



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102311501 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 11

(21) 申请号 201010220567. 1

A61K 38/22(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 08

A61K 47/48(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

(71) 申请人 天津药物研究院

A61K 9/10(2006. 01)

地址 300193 天津市南开区鞍山西道 308 号

A61K 9/19(2006. 01)

(72) 发明人 龚珉 徐为人 郑学敏 任晓文

A61P 3/04(2006. 01)

汤立达 王玉丽 刘巍 孟凡翠

A61P 3/10(2006. 01)

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 曹津燕

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 21 页

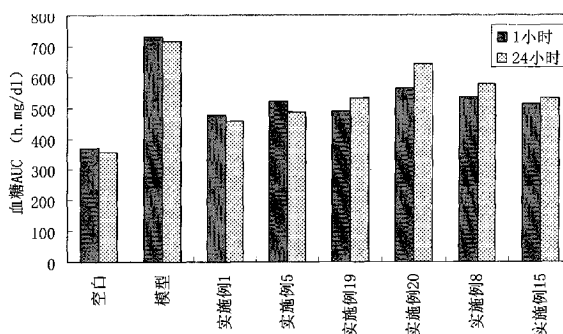
序列表 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

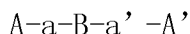
含有 GLP-1 或其类似物的融合蛋白、制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明属于糖尿病、肥胖症药物领域。具体而言,本发明涉及具有延长胰高血糖素样肽体内半衰期的重组融合蛋白及其制备方法、包含该融合蛋白的药物组合物以及该融合蛋白在制备治疗糖尿病和 / 或肥胖症药物中的应用。该融合蛋白由以下通式 I 表示 :A-a-B-a'-A' (I) 其中,A、A' 独立地为氨基酸序列为 SEQ ID NO 53 的多肽 1 或氨基酸序列为 SEQ ID NO 54 的多肽 2 ;B 为氨基酸序列为 SEQ ID NO 55 的多肽 3 或氨基酸序列为 SEQ ID NO 56 的多肽 4 ;a、a' 独立地为由 0-5 个氨基酸残基,例如 0-3 个氨基酸残基组成的连接肽。



1. 一种融合蛋白,所述融合蛋白由以下通式 I 表示:



(I)

其中,

A、A'独立地为氨基酸序列为 SEQ ID NO 53 的多肽 1 或氨基酸序列为 SEQ ID NO 54 的多肽 2;

B 为氨基酸序列为 SEQ ID NO 55 的多肽 3 或氨基酸序列为 SEQ ID NO 56 的多肽 4;

a、a' 独立地为由 0-5 个氨基酸残基,例如 0-3 个氨基酸残基组成的连接肽。

2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白,其特征在于,组成所述连接肽的氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;优选为甘氨酸。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白,其特征在于,所述 A 和 A' 中之一以 N- 末端与连接肽相连,另一个以 C- 末端与连接肽相连。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的结构如下:

NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 1- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 1- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 1- 多肽 4- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 1- 多肽 3- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 1- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 1- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 2- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 2- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 2- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 2- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 2- 多肽 3- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 2- 多肽 4- 多肽 2-COOH;

NH₂- 多肽 1-(GLY)₅- 多肽 4-(GLY)₅- 多肽 1-COOH;

NH₂- 多肽 1-(ALA)₂- 多肽 4-(ILE)₃- 多肽 1-COOH;或

NH₂- 多肽 1-VAL- 多肽 4-(VAL)₄- 多肽 1-COOH;

优选地,所述融合蛋白的结构如下:

NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

NH₂-多肽 1-GLY-多肽 4-GLY-多肽 1-COOH;

NH₂-多肽 1-多肽 4-多肽 3-多肽 1-COOH;

NH₂-多肽 1-多肽 3-多肽 1-COOH;

NH₂-多肽 1-GLY-多肽 4-GLY-多肽 2-COOH;

NH₂-多肽 2-GLY-多肽 3-GLY-多肽 1-COOH;

NH₂-多肽 2-GLY-多肽 3-GLY-多肽 2-COOH;

NH₂-多肽 2-GLY-多肽 4-GLY-多肽 2-COOH;

NH₂-多肽 2-多肽 3-多肽 2-COOH;或

NH₂-多肽 2-多肽 4-多肽 2-COOH;

更优选地,所述融合蛋白的结构如下:

NH₂-多肽 1-GLY-多肽 3-GLY-多肽 1-COOH;或

NH₂-多肽 2-GLY-多肽 3-GLY-多肽 2-COOH。

5. 编码根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的融合蛋白的核酸序列。

6. 包含根据权利要求 5 所述的核酸序列的载体。

7. 包含根据权利要求 6 所述的载体的宿主细胞。

8. 一种根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的融合蛋白的制备方法,该制备方法包括在表达可检测量的所述融合蛋白的条件下转录和翻译权利要求 5 所述的核酸序列的步骤。

9. 一种根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的融合蛋白的制备方法,该制备方法包括以下步骤:

1) 构建根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的融合蛋白的核酸序列;

2) 构建包含步骤 1) 构建的核酸序列的表达载体;

3) 将步骤 2) 构建的表达载体用于转染或转化宿主细胞,并使所述核酸序列在宿主细胞中表达;

4) 纯化得到融合蛋白。

10. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 5 所述的核酸序列、权利要求 6 所述的载体或权利要求 7 所述的宿主细胞在制备治疗糖尿病,肥胖症,和 / 或糖尿病、肥胖症相关疾病的药物中的应用。

11. 一种药物组合物,该药物组合物包含根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的融合蛋白和一种或多种药学上可接受的辅料。

12. 根据权利要求 11 所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物为液体注射剂或冻干注射剂。

含有 GLP-1 或其类似物的融合蛋白、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于与糖尿病相关的药物领域。具体而言,本发明涉及一种具有延长的胰高血糖素样肽类的体内半衰期的融合蛋白。本发明还涉及该融合蛋白的制备方法以及其在制备糖尿病药物中的应用。

背景技术

[0002] 本发明涉及的胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, 以下简称:GLP-1) 主要是由小肠 L 细胞分泌的一种由 37 个氨基酸组成的多肽,其活性形式为 GLP-1(7-37)OH 和 GLP-1(7-36)NH₂ (Mojsov S, J Clin Invest. 1987 Feb ;79(2) :616-9)。GLP-1 能够明显降低人用餐后的血糖,刺激胰岛素的产生,同时还能起到一定的减肥效应,并且不会引起低血糖症 (Drucker D J, Diabetes. 1998 Feb ;47(2) :159-69)。近期的研究还表明 GLP-1 对胰腺具有再生作用 (Drucker D J, 2003 Dec ;144(12) :5145-8)。然而, GLP-1(7-37) 的血清半衰期仅仅为 3-5 分钟。在 GLP-1 肽的治疗用途方面,来自蜥蜴唾液的人 GLP-1 类似物 Exendin-4 的合成物 Exenatide 已于 2005 年在美国作为降糖药上市,这种合成物在血中的半衰期为 2.5 小时左右,每天需要在早饭及晚饭前注射给药,导致在临床使用中每天多次注射给药非常不便。因此,延长 GLP-1 类似物的体内时间对于临床应用具有重要的意义。

