞/mL，培养基为 OPM-293 CD05 Medium（上海奥浦迈生物科技有限公司），培养条件为 37°C，120 rpm，CO₂，每隔两天传代一次，培养一周后可用于瞬时转染。转染前调整细胞密度，使转染当天细胞密度在 4.0×10^6 个细胞/ml 左右。采用 FectoPRO
20 试剂盒(Polyplus Transfection)将质粒瞬时转染 HEK-293 细胞中，DNA 与 FectoPRO[®] Reagent 比例为 1: 1 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)，每毫升细胞转染 1 μg DNA，对应 1 μL FectoPRO[®] Reagent。用瞬转总体积 10% 的室温 Opti-MEM (Gibco) 稀释质粒，震荡混匀。将质粒稀释液一次性加入到 FectoPRO[®] Reagent 的离心管中，立即混匀，室温孵育 10 min。将制备好的质粒与转染试剂混合物一次性加入调整好的 HEK-293 细胞悬液中，混匀，细胞培养摇瓶放入培养箱，培养
25 条件为温度 37°C，5% CO₂，摇床转速 120 rpm。细胞转染培养 4h 后，加入 Volume of FectoPRO[®] Booster，每毫升细胞加入 0.5 μL 。培养 24 小时后，培养条件转换为温度 31°C，5% CO₂，120 rpm 发酵培养，培养 3-5 天，细胞活力低于 90% 时，离心收获上清 (3000 rpm) 并检测表达量，进行下一步纯化并获得目的蛋白。

2. 稳定表达细胞株的转染和高表达细胞株的筛选

[234] 将实施例 1 制备的部分表达胰岛素前体-Fc 融合蛋白的质粒（转入中国仓鼠卵巢细胞（CHO DG44）（Invitrogen）中，构建稳定表达细胞系，从中筛选高产的细胞株进行补料分批培养以制备目的蛋白。

5 [235] 用完全培养基复苏宿主细胞 DG44 并进行培养，完全培养基的组成是 CDM1N（上海奥浦迈生物科技有限公司）加上 1%HT（Invitrogen），培养条件为 37°C，5%CO₂，摇床转速为 120 rpm。每天无菌吸取一定的细胞悬液计数，当细胞密度达到 3×10⁶-4×10⁶ 个细胞/mL 时进行传代培养，传代后细胞初始密度保持在 1×10⁶ 个细胞/mL 左右。当细胞总量满足转染需求时，收集细胞进行电转染试验。采用电穿孔方法转染宿主细胞（CHO DG44），使用 Bio-Rad 电转仪，电转时选用 4mm 的电转杯，具体电转参数：电压为 290V、脉冲长度为 20 毫秒，10 电转次数为 1 次。每次电击 1×10⁷ 个细胞，质粒 40 μg，总体积为 0.8 mL。电转后将细胞转入含有 15 mL 的恢复培养基（CDM1N+1%HT）中，在细胞培养皿中静置培养 48 小时。48 小时后，离心细胞并重悬于筛选培养基（CDM1N+100nM MTX）中，将细胞稀释到 1×10⁴ 个细胞/mL 左右，接细胞稀释液种于 96 孔板中，100 μL/孔，将细胞置于培养箱中静置培养，培养温度 37°C，5% CO₂。细胞培养 5 天后补 50 μL 的筛选培养基，待克隆汇合率达到 80% 15 或以上时，采用点印迹（Dot Blotting）方法分析表达量，抗体为 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体，筛选出表达量相对高的克隆，将表达量高的克隆由 96 孔板转入 24 孔中继续培养，并补加 1 mL 筛选培养基。采用同样的方法进行 12 孔板和 10 cm 细胞培养皿高产克隆筛选和扩增。

[236] 为了提高融合蛋白产量，采用递增 MTX 浓度的加压方法培养细胞。通过 MTX 对 DHFR 基因的抑制，实现 DHFR 基因和融合蛋白基因的共扩增。筛选过程采用了本领域普通技术人员公知的方法，例如具体细节可参见：1. 杨薇，王迪，陈克清，等.质粒电穿孔转染条件的选择[J].华中科技大学学报, 2009, 38 (6) :858-860.; 2. 谷欣，黎燕. 电转染哺乳类动物细胞 DG44-CHO 的方法探讨[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(1):87; 3. Jun, Kim, Baik, Hwang, Lee: Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. Appl Microbiol Biotechnol. 2005, 69 (2): 25 162-169. 10.1007/s00253-005-1972-8.

[237] 10 cm 细胞培养皿中的克隆池经过筛选后，将高产克隆转入细胞培养摇瓶中培养，培养温度 37°C，5%CO₂，摇床转速 120 rpm。高产细胞克隆长到一定数目后，收集一部分细胞进行冻存保种，剩余细胞进行补料分批培养。分批补料时接种密度为 1×10⁶ 个细胞/ml，细胞置于细胞培养摇瓶中培养，培养温度 37°C，5%CO₂，摇床转速 120 rpm。接种后每天取样计数，记录细胞密度和活力。从培养第 3 天开始补料，每天补料 1 次。第 3~8 天，补料量分别为初始体积的 2%、3%、4%、3%、3%、3%，第 9 天后补料量均为 2%，总补料比例在 20%~30%

之间。每天补充一次葡萄糖，维持培养体系内葡萄糖浓度在 3~4 g/L。培养周期为 12-14 天，培养结束后离心（3000 rpm）收获上清液并检测表达量，进行下一步纯化以获得目的蛋白。

实施例 3：胰岛素-Fc 融合蛋白的纯化

5 1. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白的捕获

[238] 实施例 2 中表达的各个胰岛素前体-Fc 融合蛋白（SS302-002、SS302-004、SS302-005、SS302-008、SS302-012、SS302-014、SS302-015、SS302-019、SS302-029、SS302-030、SS302-035）的细胞发酵液经离心和 0.22 μ m 的滤膜过滤除去细胞碎片后用亲和层析进行捕获。博格隆 proteinA 作为亲和介质，用 3-5 倍柱体积缓冲液（20 mM Na₂HPO₄-柠檬酸，pH7.5）平衡 protein A 层析柱淋洗至基线平稳，再将处理过的发酵液上清进行上样（载量 3-8 g/L），上样完毕后，
10 用清洗缓冲液（20 mM Tris, 1.5 M NaCl, 2M Urea,pH7.5）冲洗杂蛋白至基线，最后用 20 mM Na₂HPO₄-柠檬酸，0.4M Arg, pH3.5 洗脱缓冲液进行洗脱，根据紫外检测器的示数收集，分段收集，当 UV280nm 吸收值高于 0.15 AU 开始收集，再次低于 0.20 AU 停止收集。收集样品立即加入 2.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液，并缓慢搅动，调整样品至 pH6.5-7.0。样品储存于 -80℃，
15 并进行后续 SDS-PAGE 分析（图 2）及结构鉴定（见实施例 4）。

[239] SDS-PAGE 结果如图 2 所示，其中，load 表示层析上样样品，FT 表示流穿样品（flow through），wash 表示淋洗样品，P1、P2、P3 等表示层析过程分段收集的目的蛋白样品，“P 合”表示分段收集的样品按照收集体积的体积比合并后样品，NaOH 表示柱清洗收集的样品，DTT 表示还原后的目的蛋白，M 表示分子量标记（maker）；A: SS302-002，B: SS302-004，
20 C: SS302-005，D: SS302-008，E: SS302-014，F: SS302-019，G: SS302-030，H: SS302-012，I: SS302-015，J: SS302-029，K: SS302-035。从图 2 可以看出，SS302-002 蛋白有明显的上条带（约 130KD）和下条带（95-130KD 之间），且存在高分子量形式（>170KD）。纯度大于 90% 的上条带（130KD）收率约 60%。SS302-004 蛋白具有明显的上条带（95-130KD）和下条带（约 95KD），其中下条带 P1-4 合并样品和上条带 P13-15 合并样品分别送质谱进行结构鉴定（实施例 4），且此分子在捕获蛋白中大部分为 95KD 的下条带，95-130KD 之间纯度大于 90% 的上条带在捕获收集的蛋白中收率较低（15%左右）；SS302-005 蛋白在 72-95KD 之间，电泳条带较宽且称弥散状；这几个分子的共同特征是均含 GS 柔性接头；而其他分子如 SS302-008、SS302-012、SS302-015 等，基本都为单一条带，这些分子的共同特征是含 CTP、C1 等刚性接头。质谱鉴定结果进一步表明（见实施例 4）：含柔性接头（例如 GS）的胰岛素前体-Fc 融合蛋白二硫键具有一定的错配率，正确条带回收率占比较低；而相对于含柔性接头
25
30

(例如 GS)的胰岛素前体-Fc 融合蛋白, 含刚性接头的胰岛素前体-Fc 融合蛋白二硫键错配率较低, 得到的蛋白中正确折叠的胰岛素前体蛋白含量较高。

2. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白酶切

[240] 步骤 1 中捕获的蛋白利用 G25 使用缓冲液 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0 进行换液, 换液后各蛋白用 Kex2 酶切切除 C 肽得到胰岛素-Fc 融合蛋白, SS302-002 和 SS302-004 酶切条件为: 蛋白终浓度 1 mg/mL, 投料比(质量比)为 200:1 (前体: Kex2), CaCl_2 终浓度 20 mM/L, 总反应体积为 5 mL 和 3 mL, 37°C 水浴 6h 进行酶切。SS302-008、SS302-012 三个蛋白的酶切条件为: 蛋白终浓度 1 mg/mL, 投料比(质量比)为 50:1 (前体: Kex2), CaCl_2 终浓度 20 mM/L, 总反应体积为 190 mL, 37°C 水浴反应 6h。SS302-014、SS302-015、SS302-019、SS302-029、SS302-030、SS302-035 酶切条件为蛋白终浓度 1 mg/mL, 投料比(质量比)为 1:25 (Kex2: 前体), CaCl_2 终浓度 20 mM/L, 总反应体积为 60-180 mL (不同蛋白反应体积略有差异), 37°C 水浴 6h。各胰岛素前体-Fc 融合蛋白酶切后胰岛素-Fc 融合蛋白命名为 S302-002M、SS302-004M、SS302-005M、SS302-008M、SS302-012M、SS302-014M、SS302-015M、SS302-019M、SS302-029M、SS302-030M 和 SS302-035M。

3. 酶切后的胰岛素-Fc 融合蛋白纯化

[241] 为除去蛋白酶及反应后杂质, 得到纯度较高且正确折叠的胰岛素-Fc 融合蛋白, SS302-004M 和 SS302-005M 酶切后用 10KD 超滤管去除蛋白酶及其它杂质, 得到纯度较高的胰岛素-Fc 融合蛋白。SS302-008M、SS302-012M、SS302-014M、SS302-015M、SS302-029M、SS302-030M 酶切后利用疏水层析去除杂质。用 3-5 个柱体积的 20 mM Tris, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.5 缓冲液平衡疏水层析介质 Butyl HP (博格隆), 平衡完成后开始上样 (载量 3-8 g/L), 上样完毕后, 用 20 mM Tris, pH 7.5 缓冲液线性洗脱 (0-100%, 20 个柱体积), 根据紫外检测器的示数分段收集, 并取样检测。SS302-019M、SS302-035M 酶切后分两步进行杂质去除, 第一步采用阴离子层析, 首先用 3-5 个柱体积的 20 mM Tris, pH 8.5 缓冲液平衡阴离子层析介质 Q HP (博格隆), 平衡完成后开始上样 (载量为 5 g/L), 上样完毕后, 用 20 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 8.5 缓冲液以 3 ml/min 的流速 0-60% B 15 CV 线性洗脱, 根据紫外检测器的示数分段收集 (方法同上), 并取样检测, 将纯度较高样品合并用于下一步疏水层析。用 3-5 个柱体积的 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.0 缓冲液平衡疏水层析介质 Butyl HP (博格隆), 平衡完成后开始上样, 上样载量 3-8 g/L, 上样完毕后, 用 20 mM Tris, pH 8.0 缓冲液以 1 ml/min 的流速 0-100% B 15 CV 线性洗脱, 根据紫外检测器的示数分段收集 (方法同上), 并取样进行结构解析-采用 UPLC-QTOF 表征其分子量和二硫键, 详见实施例 4。

实施例 4：融合蛋白分子结构解析

[242] 胰岛素融合蛋白前体的结构为 proINS-L-Fc，proINS 为人胰岛素前体（包括 B-C-A），L 为接头（linker），其示意图见图 3A。胰岛素融合蛋白前体经酶解后会形成成熟蛋白，其结构为胰岛素（B-A）-L-Fc，其示意图见图 3B。胰岛素融合蛋白采用的接头有柔性接头（例如 GS）或刚性接头（例如 CTP、C1）。在 CHO 细胞中发酵时，前肽、刚性接头（例如 CTP、C1）上的 S 和 T 都可能发生 O 糖基化，C1 这种接头上的 P 可能产生脯氨酸羟基化，而 GS 这种柔性接头则几乎不会发生翻译后修饰。本结构解析采用 UPLC-QTOF 表征其分子量和二硫键。胰岛素-Fc 融合蛋白分子（含糖修饰）经去糖及去糖还原后，得到容易分析的无糖修饰分子。对 SS302-002（约 130KD）、SS302-002（95-130KD 之间）、SS302-008、SS302-008M、SS302-012、SS302-012M、SS302-014、SS302-014M、SS302-015、SS302-015M、SS302-019、SS302-019M、SS302-029、SS302-029M、SS302-030、SS302-030M、SS302-035、SS302-035M 进行去糖完整、去糖还原分子检测，对 SS302-004（95-130KD 之间）、SS302-004（约 95KD）、SS302-005 进行完整、还原分子检测，结果表明，胰岛素-Fc 融合蛋白的分子量均与理论一致。

[243] 胰岛素-Fc 融合蛋白的空间结构由两个半胱氨酸（Cys）残基的巯基间形成二硫键支撑稳定。其二硫键分为两部分，即胰岛素部分的二硫键和 Fc 部分的二硫键。胰岛素部分的二硫键位于 B 链和 A 链，按照从 N 端到 C 端的顺序对 B 链和 A 链的氨基酸命名，分别为 BX 和 AX，其中 X 为氨基酸的序列号，二硫键为 CysA7-CysB7、CysA20-CysB19、CysA6-CysA11。Fc 由两条序列相同的多肽链组成，每条多肽链上含有 2 对二硫键，两条多肽链共含有 4 对二硫键，且两条多肽链之间有 2 对链间二硫键，故 Fc 共 6 对二硫键。理论上，胰岛素-Fc 融合蛋白的二硫键不受 kex2 酶解过程影响。胰岛素-Fc 融合蛋白的二硫键结构解析经由非还原变性换液，以限制性内切酶酶切处理，结合 UNIFI 软件分析完成。前处理方法一共有两种。经 UNIFI 软件分析时，胰岛素-Fc 融合蛋白前体的两条链分别命名为 1 链和 2 链，经前处理方法 1 的 Glu-C 酶解后形成的肽段 UNIFI 软件命名为 1：VN、2：VN（见表 8~表 11），经前处理方法 2 的 Glu-C 酶和胰酶酶解后形成的肽段 UNIFI 软件命名为 1：VTN、2：VTN（见表 15）；胰岛素-Fc 融合蛋白成熟蛋白的两条 B 链分别命名为 1 链和 3 链，两条 A+Fc 链分别命名为 2 链和 4 链，经前处理方法 2 的 Glu-C 酶和胰酶酶解后形成的肽段 UNIFI 软件命名为 1：VTN、2：VTN、3：VTN、4：VTN（见表 12~表 14、表 16）；其中 N 为蛋白酶解后肽段的软件编号，编号规则为从 N 端至 C 端依次为 1、2、3、……等等；同时，UNIFI 软件里的二硫键以=表示，链间二硫键位于两个肽段之间，链内二硫键位于肽段的右侧。

