



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 103408669 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201310331182. 6

CN 103068368 A, 2013. 04. 24, 说明书倒数第

(22) 申请日 2013. 08. 01

三段.

CN 101525386 A, 2009. 09. 09, 全文.

(73) 专利权人 江苏泰康生物医药有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城药城
大道 1 号 G03

闫璐颖. 融合蛋白连接肽的研究进展. 《生
物技术》. 2008, 第 18 卷 (第 3 期), 92-94.

审查员 吕健

(72) 发明人 黄岩山 杨志愉 徐正学 裘霁宛

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

C12N 15/81(2006. 01)

A61K 38/26(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101851293 A, 2010. 10. 06, 权利要求

1-3.

权利要求书1页 说明书21页

序列表17页 附图3页

(54) 发明名称

GLP-1 类似物融合蛋白, 及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明提供了一类新型 GLP-1 类似物融合蛋白及其制备这种融合蛋白的方法。该融合蛋白由三个区组成: GLP-1 类似物-连接肽-人血清白蛋白(HSA), 应用本发明制备的包含 GLP-1 类似物的化合物具有很低的生产成本, 更高的生物学活性, 更优的体内外稳定性。这类融合蛋白可用于治疗糖尿病、肥胖、肠易激综合症以及将通过降低血浆葡萄糖、抑制胃和/或肠运动和抑制胃和/或肠排空、或抑制食物摄入而受益的其他疾病。

1. 一种 GLP-1 类似物融合蛋白, 该融合蛋白结构为: GLP-1 类似物 - 连接肽 - 人血清白蛋白, 所述连接肽的长度不超过 26 个氨基酸, 且通式如下: $(Xaa)_x - (Pro)_y - (Xaa)_z$, 其中 Xaa 选自 G、A 和 S 中的一种或几种的任意组合, x, y, z 均为整数, 且 $x, z \geq 3$, $26 \geq x+y+z \geq 14$, $10 \geq y \geq 3$, $1 \geq y/(x+z) \geq 0.13$, 连接肽 N 端与 GLP-1 类似物 C 末端以肽键相连, 连接肽 C 端与人血清白蛋白的 N 端以肽键相连, 其中, 所述 GLP-1 类似物氨基酸序列为 SEQ ID NO:1; 所述连接肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:11-16 中的任一; 所述人血清白蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2。

2. 如权利要求 1 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白, 其特征在于, 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:3-5。

3. 一种多核苷酸, 其编码权利要求 1 或 2 所述 GLP-1 类似物融合蛋白。

4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸, 其特征在于, 所述的多核苷酸的序列选自 SEQ ID NO:8-10。

5. 一种制备权利要求 1 或 2 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白的方法, 该方法包括: 构建含有所述 GLP-1 类似物融合蛋白的基因序列的表达载体, 然后将所述的表达载体转化至宿主细胞中诱导表达, 从表达产物中分离获得所述的融合蛋白。

6. 如权利要求 5 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白的方法, 其特征在于, 所述表达载体为 pPIC9; 所述宿主细胞为巴斯德毕赤酵母。

7. 如权利要求 5 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白的方法, 其特征在于, 所述从表达产物中分离获得所述的融合蛋白的方法为: 采用联合亲和层析、疏水层析和离子交换层析的三步层析方法分离获得所述的融合蛋白。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白在制备治疗糖尿病及相关疾病药物上的用途。

9. 一种用于治疗糖尿病及糖尿病相关疾病的药物组合物, 含有权利要求 1 或 2 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白及至少一种药学可接受的载体或赋形剂。

GLP-1 类似物融合蛋白, 及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一类新型 GLP-1 类似物融合蛋白, 及其制备这种融合蛋白的方法。该类 GLP-1 类似物融合蛋白用于治疗糖尿病及相关的多种疾病或紊乱。

背景技术

[0002] 胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 及其类似物例如 Exendin-4 被广泛的用来研究治疗 2 型糖尿病, 由于 GLP-1 多肽在体内被蛋白酶二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 所迅速失活, 在血浆中的半衰期很短, 使其难以在临床上被广泛使用; 而 Exendin-4 对 DPP-IV 的酶降解不敏感, 其稳定性增加, 但分子量较低 (4187.61D), 在体内半衰期短, 所以每天必须注射两次, 这阻碍了在临床上使用。目前许多努力用来解决这个技术难题, 例如缓释微球、PEG 修饰, 脂肪酸链修饰, 白蛋白融合。其中白蛋白融合技术在保持目的蛋白的生物学和治疗功能的同时, 通过与人白蛋白融合大大提高了其在体内半衰期。

[0003] 尽管 GLP-1 类制剂及其衍生物用于治疗糖尿病是现实可行的。但是因为糖尿病患者一经诊断后必须长期持续给药, 终生接受治疗, 因此对于该类制剂的安全性、经济性和使用便利性的要求都是极其迫切的。但是, 现有的 GLP-1/HSA 融合类制剂还存在很大弊端。

[0004] 首先, 与 GLP-1 分子相比, 白蛋白分子量巨大, 因此两者融合后因为空间位阻原因导致 GLP-1/HSA 融合蛋白基本不具有生物学活性。Albugon 是 Laurie L. Baggio 等设计了一种新的 GLP-1/HSA 融合蛋白, 就是在其两者间插入一个额外的 GLP-1 分子作为间隔物, 但其生物学活性仅仅保留了约 1%; 生物学活性的下降导致临床剂量的大幅增加 (Laurie L. Baggio, Qingling Huang, Theodore J. Brown, and Daniel J. Drucker, DIABETES Vol. 53 : 2492-2500 (2004))。例如 GLP-1 类似物埃塞那肽 (Byetta®), 临床每次给药剂量仅为 5-10 微克, 每天 1-2 次, 但是 Albugon 临床有效给药剂量达到 4 毫克 / 天, 折合成摩尔数增加了近 22 倍。临床剂量的大幅增加会带来两个问题: 1. 增加潜在的免疫原性风险。限于注射给药容量问题, 剂量增大势必导致药物制剂浓度的增加, 如 GLP-1 类似物制剂 Byetta 单次给药仅为 5-10 微克 (50 微升), 浓度仅为 0.25 毫克 / 毫升, 而临床中 Albugon 单次剂量达到 30 毫克 / 人, 制剂浓度高达 30-50 毫克 / 毫升。高浓度的蛋白制剂在运输和贮存期间容易造成蛋白质聚体增加。已有的研究表明, 治疗用蛋白聚体增加, 会增加免疫原性 (Anne S. De Groot and David W. Scott, Trends Immunol Vol. 28No. 11:482-490)。重组蛋白多聚体会通过交联 B 细胞受体, 激活 B 细胞增生从而启动 B 细胞和 T 细胞免疫 (Rosenberg, A. S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. AAPS J. 8 :501 - 507 (2006))。而且, 重组蛋白多聚体也更容易被抗原递呈细胞 (APC) 所吞噬, 从而加快驱使树突细胞 (dendritic cell, DC) 的成熟从而激发多种免疫反应。 (Anne S. De Groot and David W. Scott, Trends Immunol Vol. 28No. 11:482-490)。因此, GLP-1/HSA 融合蛋白制剂剂量的显著增加必然会导致抗体生成的风险加大; 2. GLP-1/HSA 融合蛋白类制剂需要通过极其复杂的生物工程技术制备, 其单位蛋白量成本高昂, 给药剂量的大幅增加将使得药物价格无法被糖尿病患者所承受。

[0005] 其次,由于 GLP-1 序列大部分呈无规则卷曲构象,极易受蛋白酶攻击而被降解,因此额外加入的第二个 GLP-1 使得 Albugon 更易受到蛋白酶攻击而不稳定。这个不稳定在两个方面都体现了弊端:1. 在进行重组表达 Albugon 时,无论是生产成本低廉的酵母表达系统还是高昂的哺乳动物细胞表达系统,分泌在培养上清中的 GLP-1/HSA 融合蛋白易受蛋白酶降解,既导致表达量下降,也会产生很多不均一酶解产物而使得最终产物不均一;2. Albugon 注射进入体内后在体内循环时也易受蛋白酶降解而失效。

[0006] 此外,限于制品稳定性问题,目前该类制品都需要低温保存和运输,因此对于糖尿病人外出旅行携带极不方便。

发明内容

[0007] 本发明的目的是克服现有技术中的缺陷,设计并制备了一种新型的 GLP-1 类似物融合蛋白,该融合蛋白由三个区域组成:GLP-1 类似物-连接肽-人血清白蛋白(HSA)。与现有产品相比,该融合蛋白具有如下突出优点:

[0008] 1. 更好的热稳定性,可以在室温条件下长期保存而活性不下降,便于病人随身携带使用

[0009] 2. 更好的耐蛋白酶稳定性,在发酵上清及体内稳定性是现有该类融合蛋白的 3 倍以上,易于工业化制备。

[0010] 3. 更高的生物学活性,其生物学活性是现有该类融合蛋白的 10 倍以上。

[0011] 应用本发明制备的包含 GLP-1 类似物的化合物具有很低的生产成本,更高的生物学活性,更优的体内外稳定性,从而有望成为一类更佳的糖尿病治疗药物。

[0012] 本发明一方面公开了一种新型的 GLP-1 类似物融合蛋白,该融合蛋白结构为:GLP-1 类似物-连接肽-人血清白蛋白(HSA)。

[0013] 本发明所述的 GLP-1 类似物融合蛋白,其结构中第一个区域为 GLP-1 类似物,其序列如 SEQ ID NO:1:HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVK 所示,或者至少与其保持 85%,90%,95%,或 99%的同源性;进一步的,也可包含 2 个,3 个 GLP-1 或其类似物重复序列;进一步的,第一区域也可以是与 GLP-1 功能相似的同系物 Exendin-4。

[0014] 天然 GLP-1 在体内经过加工,成熟肽从该分子切割前 6 个氨基酸。因此,按照本领域习惯将 GLP-1 的第一个氨基酸指定为 7 号。如 SEQ ID NO:1 中所示对该多肽中的所有氨基酸连续编号。例如,第 7 位为组氨酸,第 8 位为甘氨酸。GLP-1 序列中的非保守位置可以被其他氨基酸所替换而不改变其活性,如 Gly8 → Ala, Ser 或 Cys;Glu9 → Asp, Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Gln, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met 或 Phe;Gly10 → Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met 或 Phe;Asp15 → Glu;Val16 → Leu 或 Tyr;Ser18 → Lys;Glu21 → Asp;Gly22 → Glu 或 Ser;Glu23 → Arg;Ala24 → Arg;Lys26 → Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Arg;Lys34 → Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Arg;Arg36 → Gly, Ser, Cys, Thr, Asp, Glu, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Lys。GLP-1 序列 C 末端亦可以缺失 1,2 个或 3 个氨基酸。(Wolfgang Glaesner 等,美国专利 US7452966)。

[0015] 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白,其结构中第二个区域为一个长度不超过 26 个氨基酸的连接肽,具有如下通式:(Xaa)_x-(Pro)_y-(Xaa)_z,其中 Xaa 选自 G, A, S 中的一种