[0003] 目前已经有不少研究采用 GLP-1 类似物融合蛋白技术解决 GLP-1 类似物在体内的存留时间短的问题 (例如中国专利申请 CN90101167.3、CN200710018734.2、CN200410054397.9、CN01820232.2、CN200380110152.7、CN200510039265.3、CN200610127237.1 和 CN200910009642.7)。然而,现有技术与临床上的理想目标还有很大距离。

发明内容

[0004] 针对现有技术存在的不足,本发明采用融合蛋白技术克服了 GLP-1 半衰期短的问题。本发明的一个目的是提供一种融合蛋白,该融合蛋白具有 GLP-1 或其类似物的活性,并且在体内的存留时间长,从而克服现有技术中 GLP-1 类似物药物需要每天多次注射给药的缺陷。本发明的另一目的是提供编码该融合蛋白的核酸序列、包含该核酸序列的载体以及包含该载体的宿主细胞。本发明的再一个目的是提供制备该融合蛋白的方法。本发明的又一个目的是提供该融合蛋白的应用,包括其在制备治疗糖尿病和 / 或肥胖症药物中的应用。本发明的又一个目的是提供包含该融合蛋白的药物组合物。

[0005] 用于实现上述目的的技术方案如下:

[0006] 一方面,本发明提供一种融合蛋白,融合蛋白由以下通式 I 表示:

[0007] $A-a-B-a'-A'$

[0008] (I)

[0009] 其中,

[0010] A、A' 独立地为氨基酸序列为 SEQ ID NO 53 的多肽 1 或氨基酸序列为 SEQ ID NO

54 的多肽 2；

[0011] B 为氨基酸序列为 SEQ ID NO 55 的多肽 3 或氨基酸序列为 SEQ ID N056 的多肽 4；

[0012] a、a' 独立地为由 0-5 个氨基酸残基,例如 0-3 个氨基酸残基组成的连接肽。

[0013] 在上述融合蛋白中,组成所述连接肽的氨基酸可以选自甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;优选为甘氨酸。优选地,所述 A 和 A' 中之一以 N- 末端与连接肽相连,另一个以 C- 末端与连接肽相连。

[0014] 具体而言,所述融合蛋白的结构如下:

[0015] NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

[0016] NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

[0017] NH₂- 多肽 1- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

[0018] NH₂- 多肽 1- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

[0019] NH₂- 多肽 1- 多肽 4- 多肽 1-COOH;

[0020] NH₂- 多肽 1- 多肽 3- 多肽 1-COOH;

[0021] NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

[0022] NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

[0023] NH₂- 多肽 1- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

[0024] NH₂- 多肽 1- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

[0025] NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

[0026] NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

[0027] NH₂- 多肽 2- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

[0028] NH₂- 多肽 2- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

[0029] NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

[0030] NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

[0031] NH₂- 多肽 2- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

[0032] NH₂- 多肽 2- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

[0033] NH₂- 多肽 2- 多肽 3- 多肽 2-COOH;

[0034] NH₂- 多肽 2- 多肽 4- 多肽 2-COOH;

[0035] NH₂- 多肽 1-(GLY)₅- 多肽 4-(GLY)₅- 多肽 1-COOH;

[0036] NH₂- 多肽 1-(ALA)₂- 多肽 4-(ILE)₃- 多肽 1-COOH;或

[0037] NH₂- 多肽 1-VAL- 多肽 4-(VAL)₄- 多肽 1-COOH;

[0038] 优选地,所述融合蛋白的结构如下:

[0039] NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

[0040] NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

[0041] NH₂- 多肽 1- 多肽 4-GLY- 多肽 1-COOH;

[0042] NH₂- 多肽 1- 多肽 3- 多肽 1-COOH;

[0043] NH₂- 多肽 1-GLY- 多肽 4-GLY- 多肽 2-COOH;

[0044] NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 1-COOH;

[0045] NH₂- 多肽 2-GLY- 多肽 3-GLY- 多肽 2-COOH;

[0046] NH_2 -多肽 2-GLY-多肽 4-GLY-多肽 2-COOH；

[0047] NH_2 -多肽 2-多肽 3-多肽 2-COOH；或

[0048] NH_2 -多肽 2-多肽 4-多肽 2-COOH；

[0049] 更优选地，所述融合蛋白的结构如下：

[0050] NH_2 -多肽 1-GLY-多肽 3-GLY-多肽 1-COOH；或

[0051] NH_2 -多肽 2-GLY-多肽 3-GLY-多肽 2-COOH。

[0052] 相应地，本发明还提供了编码上述融合蛋白的核酸序列，包含该核酸序列的载体，以及包含该载体的宿主细胞。

[0053] 另一方面，本发明还提供了一种上述融合蛋白的制备方法，该制备方法包括在表达可检测量的所述融合蛋白的条件下转录和翻译上述核酸序列的步骤。

[0054] 具体来说，上述融合蛋白的制备方法包括以下步骤：

[0055] 1) 构建根据上述融合蛋白的核酸序列；

[0056] 2) 构建包含步骤 1) 构建的核酸序列的表达载体；

[0057] 3) 将步骤 2) 构建的表达载体用于转染或转化宿主细胞，并使所述核酸序列在宿主细胞中表达；

[0058] 4) 纯化得到融合蛋白。

[0059] 又一方面，本发明提供了上述融合蛋白、核酸序列、载体或宿主细胞在制备治疗糖尿病，肥胖症，和 / 或糖尿病、肥胖症相关疾病的药物中的应用。

[0060] 再一方面，本发明提供了一种药物组合物，该药物组合物包含上述融合蛋白和一种或多种药学上可接受的辅料。优选地，该药物组合物为液体注射剂或冻干注射剂。

[0061] 与现有技术相比，本发明至少具有以下优点：

[0062] 1、本发明的融合蛋白在体内的存留时间较长，避免了同类产品在用于治疗时需要每天多次注射给药的缺陷，便于临床应用。

[0063] 2、本发明的融合蛋白优选来源于人的天然序列，减少了融合蛋白在人体内潜在的免疫原性风险。

[0064] 3、本发明的融合蛋白可以通过浓缩至药用浓度，作为药物有效成分与一种或多种药学上可接受的载体等组分制备成药用组合物，用于糖尿病及肥胖症等疾病和相关病症或疾病的治疗中。