[244] SS302-002（约 130KD）、SS302-002（95-130KD 之间）、SS302-004（95-130KD 之间）、SS302-004（约 95KD）、SS302-005，采用了前处理方法 1 进行了二硫键解析。前处理方法 1

- 步骤如下：取 SS302 蛋白样品至 0.5 mL 10kD 超滤管中，在 4℃、12000 rpm 的条件下，浓缩至 5mg/mL，取 30 μ L 上述浓缩样品，加入 8M 盐酸胍 18 μ L (pH7.5) 和 1M IAA (碘乙酰胺) 0.48 μ L，涡旋混匀后于室温避光孵育 40min，取 1.8 μ L 上述样品，加入 50mM Tris-HCl 23 μ L (pH8) 缓冲液稀释样品，并按照蛋白：酶=25:1 (μ g: μ g) 加入 0.1mg/mL 的 Glu-C 酶 2.25 μ L，37℃水浴过夜，次日加入 3 μ L 的 10% FA (甲酸) 终止反应，用 UPLC-QTOF 检测。前处理方法 1 变性不完全，故 linker 区域难以酶解，使得胰岛素上的二硫键和铰链区的二硫键通过连接肽连接在一起，分子量大，难以匹配，此方法会缺失关键二硫键信息，主要用于对比 SS302-002 (约 130KD) 与 SS302-002 (95-130KD 之间) 这两条带及 SS302-004 (95-130KD 之间) 与 SS302-004 (约 95KD) 这两条带之间的二硫键错配情况的差异。
- 10 **[245]** SS302-008、SS302-012、SS302-012M、SS302-014、SS302-014M、SS302-015、SS302-015M、SS302-019M、SS302-029M、SS302-030M、SS302-035、SS302-035M 采用前处理方法 2 进行二硫键解析。前处理方法 2 步骤如下：取 40 μ L SS302 蛋白样品，加入 8M 盐酸胍 120 μ L，于 60℃水浴 1h，冷却至室温后，加入 1M IAA 3.2 μ L，于室温避光孵育 45min，用 0.5 mL 10kD 超滤管在 12000rpm、4℃条件下换液 3 次换至 50 mM Tris-HCl (pH8) 缓冲液中，使得换液后样品浓度约为 0.62mg/mL。取 40 μ L 上述样品，按照蛋白：酶=25:1 (μ g: μ g) 加入 2 μ L Glu-C 酶 (0.5 mg/mL) 和 2 μ L Trypsin 酶 (0.5 mg/mL)，37℃水浴过夜，次日加入 5 μ L 的 10%FA 终止反应，用 UPLC-QTOF 检测。前处理方法 2 采用胰酶和 Glu-C 酶一起酶解，上述 SS302 分子均实现 linker 区域的酶解，正确二硫键得以匹配，此方法错配二硫键的计算结果更真实。
- 15 **[246]** 结合 UNIFI 软件分析 UPLC-QTOF 的二硫键检测结果，可解析正确二硫键和错配二硫键，其二硫键错配情况以总错配率和胰岛素错配率表示，其中总错配率为错配二硫键肽段总 XIC 峰面积与所有二硫键肽段总 XIC 峰面积之比，胰岛素错配率为胰岛素部分的错配二硫键总 XIC 峰面积与所有二硫键肽段总 XIC 峰面积之比。SS302-002、SS302-004、SS302-005、SS302-008、SS302-012、SS302-012M、SS302-014、SS302-014M、SS302-015、SS302-015M、SS302-019M、SS302-029M、SS302-030M、SS302-035、SS302-035M 的错配率见表 7。
- 20 **[247]** 就包含柔性接头的融合蛋白 (SS302-004、SS302-005) 而言，SS302-005 的错配率是所有分子中最高的，SS302-004 的目标带 (95-130KD 之间) 的错配率比较低，但是不易与错配率高的组分分离，故其收率不高。对于接头中既包含柔性部分又包含刚性部分的融合蛋白 (SS302-002)，其目标带与包含柔性接头的融合蛋白 (SS302-004) 的总错配率及胰岛素错配率相当，二者均含有总错配率及胰岛素错配率高的组分，且不易于纯化分离。而包含刚性接头的
- 25 前体蛋白和成熟蛋白 (SS302-008、SS302-012、SS302-012M、SS302-014、SS302-014M、SS302-015、SS302-015M、SS302-019M、SS302-029M、SS302-030M、SS302-035、SS302-035M) 的总错配率和胰岛素错配率均低于 8%。对实施例 4 中 SS302-002、SS302-004、SS302-012M、
- 30

SS302-019M、SS302-030M、SS302-035、SS302-035M 的二硫键结果做详细说明，结果见表 8-16。

[248] 综上所述表明：刚性接头对胰岛素融合蛋白在 CHO 细胞中结构表达的准确性有很大的积极作用，且刚性越强，其分子结构表达的准确性越高。

5

表 7. 融合蛋白中二硫键的错配率

分子编号	胰岛素错配率	总错配率
SS302-002 ^b	约 130KD 的条带（是目标条带，且纯度大于 90%组分收率为 60%）：9%（回收到的蛋白的检测结果） 95-130KD 之间的条带：29%	约 130KD 的条带（是目标条带，且纯度大于 90%组分收率为 60%）：9%（回收到的蛋白的检测结果） 95-130KD 之间条带：29%
SS302-004 ^a	95-130KD 之间条带（目标条带，纯度大于 90%组分收率约 15%）：4%， 约 95KD 条带：37%	95-130KD 之间条带（纯度大于 90%组分收率约 15%）：4%， 约 95KD 条带：37%
SS302-005 ^a	69%	69%
SS302-008 ^b	6.2%	6.2%
SS302-012 ^b	5.6%	7.5%
SS302-012M ^b	2.2%	2.9%
SS302-014 ^b	2.4%	4.8%
SS302-014M ^b	0.8%	2.8%
SS302-015 ^b	1.8%	4.5%
SS302-015M ^b	1.2%	3.6%
SS302-019M ^b	1.2%	2.8%
SS302-029M ^b	0%	1.1%
SS302-030M ^b	0%	1.7%
SS302-035 ^b	2.2%	4.3%
SS302-035M ^b	2.0%	2.5%

注：^a表示该融合蛋白包含柔性接头，^b表示该融合蛋白包含刚性接头；

总错配率为错配二硫键肽段总 XIC 峰面积与所有二硫键肽段总 XIC 峰面积之比；

胰岛素错配率为胰岛素部分的错配二硫键总 XIC 峰面积与所有二硫键肽段总 XIC 峰面积之比。

1. SS302-002

[249] 结合 SDS-PAGE 技术, 此分子可纯化得到约 130KD 条带和 95-130KD 之间条带。对这两条带分别进行二硫键鉴定, 估算二硫键总错配率和胰岛素错配率。结果显示约 130KD 条带的总错配率和胰岛素错配率均为 9%, 95-130KD 之间条带的总错配率和胰岛素错配率均为 29%。约 130KD 条带的二硫键结果见表 8, 95-130KD 之间条带的二硫键结果见表 9, 错配二硫键主要体现为胰岛素 B 链自连和胰岛素两条 B 链错配。

表 8. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-002) 约 130KD 位置条带的二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:V1-1:V8	43.23	2968.3103	0.2	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSLYQLE=	1186566144	990.1083	3
1:V11-12-1:V17	32.63	3161.5521	0.9	VTCVVVDVSHEDPE=YKCKVSNKGLPASIE	674588864	791.1435	4
1:V20-1:V23	57.43	7379.5855	0.3	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE=NNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVLHE	22043154	1055.0899	7
<u>1:V2-2:V2</u>	52.36	1731.8312	/	ALYLVCGE=ALYLVCGE	20559026	866.4193	2
<u>1:V1-1:V2</u>	40.7	2347.1204	/	FVNQHLCGSHLVE=ALYLVCGE	73175656	783.0450	3
<u>1:V2-1:V8</u>	53.21	2353.0198	/	ALYLVCGE=QCCTSICSLYQLE=	54944492	1177.0136	2
<u>1:V1-2:V1</u>	32.96	2962.4083	/	FVNQHLCGSHLVE=FNQHLCGSHLVE	36753932	741.3575	4
<u>1:V8-2:V8</u>	56.91	2974.2084	/	QCCTSICSLYQLE=QCCTSICSLYQLE=	7446664	992.0743	3

注: 下划线为错配二硫键所在区段

表 9. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-002) 95-130KD 之间条带二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰 面积	实测 m/z	电荷 数
1:V1-1:V8	43.35	2968.31 00	0.1	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSL YQLE=	329770 26	990.10 82	3
1:V11-12-1:V17	32.71	3161.55 37	1.4	VTCVVVDVSHEDPE=YKCKVS NKGLPASIE	673510 272	791.14 39	4
1:V20-1:V23	57.4	7379.58 32	-0.1	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV E=NNYKTTTPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVDFSCSVLH E	220703 20	1055.0 896	7
<u>1:V2-2:V2</u>	52.33	1731.83 24	/	ALYLVCGE=ALYLVCGE	235110 48	866.41 98	2
<u>1:V1-1:V2</u>	40.64	2347.12 04	/	FVNQHLCGSHLVE=ALYLVCGE	208205 216	783.04 50	3
<u>1:V2-1:V8</u>	53.18	2353.01 83	/	ALYLVCGE=QCCTSICSLYQLE=	100710 84	1177.0 128	2
<u>1:V1-2:V1</u>	33.03	2962.41 18	/	FVNQHLCGSHLVE= FVNQHLCGSHLVE	481027 52	741.35 84	4
<u>1:V8-2:V8</u>	55.79	2974.21 16	/	QCCTSICSLYQLE= QCCTSICSLYQLE=	748303 8	992.07 54	3

注：下划线为错配二硫键所在区段

2. SS302-004

[250] 此分子纯化得到 95-130KD 之间条带 (P1-4 合并样品) 和约 95KD 条带 (P13-15 合并样品)。对这两条带分别进行二硫键鉴定, 结果显示 95-130KD 之间条带的总错配率和胰岛素错配率均为 4%, 约 95KD 条带的总错配率和胰岛素错配率均为 37%。95-130KD 之间条带的二硫键结果见表 10, 约 95KD 条带的二硫键结果见表 11, 错配二硫键主要体现为胰岛素 B 链自连和胰岛素两条 B 链错配。

表 10. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-004) 95-130KD 之间条带二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:V20-21-1:V23	59.16	7694.7361	4	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE=NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVLHE	46691960	1100.1114	7
1:V11-12-1:V17	32.48	3161.5451	-1.3	VTCVVVDVSHEDPE=YKCKVSNKGLPASIE	167953840	791.1417	4
1:V1-1:V7-8	41.38	4035.9188	0.1	FVNQHLCGSHLVE=GSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLE=	315009248	807.9896	5
<u>1:V2-2:V2</u>	51.87	1731.8299	/	ALYLVCGE=ALYLVCGE	1731012	866.4186	2
<u>1:V1-1:V2</u>	40.35	2347.1168	/	FVNQHLCGSHLVE=ALYLVCGE	14865076	783.0438	3
<u>1:V2-1:V8</u>	52.7	2353.0129	/	ALYLVCGE=QCCTSICSLYQLE=	1644195	1177.0101	2
<u>1:V1-2:V1</u>	32.8	2962.4079	/	FVNQHLCGSHLVE=FVNQHLCGSHLVE	2344622	741.3574	4

注: 下划线为错配二硫键所在区段

表 11. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-004) 约 95KD 位置条带二硫键检测结果

肽段	出峰时间(min)	实测分子量(Da)	误差(ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:V1-1:V8	42.98	2968.3085	-0.4	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSLY QLE=	3461461	742.8326	4
1:V20-21-1:V23	59.12	7694.7026	-0.4	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WE=NNYKTTTPMLDSGDFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSLVHE	32341352	1100.1066	7
1:V11-12-1:V17	32.56	3161.5447	-1.5	VTCVVVDVSHEDPE=YKCKVSNK GLPASIE	60397856	791.1416	4
<u>1:V2-2:V2</u>	51.97	1731.8284	/	ALYLVCGE=ALYLVCGE	3500262	866.4178	2
<u>1:V1-1:V2</u>	40.35	2347.1210	/	FVNQHLCGSHLVE=ALYLVCGE	46351952	783.0452	3
<u>1:V2-1:V8</u>	52.79	2353.0119	/	ALYLVCGE=QCCTSICSLYQLE=	619685	1177.0096	2
<u>1:V1-2:V1</u>	32.88	2962.4057	/	FVNQHLCGSHLVE= FVNQHLCGSHLVE	5660477	741.3569	4
<u>1:V8-2:V8</u>	55.45	2974.2100	/	QCCTSICSLYQLE= QCCTSICSLYQLE=	1512188	992.0748	3

注：下划线为错配二硫键所在区段

3. SS302-012M

[251] 此分子的二硫键与理论一致，总错配率为 2.9%，胰岛素错配率为 2.2%，其二硫键结果见表 12。

表 12. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-012M) 的二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:VT4-2:VT3	46.82	2801.382	2.4	ALYLVCGE=NYCNGGGSVAPPPALP APVR	77401200	934.4654	3
2:VT31-1:VT39	45.31	2753.298	5	NQVSLTCLVK=WQQGNVFSCSVM HE	200181680	689.08	4
2:VT9-10-2:VT20	25.38	1774.804	2.8	VTCVVVDVSHEDPE=CK	277400448	592.2727	3
2:VT5-6-4:VT5-6	60.63	5814.054	0.2	LPGPAVECPAPPCAPPVAGPSVFLFPP KPK=LPGPAVECPAPPCAPPVAGPSVF LFPPKPK	400366784	969.8484	6
1:VT3-2:VT2	44.45	2968.325	5	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSLYQ LE=	520490464	990.113	3
<u>2:VT2-2:VT20-2:VT31</u>	46.82	2839.327	3.6	QCCTSICSLYQLE=CK=NQVSLTCL VK	11296762	710.5872	4
<u>1:VT3x2</u>	33.87	2962.406	-0.9	FVNQHLCGSHLVE=	13642756	593.287	5
<u>1:VT3-1:VT4</u>	41.85	2347.132	4.7	FVNQHLCGSHLVE=ALYLVCGE	19307852	587.5384	4