或几种的任意组合, x, y, z 均为整数, 且 $x, z \geq 3, 26 \geq x+y+z \geq 14, 10 \geq y \geq 3, 1 \geq y/(x+z) \geq 0.13$ 。连接肽 N 端与第一区域 C 末端以肽键相连, C 端与 HSA 的 N 端以肽键相连。

[0016] Xaa 选自 G, A, S 中的一种或几种的任意组合是指: 不同位置的 Xaa 均可从 G, A, S 这三种氨基酸残基中任选, 不同位置的 Xaa 可以一致也可以不一致。

[0017] 进一步的, 所述连接肽序列选自:

[0018] a) GGGSSPPPGGGGSS (SEQ ID NO:11)

[0019] b) GGGSSGGSSPPPAGGGSSGGGSS (SEQ ID NO:12)

[0020] c) GGGAPPPPPPPSSGGG (SEQ ID NO:13)

[0021] d) AGGGAAGGSSGGGPPPPPGGGGSS (SEQ ID NO:14)

[0022] e) GGSSGAPPPPGGGGSS (SEQ ID NO:15)

[0023] f) GGGSSGAPPSGGGSGGGSGGGGSS (SEQ ID NO:16)

[0024] 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白, 第三个区域为人血清白蛋白(HSA)。其序列如 SEQ ID NO:2 所示, 或者至少与其保持 85%, 90%, 95%, 99% 的同源性。HSA 序列中的非保守位置可以被其他氨基酸所替换而不改变其活性, 如 Cys34 → Ser; Leu407 → Ala; Leu408 → Val; Arg408 → Val; Val409 → Ala; Arg410 → Ala; Lys413 → Gln; Arg410 → Ala (Plumridge 等, 国际专利 W02011051489)。

[0025] SEQ ID NO:2:

[0026] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL

[0027] RETY GEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR

[0028] YKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK

[0029] VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA

[0030] EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGE

[0031] YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES

[0032] LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD DFAAFVEKCKK

[0033] ADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGL

[0034] 在本案的较佳案例中, 所述的 GLP-1 类似物融合蛋白的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:3-5。

[0035] a) SEQ ID NO:3:

[0036] HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWL VKGGGSSPPPGGGGSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFED

[0037] HVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRP

[0038] EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RD
EGKASSAKQRL

[0039] KCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN
QDSISSKLKEC

[0040] CEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLL
RLAKTYETTL

[0041] KCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS
RNLGKVGSKCC

[0042] KHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSE

[0043] KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0044] b) SEQ ID NO :4 :

[0045] HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGAPPPPPPPSSGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIAFAQYLQQ

[0046] CPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
LQHKDDNP NL P

[0047] RLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKL
DEL RDEGKASS

[0048] AKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISS

[0049] KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYS
VVL LRLAKTY

[0050] ETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPT
LVEVSRNLGKV

[0051] GSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADI

[0052] CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAA
LGL

[0053] c) SEQ ID NO :5 :

[0054] HGEFTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGSSGAPPPSGGGSGGGSGGGSDAHKSEVAHRFKDLG
EENFKALVLIA

[0055] FAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE
PERNECF LQHK

[0056] DDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKA
ACLLPKLDEL R

[0057] DEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD
DRADLAKYICE

[0058] NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA
RRHPDYSV VLL

[0059] LRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLGEYKFQNALLVRYTKKV
PQVSTPTLVEV

[0060] SRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDE
TYVPKEFNAET

[0061] FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL
VAASQAALGL

[0062] 本发明第二方面,公开了一种多核苷酸,其编码所述 GLP-1 类似物融合蛋白。

[0063] 在本案的较佳实例中,所述的 GLP-1 类似物融合蛋白,其核苷酸编码序列为 SEQ ID NO :10,其对应的蛋白序列为 SEQ ID NO :5。本发明的 GLP-1 类似物融合蛋白;其核苷酸编码序列还可为 SEQ ID NO :8,其对应的蛋白序列为 SEQ ID NO :3 ;或者为 SEQ ID NO :9,其对应的蛋白序列为 SEQ ID NO :4。

[0064] SEQ ID NO :8. GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

[0065] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATT
GCTTGGCTGGT

[0066] GAAAGGTGGTGGATCTTCTCCACCACCAGGTGGTGGAGGCTCTTCAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGC
TCATCGGTTTA

[0067] AAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTC
CATTTGAAGAT

[0068] CATGTAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAAT
TGTGACAAATC

[0069] ACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGC
TGACTGCTGTG

[0070] CAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCGAT
TGGTGAGACCA

[0071] GAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAA
ATTGCCAGAAG

[0072] ACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATG
TTGCCAAGCTG

[0073] CTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA
AACAGAGACTC

[0074] AAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAG
AGATTTCCCAA

[0075] AGCTGAGTTTGAGAAGTTTCCAAGTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGG
AGATCTGCTTG

[0076] AATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAAC
TGAAGGAATGC

[0077] TGTGAAAAACCTCTGTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCTGCTGAC
TTGCCTTCATT

[0078] AGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACCTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGG

CATGTTTTTGT

[0079] ATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAG

[0080] AAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTTGAAGAGCCTCA

[0081] GAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACA

[0082] CCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCA GCAATGTTGT

[0083] AAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGA

[0084] GAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGCACAGAGTCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGG

[0085] AAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAG

[0086] AAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAA GAGCAACTGAA

[0087] AGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTT TGCCGAGGAGG

[0088] GTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAA

[0089] SEQ ID NO :9. GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

[0090] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGCTGGT

[0091] GAAAGGCGGGGGTGCTCCACCACCACCACCACCACCACCACCATCTCCGGAGGCGGTGATGCACA CAAGAGTGAGG

[0092] TTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAG

[0093] TGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGA

[0094] AAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAA

[0095] TGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACC CAAACCTCCCC

[0096] CGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAA AAATACTTATA

[0097] TGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGC TGCTTTTACAG

[0098] AATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGA AGGCTTCGTCT

[0099] GCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAG

[0100] CCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCC

[0101] ATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTGATCTCCAGT

[0102] AAAGTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGC

[0103] TGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTGCAAAAATATGCTGAGGCAAAAGATGTCTTCC

[0104] TGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATAT

[0105] GAAACCACTCTAGAGAAGTGTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTGATGAAATTAACCTCT

[0106] TGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGAGAGTACAAATTCCAGAATGCGC

[0107] TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGCAACTCCAACCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTG

[0108] GGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCACTT

[0109] ATGTGTGTTGCATGAGAAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGCACAGAGTCCTTGGTGAAAGGCGACCAT

[0110] GCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATATA

[0111] TGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAAC

[0112] AAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCT

[0113] GCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAA

[0114] SEQ ID NO :10. GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

[0115] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGT

[0116] GAAAGGCGGTGGATCTTCTGGTGCTCCACCACCATCTGGTGGTGGAGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGGGGTT

[0117] CAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCC

[0118] TTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATG

[0119] TGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTGGAGACAAATTATGCAC

AGTTGCAACTC

[0120] TTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCT
TGCAACACAAA

[0121] GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGAC
AATGAAGAGAC

[0122] ATTTTGTAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGAACTCCTTTT
CTTTGCTAAAA

[0123] GGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAGCTCG
ATGAACTTCGG

[0124] GATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGA
GCTTTCAAAGC

[0125] ATGGGCAGTAGCTCGCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGAC
AGATCTTACCA

[0126] AAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGT
ATATCTGTGAA

[0127] AATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGC
ATTGCCGAAGT

[0128] GGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCCTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTG
CAAAAATATG

[0129] CTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTG
TCGTGCTGCTG

[0130] CTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGC
TATGCCAAAGT

[0131] GTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGA
GCAGCTTGGAG

[0132] AGTACAAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGCAACTCCAACCTC
TTGTAGAGGTC

[0133] TCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCA
GAAGACTATCT

[0134] ATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATG
CTGCACAGAGT

[0135] CCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTA
ATGCTGAAACA

[0136] TTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTT
GTTGAGCTTGT

[0137] GAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGA
GAAGTGCTGCA

[0138] AGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAATGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCT
TAGGCTTATAA

[0139] 编码含有 GLP-1 类似物融合蛋白的核苷酸序列可以通过本领域技术人员熟知的任何适当的技术制备。包括但不限于重组 DNA 技术、化学合成等方法；也可以先合成具有 GLP-1 氨基酸序列的核苷酸序列，然后通过定点突变、定向诱变或以其它本领域熟知的技术来插入、替换、剔除序列以获得所需的核苷酸序列。

[0140] 编码载体蛋白的核苷酸序列可以通过本领域技术人员熟知的任何适当的技术制备。在本发明的一个具体实施例中，载体蛋白的核苷酸序列为编码人血清白蛋白的核苷酸序列或至少 95% 的序列与其一致。

[0141] 编码 GLP-1 类似物核苷酸序列和编码载体蛋白的核苷酸序列之间的融合技术见于本领域的一般描述，如《分子克隆实验指南》（J. 萨姆布鲁克等，科学出版社，1995）

[0142] 本发明第三方面，公开了一种制备前述融合蛋白的方法，该方法包括：构建含有融合蛋白基因序列的表达载体，然后将含有融合蛋白基因序列的表达载体转化至宿主细胞中诱导表达，从表达产物中分离获得所述的融合蛋白。

[0143] 构建含有融合蛋白基因序列的表达载体，可通过先合成编码 GLP-1 类似物的核苷酸序列，而后再将此核苷酸序列与编码人血清白蛋白的核苷酸序列融合并构建至合适表达载体中获得。

[0144] 有表达 GLP-1 类似物融合蛋白的基因序列可以通过本领域技术人员熟知的表达系统表达，包括但不限于用重组噬菌体、质粒等载体转化的细菌，用酵母表达载体转化的酵母，用真菌载体转化的丝状真菌、用病毒载体感染的昆虫细胞、动物细胞等等。在本发明的一个具体实施例中，表达系统选用巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）分泌形式表达，巴斯德毕赤酵母具有高水平表达、成本低、以及具有真核表达系统的蛋白质加工、折叠、翻译后修饰的优点。在具体生产中，细胞可以在实验室中通过摇瓶培养，或者通过发酵罐发酵培养（包括连续、分批、补料分批和固体状态发酵）。

[0145] 分泌到培养基的融合蛋白可以通过本领域技术人员熟知的方法纯化，包括但不限于超滤、硫酸铵沉淀、丙酮沉淀、以及离子交换层析、疏水层析、反相层析、分子筛层析等。在本发明的一个具体实施例中，发明者采用联合亲和层析、疏水层析和离子交换层析的三层层析手段使融合蛋白纯化到均一。

[0146] 本发明第四方面，公开了所述 GLP-1 类似物融合蛋白在制备治疗糖尿病及相关疾病药物上的用途。

[0147] 本发明第五方面，公开了一种药物组合物，含有前述 GLP-1 类似物融合蛋白及至少一种药学可接受的载体或赋形剂。

[0148] 所述药物组合物的主要用途为治疗糖尿病及相关疾病。所述相关疾病包括：II 型糖尿病、I 型糖尿病、肥胖、II 型糖尿病患者严重心血管事件和其他严重并发症等（Madsbad S, Kielgast U, Asmar M, et al. *Diabetes Obes Metab*. 2011May;13(5):394-407; Issa CM, Azar ST. *Curr Diab Rep*, 2012Oct;12(5):560-567; Neff LM, Kushner RF. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2010Jul20;3:263-273; Sivertsen J, Rosenmeier J, Holst JJ, et al. *Nat Rev Cardiol*, 2012Jan31;9(4):209-222)。