[0065] 以下是本发明的详细描述：

[0066] 本发明的一个目的是针对临床上 GLP-1 或其类似物药物在体内的存留时间较短，导致治疗作用较短、每天需要多次注射给药的缺陷，提供具有通式 I 结构的含有 GLP-1 或其类似物的融合蛋白及其在制备糖尿病治疗药物中的应用。

[0067] 本发明的另一个目的是提供一种药用组合物，该药用组合物含有通式 I 结构所示的含 GLP-1 或其类似物融合蛋白作为有效成分，以及一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂等。

[0068] 现结合本发明的目的对本发明逐一加以描述。

[0069] 本发明的含 GLP-1 或类似物融合蛋白也可以如下述通式 I' 所示：

[0070] A-连接肽 1-多肽 2-连接肽 2-A'

[0071] I'

- [0072] 其中，
- [0073] A、A' 分别为 GLP-1 或 Exendin-4；
- [0074] 多肽 2 为人血清白蛋白 HSA 或人免疫球蛋白 Fc；
- [0075] 连接肽 1、连接肽 2 分别为 0-5 个氨基酸残基，氨基酸残基优选 GLY、ALA、ILE 和 VAL 中的一种或多种；
- [0076] A 和 A' 可以以 N- 末端及 C- 末端与其它肽连接。
- [0077] 根据通式 I'，优选以下的含 GLP-1 或类似物融合蛋白，其中，
- [0078] A、A' 分别为 GLP-1 或 Exendin-4；
- [0079] 多肽 2 为人血清白蛋白 HSA 或人免疫球蛋白 Fc；
- [0080] 连接肽 1、连接肽 2 分别为 0-3 个氨基酸残基，氨基酸残基优选 :GLY；
- [0081] A 和 A' 可以以 N- 末端及 C- 末端与其它肽连接。
- [0082] 根据通式 I'，本发明更为优选的含 GLP-1 或类似物融合蛋白选自：
- [0083] $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-HSA-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0084] $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-Fc-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0085] $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0086] $\text{NH}_2\text{GLP-1-Fc-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0087] $\text{NH}_2\text{GLP-1-Fc-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0088] $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0089] $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0090] $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-Fc-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0091] $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0092] $\text{NH}_2\text{GLP-1-Fc-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0093] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-GLY-HSA-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0094] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-GLY-Fc-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0095] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-HSA-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0096] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-Fc-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0097] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-GLY-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0098] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-GLY-Fc-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0099] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0100] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-Fc-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0101] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-HSA-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0102] $\text{NH}_2\text{Exendin-4-Fc-Exendin-4}^{\text{COOH}}$
- [0103] $\text{NH}_2\text{GLP-1-(GLY)}_5\text{-Fc-(GLY)}_5\text{-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0104] $\text{NH}_2\text{GLP-1-(ALA)}_2\text{-Fc-(ILE)}_3\text{-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0105] $\text{NH}_2\text{GLP-1-VAL-Fc-(VAL)}_4\text{-GLP-1}^{\text{COOH}}$
- [0106] 在前述融合蛋白中，GLP-1 的氨基酸序列为：
- [0107] SEQ ID NO 53：⁷-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-³⁶
- [0108] Exendin-4 序列为：
- [0109] SEQ ID NO 54：GEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKIGGPSSGAPPPS

[0110] HSA 氨基酸序列为：

[0111] SEQ ID NO 55：

[0112] MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDDAHKSEVAHRFKDLGEEFNFKALV
[0113] LIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF
[0114] GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLPRLV
[0115] RPEVDVMCTAFHDNEETFLLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKA
[0116] AFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKAS SAKQRLK CASLQKFGER
[0117] AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECAD
[0118] DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP
[0119] SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLLRL
[0120] AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKLV EEPQNLIKQNC ELF E
[0121] QLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
[0122] AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCF
[0123] SALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHK
[0124] PKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAA
[0125] LGL

[0126] IgG Fc 氨基酸序列为：

[0127] SEQ ID NO 56：

[0128] WQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKC
[0129] QGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLS
[0130] T L S D P V Q L E V H I G W L L L Q A P R W V F K E E D P I H L R C H S W K N T A L H K V T
[0131] YLQNGKGRKYFHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSETV
[0132] NITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRS
[0133] STRDWDHKFKWRKDPQDK

[0134] 根据上述融合蛋白的氨基酸序列可以获得该融合蛋白相应的核酸序列,或包含该核酸序列的核酸序列。该融合蛋白可以采用其核酸序列或包含其核酸序列的序列,通过本领域常规技术手段获得。上述融合蛋白的核酸及氨基酸序列由 NCBI 公布,属于公认序列。

[0135] 本发明提供产生该融合蛋白的方法,该方法可包括在表达可检测量的所述融合蛋白的条件下转录和翻译上述融合蛋白的核酸序列的步骤。

[0136] 此外,本发明所提供的该融合蛋白的制备方法还可以包含以下步骤：

[0137] 1、构建编码本发明的异源融合蛋白的 DNA

[0138] 可以从各种来源获得本发明中的异源融合蛋白中的野生型白蛋白和免疫球蛋白,例如这些蛋白可以从由表达野生型白蛋白及免疫球蛋白的 mRNA 的组织或细胞的 cDNA 文库获得。本发明采用标准的 PCR 方法对相关的异源融合蛋白的 mRNA 进行筛选,通过公开的白蛋白及免疫球蛋白的 DNA、蛋白序列设计引物。

[0139] 本发明的异源融合蛋白(白蛋白、免疫球蛋白)优选来源于人的天然序列,以减少融合蛋白在人体内潜在的免疫原性危险。另外,本发明中的免疫球蛋白优选仅包含免疫球蛋白的 Fc 片段。本发明中将根据人血清白蛋白及人免疫球蛋白的公开序列设计 PCR 引物,从人血 RNA 中提取人血清白蛋白及人免疫球蛋白的 mRNA。通过标准的 mRNA 逆转录技术,

