(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
2019 年 8 月 15 日 (15.08.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/154311 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/62 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
C12N 15/17 (2006.01) *C12N 1/16* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/074384

(22) 国际申请日: 2019 年 2 月 1 日 (01.02.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810131794.3 2018年2月9日 (09.02.2018) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。

(72) 发明人: 王菲菲 (WANG, Feifei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。 陈磊 (CHEN, Lei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。 王宏伟 (WANG, Hongwei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层程伟, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。

WO 2019/154311 A1

(54) **Title:** CODON OPTIMIZED PRECURSOR GENE AND SIGNAL PEPTIDE GENE OF HUMAN INSULIN ANALOGUE

(54) **发明名称:** 一种密码子优化的人胰岛素类似物前体基因和信号肽基因

(57) **Abstract:** Provided is a nucleic acid molecule of a codon optimized precursor gene and signal peptide gene of a human insulin analogue. The nucleic acid molecule comprises a nucleic acid molecule encoding the precursor of the fusion insulin analogue and a nucleic acid molecule encoding the yeast secreting signal peptide α-factor. The nucleic acid molecule improves the expression of the precursor of the insulin analogue in Pichia pastoris, and reduces the production cost of the human insulin analogue.

(57) **摘要:** 提供一种密码子优化的人胰岛素类似物前体基因和信号肽基因的核酸分子。该核酸分子包含一种融合胰岛素类似物前体的编码核酸分子和一种酵母分泌信号肽α-因子的编码核酸分子。该核酸分子使得胰岛素类似物前体在毕赤酵母中的表达量提高，降低人胰岛素类似物的生产成本。

一种密码子优化的人胰岛素类似物前体基因和信号肽基因

技术领域

本发明涉及一种密码子优化的人胰岛素类似物前体基因和一种密码子优化的 α-因子（α-factor）信号肽基因，并提供了所述人胰岛素类似物前体基因的表达方法。

背景技术

人胰岛素是由 51 个氨基酸组成的多肽，包含两条链，分别为 A 链和 B 链。胰岛素的主要药效是调节糖代谢，在糖尿病治疗中，胰岛素干预作为替代或补充治疗是最直接有效的方法。胰岛素还有促进脂肪合成、抑制脂肪分解、减少酮体生成的作用，所以亦被用来纠正胰岛素相关酮症和酸血症的各种症状。

胰岛素最早一直由猪、牛等动物胰腺提取而得，但这些产品与人胰岛素结构有所不同，故存在免疫原性。上世纪八十年代初、中期美国礼来和丹麦诺和诺德公司相继开发出基因重组人胰岛素生产技术，从此基因工程表达人胰岛素及其类似物成为工业主流手段。但是人胰岛素作用时间较短，使得病人必须频繁注射，极为不便。因此，人们致力于获得一些能够更长时间作用于人体的胰岛素类似物及其衍生物。其中，使用酰化基团修饰人胰岛素或其类似物，是一种提高其半衰期的有效方法。WO2018024186 公开了一种 B29 位被长链脂肪酸取代、B30 位氨基酸缺失的人胰岛素类似物，公开了该人胰岛素类似物的结构和生物活性。WO9507931 公开了一种 B29 位连接一个十四酰基侧链、B30 位氨基酸缺失的胰岛素类似物及其制剂。WO2005012347 公开了一种 B29 位被一个谷氨酸和长链脂肪酸取代、B30 位氨基酸缺失的人胰岛素类似物。目前常用的表达人胰岛素及其类似物的表达系统主要有是大肠杆菌、酿酒酵母和巴斯德毕赤酵母，其中大肠杆菌表达为包涵体形式，需经过包涵体裂解和复性，工艺繁琐且得率低，酿酒酵母与毕赤酵母有着操作简易、易于培养、对外源蛋白修饰、可以分泌表达等遗传表达优点，但酿酒酵母分泌效率低、表达菌株不够稳定，相比之下毕赤酵母是工业生产重组蛋白应用更广泛的表达系统。工业上，生产过程中发酵产量是控制生产成本的关键因素，由于胰岛素市场需求量大，作为重要生产商的诺和诺德利用酵母表达生产时罐子规模达到几十吨，对厂房、设备要求很高，成本也高，所以提高人胰岛素及其类似物的发酵产量对工业生产有着重要意义。

遗传密码子是三联体密码,一个密码子由信使核糖核酸（mRNA）上相邻的三个碱基组成。遗传密码共有64种，但不同的生物，甚至同种生物不同的蛋白质编码基因，对不同密码子使用频率并不相同，具有一定的偏爱性。外源基因

的密码子主要在翻译水平上影响基因的表达，很多文献已经证明密码子的优化对于在毕赤酵母中提高外源蛋白的表达量卓有成效。毕赤酵母表达外源基因分为胞内表达和分泌表达两种，后者需要信号肽来引导外源基因表达产物的分泌，目前最普遍使用的信号肽为来源于酿酒酵母α-因子信号肽，其核苷酸序列也来源于酿酒酵母，目前还没有报道针对毕赤酵母优化的α-因子信号肽核苷酸序列。胰岛素前体密码子优化的相关文献很多，如Gurramkonda 等人优化的人胰岛素前体基因序列并在毕赤酵母的表达研究（Gurramkonda et al. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using Pichia pastoris with subsequent purification and conversion to human insulin. Microbial Cell Factories, 2010, 9:31），专利WO1998028429公开了表达人胰岛素类似物前体的基因序列，该基因编码的胰岛素前体氨基酸序列是EEGEPK-B(1-29）-AAK-A(1-21)，其中EEGEPK为胰岛素前体N端延伸，称为间隔肽或前导肽，可以保护胰岛素前体的N端免于酵母蛋白酶的水解作用，并且能提高胰岛素前体的表达效率；B（1-29）是缺失B30位苏氨酸的人胰岛素B链；A（1-21）是人胰岛素A链氨基酸序列；AAK为连接B链和A链的连接肽，也称为C肽。