[0149] 本领域技术人员已知的治疗惰性的无机或有机的载体包括（但不限于）糖类或其衍生物、氨基酸类或其衍生物、表面活性剂、植物油、蜡、脂肪、多羟基化合物例如聚乙二醇、醇类、甘油，各种防腐剂、抗氧化剂、稳定剂、盐、缓冲液，水、诸如此类也可加入其中，这些物

质根据需要用于帮助配方的稳定性或有助于提高活性或它的生物有效性。

[0150] 本发明的药物组合物可以用本领域技术人员所熟知的技术配制,包括液体或凝胶体,冻干的或其他形式,以产生储存稳定的适合对人或动物给药的药物。

[0151] 本发明第六方面,公开了一种治疗糖尿病及其相关疾病的方法,为向对象施用本发明的 GLP-1 类似物融合蛋白。

[0152] 前述融合蛋白用于治疗包括患有非胰岛素依赖型和胰岛素依赖型糖尿病、肥胖及多种其他疾病患者的方法可参考现有的 GLP-1 类药物制剂,如 Byetta® (GLP-1 类似肽), Albugon® (GLP-1/HSA 融合蛋白), Dulaglutide® ((GLP-1/Fc 融合蛋白))等,其使用剂量范围为 0.05-1 毫克/公斤。

[0153] 本发明的蛋白质可以单独给药,或以各种组合给药,以及与其它治疗药剂一起结合形式给药。

[0154] 本发明使用以下缩写:

[0155] GLP-1(glucagon like protein-1) 胰高血糖素样肽 -1 ;HSA(human serum albumin) 人血清白蛋白。

附图说明

[0156] 图 1 不同结构 GLP-1 类似物融合蛋白表达电泳图,泳道 1-9 分别为表 1 所述 1-9 号序列融合蛋白表达结果。

[0157] 图 2 正常恒河猴单次皮下注射 GLP-1 类似物融合蛋白药效动力学试验

[0158] A:GLP-1-E3-HSA 皮下注射 1 天后进行分级葡萄糖输注时恒河猴的血糖水平

[0159] B:GLP-1-E3-HSA 皮下注射 4 天后进行分级葡萄糖输注时恒河猴的血糖水平

[0160] C:GLP-1-E3-HSA 皮下注射 1 天后进行分级葡萄糖输注时恒河猴的胰岛素水平

[0161] D:GLP-1-E3-HSA 皮下注射 4 天后进行分级葡萄糖输注时恒河猴的胰岛素水平

[0162] 图 3 猕猴单次给药后药物-时间曲线图

[0163] 序列说明:

[0164] SEQ ID NO :1. GLP-1 类似物氨基酸序列

[0165] SEQ ID NO :2. HSA 氨基酸序列

[0166] SEQ ID NO :3. GLP-1 类似物融合蛋白氨基酸序列

[0167] SEQ ID NO :4. GLP-1 类似物融合蛋白氨基酸序列

[0168] SEQ ID NO :5. GLP-1 类似物融合蛋白氨基酸序列

[0169] SEQ ID NO :6. GLP-1 类似物核苷酸编码序列

[0170] SEQ ID NO :7. HSA 核苷酸编码序列

[0171] SEQ ID NO :8. GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

[0172] SEQ ID NO :9. GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

[0173] SEQ ID NO :10. GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

具体实施方式

[0174] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实

施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0175] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组 DNA 技术及相关领域的常规技术。

[0176] 实施例 1 重组融合蛋白表达质粒构建

[0177] GLP-1 类似物核苷酸编码序列(SEQ ID NO :6):

[0178] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAA

[0179] 1. 13' 端带 HSA 融合片段的 (GLP-1 类似物)₂ 基因片段:

[0180] 人工合成如下寡核苷酸序列(SEQ ID NO :17):

[0181] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAACACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0182] 其中,单划线部分为 (GLP-1 类似物)₂ 基因序列,其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0183] 1. 23' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₃ 基因片段

[0184] 人工合成如下寡核苷酸序列(SEQ ID NO :18):

[0185] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGTGGTGGAGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGGGTTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0186] 其中,单划线部分为 GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₃ 基因序列,其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0187] 1. 33' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₄ 基因片段

[0188] 人工合成如下寡核苷酸序列(SEQ ID NO :19):

[0189] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGTGGAGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCCGGAGGCGGGGTTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0190] 其中,单划线部分为 GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₄ 基因序列,其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0191] 1. 43' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E1 基因片段

[0192] 人工合成如下寡核苷酸序列(SEQ ID NO :20):

[0193] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGTGGTGGATCTTCTCCACCACCAGGTGGTGGAGGCTCTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0194] 其中,单划线部分为 GLP-1 类似物-E1 基因序列,其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0195] 1. 53' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E2 基因片段

[0196] 人工合成如下寡核苷酸序列(SEQ ID NO :21):

[0197] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATT

GCTTGGCTGGTGAAAGGTGGAGGCTCTTCAGGTGGAGGCTCTTCACCACCACCAGCTGGTGGAGGCTCTTCAGGTGGAGGCTCTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0198] 其中，单划线部分为 GLP-1 类似物 -E2 基因序列，其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0199] 1. 63' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物 -E3 基因片段

[0200] 人工合成如下寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:22):

[0201] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCGGGGGTGCTCCACCACCACCACCACCACCACCACCATCTCCGGAGGCGGTGATGCACACAAGAGTGAGG

[0202] 其中，单划线部分为 GLP-1 类似物 -E3 基因序列，其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0203] 1. 73' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物 -E4 基因片段

[0204] 人工合成如下寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:23):

[0205] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGCTGGCGGGGGTGCTGCTGGAGGCGGGTCTCTGGCGGGGGTCCACCACCACCAGGAGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0206] 其中，单划线部分为 GLP-1 类似物 -E4 基因序列，其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0207] 1. 83' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物 -E5 基因片段

[0208] 人工合成如下寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:24):

[0209] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGTGGATCTTCTGGTGCTCCACCACCACCAGGAGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0210] 其中，单划线部分为 GLP-1 类似物 -E5 基因序列，其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0211] 1. 93' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物 -E6 基因片段

[0212] 人工合成如下寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:25):

[0213] CACGGCGAAGGGACCTTTACCAGTGATGTAAGTTCTTATTTGGAAGAGCAAGCTGCCAAGGAATTCATTGCTTGGCTGGTGAAAGGCGGTGGATCTTCTGGTGCTCCACCACCATCTGGTGGTGGAGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCGGAGGCGGGGGTTCAGATGCACACAAGAGTGAGG

[0214] 其中，单划线部分为 GLP-1 类似物 -E6 基因序列，其余部分为 HSA N 端部分编码序列。

[0215] E1:GGGSSPPPGGGSS (SEQ ID NO:11)

[0216] E2:GGGSSGGGSSPPAGGGSSGGGSS (SEQ ID NO:12)

[0217] E3:GGGAPPPPPPPSSGGG (SEQ ID NO:13)

[0218] E4:AGGGAAGGSSGGGPPPPGGGSS (SEQ ID NO:14)

[0219] E5:GGSSGAPPPGGGSS (SEQ ID NO:15)

[0220] E6:GGSSGAPPSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO:16)

[0221] 注:(Xaa)x-(Pro)y-(Xaa)z, 其中 Xaa 为 G,A,S 中的一种或几种的任意组

合, $x, z \geq 3, 26 \geq x+y+z \geq 14, 10 \geq y \geq 3, 1 \geq y/(x+z) \geq 0.13$ 。连接肽 N 端与第一区 C 末端以肽键相连, C 端与 HSA 的 N 端以肽键相连。

[0222]

增强域	X	Y	Z	X+Y+Z	Y/X+Z
E1	5	3	6	14	0.272727
E2	10	3	11	24	0.142857
E3	4	10	7	21	0.909091
E4	14	5	5	24	0.263158
E5	6	4	5	15	0.363636
E6	7	3	16	26	0.130435

[0223] 2. HSA 基因的扩增

[0224] HSA 核苷酸编码序列 (SEQ ID NO :7) :

[0225] GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTG
TTGATTGCCTT

[0226] TGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGC
AAAAACATGTG

[0227] TTGCTGATGAGTCAGCTGAAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAG
TTGCAACTCTT

[0228] CGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTG
CAACACAAAGA

[0229] TGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAA
TGAAGAGACAT

[0230] TTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCCTTTTCT
TTGCTAAAAGG

[0231] TATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAGCTCGAT
GAACTTCGGGA

[0232] TGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGC
TTTCAAAGCAT

[0233] GGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAG
ATCTTACCAA

[0234] GTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTAT
ATCTGTGAAAA

[0235] TCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCAT
TGCCGAAGTGG

[0236] AAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCA
AAAATATGCT

[0237] GAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTC
GTGCTGCTGCT

[0238] GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTA

TGCCAAAGTGT

[0239] TCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGGAGAG

[0240] TACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCTGTAGAGGTCTC

[0241] AAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAGACTATCTAT

[0242] CCGTGGTCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGCACAGAGTCC

[0243] TTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATT

[0244] CACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTGTAGCTTGTGA

[0245] AACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGAGTGCTGCAAG

[0246] GCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAA

[0247] 引物设计：

[0248] GLP-1/P1 (SEQ ID NO:26):5'-TCTCTCGAGAAAAGACACGGCGAAGGGACCTTTACCAAGT-3' (XhoI 酶切位点)

[0249] HSA/P1 (SEQ ID NO:27):5'-GATGCACACAAGAGTGAGG-3'

[0250] HSA/P2 (SEQ ID NO:28):5'-TTAGCGGCCGCTTATAAGCCTAAGGCAGCTTG-3' (NotI 酶切位点)

[0251] 以 Human Serum Albumin/HSA/ALB Gene cDNA Clone/ORF Clone 基因(北京义翘神州生物技术有限公司)为模板, HSA/P1 与 HSA/P2 为引物, 扩增 HSA 片断, PCR 体系为: 模板 0.5 μ l, 25 μ mol/L 的 HSA/P1 与 HSA/P2 引物各 1 μ l, 2mmol/L 的 dNTP4 μ l, 5xPS 反应缓冲液 10 μ l, PrimeStar DNA 聚合酶 2.5 U, ddH₂O 补充体积至 50 μ l。

[0252] PCR 条件为: 98℃ 变性 10 分钟, 68℃ 1 分 48 秒, 25 个循环后, 4℃ 保温。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1750bp 的条带。

[0253] 3. 融合基因的扩增

[0254] 3.1 (GLP-1 类似物)₂-HSA 融合基因的扩增

[0255] 将 (GLP-1 类似物)₂ 基因片段与 HSA 的 PCR 产物等摩尔混合作为模板, GLP-1/P1 和 HSA/P2 为引物, 扩增 (GLP-1 类似物)₂-HSA, PCR 体系为: 0.5 μ l 模板, 25 μ mol/L 的 GLP-1/P1 和 HSA/P2 引物各 1 μ l, 2mmol/L 的 dNTP4 μ l, 5xPS 反应缓冲液 10 μ l, PrimeStar DNA 聚合酶 2.5 U, ddH₂O 补充体积至 50 μ l。PCR 条件: 98℃ 10 秒, 68℃ 2 分 30 秒, 25 个循环后 4℃ 保温。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1950bp 的条带。