将异源融合的 mRNA 逆转录为 DNA。

[0140] 2、构建本发明中 GLP-1 或类似物的 DNA：

[0141] 本发明参考专利 CN1363654A 中 GLP-1 中双链 DNA 全长的合成方法,进行 GLP-1、Exendin-4 及其它 GLP-1 类似物双链 DNA 全长的合成。本发明中 GLP-1、Exendin-4 及其它 GLP-1 类似物都经过标准的 DNA 测序进行序列验证。本发明中的 GLP-1、Exendin-4 及其它 GLP-1 类似物指代连接或不连接连接肽的 GLP-1、Exendin-4 及其它 GLP-1 类似物。

[0142] 3、构建本发明中 GLP-1 异源融合蛋白载体：

[0143] 利用本领域常规的 PCR 突变技术制备连接有不同连接短肽的 GLP-1、Exendin-4 及其它 GLP-1 类似物,并将其用于与蛋白表达质粒的连接。连接技术是本领域常规操作,本发明利用 PCR 将含有连接肽的 GLP-1 类似物与蛋白表达质粒通过 T4 连接酶进行连接,连接位点为 BamHI 与 NdeI,得到本发明中所有融合蛋白的表达载体(示意图如图 3 所示)。一旦产生了编码完整融合蛋白的表达载体,它可以用来传染或转化大肠杆菌等宿主细胞,生产融合蛋白。重组 DNA 载体转化或转染细胞的技术是本领域的常规技术。

[0144] 4、用于重组表达本发明的异源融合蛋白的一般方法：

[0145] 用本发明中的表达载体传染或转化宿主细胞,用于表达异源融合蛋白。参考本领域常规的异源蛋白表达技术优化本发明中各种异源融合蛋白的表达,用于增加细胞培养物的原则、技术(例如培养基、温度、pH 等)可以参见 Mammalian Cell Biotechnology :A Practical Approach, M. Butler。本发明中的含 GLP-1 及其类似物融合蛋白的表达采用本领域常规的 lac 启动子大肠杆菌融合蛋白表达技术,使用 IPTG 启动 GLP-1 类似物融合蛋白的产生。

[0146] 5、本发明异源融合蛋白的纯化：

[0147] 一旦本发明的异源融合蛋白在适当的宿主细胞中表达,可以通过标准的蛋白分离和纯化技术对本发明中的融合蛋白进行纯化。例如根据融合蛋白表达载体内的标签进行融合蛋白的粗提纯。本发明中,纯化后的异源融合蛋白可以通过超滤方法将其浓缩至药用浓度,融合蛋白经过紫外线的处理用以增加其药用的安全性。

[0148] 6、本发明的融合蛋白的表征：

[0149] 本发明中,可以用许多方法表征本发明的融合蛋白。这些方法中的一些包括:与蛋白染色偶联的 SDS-PAGE 或免疫印迹技术。本发明中所有的异源融合蛋白都通过免疫印迹的鉴定,例如使用抗 IgG 的抗体,使用抗 HSA 的抗体,抗 GLP-1 的抗体及抗 Exendin-4 的抗体。发明中免疫印迹表征中抗体的选择见表 1。

[0150] 表 1. 本专利所涉及的蛋白免疫印迹方法中使用的抗体

[0151]

融合蛋白名称	人血清白蛋白抗体	人免疫球蛋白抗体	GLP-1 抗体	Exendin-4 抗体
GLP-1—A—HSA—B—GLP-1	√		√	
Exendin-4—A—HSA—B—Exendin-4	√			√
GLP-1—A—HSA—B—Exendin-4	√		√	√
Exendin-4—A—HSA—B—GLP-1	√		√	√
GLP-1—A—IgG Fc—B—GLP-1		√	√	
Exendin-4—A—IgG Fc—B—Exendin-4		√		√
GLP-1—A—IgG Fc—B—GLP-1		√	√	√
Exendin-4—A—IgG Fc—B—Exendin-4		√	√	√

[0152] 注：A, B 均为连接肽, 氨基酸序列见具体实施例。

[0153] 本发明还提供包含该融合蛋白的药用组合物。

[0154] 本发明含 GLP-1 及 GLP-1 类似物的融合蛋白, 可以与一种或多种药学上可接受的辅料共同制成药物组合物, 这些辅料包括: 水溶性填充剂、PH 调节剂、稳定剂、注射用水、渗透压调节剂等等。该药物组合物可以通过肌肉、静脉内、皮下注射途径进行给药, 优选的剂型为冻干或溶液注射剂。

[0155] 本发明所述的水溶性填充剂辅料包括: 甘露醇、低分子右旋糖苷、山梨醇、聚乙二醇、葡萄糖、乳糖、半乳糖等一种或几种的组合。

[0156] PH 调节剂包括枸橼酸、磷酸、盐酸等非挥发性的酸以及氢氧化钾、氢氧化钠、或钾或铵、碳酸钠或钾或铵盐、碳酸氢钠或钾或铵盐等生理可接受的有机或无机酸和碱及盐以及上述物质中一种或几种的组合;

[0157] 稳定剂包括: EDTA-2Na、硫代硫酸钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、磷酸氢二钾、碳酸氢钠、碳酸钠、精氨酸、谷氨酸、聚乙二醇 6000、聚乙二醇 4000、十二烷基硫酸钠或三羟甲基氨基甲烷的一种或几种的组合。优选焦亚硫酸钠、磷酸氢二钾、精氨酸、聚乙二醇 6000、三羟甲基氨基甲烷的一种或几种的组合。

[0158] 渗透压调节剂包括氯化钠、氯化钾的一种或两种的组合。

[0159] 本发明提供包含该融合蛋白的注射制剂, 所述注射制剂的制备可以示范性参考以下方法:

[0160] (1) 冻干剂

[0161] 取含 GLP-1 及 GLP-1 类似物的融合蛋白和水溶性填充剂、稳定剂、渗透压剂等, 加入注射用水适量, 调节 PH 值至 5-8.5 使其溶解, 加水至刻度, 加入 0.1-0.5% 活性炭, 在 10-25℃ 下搅拌 10-20 分钟, 脱碳, 采用微孔滤膜过滤除菌, 滤液进行分装, 采用冷冻干燥法, 制得白色疏松块状物, 封口即得。

[0162] (2) 溶液注射液

[0163] 取含 GLP-1 及 GLP-1 类似物的融合蛋白和水溶性填充剂、稳定剂、渗透压剂等，加入注射用水适量，调节 PH 值至 5-8.5 使其溶解，加水至刻度，加入 0.1-0.5% 活性炭，在 10-25℃ 下搅拌 10-20 分钟，脱碳，采用微孔滤膜过滤除菌，滤液进行分装，封口即得。