注：下划线为错配二硫键所在区段

4. SS302-019M

[252] 此分子的二硫键与理论一致，总错配率为 2.8%，胰岛素错配率为 1.2%，其二硫键结果见表 13。

表 13. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-019M) 的二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:VT5-2:VT4	38.44	2452.209	-0.7	LVCGE=NYCNGGAAVAPPALPAPVR	22246750	818.0746	3
2:VT13-14-2:VT24	26.29	1765.796	-1.3	VTCVVVDVSQEDPE=CK	52450476	883.4016	2
1:VT3-2:VT2	35.06	2564.104	0.2	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSL=	135588016	855.3729	3
2:VT9-4:VT9	35.21	2449.994	-0.8	YGPPCPPCPAPE=YGPPCPPCPAPE	193310336	1225.5006	2
2:VT34-2:VT43	40.53	2311.086	-1	NQVSLTCLVK=GNVFSCSVMHE	206535696	771.0334	3
<u>2:VT24-2:VT43</u>	23.17	1456.596	-3.7	CK=GNVFSCSVMHE	928513	728.8018	2
<u>1:VT3-2:VT4</u>	37.88	3414.682	-0.4	FVNQHLCGSHLVE=NYCNGGAAVAPPALPAPVR	1510880	854.426	4
<u>1:VT5-2:VT43</u>	34.23	1726.717	-3.8	LVCGE=GNVFSCSVMHE	1533685	863.862	2
<u>2:VT24-2:VT34</u>	27.4	1351.704	-2.8	CK=NQVSLTCLVK	1862756	676.3554	2
<u>1:VT5-2:VT2</u>	33.33	1601.627	-2.6	LVCGE=QCCTSICSL=	1953380	801.3173	2
<u>1:VT5-2:VT34</u>	36.23	1621.824	-2.7	LVCGE=NQVSLTCLVK	2026153	811.4158	2
<u>1:VT3-2:VT43</u>	34.6	2689.19	-2.1	FVNQHLCGSHLVE=GNVFSCSVMHE	3542051	673.0529	4
<u>1:VT3-1:VT5</u>	30.27	1999.935	-0.6	FVNQHLCGSHLVE=LVCGE	4212471	667.3166	3

注：下划线为错配二硫键所在区段

5. SS302-030M

[253] 此分子的二硫键与理论一致，总错配率为 1.7%，胰岛素错配率为 0%，其二硫键结果见表 14。

表 14. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-030M) 的二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:VT5-2:VT4	38.48	2452.208	-1.4	LVCGE=NYCNGGAAPPPALPAPVR	40117228	818.0741	3
1:VT3-2:VT2	34.9	2564.101	-1.2	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSLE=	101441504	855.3717	3
2:VT13-14-2:VT24	26.15	1765.798	-0.1	VTCVVVDVSQEDPE=CK	206735120	883.4027	2
2:VT9-4:VT9	35.04	2449.994	-1	YGPPCPPCPAPE=YGPPCPPCPAPE	280355584	1225.5004	2
2:VT34-2:VT43	41.82	2293.13	-0.9	NQVSLTCLVK=GNVFSCSVLHE	608834752	765.048	3
<u>2:VT43x2</u>	42.86	2380.065	-2.2	GNVFSCSVLHE=	2241952	794.0264	3
<u>1:VT5-2:VT43</u>	36.62	1708.763	-2.4	LVCGE=GNVFSCSVLHE	2406495	854.8851	2
<u>1:VT5-2:VT34</u>	36.18	1621.824	-2.7	LVCGE=NQVSLTCLVK	2788118	811.4158	2
<u>2:VT34x2</u>	41.34	2206.188	-2.6	NQVSLTCLVK=	2967141	736.0674	3
<u>2:VT24-2:VT34</u>	27.24	1351.704	-2.3	CK=NQVSLTCLVK	3205830	676.3557	2
<u>1:VT3-2:VT43</u>	36.16	2671.229	-3.7	FVNQHLCGSHLVE=GNVFSCSVLHE	4306797	891.0813	3
<u>2:VT4-2:VT43</u>	42.97	3123.506	-2.7	NYCNGGAAPPPALPAPVR=GNVFSCSVLHE	1421928	1041.84	3
<u>2:VT4-2:VT34</u>	42.95	3036.571	-1.6	NYCNGGAAPPPALPAPVR=NQVSLTCLVK	1651991	1012.8618	3

5 注：下划线为错配二硫键所在区段

6. SS302-035

[254] 此分子的二硫键与理论一致，总错配率为 4.3%，胰岛素错配率为 2.2%，其二硫键结果见表 15。

表 15. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白 (SS302-035) 的二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:VT21-2:VT2 1	36.28	2449.9 91	-1.9	YGPPCPPCPAPE=YGPPCPPCPAPE	4640972 80	1225.49 93	2
1:VT25-26-1:V T36	27.77	1765.7 95	-2	VTCVVVDVSDPE=CK	4786026 88	883.401	2
1:VT4-1:VT17	42.56	2773.3 97	2.1	ALHLCVGE=NYCNGGAAVAPPALPAP VR	5196316 16	925.137 2	3
1:VT3-1:VT15	36.69	2564.1	-1.6	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSLVE=	7569474 56	855.371 4	3
1:VT46-1:VT5 5	42.41	2311.0 86	-0.7	NQVSLTCLVK=GNVFCSCVMHE	8223080 96	771.033 6	3
<u>1:VT17-1:VT3</u> 6	34.31	2182.0 91	0.8	NYCNGGAAVAPPALPAPVR=CK	1077460 9	728.035 3	3
<u>1:VT3-1:VT36</u>	23.49	1729.8 17	1.1	FVNQHLCGSHLVE=CK	1278725 0	433.209 7	4
<u>1:VT3-1:VT46</u>	37.67	2584.3 04	1.1	FVNQHLCGSHLVE=NQVSLTCLVK	1998597 8	646.831 4	4
<u>1:VT36-1:VT4</u> 6	29.34	1351.7 05	-1.9	CK=NQVSLTCLVK	2338231 2	451.239 8	3
<u>1:VT15-1:VT1</u> 7	45.75	3016.3 7	-2.8	QCCTSICSLVE=NYCNGGAAVAPPALPA PVR=	3002499 0	1006.12 81	3
<u>1:VT3-1:VT17</u>	39.41	3414.6 79	-1.2	FVNQHLCGSHLVE=NYCNGGAAVAPP ALPAPVR	3954654 0	854.425 2	4

5 注：下划线为错配二硫键所在区段

7. SS302-035M

[255] 此分子的二硫键与理论一致，总错配率为 2.5%，胰岛素错配率为 2.0%，其二硫键结果见表 16。

表 16. 胰岛素前体-Fc 融合蛋白（SS302-035M）的二硫键检测结果

肽段	出峰时间 (min)	实测分子量 (Da)	误差 (ppm)	序列	XIC 峰面积	实测 m/z	电荷数
1:VT4-2:VT4	42.38	2773.39 61	1.8	ALHLVCGE=NYCNGGA AVAPPALPAP VR	1739333 92	925.136 9	3
2:VT12-13-2:VT23	27.91	1765.79 66	-0.9	VTCVVVDVSQEDPE=CK	2175094 72	883.402	2
2:VT33-2:VT4 2	42.48	2311.08 37	-1.8	NQVSLTCLVK=GNVFSCVMHE	2585542 40	771.032 8	3
2:VT8-4:VT8	36.23	2449.99 15	-1.8	YGPPCPPPAPE=YGPPCPPPAPE	2655217 92	1225.49 94	2
1:VT3-2:VT2	36.69	2564.11 29	3.6	FVNQHLCGSHLVE=QCCTSICSL=	5468490 88	855.375 8	3
<u>2:VT2-2:VT4</u>	45.04	3016.37 13	-2.3	QCCTSICSL=NYCNGGA AVAPPALPA PVR=	5217733	1006.12 86	3
<u>1:VT3-2:VT33</u>	37.63	2584.30 74	2.5	FVNQHLCGSHLVE=NQVSLTCLVK	8513202	646.832 3	4
<u>1:VT3x2</u>	33.69	2962.41 49	2.1	FVNQHLCGSHLVE=	1061694 5	741.359 2	4
<u>1:VT3-2:VT4</u>	39.29	3414.68 39	0.2	FVNQHLCGSHLVE=NYCNGGA AVAPP ALPAPVR	1380192 8	854.426 4	4

注：下划线为错配二硫键所在区段

实施例 5: SS302-002 和 SS302-002M 对昆明小鼠的降糖效果

[256] 24 只健康雄性昆明小鼠(22-28 g)随机分成 4 组, 6 只/组: (1)SS302-002M-24 nmol/kg; (2) SS302-002-24 nmol/kg; (3) 甘精胰岛素-48 nmol/kg; (4) 阴性对照组。颈部皮下注射给药。分别在 0、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72、96h 进行血糖值检测。实验过程中小鼠不禁食, 给予充足的水和食物。

[257] 如图 4 所示, 甘精胰岛素药效持续到 4h。SS302-002 组在给药后 4h 开始出现明显降糖效果, 但 SS302-002 组就降糖效果及药效持续时间方面均明显弱于 SS302-002M 组, SS302-002 组 vs. SS302-002M 组最大降糖效果依次为 (5.33 vs. 2.97mmol/L) 和药效持续时间依次为 (36h vs. 72h)。上述数据分析表明切除 C 肽后的胰岛素融合蛋白效价更高, 降糖效果更优。

实施例 6: SS302-008M、SS302-012M、SS302-014M、SS302-015M、SS302-019M、SS302-029M、SS302-030M 和 SS302-035M 对正常 C57 小鼠的降糖效果

[258] 将 50 只 8-10 周龄, 体重 22-28 g 健康雄性 C57 小鼠, 随机分为 10 组, 5 只/组, 包括 SS302-008M、SS302-012M、SS302-014M、SS302-015M、SS302-019M、SS302-029M、SS302-030M、SS302-035M、德谷胰岛素和对照组。待测样品按 15 nmol/kg 颈部皮下给药, 德谷胰岛素剂量为 30 nmol/kg, 分别于给药前和给药后不同时间点检测血糖值。实验过程中小鼠不禁食。实验数据采用 Graphpad prism7.0 作图, Mann-whitney 统计分析差异性。

[259] 如图 5A 和 5B 所示, 与对照组相比, 给药组小鼠均有明显的降血糖效果。德谷胰岛素 (30 nmol/kg) 药效持续到 12h; 在 15 nmol/kg 剂量下, 不同胰岛素融合蛋白在正常 C57 小鼠上的药效持续时间如下:

SS302-035M/SS302-030M/SS302-019M/SS302-008M(96h)>SS302-012M(72h) > SS302-015M(48h)>SS302-029M /SS302-014M(24h)。

实施例 7: 不同剂量 SS302-035M 在正常 C57 小鼠中的降糖效果

[260] 将 25 只 8-10 周龄, 体重 22-28 g 健康雄性 C57 小鼠, 随机分为 5 组, 5 只/组。SS302-035M 分别按 5、7.5、10、12.5nmol/kg 颈部皮下给药, 并在 0、4、24、48、72、96、120h 进行血糖值检测。实验过程中小鼠不禁食。实验结果数据用 Graphpad prism7.0 进行作图, 并用 Mann-whitney 统计分析差异性。

[261] 如图 6 所示, 在正常 C57 小鼠中, SS302-035M 的降糖效果具有明显的剂量依赖关系。SS302-035M-5nmol/kg 组, 血糖最低值 4.3mmol/L, 药效持续至 72h; SSS302-035M-7.5nmol/kg 组, 血糖最低值至 3.2mmol/L, 药效持续至 72h; SSS302-035M-10nmol/kg 组, 血糖最低值至 2.8mmol/L, 药效持续至 96h; SSS302-035M-12.5nmol/kg 组, 血糖最低值至 2.5mmol/L, 药效持续至 96h。

实施例 8: SS302-004M 和 SS302-002M 在糖尿病模型小鼠中的降糖效果

1. STZ 诱导 I 型糖尿病小鼠模型

[262] C57BL/6j 小鼠 (8 周龄, 体重 22-28g) 腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 0.4% 链脲佐菌素 (STZ) 溶液, 40mg/kg 连续给药五天, 每天一次, 末次给药后第 7-10 天检测空腹血糖值。空腹血糖值 >13.8 mmol/L (空腹时间为 8:00a.m-14:00 p.m) 即为造模成功。

2. 体内活性和长效性检测

[263] 取 35 只 STZ 诱导的 I 型糖尿病小鼠, 按血糖值随机分成 7 组: 1~2: SS302-002M 高、低剂量组; 3~4: SS302-004M 高、低剂量组; 5~6: 甘精胰岛素 (Glargine Insulin) 高、低剂量组; (7) 对照组 (20mM Tris + 300mM NaCl)。其中, SS302-002M 和 SS302-004M 的高、低剂量组分别按 12.5nmol/kg 和 6.25nmol/kg 颈部皮下注射给药, 甘精胰岛素高、低剂量组分别按 25nmol/kg 和 12.5nmol/kg 颈部皮下注射给药。分别于给药前和给药后不同时间点监测血糖值变化。实验过程中小鼠不禁食, 给予充足的水和食物。

[264] 结果如图 7A (SS302-002M) 和 7B (SS302-004M) 所示。在 STZ 诱导的 I 型糖尿病小鼠中给予 SS302-002M、SS302-004M 后均有明显的降血糖药效, S302-002M 低剂量组药效维持至 120h, 高剂量组药效维持至 192h; S302-004M 低剂量组药效维持至 84h, 高剂量组药效维持至 144h。

[265] 值得注意的是, 在相同摩尔的胰岛素, 即 25 nmol/kg 给药剂量下, 相比 SS302-002M 和 SS302-004M 组, 甘精胰岛素组的血糖值下降和恢复程度更为迅速, 在给药后 1h 左右即降到血糖最低点 (约 5 mmol/L), 低于正常 C57 血糖值 (约 8 mmol/L), 随后又快速回升, 6h 回升至初始血糖值。这提示 SS302-002M、SS302-004M 具有更为平坦和稳定 PD 谱, 临床安全性更高。

实施例 9: SS302-008M、SS302-012M 和 SS302-035M 在糖尿病模型小鼠中的降糖效果

1. STZ 诱导小鼠 I 型糖尿病模型

[266] C57BL/6j 小鼠（12 周龄，体重 22-28g）腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 0.4% 链脲佐菌素（STZ）溶液，40mg/kg 连续给药五天，每天一次，在最后一次给药后第 7-10 天检测空腹血糖值>13.8 mmol/L（空腹时间为 8:00a.m-14:00 p.m），即为造模成功。

[267] 2. 体内活性和长效性检测

5 [268] 取 40 只 STZ 造模成功的 I 型糖尿病小鼠，按血糖值随机分成 8 组：（1）SS302-008M-7.5nmol/kg 组；（2）SS302-012M-7.5nmol/kg 组；（3）SS302-035M-7.5nmol/kg 组；（4）SS302-008M-15nmol/kg 组；（5）SS302-012M-15nmol/kg 组；（6）SS302-035M-15nmol/kg 组；（7）德谷胰岛素-30nmol/kg；（8）缓冲液对照组（20mM Tris + 150mM NaCl）。分别在
10 给药前和给药后不同时间点进行血糖值检测。实验过程中小鼠不禁食。实验结果采用 Graphpad prism7.0 进行作图，Mann-whitney 统计分析差异性。

[269] 如图 8A 和 8B 所示，相同剂量下 SS302-035M 的药效维持时间明显优于 SS302-008M 和 S302-012M，尤其在低剂量 7.5nmol/kg 组（144h vs.72h）。图 8B 中德谷胰岛素在 30nmol/kg 给药后，糖尿病小鼠的血糖值迅速下降和恢复，1h 左右即降到最低点，24h 回升至初始血糖值。这提示 SS302-008M、SS302-012M、SS302-035M 具有更长的 PD 谱，药效维持时间远
15 优于德谷胰岛素。