[0256] 3.2 GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₃-HSA 融合基因的扩增

[0257] GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₃ 基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板, PCR 体系及 PCR 条件同 3.1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1930bp 的条带。

[0258] 3. 3GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₄-HSA 融合基因的扩增

[0259] GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₄基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板,PCR 体系及 PCR 条件同 3. 1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1950bp 的条带。

[0260] 3. 4GLP-1 类似物-E1-HSA 融合基因的扩增

[0261] GLP-1 类似物-E1 基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板,PCR 体系及 PCR 条件同 3. 1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1930bp 的条带。

[0262] 3. 5GLP-1 类似物-E2-HSA 融合基因的扩增

[0263] GLP-1 类似物-E2 基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板,PCR 体系及 PCR 条件同 3. 1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1960bp 的条带。

[0264] 3. 6GLP-1 类似物-E3-HSA 融合基因的扩增

[0265] GLP-1 类似物-E3 基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板,PCR 体系及 PCR 条件同 3. 1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1940bp 的条带。

[0266] 3. 7GLP-1 类似物-E4-HSA 融合基因的扩增

[0267] GLP-1 类似物-E4 基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板,PCR 体系及 PCR 条件同 3. 1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1960bp 的条带。

[0268] 3. 8GLP-1 类似物-E5-HSA 融合基因的扩增

[0269] GLP-1 类似物-E5 基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板,PCR 体系及 PCR 条件同 3. 1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1930bp 的条带。

[0270] 3. 9GLP-1 类似物-E6-HSA 融合基因的扩增

[0271] GLP-1 类似物-E6 基因片段与 HSA 的 PCR 产物的等摩尔混合物为模板,PCR 体系及 PCR 条件同 3. 1, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳切胶回收分子量约 1970bp 的条带。

[0272] 4. 融合蛋白表达质粒的构建

[0273] 4. 1 (GLP-1 类似物)₂-HSA 表达质粒的构建

[0274] 先对表达载体质粒 pPIC9 进行 XhoI、NotI 双酶切。具体条件如下:表达载体质粒 pPIC9, 10 μl; XhoI 1 μl, NotI 1 μl, 10× 酶切缓冲液(H) 4 μl (购自 Takara 公司); ddH₂O 24 μl, 总体积 40 μl。(GLP-1 类似物)₂-HSA 片段做同样的双酶切。37℃ 恒温水浴箱内反应 2 小时,通过琼脂糖凝胶电泳回收线性化的质粒 DNA 和 (GLP-1 类似物)₂-HSA 基因片段。将回收的载体和基因片段连接构建融合蛋白表达质粒 (GLP-1 类似物)₂-HSA/pPIC9。连接体系一般为 10 μl,载体和基因片段的摩尔比为 1:2-10, 10×T4DNA ligase 缓冲液 1 μl, T4DNA ligase 1 μl,加无菌水至总体积 10 μl。连接反应于 16℃ 恒温水浴锅内反应 1 小时。连接产物转化 E. coli Top10 感受态细胞,转化克隆斑用通用引物 5' AOX1 和 3' AOX1 为引物 PCR 鉴定,将鉴定正确的克隆的菌液送金斯瑞生物技术公司,使用通用引物 5' AOX1 和 3' AOX1 进行测序。经测序验证符合预期。

[0275] 4. 2GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₃-HSA 表达质粒的构建

[0276] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₃-HSA 融合基因替代外,其余均同 4. 1,测序验证符合预期。

[0277] 4. 3GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₄-HSA 表达质粒的构建

[0278] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物-(Gly₄Ser)₄-HSA 融合基因替代外,其余均同 4. 1,测序验证符合预期。

[0279] 4. 4GLP-1 类似物 -E1-HSA 表达质粒的构建

[0280] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物 -E1-HSA 融合基因替代外,其余均同 4.1,测序验证符合预期。

[0281] 4. 5GLP-1 类似物 -E2-HSA 表达质粒的构建

[0282] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物 -E2-HSA 融合基因替代外,其余均同 4.1,测序验证符合预期。

[0283] 4. 6GLP-1 类似物 -E3-HSA 表达质粒的构建

[0284] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物 -E3-HSA 融合基因替代外,其余均同 4.1,测序验证符合预期。

[0285] 4. 7GLP-1 类似物 -E4-HSA 表达质粒的构建

[0286] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物 -E4-HSA 融合基因替代外,其余均同 4.1,测序验证符合预期。

[0287] 4. 8GLP-1 类似物 -E5-HSA 表达质粒的构建

[0288] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物 -E5-HSA 融合基因替代外,其余均同 4.1,测序验证符合预期。

[0289] 4. 9GLP-1 类似物 -E6-HSA 表达质粒的构建

[0290] 除融合蛋白基因片段采用 GLP-1 类似物 -E6-HSA 融合基因替代外,其余均同 4.1,测序验证符合预期。

[0291] 实施例 2 融合蛋白表达工程菌的构建

[0292] 分别挑选含有 (GLP-1 类似物)₂-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -(Gly₄Ser)₃-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -(Gly₄Ser)₄-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -E1-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -E2-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -E3-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -E4-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -E5-HSA/pPIC9、GLP-1 类似物 -E6-HSA/pPIC9 表达载体质粒的细菌克隆,分别提取各表达载体质粒,然后分别用 SalI 线性化各质粒,通过琼脂糖凝胶电泳回收线性化的各质粒 DNA,最后用电转化的方法分别把各线性化质粒转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中。电击完后马上加入 1ml 1M 山梨醇溶液将菌体混匀,转至 1.5ml 离心管中,30℃ 静置 1.5 小时后将菌体悬液涂布于 RDB 选择性平板上,每 300 μl 涂布一块平板。将平板置于 30℃ 培养,直至单菌落出现,将获得的阳性菌落转至新鲜的 RDB 平板上培养 24h 后,分别挑取在 RDB 平板上长出对应各 GLP-1 类似物融合蛋白的单菌落接于 10ml BMGY 培养基中,30℃、250rpm 培养 24 小时,静置沉淀后弃上清,用 10ml BMMY (2% 甲醇)重悬,30℃、250rpm 诱导 48 小时,离心取上清进行 10%SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的表达,如果条带大小符合预期,将融合蛋白 N 端测序,测序结果符合预期的单菌落即为各 GLP-1 类似物融合蛋白的表达工程菌株。

[0293] 线性化质粒具体条件如下:表达载体质粒 60 μl, SalI 2.5 μl, 10x 缓冲液 (H) 20 μl, ddH₂O 补至总体积 200 μl。37℃ 恒温水浴箱内反应 3 小时,

[0294] 感受态细胞制备具体方法如下:先进行菌体的准备,挑取酵母单菌落,接种至含有 5ml YPD 培养基的 50ml 三角瓶中,30℃、250rpm 培养过夜。然后取 30 μl 的培养物接种至含有 50ml YPD 培养基的 250ml 三角瓶中,30℃、250rpm 培养过夜,至 OD₆₀₀ 达到 1-1.5。再将细胞培养物于冰上预冷 10min 后,于 4℃,1500g 离心 5min,弃上清,用 40ml 的预冷的无菌水将菌体沉淀重悬。离心后,再用 25ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬。再离心,用

5ml 的冰预冷的 1M 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬,再离心,用 80 μ l 的冰预冷的 1M 山梨醇溶液将菌体沉淀重悬。

[0295] 电转化具体方法如下:将 10 μ l 线性化质粒与 80 μ l 的上述感受态菌体混匀,转至 0.2cm 冰预冷的电转化杯中。将电转化杯冰浴 5min,然后用 1500V 电压进行电击。

[0296] 实施例 3GLP-1 类似物融合蛋白的制备

[0297] 参考毕赤酵母表达手册(A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Invitrogen Corporation)将实施例 2 获得的表达各 GLP-1 类似物融合蛋白的菌种接种于 YPD 培养基,30℃ 220 ~ 280rpm 振荡培养至菌体湿重约 50g/L,按 10%接种量进罐(Biostat C10, Sartorius),30℃,pH5.0,30% 饱和度溶氧培养 20h 后连续流加甲醇开始诱导,控制溶氧 40%饱和度,诱导 4h 后将温度降低到 22℃,50h 后结束诱导,用 10000g 离心 15min 收集发酵上清液。

[0298] 纯化采用 BLUE 亲和、PHE 疏水、DEAE 离子交换和凝胶排阻四步层析。首先将发酵上清液用 20mM pH7.0 磷酸钠溶液稀释 3 倍,过 Blue Sepharose Fast Flow(XK50/20, GE healthcare)亲和层析柱,用 PBS 平衡后,再用 2M NaCl,20mM pH6.5 磷酸钠溶液洗脱目的蛋白。向所收蛋白溶液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使终浓度达到 0.5M,过 PHE Sepharose Fast Flow(XK50/20, GE healthcare)层析柱,经 0.6M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液平衡后,用 5mM pH6.5 磷酸钠缓冲液洗脱蛋白。将收到的蛋白再用 5mM pH6.5 磷酸钠缓冲液稀释 2 倍后过离子交换层析,采用 DEAE Sepharose Fast Flow(XK50/20, GE healthcare)层析柱,直接用 PBS 洗脱目的蛋白。最后通过 Sephadex G25coarse(XK50/60, GE healthcare)凝胶层析柱脱盐置换到 5mM pH6.5 磷酸钠缓冲液中。将表达上清和纯化的融合蛋白分别用非还原 SDS-PAGE 分析。如图 1 所示,不同结构的 GLP-1 类似物融合蛋白在表达时的稳定性就有较大差异,其中 (GLP-1 类似物)₂-HSA 稳定性最差。

[0299] 实施例 4 体外活性试验

[0300] 根据文献(Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burren N, Feng L, Whitney M, Roemer K, Tsien RY. Science. 279(5347):84-8. (1998)),构建带有人 GLP-1 受体和 CRE-Luc 报告基因的 HEK-293 细胞,以 50000 细胞/孔/200 μ l 含 10%FBS 的 DMEM 培养基接种到 Costar96 孔细胞培养板中。接种后第二天,吸掉培养液,将含 500 μ M IBMX、梯度稀释的 GLP-1 类似物融合蛋白的无血清 DMEM 培养液 50 μ l 加入各孔,孵育 5-6 小时后,加入 50 μ l 荧光素酶底物(Bright-GloTM Luciferase Assay System, Promega, E2620),反应 2 分钟,转移到 costar96 孔全白微孔板中,在多功能酶标仪(SpectraMax M5system, Molecular Device)上测定荧光值,根据荧光值描绘剂量反应曲线,确定 EC₅₀ 值。以 (GLP-1 类似物)₂-HSA 的活性为 100%计,计算各融合蛋白的相对活性。结果见表 1, Gly₄Ser 作为连接肽,其体外活性与 GLP-1 类似物作为连接肽基本相似;而当 GLP-1 类似物与 HSA 之间插入一段如权利要求 1 所述的序列后(序列 E1-E6),融合蛋白的体外活性提高了 7-10 倍左右。