[0164] 本发明的有益效果在于：本发明含 GLP-1 及 GLP-1 类似物的融合蛋白具有更长的体内存留时间，可作为有效成分制备糖尿病治疗药物。有效剂量范围是相当宽的，具体剂量可由医生根据有关的情况来决定，这些情况包括：被治疗者的身体状况、给药途径、年龄、体重、对药物的个体反应，症状的严重程度等。一般来说，本发明活性成分的有效量 1×10^{-7} -20mg/kg/天，可以单剂量给药或成分剂量给药。

附图说明

[0165] 以下，结合附图来详细说明本发明的实施例，其中：

[0166] 图 1 显示了融合蛋白中相关片段的免疫印迹结果，其中 1 为 HSA 的免疫印迹；2 为 IgG Fc 的免疫印迹；3 为 GLP-1 的免疫印迹；4 为 Exendin-4 的免疫印迹。

[0167] 图 2 显示了来自不同实施例的融合蛋白对小鼠耐糖能力的影响，具体为融合蛋白的降血糖作用。

[0168] 图 3 显示了所构建的融合蛋白的表达载体，其中 A 表示 GLP-1-连接肽或 Exendin-4-连接肽，B 表示人血清白蛋白 (HSA) 或人免疫球蛋白 Fc 片段 (IgG Fc)，C 表示 GLP-1-连接肽或 Exendin-4-连接肽。

具体实施方式

[0169] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。

[0170] 实施例 1： $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-HSA-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0171] (1) 载体构建和蛋白的表达纯化

[0172] 本载体的构建：将 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$ 的 N 末端核酸序列构建与质粒连接，同时使其 C 末端与 GLY-HSA 序列及进行连接。然后，将得到的载体（质粒 -GLP-GLY-HSA）的 C 末端与具有 GLY-GLP-1 核酸的 N 末端连接，同时其 C 末端与质粒连接。

[0173] $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY}$ 核酸序列构建所需的 DNA 序列如下：

[0174] SEQ ID NO 1：

[0175] ACGCGAAGGTACCTTACCAGCGATGTGAGCAGCTATCTG

[0176] SEQ ID NO 2：

[0177] TGACCTTCCAGATAGCTGCTCACATCGCTGGTGAAGGTACCTTCC

[0178] GCGTG

[0179] SEQ ID NO 3：

[0180] GAAGGTCAGGCGGCGAAAGAATTTATCGCGTGGCTGGTGAAAGG

[0181] TCGTGGC

[0182] SEQ ID NO 4：

[0183] GCCACGACCTTTACCAGCCACGCGATAAATTTCTTTCCGCCGCC

[0184] GLY-GLP-1^{COOH} 核酸序列的构建所需的 DNA 序列如下：

[0185] SEQ ID NO 5 :

[0186] GGCACGCGGAAGGTACCTTCACCAGCGATGTGAGCAGCTATCTG

[0187] SEQ ID NO 6 :

[0188] TGACCTTCAGATAGCTGCTCACATCGCTGGTGAAGGTACCTTCC

[0189] GCGTGGCC

[0190] SEQ ID NO 7 :

[0191] GAAGGTCAGGCGGCGAAAGAATTTATCGCGTGGCTGGTGAAAGG

[0192] TCGTGGC

[0193] SEQ ID NO 8 :

[0194] ACGACCTTTCACCAGCCACGCGATAAATTCCTTCGCCGCC

[0195] 参考专利 CN1363654A 所述方法,即冷却形成两个双链片段。使用 T4 连接酶将这两个片段连接为 GLP-1 全长序列。具体为:由 SEQ ID NO 1、2、3、4 形成的为^{NH₂}GLP-1-GLY 核酸序列;由 SEQ ID NO 5、6、7、8 形成的即为 GLY-GLP-1^{COOH} 核酸序列(由 SEQ ID 1,2,3,4 得到的双链 DNA 各 4ml,加入 1ml T4 连接酶,1ml T4 连接酶缓冲液,16°C 过夜。1%的 DNA 琼脂糖电泳用于检测连接结果,同样的方法用于由 SEQ ID 5,6,7,8 得到的双链 DNA)。

[0196] 本发明利用常规的基因重组连接技术,经过一步连接法制备^{NH₂}GLP-1-GLY-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 的核酸序列,即在 PCR 扩增 HSA 时(使用 Invitrogen 公司出品的 RNA Isolation Kit 从血液中提取人血总 RNA,然后利用 Invitrogen 公司提供的 Reverse Transcription Kit 进行 RNA 的逆转录)使其 N 及 C 末端具有 GLY 的序列(GLY-HSA-GLY)。最后通过本领域常规的基因重组技术合成^{NH₂}GLP-1-GLY-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 核酸序列。本发明中序列经过 DNA 测序的验证。同样,通过上述的方法得到的 GLP-1 融合蛋白 DNA 序列在其 N- 及 C- 末端具有与大肠杆菌蛋白表达载体 pET28c 连接使用的酶切位点 [NdeI 及 BamHI]。通过领域内常规的限制酶内切技术及 T4 连接酶连接技术,将上述权利要求中的^{NH₂}GLP-1-GLY-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 核酸序列与大肠杆菌表达质粒 pET28c 连接。

[0197] 将构建完毕的 pET28c^{NH₂}GLP-1GLY-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 以热击转化的方法转入 BL21 (DE3) 感受态细胞,热击转化方法为本领域常规的技术。将转化后的融合蛋白表达载体在含有卡那霉素抗生素的 LB 培养皿上培养筛选具有卡那霉素抗性的细胞。将得到的具有卡那霉素抗性的细菌细胞扩大培养后,进行质粒提取及纯化,质粒进行序列鉴定完全正确。

[0198] 将过夜的菌液 1 : 100 比例以 LB 新鲜培养基稀释,37°C 培养菌液直至 OD600 达到 0.6,使用 IPTG 启动融合蛋白的表达,并将体系温度降至 25°C。

[0199] 融合蛋白表达 16h 后,将菌液离心,收集后,超声波破碎菌体,操作程序为:10cycles,15 秒 /cycle。将破碎后的菌液高速离心,上清液被注入镍柱。用镍柱去捕获含 6×HIS 标签的融合蛋白,并利用咪唑的浓度梯度对融合蛋白进行洗脱。将洗脱的蛋白收集,利用具有 10kDa 半透膜的离心管对收集的蛋白进行透析及浓缩。凝血酶处理纯化后的融合蛋白用来切除 N 末端的 6×HIS 标签,凝血酶的酶切技术参考 Invitrogen 公司的实验手册。利用 GelFiltration S-200 蛋白纯化柱进行反应混合物的分离,同时对目标融合蛋白进行精纯。上述纯化后的融合蛋白经 10K 过滤膜过滤浓缩后,紫外线灭菌处理。