为了进一步提升人胰岛素及其类似物前体的产量，本发明结合毕赤酵母密码子偏好性，优化了胰岛素类似物前体基因和 α-因子信号肽基因，在毕赤酵母中进行分泌表达，并与现有技术中的人胰岛素类似物前体基因作为对照，结果表明，本发明中经过密码子优化后的基因表达人胰岛素类似物前体量提高了近2 倍，能够大大降低后期人胰岛素及其类似物工业生产的成本。

发明内容

本发明的一些实施方案中提供了核酸分子，其包含如下结构：

5′—（PS）$_a$—（SP）$_b$—（LS）$_c$—GE—（P′S）$_d$—3′，其中，

PS 是编码加工位点的核酸分子，a 是 0 或 1；

SP 是编码信号肽的核酸分子，b 是 0 或 1；

LS 是编码间隔肽的核酸分子，c 是 0 或 1；

GE 是编码目标多肽的核酸分子；

P′S 是编码加工位点的核酸分子，d 是 0 或 1。

一些实施方案中提供了核酸分子，其包含如下结构：

5′—（PS）$_a$—（SP）$_b$—（LS）$_c$—GE—（P′S）$_d$—3′，其中，

PS 是编码加工位点的核酸分子，a 是 0 或 1；

SP 是编码信号肽的核酸分子，b 是 1；

LS 是编码间隔肽的核酸分子，c 是 1；

GE 是编码目标多肽的核酸分子；

P′S 是编码加工位点的核酸分子，d 是 0 或 1。

在一些实施方案中，编码信号肽的核酸分子包含如 SEQ ID NO:1 所示序列。

在一些实施方案中，目标多肽是人胰岛素类似物前体多肽；编码人胰岛素类似物前体多肽的核酸分子包含如 SEQ ID NO:3 所示序列。

在一些实施方案中，编码信号肽的核酸分子（SP）的核酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示：

ATGAGATTTCCTTCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTGCCGCTTCCTCTG
CTTTGGCAGCTCCAGTTAATACAACCACTGAAGATGAGACTGCTCAAATC
CCAGCCGAAGCAGTTATTGGTTACTCCGACTTGGAAGGAGATTTTGACGT
CGCTGTTTTACCATTCTCTAATTCCACTAATAACGGTCTGTTGTTTATTAAT
ACTACCATTGCTTCTATCGCCGCTAAGGAGGAAGGTGTGTCCCTCGAGAA
AAGA

SEQ ID NO:1

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDV
AVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKR

SEQ ID NO:2

在一些实施方案中，编码目标多肽的核酸分子（GE）可以是编码人胰岛素类似物前体的核酸分子，其可以是 B30 位苏氨酸缺失的人胰岛素。人胰岛素类似物前体的核酸分子序列如 SEQ ID NO:3 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示：

TTCGTCAACCAGCACTTGTGTGGTTCCCATTTGGTTGAGGCTCTGTA
CTTGGTCTGTGGAGAAAGAGGTTTCTTTTACACCCCAAAGGCTGCTAAG
GGTATCGTTGAGCAATGTTGCACCTCTATTTGTTCCCTGTATCAGTTGGAA
AACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO: 3

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKAAKGIVEQCCTSICSLYQLE
NYCN

SEQ ID NO:4

在一些实施方案中，编码人胰岛素类似物前体的核酸分子的 88-96 位（即 GCTGCTAAG）为编码连接肽（也称 C 肽）的核酸分子，其可以被替代，包括但不限于如下的序列：GCCGCTAAG，GCTGCCAAG，GCTGCTAAA，GCCGCCAAG。

在一些实施方案中，编码间隔肽的核酸分子（LS）的序列如 SEQ ID NO:5 所示：

gaagaaggtgaaccaaag

SEQ ID NO:5

在一些实施方案中，PS 和/或 P'S 是编码酶切位点的核酸分子；

优选的，PS 是编码 EcoR I 酶切位点的核酸分子，和/或 P'S 是编码 Not I 酶切位点的核酸分子。

在一些实施方案中，提供能够表达人胰岛素类似物前体的核酸分子，其包含编码间隔肽的核酸分子和编码人胰岛素类似物前体的核酸分子，能够与包含信号肽的载体重组后表达人胰岛素类似物前体。

在一些实施方案中，人胰岛素类似物前体核酸分子编码的人胰岛素类似物前体氨基酸序列如下：

EEGEPK-B(1-29)-AAK-A(1-21)

其中，“EEGEPK（SEQ ID NO：16）”可以是胰岛素前体 N 端延伸，称为间隔肽或前导肽；“B(1-29)”可以是缺失 B30 位苏氨酸的人胰岛素 B 链；“A(1-21)”可以是人胰岛素 A 链氨基酸序列，“AAK”为连接 B 链和 A 链的连接肽，也称为 C 肽。

在一些实施方案中，人胰岛素类似物前体核酸分子的序列可以如 SEQ ID NO:6 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示：

GAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTCAACCAGCACTTGTGTGGTTCCCATTTGGTTGAGGCTCTGTACTTGGTCTGTGGAGAAAGAGGTTTCTTTTACACCCCAAAGGCTGCTAAGGGTATCGTTGAGCAATGTTGCACCTCTATTTGTTCCCTGTATCAGTTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:6

EEGEPKFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKAAKGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

SEQ ID NO:7

在一些实施方案中，提供另一种能够表达人胰岛素类似物前体的核酸分子，该序列中包含信号肽序列、间隔肽序列和编码人胰岛素类似物前体的序列，其能够与不包含信号肽的载体重组后表达人胰岛素类似物前体。

在一些实施方案中，表达人胰岛素类似物前体的核酸分子的核酸序列如 SEQ ID NO:8 所示，编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示：

ATGAGATTTCCTTCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTGCCGCTTCCTCTGCTTTGGCAGCTCCAGTTAATACAACCACTGAAGATGAGACTGCTCAAATCCCAGCCGAAGCAGTTATTGGTTACTCCGACTTGGAAGGAGATTTTGACGTCGCTGTTTTACCATTCTCTAATTCCACTAATAACGGTCTGTTGTTTATTAATACTACCATTGCTTCTATCGCCGCTAAGGAGGAAGGTGTGTCCCTCGAGAA

AAGAGAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTCAACCAGCACTTGTGTGGTTCC
CATTTGGTTGAGGCTCTGTACTTGGTCTGTGGAGAAAGAGGTTTCTTTTA
CACCCCAAAGGCTGCTAAGGGTATCGTTGAGCAATGTTGCACCTCTATTT
GTTCCCTGTATCAGTTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:8

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDV
AVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREEGEPKFVNQHLCGSHLV
EALYLVCGERGFFYTPKAAKGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

SEQ ID NO:9

在一些实施方案中，表达人胰岛素类似物前体的核酸分子还可以连接酶切位点序列，所述酶切位点优选 EcoR I 酶切位点和 Not I 酶切位点。

在一些实施方案中，还提供了一种能够在真核或原核细胞中表达的载体，其能够在原核或真核细胞中分泌表达人胰岛素类似物前体。

在一些实施方案中，还提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞优选为酵母菌，更优选为毕赤酵母，其能够分泌表达人胰岛素类似物前体。

在一些实施方案中，还提供一种制备人胰岛素类似物的方法，包括使用如前所述的核酸分子，载体，和/或宿主细胞。

所述的方法还可以包含如下步骤：

1）通过编码人胰岛素类似物前体的核酸分子在真核细胞中表达人胰岛素类似物前体；

2）通过酶切处理人胰岛素类似物前体得到人胰岛素类似物，所述的编码人胰岛素类似物前体的核酸分子可以如 SEQ ID NO:6 所示，所述的酶切处理胰岛素前体采用本领域技术人员公知的方法。

在一些实施方案中，步骤 1）中包含用表达载体表达人胰岛素类似物前体，所述的表达载体包含信号肽序列，所述的信号肽序列可以如 SEQ ID NO:1 所示。

在一些实施方案中，所述的人胰岛素类似物为 B30 缺失的人胰岛素，所述的人胰岛素类似物进一步经过酰化基团的取代。

在一些实施方案中，所述的 B30 缺失的人胰岛素在 B29 位的赖氨酸处被酰化基团取代。

优选的，上述取代的取代产物为赖氨酸 B29 (N^{ε}-(N^{α}-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^{ε}-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素。

缩写和术语

“密码子优化”是指利用宿主细胞偏爱密码子规则，使用偏爱密码子并避

免使用利用率低或稀有密码子来合成基因。

“对照 1”是“EEGEPK”的编码核酸分子（双下划线所示的GAAGAAGGTGAACCAAAG）与专利 WO1998028429 中的胰岛素前体基因的编码核酸分子相连，如下 SEQ ID NO:10 所示：

GAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTTAACCAACACTTGTGCGGTTCCC
ACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTCTAC
ACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAACAATGCTGTACCTCCATCTG
CTCCTTGTACCAATTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:10

“对照 2”是“EEGEPK”的编码核酸分子（双下划线所示）与 Gurramkonda 等人的文献（Microbial Cell Factories, 2010, 9:31）中经优化的胰岛素前体基因的编码核酸分子相连，如下 SEQ ID NO:11 所示：

GAAGAAGGTGAACCAAAGTTTGTTAACCAACATTTGTGTGGTTCTCA
TTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTCTTCTACA
CTCCAAAGGCTGCTAAGGGTATTGTTGAACAATGTTGTACTTCTATTTGTT
CTTTGTACCAATTGGAAAACTACTGTAACTAA

SEQ ID NO: 11

“IP-S”是经密码子优化的胰岛素前体基因对应的核酸分子。

“α-因子”是 Invitrogen 公司提供的 pPIC9K 表达载体带有的 α-因子信号肽基因对应的核酸分子，来源于酿酒酵母。

“α-因子-S”是经密码子优化的 α-因子信号肽基因对应的核酸分子。

“载体”包括核酸分子，其能够运输它连接的另一核酸，包括但不局限于质粒和病毒载体。某些载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制，而其它载体可在引入宿主细胞时整合到宿主细胞的基因组中，并因此与所述宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导有效连接到它们的基因的表达，此类载体此处称作“重组表达载体”（或简单地“表达载体”），并且典型载体为本领域熟知。

“目标多肽”是能够在酵母中表达的多肽，包括但不限于酶、抗体、干扰素、胰岛素、白介素等及其变体、前体、中间体，例如可以是胰岛素前体。

“细胞”、“宿主细胞”可互换使用。

“多核苷酸分子”、“核酸分子”可互换使用，其序列可以是 DNA 序列。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本发明，但并非限制本发明的范围。

本发明实施例中所用的载体、宿主菌和培养基均购自 Invitrogen 公司，其中毕赤酵母表达载体 pPIC9K 含有醇氧化酶 AOX1 启动子，可受甲醇诱导，该载体还含有 α-因子信号肽序列，能够分泌表达外源蛋白；毕赤酵母表达载体 pPIC3.5K 含有醇氧化酶 AOX1 启动子，可受甲醇诱导，该载体不含有 α-因子信号肽序列；宿主菌为毕赤酵母 GS115 菌株；培养基为毕赤酵母手册提供的培养基配方。

实施例 1 构建胰岛素前体重组表达载体

将对照 1（SEQ ID NO:10）、对照 2（SEQ ID NO:11）、IP-S（SEQ ID NO:6）的 5′端和 3′端都分别加入 EcoR I 和 Not I 酶切位点，由南京金斯瑞生物科技公司进行合成，并将合成的核酸分子序列连接到 T 载体。

GAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTCAACCAGCACTTGTGTGGTTCCC
ATTTGGTTGAGGCTCTGTACTTGGTCTGTGGAGAAAGAGGTTTCTTTTAC
ACCCCAAAGGCTGCTAAGGGTATCGTTGAGCAATGTTGCACCTCTATTTG
TTCCCTGTATCAGTTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:6

GAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTTAACCAACACTTGTGCGGTTCCC
ACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTCTAC
ACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAACAATGCTGTACCTCCATCTG
CTCCTTGTACCAATTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:10