实施例 10：SS302-008M 和 SS302-012M 在 SD 大鼠的药效动力学

（PD）和药代动力学（PK）实验

[270] 10 只 SD 大鼠（8-10 周龄，体重 250-350g）随机分为 2 组，每组 3♂/2♀，分别按 20nmol/kg
20 颈部皮下给与 SS302-008M、SS302-012M。在给药前和给药后的不同时间点检测血糖值，并采集全血，分离血清用于 PK 检测。实验过程中不禁食，给予充足的水和食物。全部数据用 Graphpad prism7.0 进行作图，并用 Mann-whitney 统计分析差异性。

2、ELISA 检测

[271] 鼠抗胰岛素单克隆抗体（abcam，ab8302）用 PBS 稀释至 1ug/mL，100 μL/孔加入酶
25 标板，放置于 4℃ 过夜包被；去除包被液，PBST 洗板 4 次后加入 4% BSA，250μl/孔，37℃ 封闭 2h；去除封闭液后用 PBST 洗板 4 次。SS302-008M/SS302-012M 标准品用 2%BSA 稀释，从 200ng/ml 起始，倍比稀释共 8 个梯度建立标曲。大鼠血清用 2%BSA 稀释为不同的倍数。阴性对照为正常大鼠血清。将上述样品 100μl/孔加入酶标板，于 37℃ 孵育 1h；PBST 洗板 4 次，加入 2% BSA 稀释的二抗（Mouse monoclonal Anti-Human IgG2 Fc (HRP)，1:3000）

(abcam, ab99779), 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; PBST 洗板 4 次后加入 TMB 显色液, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10min; 加入 2M H₂SO₄, 50 μ L/孔, 终止反应, 酶标仪检测 OD_{450/630} 值。

3、药效动力学实验结果

- 5 [272] 如图 9 所示: 给与 SS302-008M 和 SS302-012M 后 SD 大鼠均有明显的降血糖效果。SS302-008M 药效维持至 96 h, 而 SS302-012 M 药效维持至 72h。

4、药代动力学结果和分析

- [273] SS302-008M 和 SS302-012M 在 SD 大鼠中的药代动力学结果如图 10 所示。SS302-008M 和 SS302-012M 在 SD 大鼠中的半衰期 (T_{1/2}) 分别为 16.32 \pm 0.77h 和 13.39 \pm 0.43h, 具体 PK 参数见表 17。

表 17. SS302-008M 和 SS302-012M 的 PK 参数

组别	SS3302-008M	SS3302-0012M
T _{1/2} (hr)	16.32 \pm 0.77	13.39 \pm 0.43
T _{max} (hr)	24.00 \pm 0	24.00 \pm 0
C _{max} (nmol/L)	82.71 \pm 7.77	74.72 \pm 8.66
AUC(hr*nmol/L)	3217.73 \pm 326.15	2664.67 \pm 208.28
V _{ss} (L/kg)	0.289 \pm 0.039	0.289 \pm 0.031
Cl(L/hr/kg)	0.012 \pm 0.001	0.015 \pm 0.001
MRT(hr)	34.41 \pm 2.23	25.60 \pm 2.23

20 实施例 11: SS302-035M 在比格犬中药效动力学 (PD) 和药代动力学 (PK) 实验

- [274] 8-12kg 雄性健康普通级比格犬 (4 只) 单次皮下给与 2.5nmol/kg SS302-035M 后评估药效动力学和药代动力学参数。分别于给药前和给药后不同时间点采集血样, 采样部位为四肢外周静脉。每个时间点采集约 1 mL 全血, 放入含 EDTA-K₂ 的抗凝管中, 随后于 4 $^{\circ}$ C 条件下 3000 g/min 离心 10 min 收集血浆。在给药前 0 h 和给药后 1、2、3、4、6、24、48、72、96、120、144 及 168h 时间点取一滴全血用快速血糖仪(罗氏 ACCU-CHEK Performa) 和血糖试纸(罗氏 ACCU-CHEK Performa)测定动物的血糖值。药效动力学 (PD) 结果如图 10A 所示; 药代动力学 (PK) 结果如图 10B 所示。实验过程中 0-6h 内禁食, 之后动物自由进食进

水。使用 WinNonlin 8.2 软件计算药代动力学参数（非房室模型），相关的 PK 参数显示在表 18 中。PD 结果显示：SS302-035M 在 2.5nmol/kg 剂量下能显著性地降低比格犬随机血糖，降糖的效果持续到 120h，并且未出现明显的低血糖的症状。PK 结果显示：在 2.5nmol/kg 剂量下，SS302-035M 在正常比格犬的体内半衰期为 37.65 ± 7.36 h。

5

表 18. SS302-035M 的 PK 参数

PK 参数	结果
$AUC_{0-\infty}$ (ng*hr/mL)	14631.28 ± 628.94
T _{1/2} (hr)	37.65 ± 7.36
T _{max} (hr)	2 ± 0
C _{max} (ng/mL)	485.75 ± 26.18
V _{ss} (mL/kg)	498.53 ± 55.90
CL(mL/hr/kg)	11.83 ± 1.29
MRT(hr)	39.05 ± 4.11

10

本发明实施例中构建的融合蛋白前体全长序列如下：

1) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-001 SEQ ID NO: 47

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNCGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSSKAP
5 PPSLPPSRLPGPSDTPILPQEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT
QKSLSLSPG

10 2) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-002 SEQ ID NO: 48

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNCGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSSKAP
PPSLPPSRLPGPSDTPILPQVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDV
15 HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPASIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV LHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-003 SEQ ID NO: 49

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNCGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSSKAP
20 PPSLPPSRLPGPSDTPILPQESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLS
LSLG

25 4) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-004 SEQ ID NO: 50

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNCGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSSKAP
APPVAGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
30 REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV FSCSV LHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-005 SEQ ID NO: 51

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSSSSSKAP
35 PVAGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNV FSCSV LHEALHNHYTQKSLSLSPGK

6) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-006 SEQ ID NO: 52

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNSSSSKAPPSLPPSRLPGPSDTPILPQVECPAPP
40 VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
45 WQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

7) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-007 SEQ ID NO: 53

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNSSSSKAPPSLPPSRLPGPSDTPILPQVECPAPPV
50 AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSRE

EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

8) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-008 SEQ ID NO: 54

5 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNSSASKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTUVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

10 9) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-009 SEQ ID NO: 55

15 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAPVRLPGPASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTUVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

10) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-011 SEQ ID NO: 56

20 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAVAPPPALPASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTUVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

11) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-012 SEQ ID NO: 57

25 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTUVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

12) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-013 SEQ ID NO: 58

35 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTUVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

13) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-014 SEQ ID NO: 59

40 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSFLTUVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

45 14) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-015 SEQ ID NO: 60

50 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVVSFLTUVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKLSLSPGK

15) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-016 SEQ ID NO: 61

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLA
LEGLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRL
PGPAVAPPPALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
5 CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK
SLSLSLG

16) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-017 SEQ ID NO: 62

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGP
AVAPPPALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV
10 VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
15 NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL
SLG

17) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-018 SEQ ID NO: 63

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGP
20 AVAPPPALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV LHEALHSHYTQKSLSL
LG

18) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-019 SEQ ID NO: 64

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE
GSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPG
PAVAPPPALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
25 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
30 SNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSL
LSLG

19) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-022 SEQ ID NO: 65

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTKRIKREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLA
35 LEGSLQKRIKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAP
VRLPGPAVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISK
TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPML
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-023 SEQ ID NO: 66

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTD DDDKEAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPL
ALEGLQKR DDDDKGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGGSVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPA
LPAPVRLPGPAVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
45 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

21) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-029 SEQ ID NO: 67

FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE
50 GSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPG
PAVAPPPALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLG

22) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-030 SEQ ID NO: 68

5 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE
GSLQKRGIVEQCCTSICSLQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPG
PAVAPPPALPAPVRLPGPAESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
10 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYHTQKSLSL
LG

23) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-035 SEQ ID NO: 69

15 FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPKREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGS
LQKRGIVEQCCTSICSLQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPA
ESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

24) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-036 SEQ ID NO: 70

20 FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPKREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSL
KRGIVEQCCTSICSLQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAES
KYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
G

25) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-037 SEQ ID NO: 71

25 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSL
QKRGIVEQCCTSICSLQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAE
SKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
30 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
G

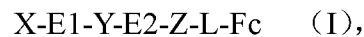
26) 胰岛素前体融合蛋白 SS302-038 SEQ ID NO: 72

35 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEG
SLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCNGGA AVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGP
AESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

权利要求书

1. 一种胰岛素-Fc 融合蛋白，其包含第一部分和第二部分，所述第一部分是提供胰岛素活性的胰岛素部分，所述第二部分是具有延长所述第一部分体内半衰期作用的 Fc 部分，所述第一部分与第二部分通过共价键相连，所述胰岛素-Fc 融合蛋白切割后具有胰岛素活
5 性。

2. 如权利要求 1 所述的胰岛素-Fc 融合蛋白，其具有式 (I) 的结构：



其中，

X 和 Z 分别是胰岛素的 B 链和 A 链，并且如果 X 是 B 链，则 Z 是 A 链；如果 X 是 A
10 链，则 Z 是 B 链；

Y 为任意的连接肽；Y 的长度可以为 1-100 个或更多个氨基酸，例如 1、2、3、4、5、6、
7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、
28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90、100 个或
以上任意两个数值之间的值；例如 Y 为胰岛素 C 肽或者其变体或片段；

E1 和 E2 中的一个存在或两个都存在，是包含位点特异性蛋白酶切割位点的一段氨基酸；
E1 和 E2 的长度可以是 1-10 个或更多个氨基酸，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个
氨基酸；如果同时存在，E1 和 E2 可被相同或不同的位点特异性蛋白酶切割，例如可被相同
的位点特异性蛋白酶切割；如果 Y 存在，则优选地 E1 和 E2 两个都存在；如果 Y 不存在，
则优选地 E1 和 E2 中存在一个；所述位点特异性蛋白酶切割位点可以是 Kex2 和/或弗林(Furin)
20 蛋白酶的切割位点，例如是 Kex2 蛋白酶的切割位点；

L 为连接 Z 与 Fc 的接头，可以是氨基酸片段，也可以是非肽链的化学结构；以及

Fc 是免疫球蛋白的 Fc 区；所述 Fc 可以来自人免疫球蛋白；所述 Fc 区可以是来自 IgG、
IgA、IgD、IgE 或 IgM 的 Fc 区；优选地，所述 Fc 区是来自 IgG 的 Fc 区，例如来自 IgG1、
IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区；再优选地，所述 Fc 区是来自 IgG2 的 Fc 区；其中与其来源序
列相比，所述 Fc 区可以带有一个或更多个替换、添加和/或缺失，同时仍保留延长半衰期的
能力，例如来自人 IgG 的 Fc 区并带有降低或消除与 FcγR 结合的突变和/或增强与 FcRn 结合
的一个或更多个突变，所述突变可以选自：N297A、G236R/L328R、L234A/L235A、N434A、
M252Y/S254T/T256E、M428L/N434S、T250R/M428L；所述 Fc 区可以是糖基化的或未糖基
化的。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白，其中所述 L 为多肽片段，
30

优选地，所述 L 包含选自 Ala、Thr、Gly 和 Ser 中一个、两个或更多个氨基酸的柔性肽段，更例如一段由 G 和 S 构成的柔性肽段；所述柔性肽段的长度可以是 2-50 个或更多个氨基酸，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45 或 50 个氨基酸；

5 优选地，所述 L 包含一个或更多个刚性单元，所述刚性单元包含或主要由刚性氨基酸构成，所述刚性氨基酸包括但不限于 V、P、I、K 和 L；

更优选地，所述刚性单元包含一个或更多个 PPPX₁LP (SEQ ID NO: 125)，其中 X₁ 为任意氨基酸；

10 更优选地，所述刚性单元包含一个或更多个 X₂APPPX₁LP (SEQ ID NO: 126)，其中 X₁ 为任意氨基酸，X₂ 为 K 或 V。

4. 根据权利要求 3 所述的融合蛋白，其中所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段：

PPPSLSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 127)；

PPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 128)；

PPPALPAVAPPALP (SEQ ID NO: 129)；

15 优选地，所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段：

KAPPPSLSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 130)；

VAPPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 131)；和

VAPPPALPAVAPPALP (SEQ ID NO: 132)。

5. 根据权利要求 1 至 4 所述的融合蛋白，其中所述 L 包含选自以下序列的多肽片段：

L	序列
CA	SASSKAPPPSLSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 27)；
CTP	SSSSKAPPPSLSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 28)；
2CTP	SASSKAPPPSLSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLSPSRLPGPS DTPI LPQ (SEQ ID NO: 29)；
C1	VAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 30)；
C1C	GGGSVAPPPALPAPVRLPGPASSSSKAPPPSLSPSRLPGSDTPILP Q (SEQ ID NO: 31)；

2C1	GGGSVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 32);
C2C	GGGSVAPPPALPAVAPPPALPASSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPIL PQ (SEQ ID NO: 33);
3C1	GGAAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPAL PAVRLPGPA (SEQ ID NO: 34);
2C1A	GGAAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 35)。

6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的融合蛋白，其中所述胰岛素选自人胰岛素、牛胰岛素或猪胰岛素，优选地是人胰岛素；例如所述胰岛素的 A 链和 B 链源自人胰岛素。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的融合蛋白，其中 Y、E1 和 E2 都存在，或者其中 Y 不存在，E1 和 E2 中存在一个。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的融合蛋白，其具有选自 SEQ ID NO: 47-72 的氨基酸序列。

9. 一种生产具有增强胰岛素活性和延长半衰期的胰岛素-Fc 融合蛋白的方法，其包括将权利要求 1 至 8 中任一项所述的融合蛋白与能切割所述位点特异性蛋白酶切割位点的位点特异性蛋白酶接触，优选地所述位点特异性蛋白酶是 Kex2 和/或 Furin 蛋白酶。

10、一种胰岛素-Fc 融合蛋白，其是由权利要求 9 所述的方法得到。

11. 一种胰岛素-Fc 融合蛋白，其具有 Ins-L-Fc 结构，其中

Ins 是提供胰岛素活性的胰岛素部分，其包括通过共价键连接的胰岛素 A 链和 B 链，但 A 链和 B 链位于不同的肽链中；所述共价键优选地是二硫键；

15 L 为连接 Z 与 Fc 的接头，可以是氨基酸片段，也可以是非肽链的化学结构；以及

Fc 是免疫球蛋白的 Fc 区；所述 Fc 可以来自人免疫球蛋白；所述 Fc 区可以是来自 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 的 Fc 区；优选地，所述 Fc 区是来自 IgG 的 Fc 区，例如来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区；再优选地，所述 Fc 区是来自 IgG2 的 Fc 区；其中与其来源序列相比，所述 Fc 区可以带有一个或多个替换、添加和/或缺失，同时仍保留延长半衰期的能力，例如来自人 IgG 的 Fc 区并带有降低或消除与 FcγR 结合的突变和/或增强与 FcRn 结合的一个或多个突变，所述突变可以选自：N297A、G236R/L328R、L234A/L235A、N434A、