[0200] (2)^{NH₂}GLP-1-GLY-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的表征

[0201] 人血清白蛋白融合蛋白的免疫印迹鉴定

[0202] 含 1% SDS 和 2mg 溴酚蓝的 PBS 稀释纯化后的 HSA 融合蛋白。煮沸变性后,取 20 μ l 样品置 SDS-PAGE 胶上,电泳后,将蛋白转至硝酸纤维膜上。用 5% 脱脂奶粉温室封闭 2 小时,加入鼠抗人 HSA 的单抗 (SantaCruz, USA) 室温下孵育 1 小时,然后用 HRP 标记的兔抗鼠多抗进行二抗结合,用 ECL 试剂盒发光显色 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)。结果如图 1 中针对 HSA 的免疫印迹结果所示本发明的融合蛋白得到了较好的表达。

[0203] GLP-1 融合蛋白的免疫印迹鉴定

[0204] 纯化后的蛋白同样将采用相应的免疫印迹方法对 GLP-1 的表达进行鉴定。用含 1% SDS 和 2mg 溴酚蓝的 PBS 稀释纯化后的融合蛋白。煮沸变性后,取 20 μ l 样品置 SDS-PAGE 胶上,电泳后,将蛋白转至硝酸纤维膜上。用 5% 脱脂奶粉温室封闭 2 小时,加入鼠抗人 GLP-1 的单抗 (SantaCruz, USA) 室温下孵育 1 小时,然后用 HRP 标记的兔抗鼠的多抗进行二抗结合,用 ECL 试剂盒发光显色 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)。结果如图 1 中针对 GLP-1 的免疫印迹结果所示本发明的融合蛋白得到了较好的表达。

[0205] 实施例 2: NH_2 GLP-1-GLY-IgG Fc-GLY-GLP-1 $^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0206] (1) 载体的构建和蛋白表达、纯化

[0207] 参考实施例 1 的操作,由实施例 1 中的 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3、SEQ ID NO 4 和 SEQ ID NO 5、SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8 分别制备 NH_2 GLP-1-GLY 和 GLY-GLP-1 $^{\text{COOH}}$ 片段。根据常规的 IgG Fc DNA 序列进行提取,并且通过 PCR 突变技术使得钩钩的 IgG Fc 的 N- 端及 C- 段具有 GLY 序列 (得到 GLY-IgG Fc-GLY)。将 GLY-IgG Fc-GLY 与 GLP-GLY 及 GLY-GLP 进行连接,得到 NH_2 GLP-1-GLY-IgGFc-GLY-GLP-1 $^{\text{COOH}}$ 。根据参考实施例 1 中的内容,进行 NH_2 GLP-1-GLY-IgG Fc-GLY-GLP-1 $^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的表达及纯化。

[0208] (2) 融合蛋白的表征

[0209] 人免疫球蛋白融合蛋白的免疫印迹鉴定

[0210] 含 1% SDS 和 2mg 溴酚蓝的 PBS 稀释纯化后的人免疫球蛋白融合蛋白。煮沸变性后,取 20 μ l 样品置 SDS-PAGE 胶上,电泳后,将蛋白转至硝酸纤维膜上。用 5% 脱脂奶粉温室封闭 2 小时,加入鼠抗人 IgG Fc 的单抗 (SantaCruz, USA) 室温下孵育 1 小时,然后用 HRP 标记的兔抗鼠抗进行二抗结合,用 ECL 试剂盒发光显色 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)。结果如图 1 中针对 IgG 的免疫印迹结果所示本发明的融合蛋白得到了较好的表达。

[0211] GLP-1 的免疫印迹鉴定

[0212] 本发明中,纯化后的蛋白同样将采用相应的免疫印迹方法对 GLP-1 的表达进行鉴定。用含 1% SDS 和 2mg 溴酚蓝的 PBS 稀释纯化后的融合蛋白。煮沸变性后,取 20 μ l 样品置 SDS-PAGE 胶上,电泳后,将蛋白转至硝酸纤维膜上。用 5% 脱脂奶粉温室封闭 2 小时,加入鼠抗人 GLP-1 的单抗 (SantaCruz, USA) 室温下孵育 1 小时,然后用 HRP 标记的兔抗鼠的多抗进行二抗结合,用 ECL 试剂盒发光显色 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)。

[0213] 实施例 3: NH_2 GLP-1-HSA-GLY-GLP-1 $^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0214] 本实施例中连接肽 GLY 仅与 HSA 的 C- 末端连接,只是在本实施例中需要制备 C- 末端不含 GLY 的 NH_2 GLP-1 序列。制备 NH_2 GLP-1 使用的序列如下 (SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10)。同时,钩钩 HSA 时,使其 N- 末端不含 GLY。

[0215] SEQ ID NO 9 :

[0216] GAAGGTCAGGCGGCGAAAGAATTTATCGCGTGGCTGGTGAAAGG

[0217] TCGT

[0218] SEQ ID NO 10 :

[0219] ACGACCTTTCACCAGCCACGCGATAAATTCTTTCGCCGCC

[0220] 本实施例中,将 SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10 取代实施例 1 中的 SEQ IDNO 3, SEQ ID NO 4,参考实施例 1 中的操作方法合成 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$ 及 $\text{GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$ 。使用实施例 1 中的方法制备 $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$,并与 pET28c 质粒连接。本实施例中的融合蛋白的表达载体构建后,按照实施例 1 中的方法表达、纯化及鉴定本实施例中的融合蛋白。

[0221] 实施例 4: $\text{NH}_2\text{GLP-1-IgG Fc-GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0222] 参考实施例 3 的操作,制备 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$ 及 $\text{GLY-GLP-1}^{\text{COOH}}$ 。参考实施例 2 的操作钩钩 IgG Fc 的 DNA,同时使其 N-末端和 C-末端不含 GLY。

[0223] 参考实施例 2 中的蛋白表达、纯化及鉴定方法对本实施例中的融合蛋白进行表达纯化及鉴定。

[0224] 实施例 5: $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLP-1}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0225] 本实施例中的 HSA 的 N-末端、C-末端分别与 GLP-1 直接连接,所以本实施例中需要制备不含连接肽的 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$ 及 $\text{GLP-1}^{\text{COOH}}$ 。 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$ 的制备与实施例 3 中的制备方法一致。制备 $\text{GLP-1}^{\text{COOH}}$ 使用的 DNA 序列如下:

[0226] SEQ ID NO 11 :

[0227] ACGCGGAAGGTACCTTCACCAGCGATGTGAGCAGCTATCTG

[0228] SEQ ID NO 12 :