GAAGAAGGTGAACCAAAGTTTGTTAACCAACATTTGTGTGGTTCTCA
TTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGTGAAAGAGGTTTCTTCTACA
CTCCAAAGGCTGCTAAGGGTATTGTTGAACAATGTTGTACTTCTATTTGTT
CTTTGTACCAATTGGAAAACTACTGTAACTAA

SEQ ID NO:11

用内切酶 EcoR I 和 Not I 将上述带有胰岛素前体核酸分子的 T 载体和表达载体 pPIC9K 进行双酶切，之后采用胶回收试剂盒分别回收目标片段和载体片段，用 T4 连接酶将酶切纯化后的目标片段分别与酶切纯化后的载体 pPIC9K 进行连接。

将上述连接液分别转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，涂布含氨苄青霉素的抗性平板，培养后，挑取克隆菌提取质粒，双酶切验证，通过验证最终得到三种重组表达载体，分别含有对照 1、对照 2、IP-S 的序列。

实施例 2 毕赤酵母重组菌表达胰岛素前体

将实施例 1 中构建的三种重组表达载体分别转化到毕赤酵母 GS115 中，表达对照 1 和对照 2 的重组菌为对照菌株，表达 IP-S 的重组菌为实验菌株。

将三种重组菌的菌落接种至 5mL 的 YPD 培养基中，30℃恒温摇床 250 rpm 振荡培养至 OD_{600}=10 左右（16-18 小时）。收集并重悬细胞于 50mL BMGY 培养基中，30℃恒温摇床 250 rpm 振荡培养过夜，至 OD_{600} 为 30 左右。1500rpm 离心 5 分钟收集细胞，用 25mL BMMY 培养基重悬。在培养基中加入 1/200 体积的甲醇（终浓度为 0.5%），30℃恒温摇床 250 rpm 振荡培养 96 小时，其中每 24 小时补加 1/200 体积的甲醇。表达结束后，10,000rpm 离心取上清，通过 HPLC 检测上清液中胰岛素前体的产量，换算为相对于对照菌株胰岛素前体表达量的百分比，胰岛素前体的表达量百分比如表 1 所示。

表 1

菌株	载体	所用信号肽	表达基因	产量百分比（%）
对照菌	pPIC9K	α-因子	对照 1	100
对照菌	pPIC9K	α-因子	对照 2	125
实验菌	pPIC9K	α-因子	IP-S	225

表 1 的数据显示，经过优化的胰岛素前体基因表达的胰岛素前体量与两个对照组相比提高到 1.8 到 2.25 倍，可见经过优化的胰岛素前体基因有更好的表达效果，其表达的胰岛素前体的产量显著提高。

实施例 3 构建融合了不同 α-因子的胰岛素前体基因的重组表达载体

在 IP-S 前分别加入 α-因子（SEQ ID NO:12）和 α-因子-S（SEQ ID NO:1），融合后的核酸分子序列分别如 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:8 所示，进行合成，合成后的核酸分子的 5′端和 3′端分别带有 EcoR I 和 Not I 酶切位点，并将合成的核酸分子连接到 T 载体。

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCC
GCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAA
TTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGAT
GTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATA
AATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGA
GAAAAGA

SEQ ID NO:12

ATGAGATTTCCTTCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTGCCGCTTCCTCTG
CTTTGGCAGCTCCAGTTAATACAACCACTGAAGATGAGACTGCTCAAATC
CCAGCCGAAGCAGTTATTGGTTACTCCGACTTGGAAGGAGATTTTGACGT

CGCTGTTTTACCATTCTCTAATTCCACTAATAACGGTCTGTTGTTTATTAAT
ACTACCATTGCTTCTATCGCCGCTAAGGAGGAAGGTGTGTCCCTCGAGAA
AAGA

SEQ ID NO:1

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCC
GCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAA
TTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGAT
GTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATA
AATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGA
GAAAAGAGAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTCAACCAGCACTTGTGTGG
TTCCCATTTGGTTGAGGCTCTGTACTTGGTCTGTGGAGAAAGAGGTTTCT
TTTACACCCCAAAGGCTGCTAAGGGTATCGTTGAGCAATGTTGCACCTCT
ATTTGTTCCCTGTATCAGTTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:13

ATGAGATTTCCTTCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTGCCGCTTCCTCTG
CTTTGGCAGCTCCAGTTAATACAACCACTGAAGATGAGACTGCTCAAATC
CCAGCCGAAGCAGTTATTGGTTACTCCGACTTGGAAGGAGATTTTGACGT
CGCTGTTTTACCATTCTCTAATTCCACTAATAACGGTCTGTTGTTTATTAAT
ACTACCATTGCTTCTATCGCCGCTAAGGAGGAAGGTGTGTCCCTCGAGAA
AAGAGAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTCAACCAGCACTTGTGTGGTTCC
CATTTGGTTGAGGCTCTGTACTTGGTCTGTGGAGAAAGAGGTTTCTTTTA
CACCCCAAAGGCTGCTAAGGGTATCGTTGAGCAATGTTGCACCTCTATTT
GTTCCCTGTATCAGTTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:8

将对照 1 前分别加入 α-因子（SEQ ID NO: 12）和 α-因子-S（SEQ ID NO：1），融合后的核酸分子序列分别如 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 所示，进行合成，合成后的核酸分子 5′端和 3′端分别带有 EcoR I 和 Not I 酶切位点，并将合成的核酸分子连接到 T 载体。

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCC
GCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAA
TTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGAT
GTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATA
AATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGA
GAAAAGAGAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTTAACCAACACTTGTGCGG
TTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCT

TCTACACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAACAATGCTGTACCTCC
ATCTGCTCCTTGTACCAATTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:14

ATGAGATTTCCTTCTATTTTCACTGCTGTTTTGTTTGCCGCTTCCTCTG
CTTTGGCAGCTCCAGTTAATACAACCACTGAAGATGAGACTGCTCAAATC
CCAGCCGAAGCAGTTATTGGTTACTCCGACTTGGAAGGAGATTTTGACGT
CGCTGTTTTACCATTCTCTAATTCCACTAATAACGGTCTGTTGTTTATTAAT
ACTACCATTGCTTCTATCGCCGCTAAGGAGGAAGGTGTGTCCCTCGAGAA
AAGAGAAGAAGGTGAACCAAAGTTCGTTAACCAACACTTGTGCGGTTCC
CACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTCTA
CACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAACAATGCTGTACCTCCATCT
GCTCCTTGTACCAATTGGAAAACTACTGCAACTAA