M252Y/S254T/T256E、M428L/N434S、T250R/M428L；所述 Fc 区可以是糖基化的或未糖基化的。

12. 根据权利要求 11 所述的融合蛋白，其中所述胰岛素选自人胰岛素、牛胰岛素或猪胰岛素，优选地是人胰岛素；例如所述胰岛素的 A 链和 B 链源自人胰岛素。

5 13. 根据权利要求 11 或 12 所述的融合蛋白，其中所述 L 为多肽片段，

优选地，所述 L 包含选自 Ala、Thr、Gly 和 Ser 中一个、两个或更多个氨基酸的柔性肽段，更例如一段由 G 和 S 构成的柔性肽段；所述柔性肽段的长度可以是 2-50 个或更多个氨基酸，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45 或 50 个氨基酸；

10 优选地，所述 L 包含一个或更多个刚性单元，所述刚性单元包含或主要由刚性氨基酸构成，所述刚性氨基酸包括但不限于 V、P、I、K 和 L；

更优选地，所述刚性单元包含一个或更多个 PPPX₁LP (SEQ ID NO: 125)，其中 X₁ 为任意氨基酸；

15 更优选地，所述刚性单元包含一个或更多个 X₂APPX₁LP (SEQ ID NO: 126)，其中 X₁ 为任意氨基酸，X₂ 为 K 或 V。

14. 根据权利要求 13 所述的融合蛋白，其中所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段：

PPPSLSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 127)；

PPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 128)；和

20 PPPALPAVAPPALP (SEQ ID NO: 129)；

优选地，所述刚性单元包含选自以下序列的多肽片段：

KAPPSLSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO: 130)；

VAPPPALPAPVRLPGP (SEQ ID NO: 131)；和

VAPPPALPAVAPPALP (SEQ ID NO: 132)。

25

15. 根据权利要求 11 至 14 任一项所述的融合蛋白，其中所述 L 包含选自以下序列的多肽片段：

L	序列
---	----

CA	SASSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 27);
CTP	SSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 28);
2CTP	SASSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLSPSRLPGPS DTPI LPQ (SEQ ID NO: 29);
C1	VAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 30);
C1C	GGGSVAPPPALPAPVRLPGPASSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILP Q (SEQ ID NO: 31);
2C1	GGGSVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 32);
C2C	GGGSVAPPPALPAVAPPPALPASSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPIL PQ (SEQ ID NO: 33);
3C1	GGAAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPAL PAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 34);
2C1A	GGAAVAPPPALPAPVRLPGPAVAPPPALPAPVRLPGPA (SEQ ID NO: 35)。

16. 编码权利要求 1 至 8 中任一项所述融合蛋白的多核苷酸。

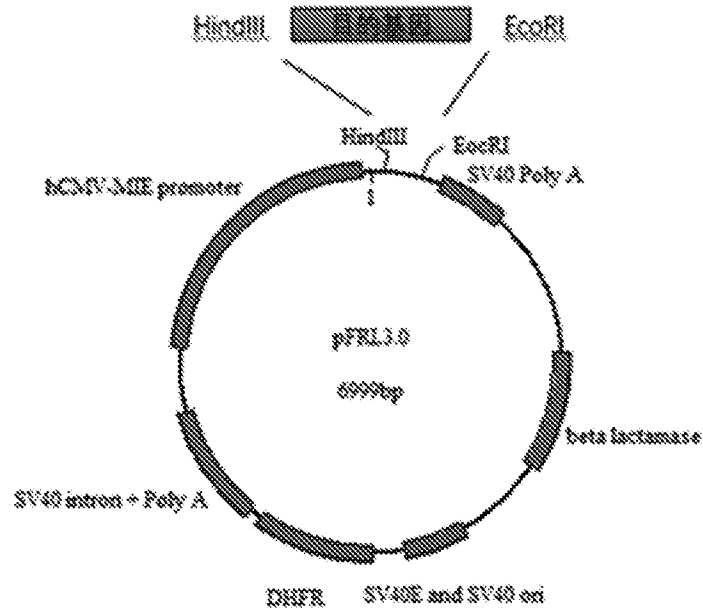
17. 表达胰岛素-Fc 融合蛋白的细胞，其包含权利要求 16 所述的多核苷酸，优选地，所述细胞为 CHO 细胞。

5 18. 一种生产胰岛素-Fc 融合蛋白的方法，其包括在表达胰岛素-Fc 融合蛋白的条件下培养权利要求 17 所述的细胞；优选地还包括使所述胰岛素-Fc 融合蛋白与能切割所述位点特异性蛋白酶切割位点的位点特异性蛋白酶相接触，其中所述培养步骤和接触步骤可以同时进行或分开进行。

10 19. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 8 中任一项所述的融合蛋白或权利要求 10 至 15 中任一项所述的融合蛋白。

20. 一种降低血糖和/或治疗糖尿病的方法，其包括将权利要求 1 至 8 中任一项所述的融合蛋白或者权利要求 10 至 15 中任一项所述的融合蛋白施予有此需要的对象，优选地所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

A



B

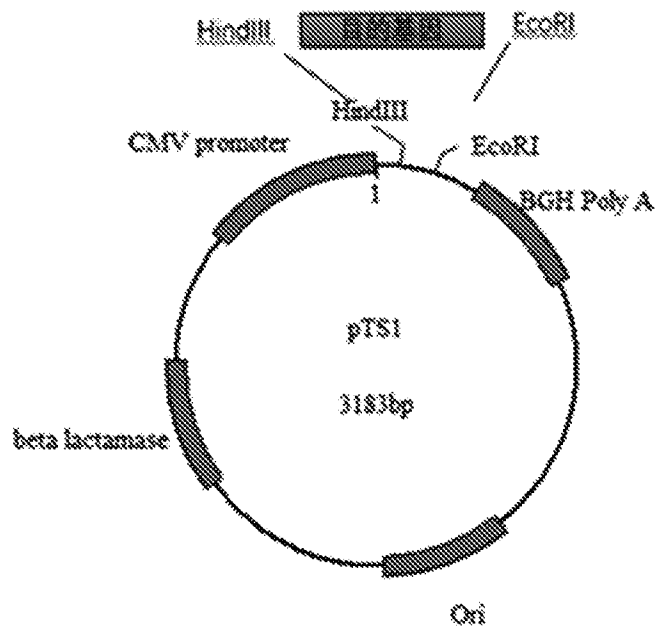


图 1

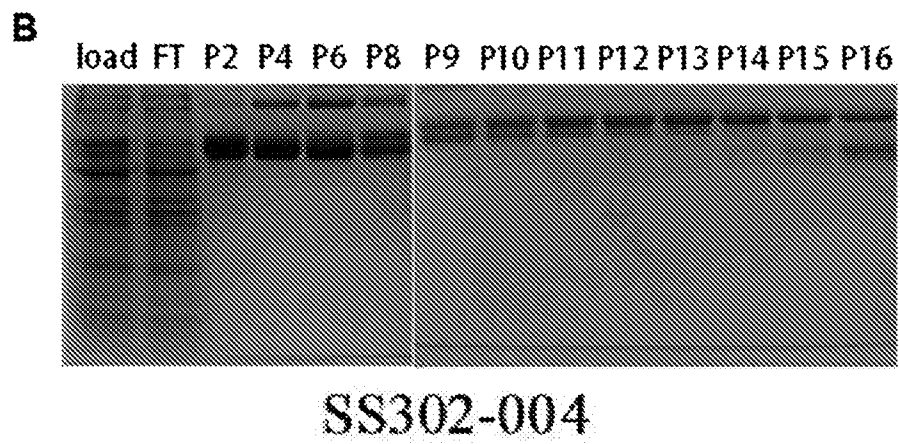
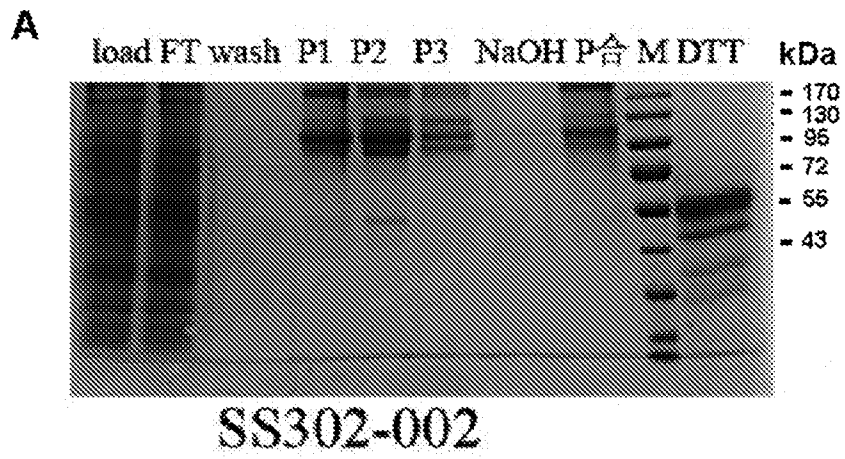
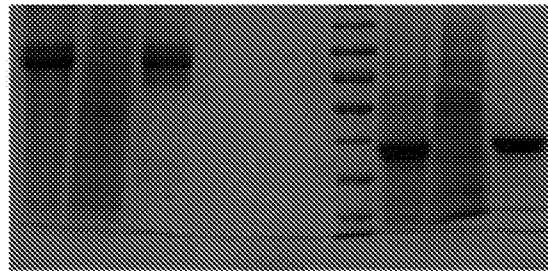


图 2

C

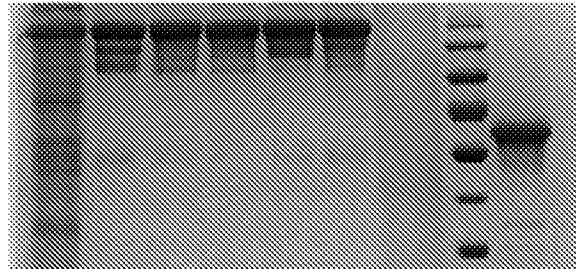
load FT P NaOH M load FT P+DTT



SS302-005

D

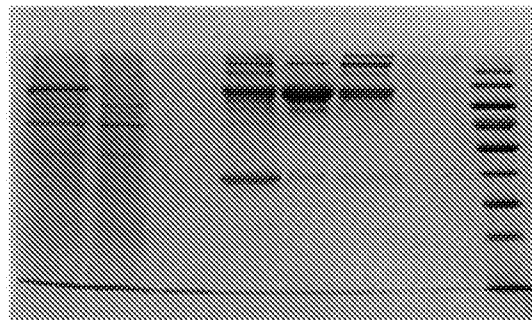
load P1 P2+3 P4 P5 P合 M P合+DTT



SS302-008

E

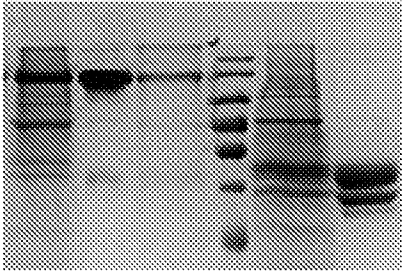
load FT wash P1 P2 P3 NaOH M



SS302-014

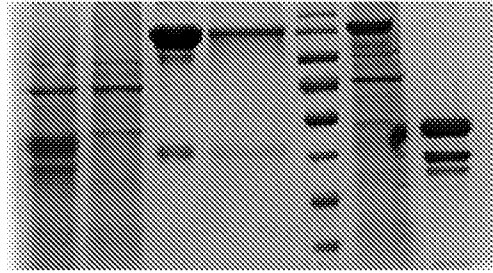
图 2 (续)

F
load P NaOH M load P+DTT



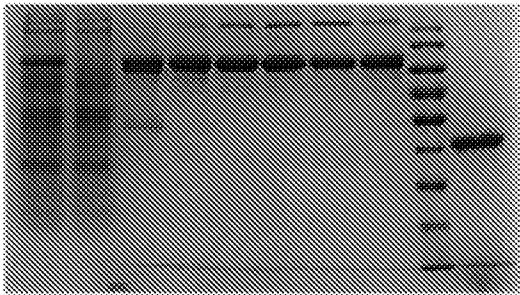
SS302-019

G
load FT P NaOH M LOAD P+DTT



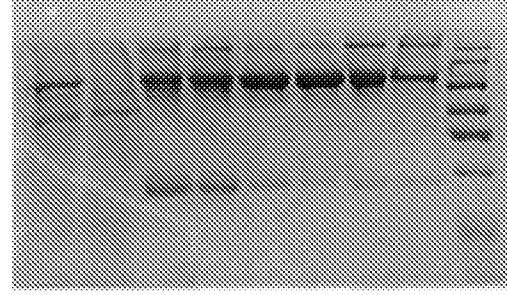
SS302-030

H
load FT P1 P2 P3 P4 P5 P合 M P合+DTT



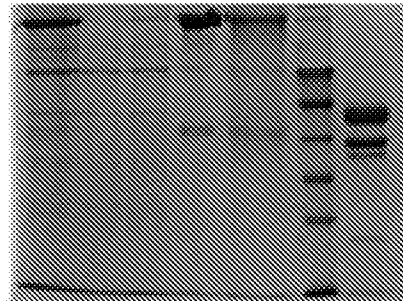
SS302-012

I
load FT P1 P2 P3 P4 P5 NaOH M



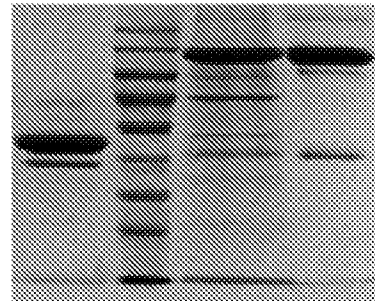
SS302-015

J
load FT FT P NaOH M P+DTT



SS302-029

K
P+DTT M load P



SS302-035

图 2 (续)