[0301] 表 1

[0302]

融合蛋白	相对活性(%)	标准差
------	---------	-----

1 (GLP-1 类似物) ₂ -HSA	100	17
2GLP-1 类似物-(Gly ₄ Ser) ₃ -HSA	103	18
3GLP-1 类似物-(Gly ₄ Ser) ₄ -HSA	108	22
4GLP-1 类似物-E1-HSA	752	98
5GLP-1 类似物-E2-HSA	823	124
6GLP-1 类似物-E3-HSA	1108	89
7GLP-1 类似物-E4-HSA	957	141
8GLP-1 类似物-E5-HSA	1003	125
9GLP-1 类似物-E6-HSA	763	99

[0303] 实施例 5 体外稳定性分析

[0304] 取高度纯化的 GLP-1 类似物融合蛋白原液,加入适量的氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠,用氢氧化钠或盐酸调 pH7.4,再加注射用水使每毫升含 GLP-1 类似物蛋白 5.0mg,氯化钠 9mg,磷酸盐 20 μmol。用 0.22 μm 的 PVDF 或 PES 滤膜过滤除菌,100 级环境下无菌封装于西林瓶,样品存放于稳定性试验箱,保存温度 25℃,在 0,1,3 个月时取样保存于 -70 度冰箱待检。合并所有待分析样品检测 SDS-PAGE 纯度和细胞生物学活性。SDS-PAGE 纯度检测方法如实施例 1 所述,待检样品的上样量为 10ug。另上自身对照 1ug,0.5ug,0.2ug,0.1ug,0.05ug,经光密度扫描,获得标准曲线,计算各杂蛋白含量百分比,最终算得融合蛋白纯度。体外活性测定方法如实施例 4 所述,以各样品 0 个月时活性为 100% 计。活性测定前样品用 Superdex7510/30 分子筛柱 (GE Healthcare) 分离去除分子量小于 10000Da 的降解片段,避免其对测活的干扰。结果见表 2, GLP-1 类似物与 HSA 之间插入 GLP-1 类似物作为连接肽时,活性保留率最差,融合蛋白最不稳定。

[0305] 表 2

	融合蛋白	SDS-PAGE 纯度 (%)			活性保留率 (%)		
		0	1	3	0	1	3
[0306]	1 (GLP-1 类似物) ₂ -HSA	97.1	65.3	34.3	100	45.4	13.5
	2 GLP-1 类似物-(Gly ₄ Ser) ₃ -HSA	97.3	84.3	67.3	100	79.0	47.2
	3 GLP-1 类似物-(Gly ₄ Ser) ₄ -HSA	98.0	89.4	66.0	100	85.5	45.3
	4 GLP-1 类似物-E1-HSA	97.5	93.4	77.9	100	97.6	60.6
	5 GLP-1 类似物-E2-HSA	98.3	94.3	72.8	100	93.4	57.9

[0307]	6	GLP-1 类似物-E3-HSA	97.9	95.1	77.3	100	91.7	49.8
	7	GLP-1 类似物-E4-HSA	97.5	94.8	75.2	100	96.2	55.6
	8	GLP-1 类似物-E5-HSA	98.4	95.7	81.2	100	93.3	47.2
	9	GLP-1 类似物-E6-HSA	98.2	96.7	80.1	100	91.7	53.9

[0308] 实施例 6 血清稳定性分析

[0309] 取纯化后的高浓度 GLP-1 类似物融合蛋白原液,按体积比 1:25 加入到猴血清中,过滤除菌,无菌封装到西林瓶中,37℃ 孵育。于第 0 天,15 天,30 天取样保存于 -70 度冰箱待检。合并所有待分析样品,以 Anti-GLP-1 单抗(Antibodyshop)为捕捉抗体,Goat anti-Human Albumin-HRP (Bethyl Laboratories)为检测抗体通过夹心 ELISA 法测定融合蛋白浓度。因为捕捉抗体结合于融合蛋白 GLP-1 类似物部分,检测抗体结合于白蛋白部分,因此测定的融合蛋白浓度与未降解部分含量正相关。结果见表 3,30 天后猴血清中 (GLP-1 类似物)₂-HSA 大部分已经降解,而其他样品保留了将近 40%。

[0310] 表 3 血清中融合蛋白含量随时间变化情况

[0311]

	融合蛋白	融合蛋白含量 (%)		
		0	15 天	30 天
1	(GLP-1 类似物) ₂ -HSA	100	37.4	17.8
2	GLP-1 类似物-(Gly ₃ Ser) ₃ -HSA	100	65.4	34.3
3	GLP-1 类似物-(Gly ₃ Ser) ₄ -HSA	100	69.3	37.6
4	GLP-1 类似物-E1-HSA	100	74.5	44.9
5	GLP-1 类似物-E2-HSA	100	72.0	41.2
6	GLP-1 类似物-E3-HSA	100	66.3	45.5
7	GLP-1 类似物-E4-HSA	100	73.2	48.2
8	GLP-1 类似物-E5-HSA	100	75.4	55.3
9	GLP-1 类似物-E6-HSA	100	76.9	45.1

[0312] 注:以 0 天测定的浓度为 100% 计。

[0313] 实施例 7 小鼠腹腔注射葡萄糖耐受试验

[0314] 32 只 KM 小鼠,雌雄各半,过夜禁食不禁水 18 小时,皮下注射 1.0mg/kg 的 HSA (对照组)、(GLP-1 类似物)₂-HSA、GLP-1 类似物-E3-HSA 和 GLP-1 类似物-E6-HSA。给药 1、8 小时后分别进行腹腔注射葡萄糖耐受试验(IPGTT):腹腔注射 1.5g/kg 葡萄糖,注射葡萄糖前(t=0)及注射后 10、20、30、60、90、120 分钟后取血测定血液中葡萄糖含量(YSI2700 型生化分析仪)。与对照组(HSA 组)比较,(GLP-1 类似物)₂-HSA、GLP-1 类似物-E3-HSA 和 GLP-1 类似物-E6-HSA 组小鼠血糖显著降低,血糖曲线峰下面积(AUC_{0-120min})均显著低于对照组(结果见表 4)。其中,给药 1 小时后进行 IPGTT 时,三组间各个时间点血糖水平类似,血糖曲线峰下面积(AUC_{0-120min})也相似,组间无显著性差异(P>0.05);但在给药 8 小时后进行 IPGTT 时,10-30min GLP-1 类似物-E3-HSA 和 GLP-1 类似物-E6-HSA 组的血糖水平要显著低于 (GLP-1 类似物)₂-HSA,血糖 AUC_{0-120min}也显著低于 (GLP-1 类似物)₂-HSA 组(P<0.01)。结果表明,(GLP-1 类似物)₂-HSA 和 GLP-1 类似物-E3-HSA 均能有效降低小鼠空腹血糖,并具有

长效特性,但 GLP-1 类似物 -E3-HSA 和 GLP-1 类似物 -E6-HSA 组较 (GLP-1 类似物)₂-HSA 组具有更显著和持续的降糖效果。

[0315] 表 4KM 小鼠单次药后 1h 和 8h IPGTT 血糖峰下面积 $AUC_{0-120min}$

[0316]

Time	Animal group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean	SEM
1h	HSA	818	713	724	778	817	1028	1220	688	1005	1096	889	184
	(GLP-1 类似物) ₂ -HSA	544	692	679	640	528	727	589	763	671	649	648	76
	GLP-1 类似物-E3-HSA	775	645	596	501	563	520	690	688	553	643	617	86
	GLP-1 类似物-E6-HSA	654	731	638	602	554	498	512	620	578	621	601	69
8h	HSA	735	746	772	831	883	717	882	933	859	854	821	74
	(GLP-1 类似物) ₂ -HSA	691	585	762	570	580	656	705	430	496	642	612	100
	GLP-1 类似物-E3-HSA	447	528	525	469	562	348	515	624	527	358	490	87
	GLP-1 类似物-E6-HSA	502	485	445	412	450	520	471	465	542	399	469	45

[0317] 实施例 8 正常恒河猴单次皮下注射 GLP-1 类似物融合蛋白药效动力学试验

[0318] 恒河猴单次皮下注射 0.5mg/kg 的 (GLP-1 类似物)₂-HSA 或 GLP-1 类似物 -E3-HSA, 24h 和 96h 后进行分级静脉注射葡萄糖试验: 静脉注射葡萄糖溶液 (20% 右旋糖溶液, 200mg/ml) 10mg/kg/min (3.0ml/kg/h) 持续 20min, 随后给予葡萄糖溶液 25mg/kg/min (7.5ml/kg/h) 持续 20min。葡萄糖注射后 0、10、20、30、40min 采集血液测定血糖和胰岛素。血糖测定使用 YSI2700 型生化分析仪, 胰岛素测定使用酶联免疫吸附方法 (Insulin ELISA 试剂盒, DRG International, Inc.)。两组间血糖在药后 1d 各时间点无显著差异 (结果见图 2)。, 给药后 4d 时 10、30、40min 组间有显著差异 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 组间胰岛素在药后 1d 和 4d 的 20、40min 时间点都具有显著差异 ($P<0.01$)。结果表明, GLP-1 类似物 -E3-HSA 较 (GLP-1 类似物)₂-HSA 能更好促进胰岛素分泌, 降低正常恒河猴分级静脉注射葡萄糖试验中血糖水平。

[0319] 实施例 9 食蟹猴单次给药药物代谢动力学研究

[0320] 食蟹猴单次皮下注射 0.5mg/kg 的 (GLP-1 类似物)₂-HSA 和 GLP-1 类似物 -E3-HSA, 分别于药前 ($t=0$)、药后 4、8、12、24、48、72、96、120、144、216h 采集血样并分离血清, -80 度冷冻保存后合并检验。以 Anti-GLP-1 单抗 (Antibodyshop) 为捕捉抗体, Goat anti-Human Albumin-HRP (Bethyl Laboratories) 为检测抗体测定血清中的融合蛋白浓度 (见图 3), 并计算药物代谢动力学参数 (见表 5)。研究表明 0.5mg/kg 的 GLP-1 类似物 -E3-HSA 在食蟹猴体内的半衰期为 102h (约 4d), 而 (GLP-1 类似物)₂-HSA 半衰期约为 60h (2.5d)。

[0321] 表 5

[0322]

parameters	(GLP-1 类似物) ₂ -HSA	GLP-1 类似物 -E3-HSA
C_{max} (ng/ml)	3954	4452
T_{max} (h)	24	24

[0323]