SEQ ID NO:15

用内切酶 EcoR I 和 Not I 将上述 T 载体和表达载体 pPIC3.5K 进行双酶切，之后采用胶回收试剂盒分别回收目标片段和载体片段，用 T4 连接酶将酶切纯化后的目标片段分别与酶切纯化后的载体 pPIC3.5K 进行连接。

将上述连接液分别转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，涂布含氨苄青霉素的抗性平板，培养后，挑取克隆菌提取质粒，双酶切验证，通过验证最终得到四种重组表达载体，分别融合了 α-因子信号肽和 α-因子-S 信号肽，表达不同核苷酸序列的胰岛素前体基因。

实施例 4 毕赤酵母重组菌表达优化前后的胰岛素前体

将实施例 3 中构建的重组表达载体分别转化到毕赤酵母 GS115 中。

将重组菌菌落接种至 5mL 的 YPD 培养基中，30℃恒温摇床 250 rpm 振荡培养至 OD_{600}=10 左右（16-18 小时）。收集并重悬细胞于 50mL BMGY 培养基中，30℃恒温摇床 250 rpm 振荡培养过夜，至 OD_{600} 为 30 左右。1500rpm 离心 5 分钟收集细胞，用 25mL BMMY 培养基重悬。在培养基中加入 1/200 体积的甲醇（终浓度为 0.5%），30℃恒温摇床 250 rpm 振荡培养 96 小时，其中每 24 小时补加 1/200 体积的甲醇。表达结束后，10,000rpm 离心取上清，通过 HPLC 检测上清液中胰岛素前体的产量。

将表达融合 α-因子的对照 1 基因的重组菌作为对照菌，将其他菌株的胰岛素前体产量换算为相对于对照菌株产量的百分比，如表 2 所示。

表 2

菌株	载体	所用信号肽	表达基因	产量百分比（%）
对照菌	pPIC3.5K	α-因子	对照 1	100
实验菌	pPIC3.5K	α-因子-S	对照 1	150
实验菌	pPIC3.5K	α-因子	IP-S	225
实验菌	pPIC3.5K	α-因子-S	IP-S	275

表 2 的数据显示，仅信号肽优化的核酸分子序列表达胰岛素前体的量提高到 1.5 倍，仅胰岛素前体基因优化的核酸分子序列表达胰岛素前体的量提高到 2.25 倍，而经信号肽和胰岛素前体基因同时优化的核酸分子序列表达胰岛素前体量提高到 2.75 倍。综合以上，密码子优化使得胰岛素前体的表达量增加到 1.5-2.75 倍。

权利要求书：

1. 核酸分子，其包含具有以下通式的分子或结构：

5′—（PS）$_a$—（SP）$_b$—（LS）$_c$—GE—（P′S）$_d$—3′，

其中，

PS 是编码加工位点的核酸分子，a 是 0 或 1；

SP 是编码信号肽的核酸分子，b 是 1；

LS 是编码间隔肽的核酸分子，c 是 0 或 1；

GE 是编码目标多肽的核酸分子；

P′S 是编码加工位点的核酸分子，d 是 0 或 1；

所述编码信号肽的核酸分子包含如 SEQ ID NO:1 所示序列。

2. 核酸分子，其包含具有以下通式的分子或结构：

5′—（PS）$_a$—（SP）$_b$—（LS）$_c$—GE—（P′S）$_d$—3′，

其中，

PS 是编码加工位点的核酸分子，a 是 0 或 1；

SP 是编码信号肽的核酸分子，b 是 0 或 1；

LS 是编码间隔肽的核酸分子，c 是 0 或 1；

GE 是编码人胰岛素类似物前体多肽的核酸分子；

P′S 是编码加工位点的核酸分子，d 是 0 或 1；

所述编码人胰岛素类似物前体多肽的核酸分子包含如 SEQ ID NO:3 所示序列。

3. 根据权利要求 1 所述的核酸分子，其中所述目标多肽是人胰岛素类似物前体，编码所述人胰岛素类似物前体的核酸分子包含编码 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列的核酸分子，优选的，包含如 SEQ ID NO:3 所示核酸序列。

4. 根据权利要求 2 所述的核酸分子，其中编码所述信号肽的核酸分子包含编码 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的核酸分子，优选的，包含如 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO:12 所示核酸序列。

5. 根据前述权利要求 2-4 中任一项所述的核酸分子，所述编码人胰岛素类似物前体的核酸分子在相当于 SEQ ID NO:3 的第 88-96 位被替换，优选的，被 GCCGCTAAG、GCTGCCAAG、GCTGCTAAA 或 GCCGCCAAG 替换。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸分子，所述间隔肽的氨基酸序列

包含 EEGEPK（Glu-Glu-Gly-Glu-Pro-Lys），优选的，编码间隔肽的核酸分子包含如 SEQ ID NO:5 所示序列。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸分子，其包含如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15 所示序列中的任意一个；或为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15 所示序列中的任意一个。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的核酸分子，所述加工位点是连接酶切位点，优选的，PS 是编码 EcoR I 酶切位点的核酸分子和/或 P'S 是编码 Not I 酶切位点的核酸分子。

9. 载体，其包含如前任一项权利要求所述的核酸分子，优选的，其是真核细胞表达载体或原核细胞表达载体。

10. 宿主细胞，其含有权利要求 1-8 任一项所述的核酸分子和/或权利要求 9 所述的载体，优选的，其为酵母菌；更优选的，其为毕赤酵母。

11. 制备人胰岛素类似物的方法，包括使用权利要求 1-8 任一项所述的核酸分子，权利要求 9 所述的载体，和/或权利要求 10 所述的宿主细胞。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其还包括如下步骤：