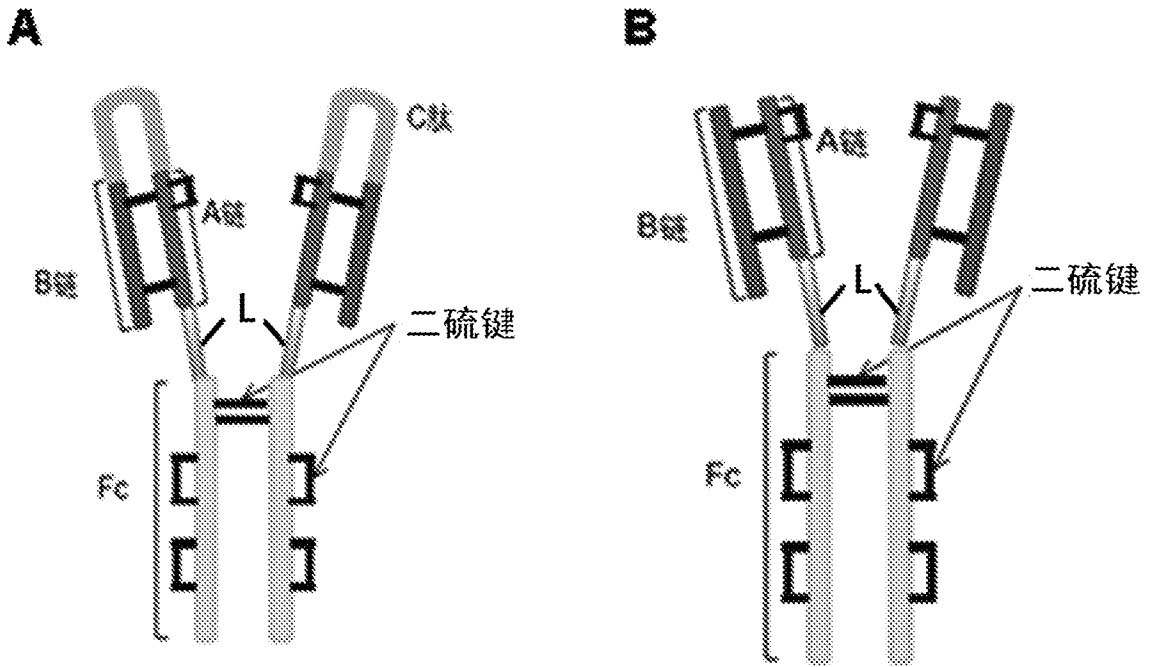


图 3

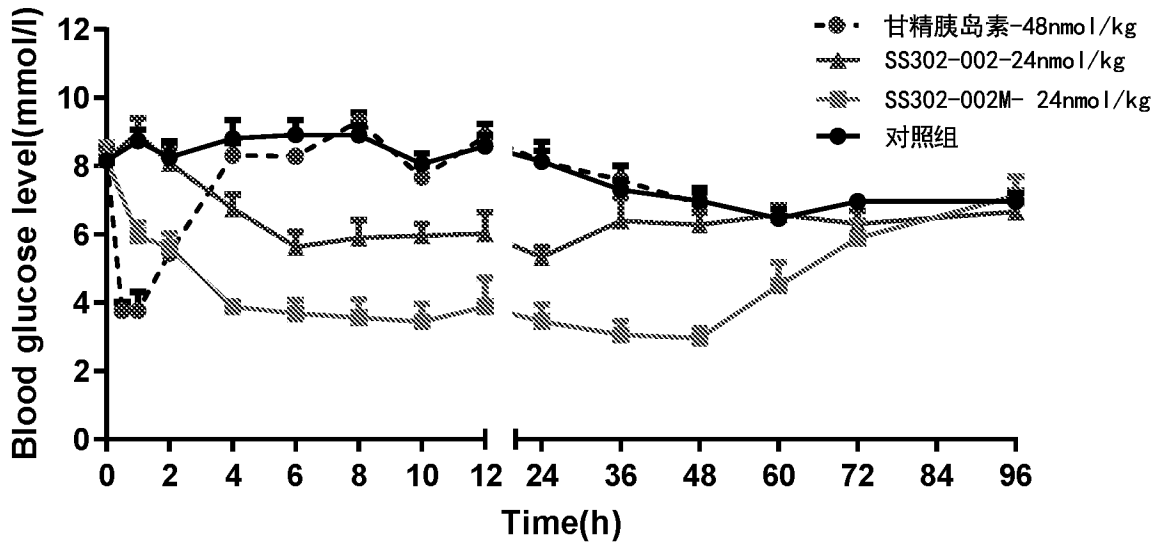
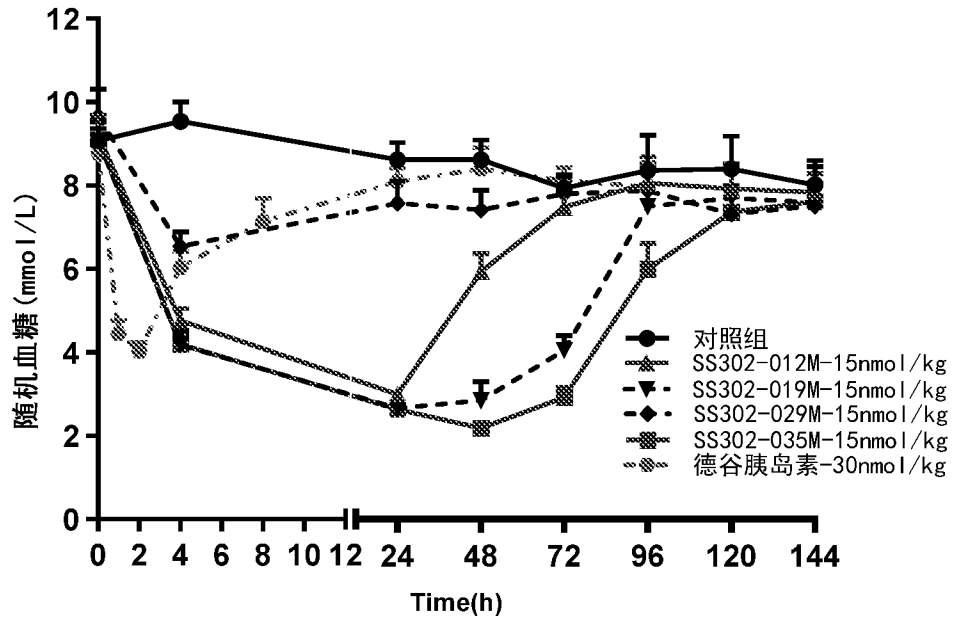


图 4

A



B

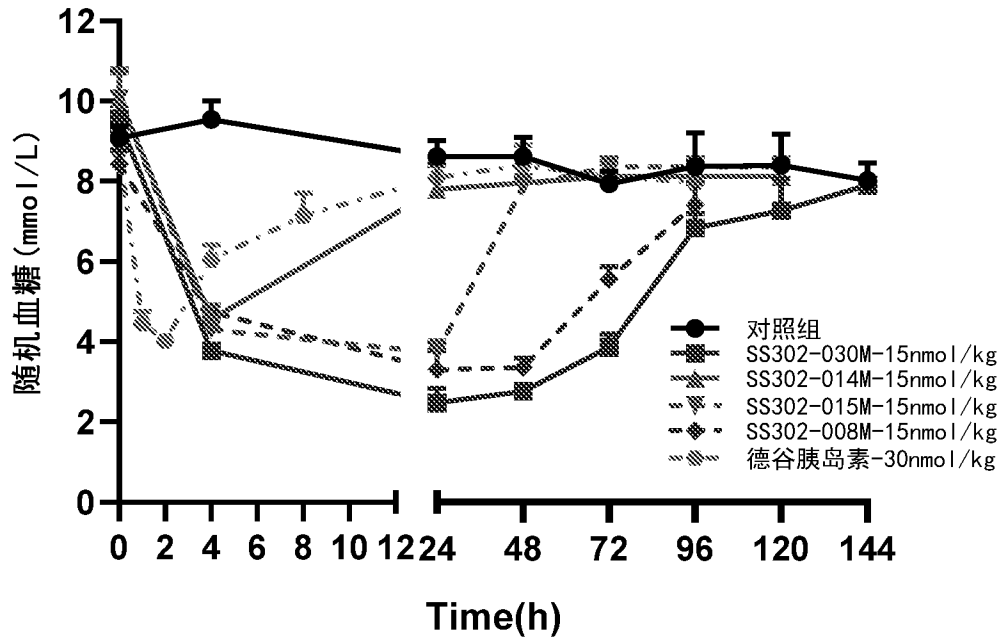


图 5

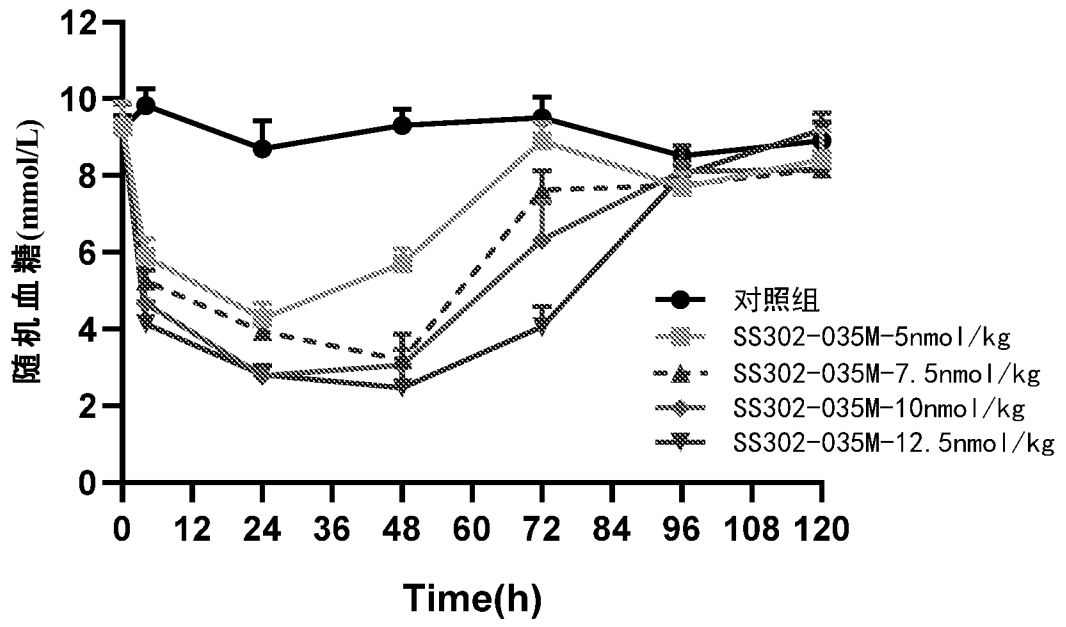
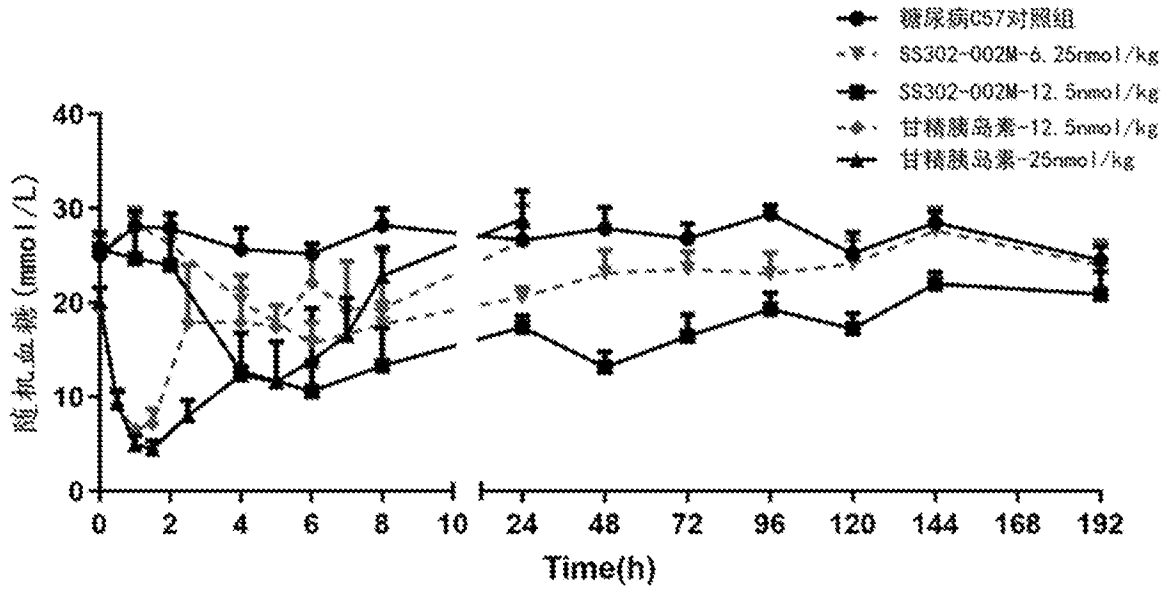


图 6

A



B

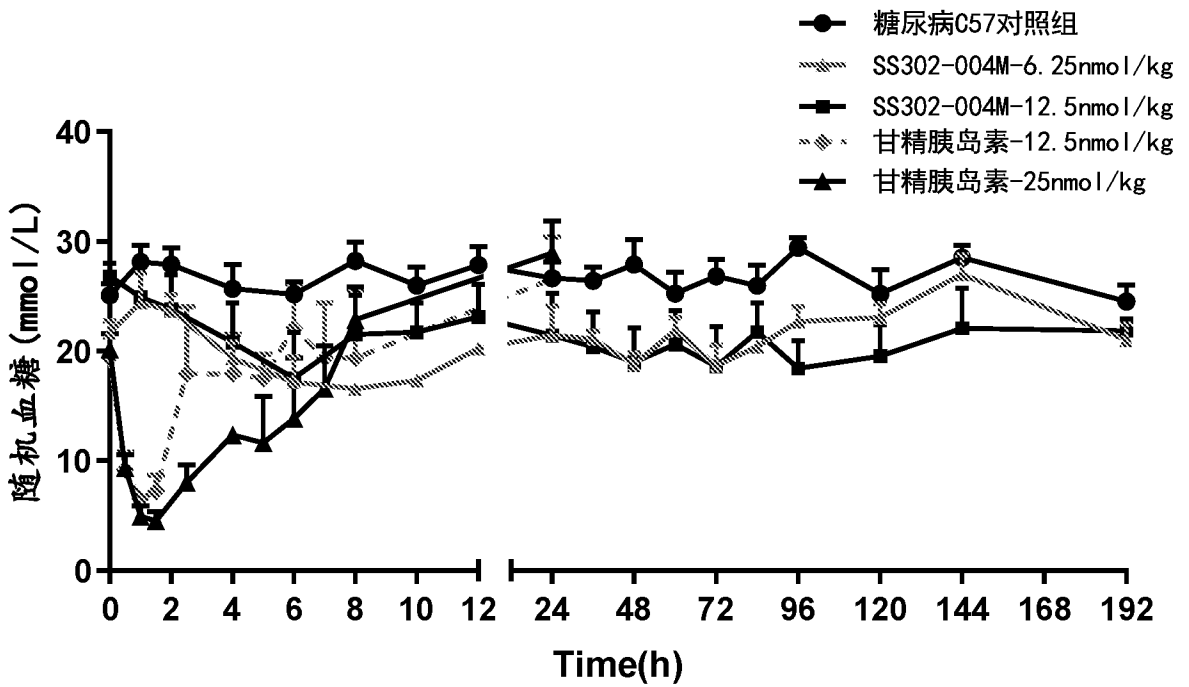
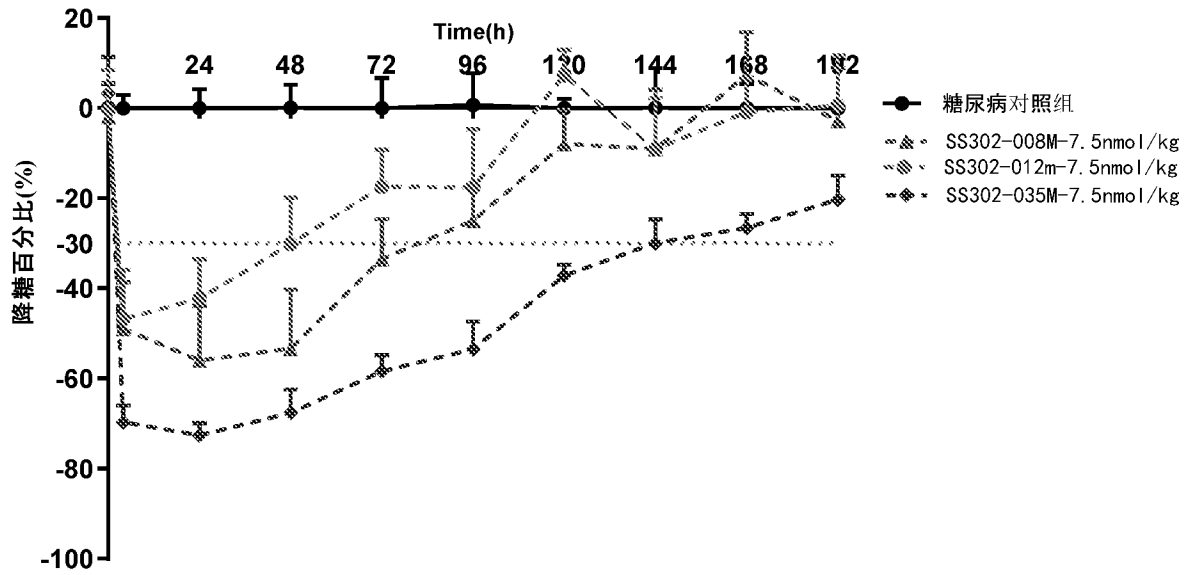