AUC _{0-∞} (ng/ml*h)	356210	516613
T _{1/2} (h)	60	102
CL (ml/h/kg)	1.404	0.968

[0324] 实施例 10 食蟹猴重复皮下给药免疫原性

[0325] 食蟹猴每周皮下注射一次 1mg/kg 的 (GLP-1 类似物)₂-HSA 和 GLP-1 类似物-E3-HSA, 连续给药 3 个月。给药前 (t=0)、给药后 1、2、3 个月分别采集血样并分离血清, -80 度冰冷冻保存后合并检验。使用酶联免疫吸附方法 (ELISA) 来测定可能产生的猴抗融合蛋白抗体。以对应的融合蛋白为包被物, 加入不同稀释度的待检血清样品, 用 mouse-anti-monkey IgG 为检测抗体来测定抗体的滴度。同时, 在相似的测定条件下, 待检血清样品中加入人血清白蛋白 (终浓度为 60 μM) 作为拮抗物, 来进一步分析产生的抗体特异性 (见表 6)。研究结果显示, 多次给药后两者均有抗体生成, 最高滴度达到 1:6400, 而且两者产生的抗体趋势与滴度基本一致。进一步在血清中加入人血清白蛋白 (HSA) 进行拮抗分析, 结果显示存在 HSA 时血清滴度显著下降, 说明所生成的抗体基本均被 HSA 所拮抗。因此说明猴反复注射融合蛋白后所生成的抗体大部分是针对融合蛋白中的人血清白蛋白部分, 而没有生成抗 GLP-1 类似物部分的抗体。

[0326] 表 6

[0327]

融合蛋白	动物号	抗融合蛋白抗体滴度				抗 GLP-1 类似物抗体滴度			
		药前	1 个月	2 个月	3 个月	药前	1 个月	2 个月	3 个月
(GLP-1 类似物) ₂ -HSA	1	N. D.	N. D.	1:1600	1:6400	N. D.	N. D.	N. D.	1:100
	2	N. D.	1:100	1:6400	1:6400	N. D.	N. D.	N. D.	1:200
	3	N. D.	N. D.	1:1600	1:1600	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
GLP-1 类似物-E3-HSA	4	N. D.	N. D.	N. D.	1:100	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	5	N. D.	1:100	1:6400	1:6400	N. D.	N. D.	1:100	N. D.
	6	N. D.	N. D.	1:1600	1:1600	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

[0328] 注抗体滴度 < 1:100 定义为未检出 (N. D.)

[0329] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效, 而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下, 对上述实施例进行修饰或改变。因此, 举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变, 仍应由本发明的权利要求所涵盖。

[0001]

序 列 表

<110> 泰康生物医药

<120> GLP-1 类似物融合蛋白, 及其制备方法和用途

<130> 130883

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys
          20           25

```

<210> 2

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1           5           10           15
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
          20           25           30
Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
          35           40           45
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
          50           55           60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
          65           70           75           80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
          85           90           95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
          100          105          110
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
          115          120          125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
          130          135          140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
          145          150          155          160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
          165          170          175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

```

[0002]

	180					185					190						
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu		
	195					200					205						
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro		
	210					215					220						
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys		
225						230					235					240	
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp		
	245										250					255	
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser		
	260					265					270						
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His		
	275					280					285						
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser		
	290					295					300						
Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala		
305						310					315					320	
Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg		
	325										330					335	
Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr		
	340					345					350						
Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu		
	355					360					365						
Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro		
	370					375					380						
Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu		
385						390					395					400	
Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro		
	405										410					415	
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys		
	420					425					430						
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys		
	435					440					445						
Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His		
	450					455					460						
Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser		
465						470					475					480	
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr		
	485										490					495	
Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp		
	500					505					510						
Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala		
	515					520					525						
Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu		
	530					535					540						

[0003]

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210> 3

<211> 627

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP-1 类似物融合蛋白的氨基酸序列

<400> 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ala His Lys Ser Glu
 35 40 45
 Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu
 50 55 60
 Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp
 65 70 75 80
 His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val
 85 90 95
 Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe
 100 105 110
 Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu
 115 120 125
 Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe
 130 135 140
 Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro
 145 150 155 160
 Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe
 165 170 175
 Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr
 180 185 190
 Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr
 195 200 205
 Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu
 210 215 220
 Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu
 225 230 235 240
 Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp

[0004]

				245						250					255				
Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu				
				260						265					270				
Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys				
				275						280					285				
His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys				
				290						295					300				
Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys				
				305						310					315				320
Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu				
				325						330					335				
Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val				
				340						345					350				
Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe				
				355						360					365				
Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser				
				370						375					380				
Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu				
				385						390					395				400
Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe				
				405						410					415				
Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln				
				420						425					430				
Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala				
				435						440					445				
Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr				
				450						455					460				
Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys				
				465						470					475				480
Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser				
				485						490					495				
Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser				
				500						505					510				
Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro				
				515						520					525				
Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe				
				530						535					540				
Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu				
				545						550					555				560
Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys				
				565						570					575				
His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp				
				580						585					590				

[0005]

Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr
 595 600 605
 Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala
 610 615 620
 Leu Gly Leu
 625

 <210> 4
 <211> 632
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> GLP-1 类似物融合蛋白的氨基酸序列
 <400> 4
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Ala
 20 25 30
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Gly Gly Asp
 35 40 45
 Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
 50 55 60
 Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
 65 70 75 80
 Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
 85 90 95
 Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
 100 105 110
 Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
 115 120 125
 Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
 130 135 140
 Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
 145 150 155 160
 Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
 165 170 175
 Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
 180 185 190
 His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
 195 200 205
 Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
 210 215 220
 Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg

[0006]

	245		250		255
Ala Phe Lys	Ala Trp Ala Val	Ala Arg Leu Ser	Gln Arg Phe	Pro Lys	
	260		265		270
Ala Glu Phe	Ala Glu Val Ser	Lys Leu Val Thr	Asp Leu Thr	Lys Val	
	275		280		285
His Thr Glu	Cys Cys His	Gly Asp Leu Leu	Glu Cys Ala	Asp Asp Arg	
	290		295		300
Ala Asp Leu	Ala Lys Tyr Ile	Cys Glu Asn Gln	Asp Ser Ile	Ser Ser	
305		310		315	320
Lys Leu Lys	Glu Cys Cys Glu	Lys Pro Leu Leu	Glu Lys Ser	His Cys	
	325		330		335
Ile Ala Glu	Val Glu Asn Asp	Glu Met Pro Ala	Asp Leu Pro	Ser Leu	
	340		345		350
Ala Ala Asp	Phe Val Glu Ser	Lys Asp Val Cys	Lys Asn Tyr	Ala Glu	
	355		360		365
Ala Lys Asp	Val Phe Leu Gly	Met Phe Leu Tyr	Glu Tyr Ala	Arg Arg	
370		375		380	
His Pro Asp	Tyr Ser Val Val	Leu Leu Leu Arg	Leu Ala Lys	Thr Tyr	
385		390		395	400
Glu Thr Thr	Leu Glu Lys Cys	Cys Ala Ala Asp	Pro His Glu	Cys	
	405		410		415
Tyr Ala Lys	Val Phe Asp Glu	Phe Lys Pro Leu	Val Glu Glu	Pro Gln	
	420		425		430
Asn Leu Ile	Lys Gln Asn Cys	Glu Leu Phe Glu	Gln Leu Gly	Glu Tyr	
	435		440		445
Lys Phe Gln	Asn Ala Leu Leu	Val Arg Tyr Thr	Lys Lys Val	Pro Gln	
450		455		460	
Val Ser Thr	Pro Thr Leu Val	Glu Val Ser Arg	Asn Leu Gly	Lys Val	
465		470		475	480
Gly Ser Lys	Cys Cys Lys His	Pro Glu Ala Lys	Arg Met Pro	Cys Ala	
	485		490		495
Glu Asp Tyr	Leu Ser Val Val	Leu Asn Gln Leu	Cys Val Leu	His Glu	
	500		505		510
Lys Thr Pro	Val Ser Asp Arg	Val Thr Lys Cys	Cys Thr Glu	Ser Leu	
	515		520		525
Val Asn Arg	Arg Pro Cys Phe	Ser Ala Leu Glu	Val Asp Glu	Thr Tyr	
530		535		540	
Val Pro Lys	Glu Phe Asn Ala	Glu Thr Phe Thr	Phe His Ala	Asp Ile	
545		550		555	560
Cys Thr Leu	Ser Glu Lys Glu	Arg Gln Ile Lys	Lys Gln Thr	Ala Leu	
	565		570		575
Val Glu Leu	Val Lys His Lys	Pro Lys Ala Thr	Lys Glu Gln	Leu Lys	
	580		585		590
Ala Val Met	Asp Asp Phe Ala	Ala Phe Val Glu	Lys Cys Cys	Lys Ala	
	595		600		605

[0007]

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
 610 615 620
 Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 625 630

<210> 5
 <211> 639
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> GLP-1 类似物融合蛋白的氨基酸序列
 <400> 5

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
 50 55 60
 Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
 65 70 75 80
 Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
 85 90 95
 Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
 100 105 110
 Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
 115 120 125
 Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
 130 135 140
 Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 145 150 155 160
 Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
 165 170 175
 Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 195 200 205
 Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 210 215 220
 Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 225 230 235 240
 Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 245 250 255
 Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg

[0008]

			260					265					270			
Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	
		275					280					285				
Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	
	290					295					300					
Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	
305					310					315					320	
Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	
			325						330				335			
Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	
		340						345				350				
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	
	355					360					365					
Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	
	370				375					380						
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	
385				390						395					400	
Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	
		405						410					415			
Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	
		420						425				430				
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	
	435					440				445						
Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	
	450					455				460						
Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	
465				470						475					480	
Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	
			485						490				495			
Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	
		500						505				510				
Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	
	515					520				525						
Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	
	530					535				540						
Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	
545				550						555					560	
Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	
		565						570					575			
Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	
		580						585				590				
Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	
	595					600				605						
Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	
	610					615				620						

[0009]

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

625 630 635

<210> 6

<211> 84

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

cacggcgaag ggacctttac cagtgaigta agttcttatt tggaagagca agctgccaaag 60
gaattcattg cttggctggg gaaa 84

<210> 7

<211> 1758

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gatgcacaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa 60
gccttgggtg tgattgcett tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta 120
aaatttagtga atgaagtaac tgaatttgcg aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa 180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactett 240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa 300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaacca aacctccccc gattgggtgag accagagggt 360
gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaaa atacttatat 420
gaaattgcca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tcttttctt tgcataaagg 480
tataaagctg ettttacaga atgttgccaa getgctgata aagetgectg cctgttgcca 540
aagetgatg aacttcggga tgaagggaag gettcgtcgc ccaaacagag actcaaggtg 600
gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaagcat gggeagtagc tcgctgagc 660
cagagatttc ccaaagctga gtttgagaa gtttccaaat tagtgacaga tcttaccaaa 720
gtccacacgg aatgetgcca tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt 780
gccaagtata tctgtgaaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa 840
aaacctctgt tggaaaaatc ccactgcatt gccgaagtgg aaaaatgatga gatccctgct 900
gacttgcctt cattagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct 960
gaggcaaagg atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcctctgat 1020
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc 1080
tgtgcccgtg cagatctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctett 1140
gtggaagagc ctcagaattt aatcaaacaa aattgtgagc tttttgagca gcttgagag 1200
tacaaattcc agaatgcgt attagttcgt tacaccaaga aagtaccca agtgtaact 1260
ccaactcttg tagaggtctc aagaaacctc ggaaggtgg gcagcaaatg ttgtaaacat 1320
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct gaaccagtta 1380
tgtgtgttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca caaatgctg cacagagtc 1440
ttggtgaaca ggcgacctg ctttcagct ctggaagtcg atgaaacata cgttcccaaa 1500
gagtttaatg ctgaaacatt caccctccat gcagatatat gcacacttgc tgagaaggag 1560
agacaaatca agnaacaaac tgcacttggt gagcttgtga aacacaagcc caaggcaaca 1620
aaagagcaac tgaagctgt lalggatgat ttgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag 1680
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttgttgc tgcaagtcaa 1740