1）表达人胰岛素类似物前体；

2）酶切步骤 1）获得的人胰岛素类似物前体，得到人胰岛素类似物。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的方法，所述的人胰岛素类似物为 B30 缺失的人胰岛素，和/或进一步经过酰化基团的取代，

优选的，所述取代是 B29 位的赖氨酸被取代；

更优选的，所述取代的产物为赖氨酸 B29 (N^{ε}-(N^{α}-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^{ε}-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/074384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/17(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i; C12N 1/16(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)

C12N; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI; CPRSABS; SIPOABS; CNABS; CNTXT; USTXT; WOTXT; EPTXT; CNKI; 万方数据库, WANFANG DATABASE; ISI WEB OF SCIENCE; PUBMED: alpha-因子, 信号, 信号肽, 胰岛素, 酵母, 密码子优化, 密码子修饰, 恒瑞, alpha-factor, yeast, saccharomyces, ps-sp-ls-gene-ps, signal, signal peptide, factor, codon optimization; GENBANK+EMBL+STN+中国专利生物序列检索数据库: 对SEQ ID NOs: 1-15的序列检索, GENBANK+EMBL+STN+NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: search for SEQ ID NOs: 1-15.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1302333 A (NOVO NORDISK A/S) 04 July 2001 (2001-07-04) see claims 1-10, and description, page 5, paragraph 3, sequence table SEQ ID NO: 3	1-13
A	US 5602034 A (CHIRON CORP.) 11 February 1997 (1997-02-11) see claims 1-5, and column 8, paragraphs 35-54	1-13
A	WO 2018024186 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO.) 08 February 2018 (2018-02-08) see description, embodiment 1	2-13
A	CN 1154143 A (NOVO NORDISK A/S) 09 July 1997 (1997-07-09) see entire document	1-13
A	CN 1836047 A (SEMBIOSYS GENETICS INC.) 20 September 2006 (2006-09-20) see entire document	1-13
A	WO 2013022721 A1 (MERCK SHARP & DOHME ET AL.) 14 February 2013 (2013-02-14) see entire document	1-13

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ 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
12 April 2019	**28 April 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **State Intellectual Property Office of the P. R. China** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing** **100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/074384

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104788556 A (SHANGHAI HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) 22 July 2015 (2015-07-22) see entire document	2-13
A	MANSUR, M. et al. "Multiple Gene Copy Number Enhances Insulin Precursor Secretion in the Yeast Pichia Pastoris" *Biotechnology Letters,* Vol. 27, No. (5), 31 March 2005 (2005-03-31), ISSN: 0438-0479, pages 339-345, see entire document	1-13
A	史莹飞等 (SHI, Yingfei et al.). "人胰岛素原密码子的优化及其在毕赤酵母中的表达 (Codon Optimization of Human Proinsulin and Expression in Pichia Pastoris)" *厦门大学学报 (自然科学版) (Journal of Xiamen University (Natural Science)),* Vol. 51, No. (1), 31 January 2012 (2012-01-31), ISSN: 0438-0479, pages 101-106	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/074384

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/074384

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1302333	A	04 July 2001	IL	136770	D0	14 June 2001
US	5602034	A	11 February 1997	FI	886008	A	01 July 1989
				DK	175910	B1	13 June 2005
				FI	100995	B	31 March 1998
				EP	0324274	B1	18 November 1993
				PT	89367	A	29 December 1989
				NO	178829	C	12 June 1996
				PT	89367	B	30 September 1993
				DK	176075	B1	10 April 2006
				US	RE37343	E	28 August 2001
				NO	885786	A	03 July 1989
				DE	3885728	T2	10 March 1994
				NO	178829	B	04 March 1996
				AT	97441	T	15 December 1993
				CA	1340772	C	28 September 1999
				AU	2765088	A	06 July 1989
				JP	H022339	A	08 January 1990
				IE	62087	B1	14 December 1994
				JP	2793215	B2	03 September 1998
				ES	2059547	T3	16 November 1994
				HK	139994	A	16 December 1994
				AU	616228	B2	24 October 1991
				US	RE37343	E1	28 August 2001
				EP	0324274	A1	19 July 1989
				DE	3885728	D1	23 December 1993
				DK	728588	A	01 July 1989
				IE	883896	L	30 June 1989
				DK	200500130	A	27 January 2005
				NO	885786	D0	28 December 1988
				IL	88802	D0	31 July 1989
				DK	728588	D0	29 December 1988
WO	2018024186	A1	08 February 2018	CN	108463468	A	28 August 2018
				TW	201805300	A	16 February 2018
CN	1154143	A	09 July 1997	CN	1115413	C	23 July 2003
				PT	763117	T	31 May 2002
				FI	965005	A	13 February 1997
				DK	0763117	T3	18 February 2002
				AU	2733495	A	05 January 1996
				US	5639642	A	17 June 1997
				JP	3676369	B2	27 July 2005
				PL	317722	A1	28 April 1997
				BR	9508033	A	29 June 1999
				DE	69523915	T2	22 August 2002
				JP	H10501413	A	10 February 1998
				NO	965362	D0	13 December 1996
				US	5795746	A	18 August 1998
				EP	0763117	A1	19 March 1997
				NO	965362	A	13 February 1997
				CZ	9603641	A3	14 May 1997
				AT	208823	T	15 November 2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/074384