图 7

A



B

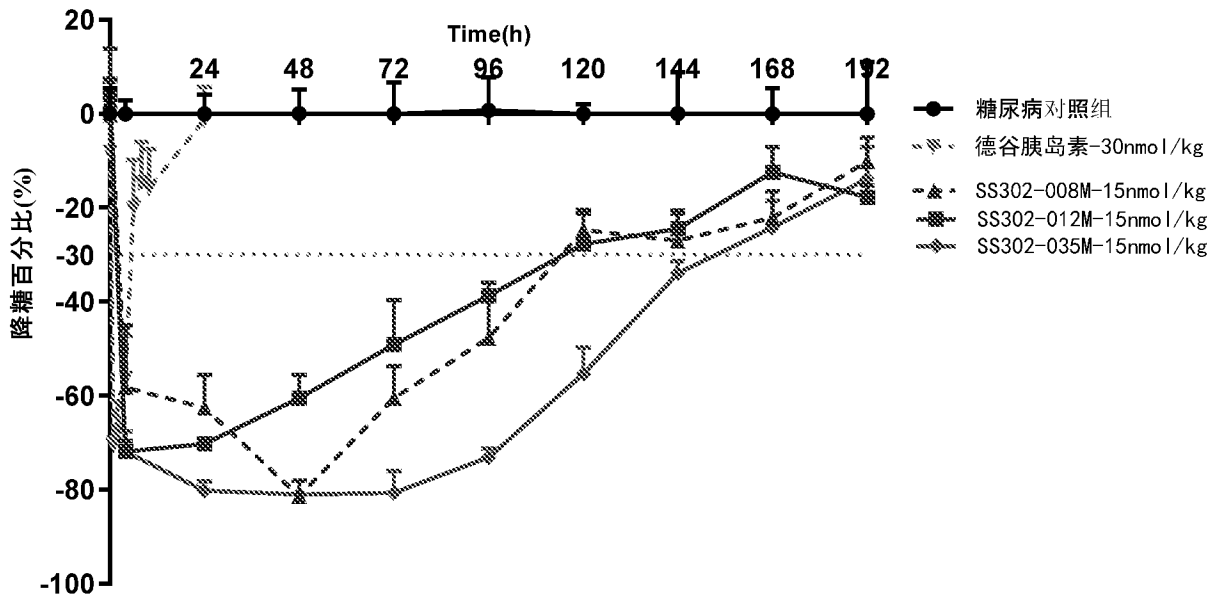


图 8

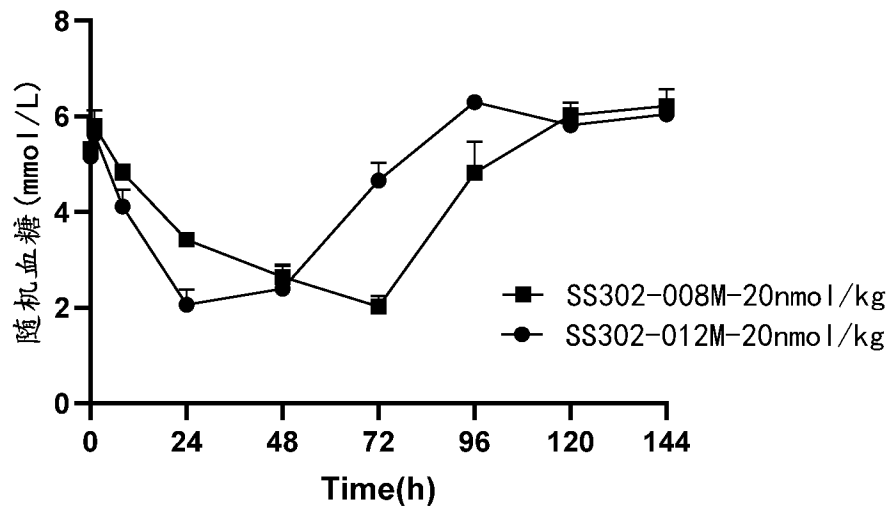


图 9

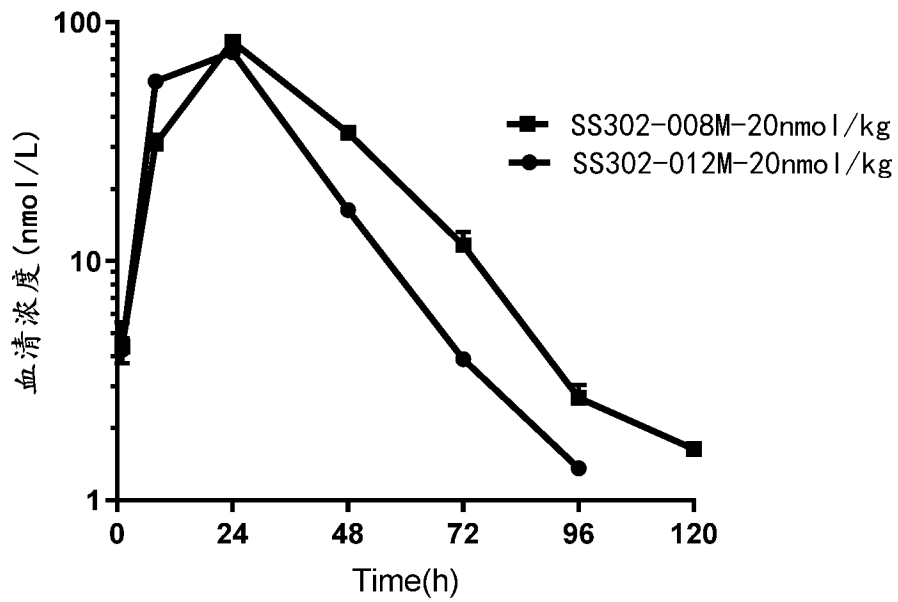
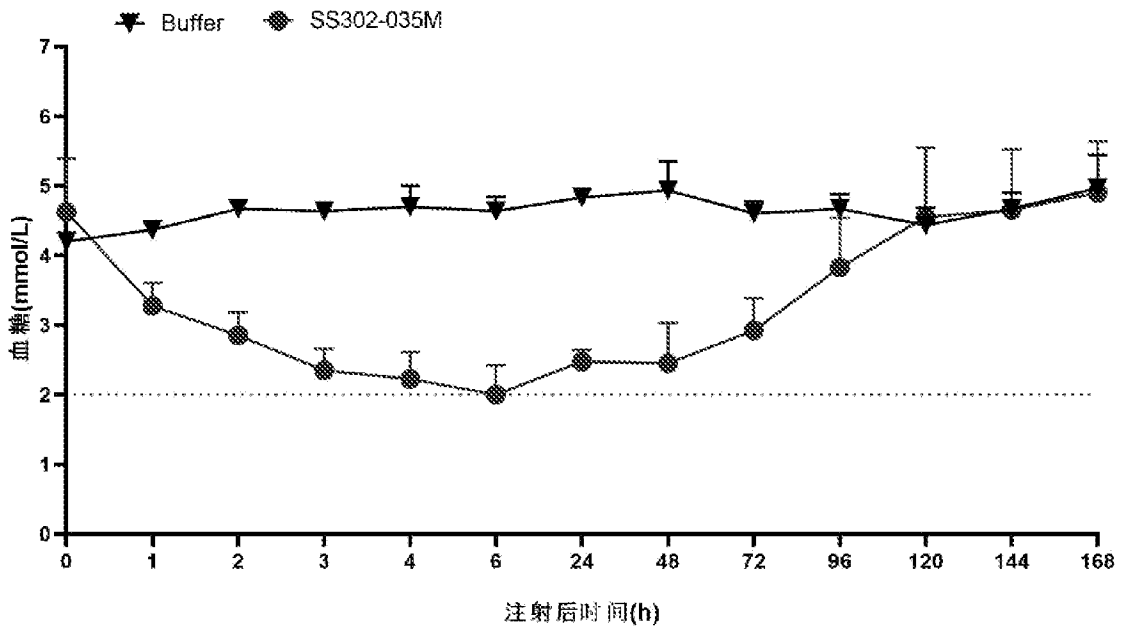


图 10

A



B

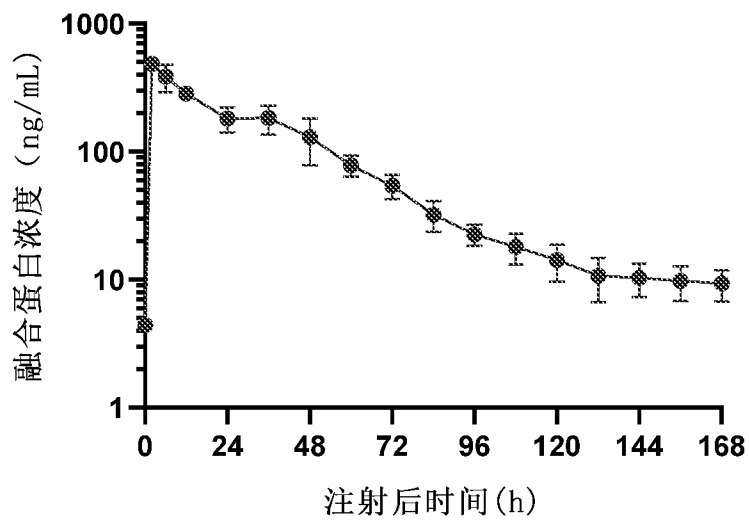


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/107040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/00(2006.01)i; A61K 38/28(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)i; C07K 14/62(2006.01)i; C07K 19/00(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)		
A61K C07K		
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, SIPOABS, DWPI, CNKI, baidu, patentics, NCBI, 江苏晟斯生物制药有限公司, 王亚里, 陈宪, 朱鹿燕, 周婷婷, 莫炜川, 刘成亮, 郝维维, 王淑亚, 姜召菊, 任子甲, 苏鸿声, 胰岛素-Fc融合蛋白, 胰岛素, Fc部分, 共价键, 切割, X-E1-Y-E2-Z-L-Fc (I), Kex2蛋白酶, 弗林(Furin)蛋白酶, 切割位点, 增强胰岛素活性, 延长半衰期, 降低血糖, 糖尿病, insulin, Fc, insulin-Fc fusion, cleavage, cleavable, linker, prolong, proteolytic, protease, Furin, Kex2, covalent, half-life, half-time, half-value, N297A, G236R/L328R, L234A/L235A, N434A, M252Y/S254T/T256E, M428L/N434S, T250R/M428L, 糖基化, PPPX1LP(SEQ ID NO:125), X2APPPX1LP(SEQ ID NO:126), PPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ(SEQ ID NO:127), PPPALPAPVRLPQP(SEQ ID NO:128), PPPALPAVAPPPALP(SEQ ID NO:129), KAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ(SEQ ID NO:130), VAPPPALPAPVRLPQP(SEQ ID NO:131), VAPPPALPAVAPPPALP(SEQ ID NO:132), SEQ ID NO:27-35、47-72、125-132.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104995206 A (HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 21 October 2015 (2015-10-21) claims 1-32, description, paragraphs 0009, 0121, 0124-0125, 0210, figure 1	1-7, 9-20
Y	SREENIVAS, S. et al. "Enhancement in production of recombinant two-chain Insulin Glargine by over-expression of Kex2 protease in Pichia pastoris." <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> , 20 September 2014 (2014-09-20), pp. 1-10	1-7, 9-20
Y	CN 110612112 A (AKSTON BIOSCIENCES CORP) 24 December 2019 (2019-12-24) claims 1-4, description, paragraph 0086	1-7, 9-20
A	CN 103509118 A (GUO, Huaizu) 15 January 2014 (2014-01-15) entire document	1-20
<input checked="" 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		Date of mailing of the international search report
24 August 2021		28 September 2021
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/107040

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020006529 A1 (AKSTON BIOSCIENCES CORPORATION) 02 January 2020 (2020-01-02) entire document	1-20
A	GLAESNER, W. et al. "engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an fc fusion protein." <i>Diabetes/Metabolism Research and Reviews.</i> , Vol. 26, 30 April 2010 (2010-04-30), pp. 287-296	1-20
A	CHURCH, C. et al. "pharmacological characterization of an ultra-long acting once-weekly insulin-fc fusion with continuous glucose monitoring." <i>European association for the study of diabetes.</i> , 03 October 2018 (2018-10-03), p. 1	1-20
A	WANG, Y. et al. "Expression and characterization of a potent long-acting glp-1 receptor agonist, glp-1-igg2σ-fc." <i>Plos one.</i> , Vol. 11, No. 5, 27 May 2016 (2016-05-27), article no. e0156449, pages 1-14	1-20
A	WANG, Q.J. et al. "novel glp-1 fusion chimera as potent long acting glp-1 receptor agonist." <i>Plos one.</i> , Vol. 5, No. 9, 15 September 2010 (2010-09-15), article no. e12734, pages 1-9	1-20
A	CN 105636979 A (NOVO NORDISK A/S) 01 June 2016 (2016-06-01) entire document	1-20
A	NOVO NORDISK A/S. "Novolin® R." <i>NOVO NORDISK A/S.</i> 30 November 2019 (2019-11-30), pp. 1-8	1-20
A	何尧声 等 (HE, Yaosheng et al.). "重组人胰岛素在毕赤氏酵母中的分泌表达 (Secretory Expression of Recombinant Human Insulin in the Pichia Pastoris)" <i>药物生物技术 (Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology)</i> , Vol. 16, No. 2, 31 December 2009 (2009-12-31), pp. 108-112	1-20

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:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Although the technical solution described in claim 20 relates to a method for treating diseases, and pertains to the subject matter under PCT Rule 39 (iv), a search has been carried out on the basis of the uses in a drug preparation.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/107040