[0010]

gctgccttag gcttataa		1758
<210>	8	
<211>	1884	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列	
<400>	8	
cacggcgaag ggaccctllac caglgatgla agllcttall lggaagagca agclgccaag	60	
gaattcattg cttggetggg gaaagggtgg ggatcttctc caccaccagg tgggtggagge	120	
tcttcagatg cacacaagag tgagggttgc catcggttta aagatttggg agaagaaaat	180	
ttcaaaagcct tgggtgttgat tgccttttgc cagtatcttc agcagtgtcc atttgaagat	240	
catglaaaal tagtgaalga agtaactgaa tllgcaaaaa caiglgllgc lgalgaglea	300	
gctgaaaatt gtgacaaate acttcatacc ctttttggag acaaattatg cacagttgca	360	
actcttcgtg aaacctatgg tgaattggct gactgctgtg caaaacaaga acctgagaga	420	
aatgaatgct tcttgcaaca caaagatgac aaceccaaacc tcccccgatt ggtgagacca	480	
gaggllgaig tgalgtgcac lgcctllcat gacaatgaag agacatllll gaaaaaatac	540	
ttatatgaaa ttgccagaag acatccttac ttttatgccc cggaactect tttcttttgc	600	
aaaaggfata aagctgcttt tacagaatgt tgccaagctg ctgataaagc tgccctgectg	660	
ttgccaaagc tcgatgaact tcgggatgaa gggaaggctt cgtctgcca acagagactc	720	
aagtggtcca gtctccaaaa atttggagaa agagctttca aageatgggc agtagctcgc	780	
ctgagccaga gatttcccaa agetgagttt gcagaagttt ccaagttagt gacagatctt	840	
accaaagtc acacggaatg ctgccatgga gatctgcttg aatgtgctga tgacagggcg	900	
gaccttgcca agtatatctg tgaaaatcaa gattcgatct ccagtaaaact gaaggaaatgc	960	
tgtgaaaaac ctctgttgga aaaateccac tgcattgccg aagtggaaaa tgatgagatg	1020	
cctgtgact tgccttcatt agctgctgat tttgttgaaa gtaaggatgt ttgcaaaaac	1080	
tatgtgagg caaaggatgt ctctctgggc atgtttttgt atgaatatgc aagaaggcat	1140	
cctgattact ctgtctgtct gctgttgaga cttgccaaaga catatgaaac cactctagag	1200	
aagtgtgtg ccgttcgaga tctcatgaa tgetatgcca aagtgttcga tgaattttaa	1260	
cctcttgtgg aagageetca gaatttaate aaacaaaatt gtgagctttt tgagcagctt	1320	
ggagagtaca aattccagaa tgcctatata gtctgttaca ccaagaaagt accccaagtg	1380	
tcaactccaa ctcttgtaga ggtctcaaga aacctaggaa aagtgggcag caaatgttgt	1440	
aaacatcctg aagcaaaaag aatgccctgt gcagaagact atctatccgt ggtcctgaac	1500	
cagttatgtg tgttgcatga gaaaacgcca gtaagtgaca gagtcacaaa atgctgcaca	1560	
gagtccttgg tgaacaggcg accatgcctt tcagctctgg aagtcatga aacatacggt	1620	
cccaaagagt ttaatgtctg aacattcacc ttcctatgcag atatatgcac actttctgag	1680	
aaggagagac aaatcaagaa acaaaactgca cttgttgagc ttgtgaaaca caagcccaag	1740	
gcaacaaaag agcaactgaa agctgitatg gatgatttcg cagcttttgt agagaagtgc	1800	
tgcaaggctg acgataagga gacctgcttt gccgaggagg gtaaaaaact tgttgcctgca	1860	
agtcaagctg ccttaggctt ataa	1884	
<210>	9	
<211>	1899	
<212>	DNA	

[0011]

<213> Artificial

<220>

<223> GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

<400> 9

```

cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggagagca agctgccaaag      60
gaattcattg ctiggetggt gaaaggcggg ggtgetccac caccaccace accaccacca      120
ccaccatctt cgggagcggg tgatgcacac aagagtgagg ttgetcaccg gttaaagat      180
ttgggagaag aaaatttcaa agccttgglg ttgattgcct ttgctcagta tcttcagcag      240
tgtccatttg aagatcaigt aaanttagtg aatgaagtaa ctgaatttgc aaaaacatgt      300
gttgetgatg agtcagctga aaattgtgac aaatcacttc ataccctttt tggagacaaa      360
ttatgcacag ttgcaactct tcgtgaaacc tatggtgaaa tggctgactg ctgtgcaaaa      420
caagaacctg agagaaatga atgcttcttg caacacaaag atgacaaccc aaacctcccc      480
cgatttggtg gaccagaggt tgatgtgatg tgcactgctt ttcattgaca tgaagagaca      540
tttttgaaaa aatacttata tgaaattgcc agaagacatc cttactttta tgccccggaa      600
ctccttttct ttgctaaaag gtataaagct gcttttacag aatgttgcga agctgetgat      660
aaagetgect gectgttgc aaagctgat gaacttcggg atgaaggga ggettctct      720
gccaaacaga gactcaagtg tgccagtctc caaaaatttg gagaaagagc tticaaagca      780
tgggcagtag ctgcctgag ccagagattt ccaaaagctg agtttgcaga agtttccaa      840
ttagtgacag atcttaccac agtcacacag gaatgtgcc atggagatct gcttgaatgt      900
getgatgaca gggcggacct tgccaagtat atctgtgaaa atcaagattc gatctccagt      960
aaactgaagg aatgtgtga aaaacctctg ttggaaaaat ccaactgcat tgccgaagt      1020
gaaaatgatg agatgcctgc tgacttgcct tcattagctg ctgattttgt tgaagtaag      1080
gatgtttgca aaaactatgc tgaggcaaag gatgtcttcc tgggcatgtt tttgtatgaa      1140
tatgcaagaa ggcatectga ttactctgtc gtgctgtctc tgagacttgc caagacatat      1200
gaaaccactc tagaagaagt ctgtgccgt gcagatctc atgaatgcta tgccaaagt      1260
ttcgatgaal ttaaacctct tglggaagag cctcagaatt taatcaaaaca aaattgtgag      1320
ctttttgagc agcttgaga gtacaaatc cagaatgcgc tattagtctg ttacaccaag      1380
aaagtacccc aagtgtcaac tccaactctt gtagaggtct caagaaacct aggaaaagt      1440
ggcagcaant gttgtaaaca tcctgaagca aaaagaatgc cctgtgcaga agactatcta      1500
tccgtggtcc tgaaccagtt atgtgtgttg catgagaaaa cgccagtaag tgacagagtc      1560
acaaaatgct gcacagagtc ctiggtgaac aggcgaccat gcttttcagc tctggaagtc      1620
gatgaacat acgttcccaa agagttaa atgctgaacat tcaccttcca tgcagatata      1680
tgcacacttt ctgagaagga gagacaaatc aagaaacaaa ctgcacttgt tgagcttgtg      1740
aaacacagc ccaaggcaac aaaagagcaa ctgaaagctg ttatggatga ttctgcagct      1800
ttttagaga agtgtgcaa ggtgacgat aaggagacct gcttttgcga ggagggtaaa      1860
aaacttggtg ctgcaagtca agctgcctta ggttataa      1899

```

<210> 10

<211> 1920

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GLP-1 类似物融合蛋白核苷酸编码序列

<400> 10

```

cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggagagca agctgccaaag      60

```

[0012]

```

gaattcatgt cttggctggt gaaaggcggg ggatcttctg gtgctccacc accatctggt 120
ggtggaggct ctggagggtg aggttccgga ggcggggggt cagatgcaca caagagtggag 180
gttgctcacc ggtttaaga ttggggagaa gaaaatttca aagccttggt gttgattgcc 240
tttgctcagt atcttcagea gtgtccatit gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta 300
actgaatttg caaaaacatg ttttgcgat gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt 360
catacccttt ttggagacaa attatgcaca gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa 420
atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa 480
gatgacaacc caaacctccc ccgattgggt agaccagagg ttgatgtgat gtgactgct 540
tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa aaatacttat atgaaattgc cagaagacat 600
ccttactlll algccccgga acitctllllc tllgclaaaa gglalaaaagc tgcillllaca 660
gaatgttgcc aagctgtga taaagctgcc tgctgttgc caaagctcga tgaacttcgg 720
gatgaaggga aggettcgtc tgccaaacag agaetcaagt gtgccagtct ccaaaaattt 780
ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta gctgcctga gccagagatt tcccaaagct 840
gaglllgcag aaglllccaa gttagtgaca gatlclacca aaglcacac ggaatgctgc 900
catggagatc tgettgaatg tgetgatgac agggcggacc ttgccaaagta tatctgtgaa 960
aatcaagatt cgatectcag taaactgaag gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa 1020
tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct 1080
gctgattllg ttganagtaa ggalglllgc aaaaactalg ctgaggcaaa ggaatgcttc 1140
ctgggcattg ttttgtatga atatgcaaga aggcattctg attactctgt cgtgctgctg 1200
ctgagacttg ccaagacata tgaaccact ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct 1260
catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa tttaaaccct ttgtggaaga gccacagaat 1320
ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag cagcttggag agtacaaatt ccagaatgct 1380
ctattagtct gttacaccaa gaaagtacc caagtgtcaa ctccaaactct tgtagaggct 1440
tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg 1500
ccctgtgcag aagactatct atccgtgggt ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa 1560
acgccagtaa gtgacagagt cacaaaatgc tgcacagagt ccttgggtgaa caggcgacca 1620
tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca tacgttccca aagagtttaa tgcgaaaca 1680
ttcaccttcc atgcagatat atgcacactt tetgagaagg agagacaaat caagaaacaa 1740
actgcacttg ttgagcttgt gaaacacaag cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct 1800
gttatggatg atttcgcagc tttttagtag aagtgtgca aggtgacga taaggagacc 1860
tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt gctgcaagtc aagctgcctt aggtttataa 1920

```

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 连接肽

<400> 11

Gly Gly Gly Ser Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Ser Ser

1

5

10

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

[0013]

<213> Artificial

<220>

<223> 连接肽

<400> 12

Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser Pro Pro Pro Ala Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser

20

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 连接肽

<400> 13

Gly Gly Gly Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 连接肽

<400> 14

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Pro Pro

1 5 10 15

Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Ser

20

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 连接肽

<400> 15

Gly Gly Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 16

<211> 26

[0014]