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				DE	69523915	D1	20 December 2001
				ES	2168367	T3	16 June 2002
				AU	693569	B2	02 July 1998
				HU	221118	B1	28 August 2002
				CZ	290069	B6	15 May 2002
				HU	T76378	A	28 August 1997
				WO	9534666	A1	21 December 1995
				FI	965005	A0	13 December 1996
				KR	100251054	B1	15 April 2000
				MX	9606492	A	29 March 1997
				PT	763117	E	31 May 2002
				EP	0763117	B1	14 November 2001
				HU	9603477	D0	28 February 1997
CN	1836047	A	20 September 2006	TW	I345587	B	21 July 2011
				US	7547821	B2	16 June 2009
				AU	2004247762	A1	23 December 2004
				JP	2011200251	A	13 October 2011
				DE	602004015980	D1	02 October 2008
				KR	20060052705	A	19 May 2006
				EA	014887	B1	28 February 2011
				EP	1633876	A2	15 March 2006
				JP	4864701	B2	01 February 2012
				AR	044803	A1	05 October 2005
				BR	PI0411479	A	25 July 2006
				US	2005039235	A1	17 February 2005
				NO	20055885	A	17 January 2006
				ES	2313018	T3	01 March 2009
				MX	PA05013723	A	13 March 2006
				IL	172469	D0	10 April 2006
				DK	1633876	T3	08 December 2008
				AT	405660	T	15 September 2008
				EP	1959017	A1	20 August 2008
				CY	1108477	T1	09 April 2014
				WO	2004111244	A2	23 December 2004
				AU	2004247762	B2	27 May 2010
				CN	1836047	B	22 December 2010
				WO	2004111244	A3	03 February 2005
				CA	2528741	A1	23 December 2004
				NZ	544522	A	28 March 2008
				IL	172469	A	31 August 2011
				JP	2007523611	A	23 August 2007
				TW	200510529	A	16 March 2005
				EP	1633876	B1	20 August 2008
				HK	1088037	A1	05 June 2009
				EA	200600050	A1	30 June 2006
				US	2009282583	A1	12 November 2009
				PT	1633876	E	03 November 2008
WO	2013022721	A1	14 February 2013	CA	2843640	A1	14 February 2013
				KR	20140057589	A	13 May 2014
				US	2016289290	A1	06 October 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/074384

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				CN	103889444	A	25 June 2014
				TW	201311720	A	16 March 2013
				EP	2744510	A4	29 April 2015
				JP	2014525922	A	02 October 2014
				AR	087433	A1	26 March 2014
				US	2014235537	A1	21 August 2014
				EP	2744510	A1	25 June 2014
				AU	2012294656	A1	20 February 2014
CN	104788556	A	22 July 2015	HK	1188795	A1	21 July 2017
				AU	2012350586	B2	02 February 2017
				CN	103443122	B	11 May 2016
				CN	103443122	A	11 December 2013
				MX	2014006698	A	09 July 2014
				JP	6153206	B2	28 June 2017
				BR	112014013483	A2	13 June 2017
				EP	2784085	A4	08 July 2015
				CA	2858253	A1	20 June 2013
				IN	933MUN2014	A	01 May 2015
				US	9458219	B2	04 October 2016
				TW	201323439	A	16 June 2013
				EP	2784085	A1	01 October 2014
				ZA	201404417	B	27 July 2016
				RU	2014127270	A	10 February 2016
				WO	2013086927	A1	20 June 2013
				AU	2012350586	A1	03 July 2014
				US	2014329745	A1	06 November 2014
				KR	20140104994	A	29 August 2014
				JP	2015501819	A	19 January 2015

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2019/074384

A. 主题的分类

C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/17(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i; C12N 1/16(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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）)

DWPI;CPRSABS;SIPOABS;CNABS;CNTXT;USTXT;WOTXT;EPTXT;CNKI;万方数据库; ISI WEB OF SCIENCE;PUBMED:alpha-因子，信号，信号肽，胰岛素，酵母，密码子优化，密码子修饰，恒瑞，alpha-factor,yeast,saccharomyces,ps-sp-ls-gene-ps，signal，signal peptide,factor，codon optimization;GENBANK+EMBL+STN+中国专利生物序列检索数据库：对SEQ ID NOs:1-15的序列检索。

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	CN 1302333 A (诺沃挪第克公司) 2001年 7月 4日 (2001-07-04) 参见权利要求1-10，说明书第5页第3段，序列表SEQ ID NO:3	1-13
A	US 5602034 A (CHIRON CORP) 1997年 2月 11日 (1997-02-11) 参见权利要求1-5，第8栏35-54段	1-13
A	WO 2018024186 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO) 2018年 2月 8日 (2018-02-08) 参见说明书实施例1	2-13
A	CN 1154143 A (诺沃挪第克公司) 1997年 7月 9日 (1997-07-09) 参见全文	1-13
A	CN 1836047 A (赛姆生物系统遗传公司) 2006年 9月 20日 (2006-09-20) 参见全文	1-13
A	WO 2013022721 A1 (MERCK SHARP & DOHME等) 2013年 2月 14日 (2013-02-14) 参见全文	1-13

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 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

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 4月 12日	2019年 4月 28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 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 传真号 (86-10)62019451	受权官员 李肖蕖 电话号码 62411615

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/074384

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	CN 104788556 A (上海恒瑞医药有限公司 江苏恒瑞医药股份有限公司) 2015年 7月 22日 (2015 - 07 - 22) 参见全文	2-13
A	MANSUR M.等. "Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast Pichia pastoris" Biotechnology Letters, 第27卷，第5期，2005年 3月 31日 (2005 - 03 - 31)， ISSN：0438-0479, 第339-345页，参见全文	1-13
A	史莹飞等. "人胰岛素原密码子的优化及其在毕赤酵母中的表达" 厦门大学学报（自然科学版），第51卷，第1期，2012年 1月 31日 (2012 - 01 - 31)， ISSN：0438-0479, 第101-106页	1-13

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/074384

第I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表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/074384