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104995206	A	21 October 2015	EP	3616727	B1	31 March 2021
				TW	201520224	A	01 June 2015
				PH	12015501814	A1	07 December 2015
				AU	2018267648	B2	16 April 2020
				ZA	201507104	B	24 April 2019
				KR	20140106452	A	03 September 2014
				TW	I621626	B	21 April 2018
				MX	2015010471	A	25 April 2016
				AU	2014221531	A1	27 August 2015
				EP	2963056	A1	06 January 2016
				RU	2676729	C2	10 January 2019
				DK	2963056	T3	17 February 2020
				UA	119533	C2	10 July 2019
				ES	2770776	T3	03 July 2020
				EP	3616727	A1	04 March 2020
				WO	2014133324	A1	04 September 2014
				JP	6552968	B2	31 July 2019
				JP	2019187440	A	31 October 2019
				IL	240717	A	31 May 2020
				TW	201920243	A	01 June 2019
				EP	2963056	A4	07 June 2017
				AU	2014221531	B2	23 August 2018
				CA	2901873	A1	04 September 2014
				MX	366400	B	08 July 2019
				RU	2015138536	A	03 April 2017
				SG	10201907106V	A	27 September 2019
				PE	20151409	A1	07 October 2015
				PT	2963056	T	19 February 2020
				TW	201817741	A	16 May 2018
				HK	1211944	A1	03 June 2016
				CL	2015002330	A1	28 December 2015
				JP	2016510003	A	04 April 2016
				PE	20191481	A1	18 October 2019
SG	11201506095 T	A	29 September 2015				
AU	2018267648	A1	13 December 2018				
US	2016008483	A1	14 January 2016				
EP	2963056	B1	13 November 2019				
TW	I708782	B	01 November 2020				
IL	240717	D0	29 October 2015				
US	2018256731	A1	13 September 2018				
<hr/>							
CN	110612112	A	24 December 2019	US	2019315828	A1	17 October 2019
				AU	2017371217	B2	19 March 2020
				EP	3551209	A4	03 June 2020
				US	10597435	B2	24 March 2020
				EP	3551209	A1	16 October 2019
				AU	2020227002	A1	17 September 2020
				BR	112019011860	A2	12 November 2019
				WO	2018107117	A1	14 June 2018
				US	2020131243	A1	30 April 2020
				AU	2017371217	A1	25 July 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/107040

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				JP	2020503889	A	06 February 2020
				CA	3046337	A1	14 June 2018
CN	103509118	A	15 January 2014	CN	103509118	B	23 March 2016
WO	2020006529	A1	02 January 2020	US	10947292	B2	16 March 2021
				EP	3655006	A1	27 May 2020
				BR	112020026777	A2	30 March 2021
				US	2020407414	A1	31 December 2020
				US	2020407413	A1	31 December 2020
				EP	3655006	A4	13 January 2021
				US	10870686	B2	22 December 2020
				KR	20210029210	A	15 March 2021
				US	2020157170	A1	21 May 2020
				US	10851147	B2	01 December 2020
				US	2020231646	A1	23 July 2020
				US	2020157171	A1	21 May 2020
				US	10961294	B2	30 March 2021
				AU	2019291945	A1	14 January 2021
				US	2020157169	A1	21 May 2020
				CA	3104144	A1	02 January 2020
CN	105636979	A	01 June 2016	HU	E036702	T2	30 July 2018
				RU	2016114098	A	15 November 2017
				CA	2926701	A1	16 April 2015
				AU	2014333979	A1	24 March 2016
				RU	2673185	C2	22 November 2018
				BR	112016007166	A2	12 September 2017
				CN	105636979	B	10 January 2020
				IL	244507	A	31 May 2018
				SI	3055325	T1	31 May 2018
				RS	57004	B1	31 May 2018
				US	2016215037	A1	28 July 2016
				IL	244507	D0	21 April 2016
				MX	366636	B	17 July 2019
				DK	3055325	T3	16 April 2018
				US	9896496	B2	20 February 2018
				EP	3055325	A1	17 August 2016
				MX	2016004325	A	11 July 2016
				KR	20160065126	A	08 June 2016
				RU	2016114098	A3	21 May 2018
				PL	3055325	T3	29 June 2018
				AU	2014333979	B2	15 February 2018
				JP	2017502074	A	19 January 2017
				PT	3055325	T	06 April 2018
				WO	2015052088	A1	16 April 2015
				HR	P20180468	T1	04 May 2018
				EP	3055325	B1	03 January 2018
				ES	2676065	T3	16 July 2018
				JP	6499184	B2	10 April 2019

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 38/00(2006.01)i; A61K 38/28(2006.01)i; C07K 14/435(2006.01)i; C07K 14/62(2006.01)i; C07K 19/00(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>A61K C07K</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, SIPOABS, DWPI, CNKI, baidu, patentics, NCBI, 江苏晟斯生物制药有限公司, 王亚里, 陈宪, 朱鹿燕, 周婷婷, 莫炜川, 刘成亮, 郝维维, 王淑亚, 姜召菊, 任子甲, 苏鸿声, 胰岛素-Fc融合蛋白, 胰岛素, Fc部分, 共价键, 切割, X-E1-Y-E2-Z-L-Fc (I), Kex2蛋白酶, 弗林(Furin)蛋白酶, 切割位点, 增强胰岛素活性, 延长半衰期, 降低血糖, 糖尿病, insulin, Fc, insulin-Fc fusion, cleavage, cleavable, linker, prolong, proteolytic, protease, Furin, Kex2, covalent, half-life, half-time, half-value, N297A, G236R/L328R, L234A/L235A, N434A, M252Y/S254T/T256E, M428L/N434S, T250R/M428L, 糖基化, PPPX1LP(SEQ ID NO:125), X2APPPX1LP(SEQ ID NO:126), PPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ(SEQ ID NO:127), PPPALPAPVRLPGP(SEQ ID NO:128), PPPALPAVAPPPALP(SEQ ID NO:129), KAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ(SEQ ID NO:130), VAPPPALPAPVRLPGP(SEQ ID NO:131), VAPPPALPAVAPPPALP(SEQ ID NO:132), SEQ ID NO:27-35、47-72、125-132。</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>Y</td> <td>CN 104995206 A (韩美药品株式会社) 2015年 10月 21日 (2015 - 10 - 21) 权利要求1-32, 说明书第0009、0121、0124-0125、0210段, 图1</td> <td>1-7、9-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SREENIVAS, S. 等. "Enhancement in production of recombinant two-chain Insulin Glargine by over-expression of Kex2 protease in Pichia pastoris." Appl Microbiol Biotechnol., 2014年 9月 20日 (2014 - 09 - 20), 第1-10页</td> <td>1-7、9-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110612112 A (阿卡斯通生物科学公司) 2019年 12月 24日 (2019 - 12 - 24) 权利要求1-14, 说明书第0086段</td> <td>1-7、9-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103509118 A (郭怀祖) 2014年 1月 15日 (2014 - 01 - 15) 全文</td> <td>1-20</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	Y	CN 104995206 A (韩美药品株式会社) 2015年 10月 21日 (2015 - 10 - 21) 权利要求1-32, 说明书第0009、0121、0124-0125、0210段, 图1	1-7、9-20	Y	SREENIVAS, S. 等. "Enhancement in production of recombinant two-chain Insulin Glargine by over-expression of Kex2 protease in Pichia pastoris." Appl Microbiol Biotechnol., 2014年 9月 20日 (2014 - 09 - 20), 第1-10页	1-7、9-20	Y	CN 110612112 A (阿卡斯通生物科学公司) 2019年 12月 24日 (2019 - 12 - 24) 权利要求1-14, 说明书第0086段	1-7、9-20	A	CN 103509118 A (郭怀祖) 2014年 1月 15日 (2014 - 01 - 15) 全文	1-20
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 104995206 A (韩美药品株式会社) 2015年 10月 21日 (2015 - 10 - 21) 权利要求1-32, 说明书第0009、0121、0124-0125、0210段, 图1	1-7、9-20															
Y	SREENIVAS, S. 等. "Enhancement in production of recombinant two-chain Insulin Glargine by over-expression of Kex2 protease in Pichia pastoris." Appl Microbiol Biotechnol., 2014年 9月 20日 (2014 - 09 - 20), 第1-10页	1-7、9-20															
Y	CN 110612112 A (阿卡斯通生物科学公司) 2019年 12月 24日 (2019 - 12 - 24) 权利要求1-14, 说明书第0086段	1-7、9-20															
A	CN 103509118 A (郭怀祖) 2014年 1月 15日 (2014 - 01 - 15) 全文	1-20															
<p><input checked="" 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: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "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) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "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 "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 "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 "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 "&" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 8月 24日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 9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>朱宁</p> <p>电话号码 86-(10)-53961956</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2020006529 A1 (AKSTON BIOSCIENCES CORPORATION) 2020年 1月 2日 (2020 - 01 - 02) 全文	1-20
A	GLAESNER, W. 等. "engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an fc fusion protein." diabetes metabolism research and reviews., 第26卷, 2010年 4月 30日 (2010 - 04 - 30), 第287-296页	1-20
A	CHURCH, C. 等. "pharmacological characterization of an ultra-long acting once-weekly insulin-fc fusion with continuous glucose monitoring." European association for the study of diabetes., 2018年 10月 3日 (2018 - 10 - 03), 第1页	1-20
A	YANG, Y. 等. "Expression and characterization of a potent long-acting glp-1 receptor agonist, glp-1-igg2 σ -fc." plus one., 第11卷, 第5期, 2016年 5月 27日 (2016 - 05 - 27), 第e0156449篇, 第1-14页	1-20
A	WANG, Q.H. 等. "novel glp-1 fusion chimera as potent long acting glp-1 receptor agonist." Plos one., 第5卷, 第9期, 2010年 9月 15日 (2010 - 09 - 15), 第e12734篇, 第1-9页	1-20
A	CN 105636979 A (诺和诺德股份有限公司) 2016年 6月 1日 (2016 - 06 - 01) 全文	1-20
A	Novo Nordisk A/S. "Novolin® R." Novo Nordisk A/S., 2019年 11月 30日 (2019 - 11 - 30), 第1-8页	1-20
A	何尧声等. "重组人胰岛素在毕赤氏酵母中的分泌表达." 药物生物技术., 第16卷, 第2期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第108-112页	1-20

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:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 虽然权利要求20技术方案涉及“一种疾病的治疗方法”属于细则第39条(iv)规定的主题，但是基于“制备药物的用途”进行检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/107040

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	104995206	A	2015年 10月 21日	EP	3616727	B1	2021年 3月 31日
				TW	201520224	A	2015年 6月 1日
				PH	12015501814	A1	2015年 12月 7日
				AU	2018267648	B2	2020年 4月 16日
				ZA	201507104	B	2019年 4月 24日
				KR	20140106452	A	2014年 9月 3日
				TW	1621626	B	2018年 4月 21日
				MX	2015010471	A	2016年 4月 25日
				AU	2014221531	A1	2015年 8月 27日
				EP	2963056	A1	2016年 1月 6日
				RU	2676729	C2	2019年 1月 10日
				DK	2963056	T3	2020年 2月 17日
				UA	119533	C2	2019年 7月 10日
				ES	2770776	T3	2020年 7月 3日
				EP	3616727	A1	2020年 3月 4日
				WO	2014133324	A1	2014年 9月 4日
				JP	6552968	B2	2019年 7月 31日
				JP	2019187440	A	2019年 10月 31日
				IL	240717	A	2020年 5月 31日
				TW	201920243	A	2019年 6月 1日
				EP	2963056	A4	2017年 6月 7日
				AU	2014221531	B2	2018年 8月 23日
				CA	2901873	A1	2014年 9月 4日
				MX	366400	B	2019年 7月 8日
				RU	2015138536	A	2017年 4月 3日
				SG	10201907106V	A	2019年 9月 27日
				PE	20151409	A1	2015年 10月 7日
				PT	2963056	T	2020年 2月 19日
				TW	201817741	A	2018年 5月 16日
				HK	1211944	A1	2016年 6月 3日
				CL	2015002330	A1	2015年 12月 28日
				JP	2016510003	A	2016年 4月 4日
				PE	20191481	A1	2019年 10月 18日
				SG	11201506095T	A	2015年 9月 29日
				AU	2018267648	A1	2018年 12月 13日
				US	2016008483	A1	2016年 1月 14日
				EP	2963056	B1	2019年 11月 13日
				TW	1708782	B	2020年 11月 1日
				IL	240717	D0	2015年 10月 29日
				US	2018256731	A1	2018年 9月 13日
<hr/>							
CN	110612112	A	2019年 12月 24日	US	2019315828	A1	2019年 10月 17日
				AU	2017371217	B2	2020年 3月 19日
				EP	3551209	A4	2020年 6月 3日
				US	10597435	B2	2020年 3月 24日
				EP	3551209	A1	2019年 10月 16日
				AU	2020227002	A1	2020年 9月 17日
				BR	112019011860	A2	2019年 11月 12日
				WO	2018107117	A1	2018年 6月 14日
				US	2020131243	A1	2020年 4月 30日
				AU	2017371217	A1	2019年 7月 25日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/107040

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)
				JP	2020503889	A	2020年 2月 6日
				CA	3046337	A1	2018年 6月 14日
CN	103509118	A	2014年 1月 15日	CN	103509118	B	2016年 3月 23日
WO	2020006529	A1	2020年 1月 2日	US	10947292	B2	2021年 3月 16日
				EP	3655006	A1	2020年 5月 27日
				BR	112020026777	A2	2021年 3月 30日
				US	2020407414	A1	2020年 12月 31日
				US	2020407413	A1	2020年 12月 31日
				EP	3655006	A4	2021年 1月 13日
				US	10870686	B2	2020年 12月 22日
				KR	20210029210	A	2021年 3月 15日
				US	2020157170	A1	2020年 5月 21日
				US	10851147	B2	2020年 12月 1日
				US	2020231646	A1	2020年 7月 23日
				US	2020157171	A1	2020年 5月 21日
				US	10961294	B2	2021年 3月 30日
				AU	2019291945	A1	2021年 1月 14日
				US	2020157169	A1	2020年 5月 21日
				CA	3104144	A1	2020年 1月 2日
CN	105636979	A	2016年 6月 1日	HU	E036702	T2	2018年 7月 30日
				RU	2016114098	A	2017年 11月 15日
				CA	2926701	A1	2015年 4月 16日
				AU	2014333979	A1	2016年 3月 24日
				RU	2673185	C2	2018年 11月 22日
				BR	112016007166	A2	2017年 9月 12日
				CN	105636979	B	2020年 1月 10日
				IL	244507	A	2018年 5月 31日
				SI	3055325	T1	2018年 5月 31日
				RS	57004	B1	2018年 5月 31日
				US	2016215037	A1	2016年 7月 28日
				IL	244507	D0	2016年 4月 21日
				MX	366636	B	2019年 7月 17日
				DK	3055325	T3	2018年 4月 16日
				US	9896496	B2	2018年 2月 20日
				EP	3055325	A1	2016年 8月 17日
				MX	2016004325	A	2016年 7月 11日
				KR	20160065126	A	2016年 6月 8日
				RU	2016114098	A3	2018年 5月 21日
				PL	3055325	T3	2018年 6月 29日
				AU	2014333979	B2	2018年 2月 15日
				JP	2017502074	A	2017年 1月 19日
				PT	3055325	T	2018年 4月 6日
				WO	2015052088	A1	2015年 4月 16日
				HR	P20180468	T1	2018年 5月 4日
				EP	3055325	B1	2018年 1月 3日
				ES	2676065	T3	2018年 7月 16日
				JP	6499184	B2	2019年 4月 10日