<211>	145	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	3' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E1 基因片段	
<400>	20	
cacggcgaag	ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag	60
gaattcattg	cttggctggg gaaagggtgg ggtctcttc caccaccagg tgggtggagge	120
tcttcagatg	cacacaagag tgagg	145
<210>	21	
<211>	175	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	3' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E2 基因片段	
<400>	21	
cacggcgaag	ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag	60
gaattcattg	cttggctggg gaaagggtgga ggctcttcag gtggaggctc ttcaccacca	120
ccagctgggtg	gaggctcttc aggtggaggg tcttcagatg cacacaagag tgagg	175
<210>	22	
<211>	160	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	3' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E3 基因片段	
<400>	22	
cacggcgaag	ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag	60
gaattcattg	cttggctggg gaaaggcggg ggtgctccac caccaccacc accaccacca	120
ccaccatctt	ccggaggcgg tgatgcacac aagagtgagg	160
<210>	23	
<211>	175	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	3' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E4 基因片段	
<400>	23	
cacggcgaag	ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaagagca agctgccaag	60
gaattcattg	cttggctggg gaaagctggc gggggctctg ctggaggcgg gctctctggc	120
gggggtccac	caccaccacc aggaggcggg ggttcagatg cacacaagag tgagg	175
<210>	24	
<211>	148	

[0016]

<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	3' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E5 基因片段	
<400>	24	
	cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggagagca agctgccaag	60
	gaattcattg cttggetggt gaaagggtga tcttctgggtg ctccaccacc accaggagge	120
	gggggttcag atgcacacaa gagtgagg	148
<210>	25	
<211>	181	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	3' 端带 HSA 融合片段的 GLP-1 类似物-E6 基因片段	
<400>	25	
	cacggcgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggagagca agctgccaag	60
	gaattcattg cttggetggt gaaaggcggt ggatcttctg gtgtccacc accatctggt	120
	ggtggaggct ctggaggtgg aggttccgga ggcgggggtt cagatgcaca caagagtgag	180
	g	181
<210>	26	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	26	
	tctctcgaga aaagacacgg cgaagggacc ttaccagtg	40
<210>	27	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	27	
	gatgcacaca agagtgagg	19
<210>	28	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	

[0017]

<400> 28

ttagcggccg ettataagec taaggcagct tg

32

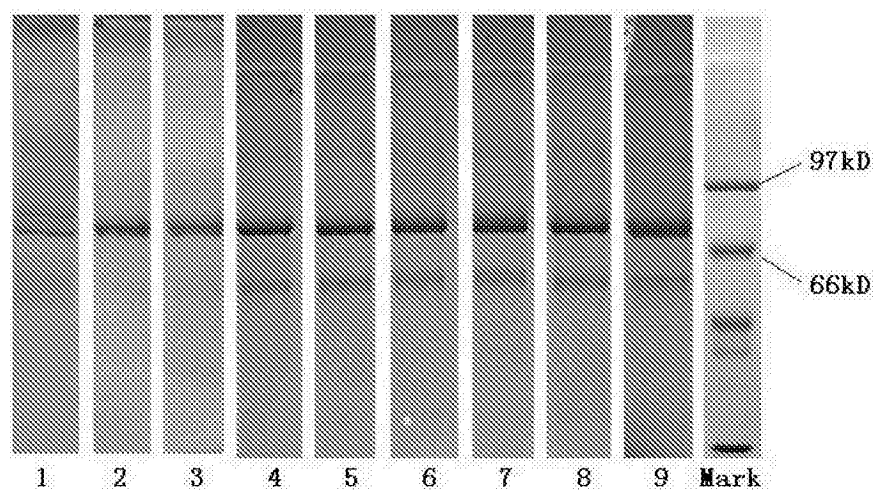


图 1

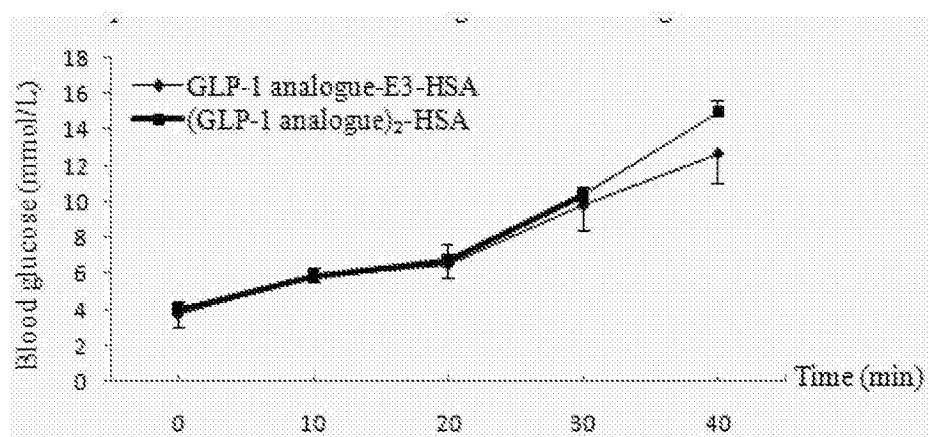


图 2A

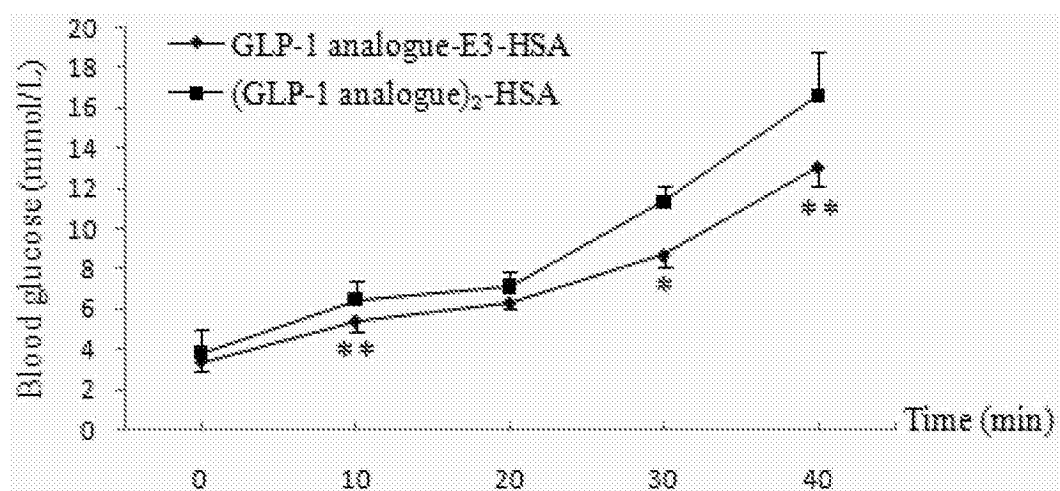


图 2B

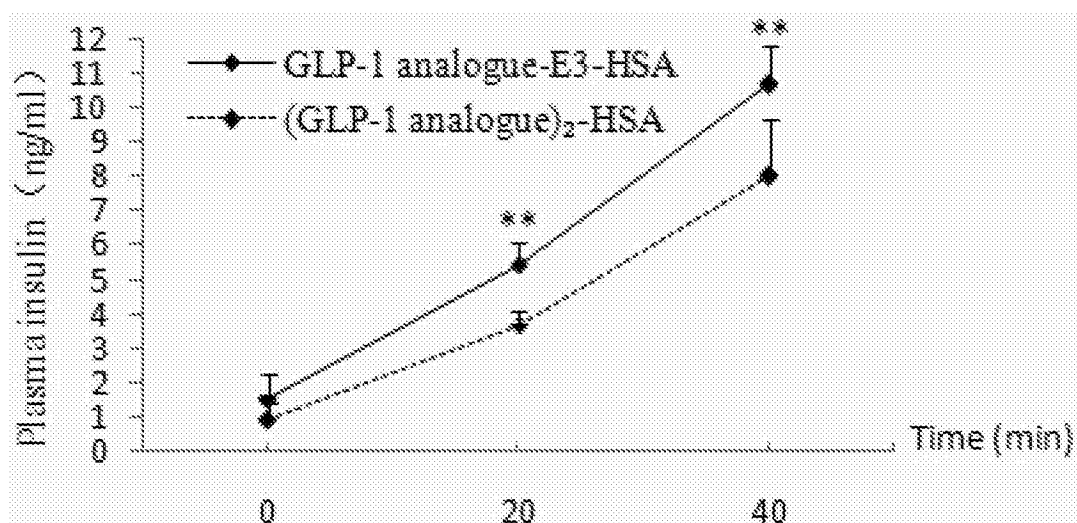


图 2C

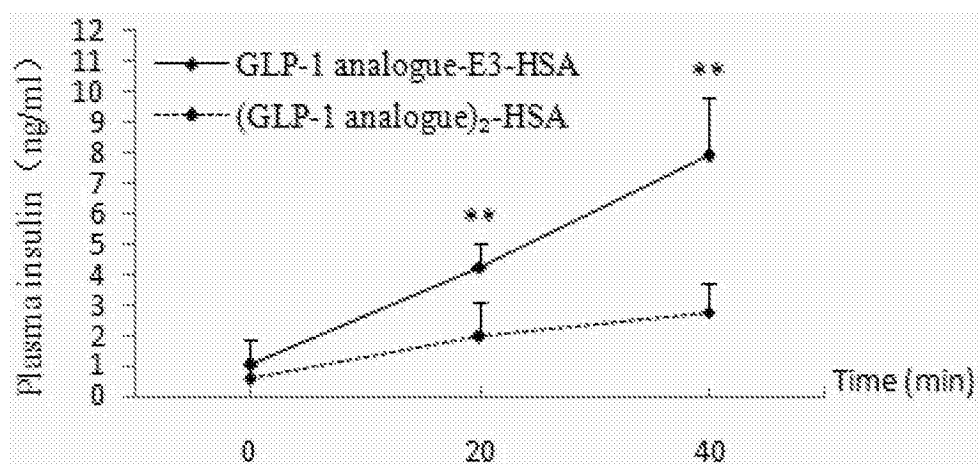


图 2D

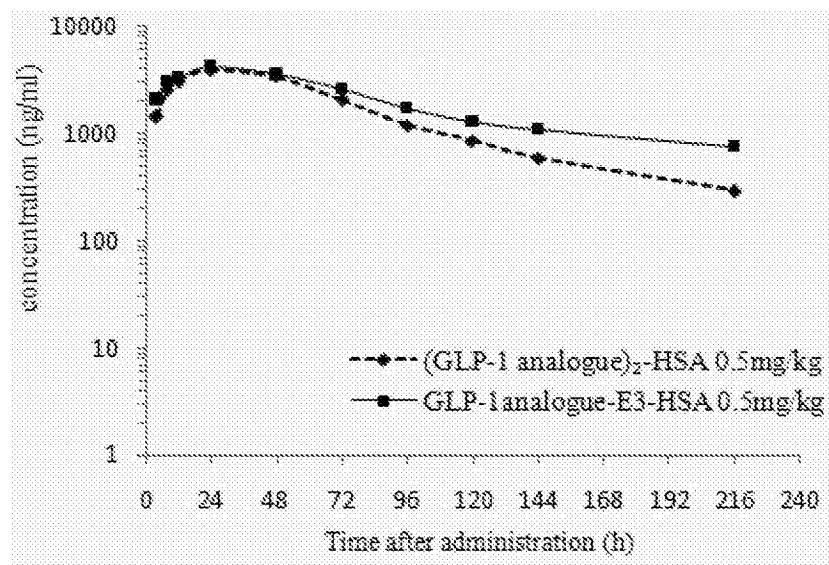


图 3