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	1302333	A	2001年 7月 4日	IL	136770	D0	2001年 6月 14日
US	5602034	A	1997年 2月 11日	FI	886008	A	1989年 7月 1日
				DK	175910	B1	2005年 6月 13日
				FI	100995	B	1998年 3月 31日
				EP	0324274	B1	1993年 11月 18日
				PT	89367	A	1989年 12月 29日
				NO	178829	C	1996年 6月 12日
				PT	89367	B	1993年 9月 30日
				DK	176075	B1	2006年 4月 10日
				US	RE37343	E	2001年 8月 28日
				NO	885786	A	1989年 7月 3日
				DE	3885728	T2	1994年 3月 10日
				NO	178829	B	1996年 3月 4日
				AT	97441	T	1993年 12月 15日
				CA	1340772	C	1999年 9月 28日
				AU	2765088	A	1989年 7月 6日
				JP	H022339	A	1990年 1月 8日
				IE	62087	B1	1994年 12月 14日
				JP	2793215	B2	1998年 9月 3日
				ES	2059547	T3	1994年 11月 16日
				HK	139994	A	1994年 12月 16日
				AU	616228	B2	1991年 10月 24日
				US	RE37343	E1	2001年 8月 28日
				EP	0324274	A1	1989年 7月 19日
				DE	3885728	D1	1993年 12月 23日
				DK	728588	A	1989年 7月 1日
				IE	883896	L	1989年 6月 30日
				DK	200500130	A	2005年 1月 27日
				NO	885786	D0	1988年 12月 28日
				IL	88802	D0	1989年 7月 31日
				DK	728588	D0	1988年 12月 29日
WO	2018024186	A1	2018年 2月 8日	CN	108463468	A	2018年 8月 28日
				TW	201805300	A	2018年 2月 16日
CN	1154143	A	1997年 7月 9日	CN	1115413	C	2003年 7月 23日
				PT	763117	T	2002年 5月 31日
				FI	965005	A	1997年 2月 13日
				DK	0763117	T3	2002年 2月 18日
				AU	2733495	A	1996年 1月 5日
				US	5639642	A	1997年 6月 17日
				JP	3676369	B2	2005年 7月 27日
				PL	317722	A1	1997年 4月 28日
				BR	9508033	A	1999年 6月 29日
				DE	69523915	T2	2002年 8月 22日
				JP	H10501413	A	1998年 2月 10日
				NO	965362	D0	1996年 12月 13日
				US	5795746	A	1998年 8月 18日
				EP	0763117	A1	1997年 3月 19日
				NO	965362	A	1997年 2月 13日
				CZ	9603641	A3	1997年 5月 14日
				AT	208823	T	2001年 11月 15日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/074384

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）
				DE	69523915	D1	2001年 12月 20日
				ES	2168367	T3	2002年 6月 16日
				AU	693569	B2	1998年 7月 2日
				HU	221118	B1	2002年 8月 28日
				CZ	290069	B6	2002年 5月 15日
				HU	T76378	A	1997年 8月 28日
				WO	9534666	A1	1995年 12月 21日
				FI	965005	A0	1996年 12月 13日
				KR	100251054	B1	2000年 4月 15日
				MX	9606492	A	1997年 3月 29日
				PT	763117	E	2002年 5月 31日
				EP	0763117	B1	2001年 11月 14日
				HU	9603477	D0	1997年 2月 28日
CN	1836047	A	2006年 9月 20日	TW	I345587	B	2011年 7月 21日
				US	7547821	B2	2009年 6月 16日
				AU	2004247762	A1	2004年 12月 23日
				JP	2011200251	A	2011年 10月 13日
				DE	602004015980	D1	2008年 10月 2日
				KR	20060052705	A	2006年 5月 19日
				EA	014887	B1	2011年 2月 28日
				EP	1633876	A2	2006年 3月 15日
				JP	4864701	B2	2012年 2月 1日
				AR	044803	A1	2005年 10月 5日
				BR	PI0411479	A	2006年 7月 25日
				US	2005039235	A1	2005年 2月 17日
				NO	20055885	A	2006年 1月 17日
				ES	2313018	T3	2009年 3月 1日
				MX	PA05013723	A	2006年 3月 13日
				IL	172469	D0	2006年 4月 10日
				DK	1633876	T3	2008年 12月 8日
				AT	405660	T	2008年 9月 15日
				EP	1959017	A1	2008年 8月 20日
				CY	1108477	T1	2014年 4月 9日
				WO	2004111244	A2	2004年 12月 23日
				AU	2004247762	B2	2010年 5月 27日
				CN	1836047	B	2010年 12月 22日
				WO	2004111244	A3	2005年 2月 3日
				CA	2528741	A1	2004年 12月 23日
				NZ	544522	A	2008年 3月 28日
				IL	172469	A	2011年 8月 31日
				JP	2007523611	A	2007年 8月 23日
				TW	200510529	A	2005年 3月 16日
				EP	1633876	B1	2008年 8月 20日
				HK	1088037	A1	2009年 6月 5日
				EA	200600050	A1	2006年 6月 30日
				US	2009282583	A1	2009年 11月 12日
				PT	1633876	E	2008年 11月 3日
WO	2013022721	A1	2013年 2月 14日	CA	2843640	A1	2013年 2月 14日
				KR	20140057589	A	2014年 5月 13日
				US	2016289290	A1	2016年 10月 6日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/074384

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	103889444	A	2014年 6月 25日
				TW	201311720	A	2013年 3月 16日
				EP	2744510	A4	2015年 4月 29日
				JP	2014525922	A	2014年 10月 2日
				AR	087433	A1	2014年 3月 26日
				US	2014235537	A1	2014年 8月 21日
				EP	2744510	A1	2014年 6月 25日
				AU	2012294656	A1	2014年 2月 20日
CN	104788556	A	2015年 7月 22日	HK	1188795	A1	2017年 7月 21日
				AU	2012350586	B2	2017年 2月 2日
				CN	103443122	B	2016年 5月 11日
				CN	103443122	A	2013年 12月 11日
				MX	2014006698	A	2014年 7月 9日
				JP	6153206	B2	2017年 6月 28日
				BR	112014013483	A2	2017年 6月 13日
				EP	2784085	A4	2015年 7月 8日
				CA	2858253	A1	2013年 6月 20日
				IN	933MUN2014	A	2015年 5月 1日
				US	9458219	B2	2016年 10月 4日
				TW	201323439	A	2013年 6月 16日
				EP	2784085	A1	2014年 10月 1日
				ZA	201404417	B	2016年 7月 27日
				RU	2014127270	A	2016年 2月 10日
				WO	2013086927	A1	2013年 6月 20日
				AU	2012350586	A1	2014年 7月 3日
				US	2014329745	A1	2014年 11月 6日
				KR	20140104994	A	2014年 8月 29日
				JP	2015501819	A	2015年 1月 19日