[0229] TGACCTTCCAGATAGCTGCTCACATCGCTGGTGAAGGTACCTTCC

[0230] GCGTG

[0231] 由上述的 SEQ ID NO 11,SEQ ID NO 12 取代实施例 1 中的 SEQ ID NO5,SEQ ID NO 6。由 SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10 取代实施例 1 中的 SEQ IDNO 3, SEQ ID NO 4。

[0232] 参考实施例 1 的方法制备所得的 $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLP-1}^{\text{COOH}}$ 与表达体质粒 pET28c 连接,并转染大肠杆菌 BL21 (DE3) 细菌。融合蛋白的表达、纯化及鉴定方法均与实施例 1 中所述方法一致。

[0233] 实施例 6: $\text{NH}_2\text{GLP-1-IgG Fc-GLP-1}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0234] 参考实施例 5 的操作,制备 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$ 及 $\text{GLP-1}^{\text{COOH}}$ 。本实施例中 IgG Fc 的钩钩不含连接肽。

[0235] 参考实施例 2 中的核酸连接、蛋白表达、纯化及鉴定方法对本实施例中的融合蛋白进行表达纯化及鉴定。

[0236] 实施例 7: $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0237] (1) 载体构建和蛋白表达、纯化

[0238] $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY}$ 的构建由 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO2、SEQ ID NO3 及 SEQ ID NO 4 参考实施例 1 中的方法合成。 $\text{GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 的构建由 SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15 及 SEQ ID NO 16 参考实施例 1 中双链 DNA 的合成方法,使用的序列如下:

[0239] SEQ ID NO 13 :

[0240] GGCCACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGAT

[0241] GGAAGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0242] SEQ ID NO 14 :

[0243] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0244] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTGCCG

[0245] SEQ ID NO 15 :

[0246] GTTTATCGAATGGCTGAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0247] TCCTCCTAGC

[0248] SEQ ID NO 16 :

[0249] GCTAGGAGGAGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC

[0250] ATTCGATAAA

[0251] 参考实施例 1 中所述的操作, 分别制备 $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY}$, $\text{GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 及 GLY-HSA-GLY , 并表达、纯化 $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白。

[0252] (2) 融合蛋白的表征

[0253] 人血清白蛋白融合蛋白的免疫印迹鉴定

[0254] 含 1% SDS 和 2mg 溴酚蓝的 PBS 稀释纯化后的 HSA 融合蛋白。煮沸变性后, 取 20 μ l 样品置 SDS-PAGE 胶上, 电泳后, 将蛋白转至硝酸纤维膜上。用 5% 脱脂奶粉温室封闭 2 小时, 加入鼠抗人 HSA 的单抗 (SantaCruz, USA) 室温下孵育 1 小时, 然后用 HRP 标记的兔抗鼠多抗进行二抗结合, 用 ECL 试剂盒发光显色 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)。结果如图 1 中针对 Exendin-4 的免疫印迹结果所示本发明的融合蛋白得到了较好的表达。

[0255] GLP-1 及 Exendin-4 的免疫印迹鉴定

[0256] 本发明中, 纯化后的蛋白同样将采用相应的免疫印迹方法对 GLP-1 及 Exendin-4 的表达进行鉴定。用含 1% SDS 和 2mg 溴酚蓝的 PBS 稀释纯化后的融合蛋白。煮沸变性后, 取 20 μ l 样品置 SDS-PAGE 胶上, 电泳后, 将蛋白转至硝酸纤维膜上。用 5% 脱脂奶粉温室封闭 2 小时, 加入鼠抗人 GLP-1 及 Exendin-4 的单抗 (SantaCruz, USA) 室温下孵育 1 小时, 然后用 HRP 标记的兔抗鼠的多抗进行二抗结合, 用 ECL 试剂盒发光显色 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)。

[0257] 实施例 8: $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-IgG Fc-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0258] 参考实施例 7 的操作, 分别制备 $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY}$ 及 $\text{GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 并参考实施例 2 中的方法制备 GLY-IgG Fc-GLY 。

[0259] 参考实施例 1 中的操作, 表达及纯化 $\text{NH}_2\text{GLP-1-GLY-IgG Fc-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白。

[0260] 参考实施例 1 中的操作, 对 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。

[0261] 实施例 9: $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备

[0262] 参考实施例 5 中所述的不含连接肽的 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$ 的制备方法合成本实施例中的 $\text{NH}_2\text{GLP-1}$, 并参考实施例 7 中所述的 $\text{GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 的制备方法合成所需的 $\text{GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 。参考实施例 1 中所述的基因重组及融合蛋白表达纯化技术进行本实施例中 $\text{NH}_2\text{GLP-1-HSA-GLY-Exendin-4}^{\text{COOH}}$ 融合蛋白的制备。

[0263] 参考实施例 1 中的操作,对 HSA 及 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。

[0264] 实施例 10:^{NH₂}GLP-1-IgG Fc-GLY-Exendin-4^{COOH}

[0265] 参考实施例 9 的操作,其中的融合蛋白由人免疫球蛋白取代。

[0266] 参考实施例 1 中的操作,对 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。

[0267] 实施例 11:^{NH₂}Exendin-4-GLY-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的制备

[0268] ^{NH₂}Exendin-4-GLY 的制备所需的 DNA 序列如下:

[0269] SEQ ID NO 17:

[0270] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA

[0271] AGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0272] SEQ ID NO 18:

[0273] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0274] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG

[0275] SEQ ID NO 19:

[0276] GTTTATCGAATGGCTGAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0277] TCCTCCTAGCGGC

[0278] SEQ ID NO 20:

[0279] GCCGCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCA

[0280] GCCATTCGATAAA

[0281] GLY-GLP-1^{COOH} 的制备参考实施例 1 中的方法进行制备。并参考实施例 1 中所述的方法,制备 ^{NH₂}Exendin-4-GLY-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的 DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。

[0282] 参考实施例 1 中的操作,对 HSA 及 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。

[0283] 实施例 12:^{NH₂}Exendin-4-GLY-IgG Fc-GLY-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的制备

[0284] 参考实施例 11,但是本实施例中的融合蛋白可以由人免疫球蛋白取代。

[0285] 参考实施例 1 中的操作,对 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。

[0286] 实施例 13:^{NH₂}Exendin-4-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的制备

[0287] C-末端不含连接肽的 ^{NH₂}Exendin-4 的制备所需的 DNA 序列为:

[0288] SEQ ID NO 21:

[0289] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA

[0290] AGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0291] SEQ ID NO 22:

[0292] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0293] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG

[0294] SEQ ID NO 23:

[0295] GTTTATCGAATGGCTGAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

- [0296] TCCTCCTAGC
- [0297] SEQ ID NO 24 :
- [0298] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC
- [0299] ATTCGATAAA
- [0300] GLY-GLP-1^{COOH} 的制备参考实施例 1 中的合成方法进行。参考实施例 1 中所述的方法制备^{NH₂}Exendin-4-HSA-GLY-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的 DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。
- [0301] 参考实施例 1 中的操作,对 HSA 及 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。
- [0302] 实施例 14 :^{NH₂}Exendin-4-IgG Fc-GLY-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的制备
- [0303] 参考实施例 13 的操作,但是本实施例中的融合蛋白由人免疫球蛋白取代。
- [0304] 参考实施例 1 中的操作,对 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。
- [0305] 实施例 15 :^{NH₂}Exendin-4-GLY-HSA-GLY-Exendin-4^{COOH} 融合蛋白的制备
- [0306] GLY-Exendin-4^{COOH} 的构建由 SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15 及 SEQ ID NO 16 参考实施例 1 中的方法合成,使用的序列如下 :
- [0307] SEQ ID NO 13 :
- [0308] GGCCACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGAT
- [0309] GGAAGAAGAAGCGGTTAGGCT
- [0310] SEQ ID NO 14 :
- [0311] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG
- [0312] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTGCCG
- [0313] SEQ ID NO 15 :
- [0314] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC
- [0315] TCCTCCTAGC
- [0316] SEQ ID NO 16 :
- [0317] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC
- [0318] ATTCGATAAA
- [0319] ^{NH₂}Exendin-4-GLY 的制备所需的 DNA 序列如下 :
- [0320] SEQ ID NO 17 :
- [0321] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA
- [0322] AGAAGAAGCGGTTAGGCT
- [0323] SEQ ID NO 18 :
- [0324] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG
- [0325] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG
- [0326] SEQ ID NO 19 :
- [0327] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC
- [0328] TCCTCCTAGCGCGC
- [0329] SEQ ID NO 20 :

- [0330] GCCGCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCA
- [0331] GCCATTCGATAAAA
- [0332] 参考实施例 1 中所述的方法制备^{NH₂}Exendin-4-GLY-HSA-GLY-Exendin-4^{COOH}融合蛋白的 DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。
- [0333] 参考实施例 1 中的操作,对 HSA 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。
- [0334] 实施例 16:^{NH₂}Exendin-4-GLY-IgG Fc-GLY-Exendin-4^{COOH}融合蛋白的制备
- [0335] 参考实施例 16 的操作,但是本实施例中的融合蛋白由人免疫球蛋白取代。
- [0336] 参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。
- [0337] 实施例 17:^{NH₂}Exendin-4-HSA-GLY-Exendin-4^{COOH}融合蛋白的制备
- [0338] C-末端不含连接肽的^{NH₂}Exendin-4 的制备所需的 DNA 序列为:
- [0339] SEQ ID NO 21:
- [0340] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAAACAGATGGA
- [0341] AGAAGAAGCGGTTAGGCT
- [0342] SEQ ID NO 22:
- [0343] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG
- [0344] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG
- [0345] SEQ ID NO 23:
- [0346] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC
- [0347] TCCTCCTAGC
- [0348] SEQ ID NO 24:
- [0349] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC
- [0350] ATTCGATAAAA
- [0351] GLY-Exendin-4^{COOH}的制备所需的 DNA 序列为:
- [0352] SEQ ID NO 13:
- [0353] GGCCACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAAACAGAT
- [0354] GGAAGAAGAAGCGGTTAGGCT
- [0355] SEQ ID NO 14:
- [0356] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG
- [0357] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTGCCG
- [0358] SEQ ID NO 15:
- [0359] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC
- [0360] TCCTCCTAGC
- [0361] SEQ ID NO 16:
- [0362] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC
- [0363] ATTCGATAAAA
- [0364] 参考实施例 1 中所述的方法制备^{NH₂}Exendin-4-HSA-GLY-Exendin-4^{COOH}融合蛋白的

DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。

[0365] 参考实施例 1 中的操作,对 HSA 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。

[0366] 实施例 18:^{NH₂}Exendin-4-IgG Fc-GLY-Exendin-4^{COOH} 融合蛋白的制备

[0367] 参考实施例 17 的操作,但是本实施例中的融合蛋白由人免疫球蛋白取代。

[0368] 参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。

[0369] 实施例 19:^{NH₂}Exendin-4-HSA-Exendin-4^{COOH} 融合蛋白的制备

[0370] ^{NH₂}Exendin-4 的制备所需的 DNA 序列为:

[0371] SEQ ID NO 21:

[0372] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA

[0373] AGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0374] SEQ ID NO 22:

[0375] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0376] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG

[0377] SEQ ID NO 23:

[0378] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0379] TCCTCCTAGC

[0380] SEQ ID NO 24:

[0381] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC

[0382] ATTCGATAAA

[0383] N-末端不含连接肽的 Exendin-4^{COOH} 的构建所需 DNA 序列为:

[0384] SEQ ID NO 25:

[0385] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA

[0386] AGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0387] SEQ ID NO 26:

[0388] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0389] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG

[0390] SEQ ID NO 27:

[0391] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0392] TCCTCCTAGC

[0393] SEQ ID NO 28:

[0394] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC

[0395] ATTCGATAAA

[0396] 参考实施例 1 中所述的方法制备 ^{NH₂}Exendin-4-HSA-Exendin-4^{COOH} 融合蛋白的 DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。

[0397] 参考实施例 1 中的操作,对 HSA 进行蛋白的表征。参考实施例 7 进行 Exendin-4

的蛋白表征。

[0398] 实施例 20：^{NH₂}Exendin-4-IgG Fc-Exendin-4^{COOH} 融合蛋白的制备

[0399] 参考实施例 19 的操作，但是本实施例中的融合蛋白由人免疫球蛋白取代。

[0400] 参考实施例 7 进行 Exendin-4 的蛋白表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。

[0401] 实施例 21：^{NH₂}GLP-1-(GLY)₅-IgG Fc-(GLY)₅-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的制备

[0402] ^{NH₂}GLP-1-(GLY)₅ 的制备所需的 DNA 序列为：

[0403] SEQ ID NO 29：

[0404] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA

[0405] AGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0406] SEQ ID NO 30：

[0407] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0408] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG

[0409] SEQ ID NO 31：

[0410] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0411] TCCTCCTAGCGGCGGCGGCGGC

[0412] SEQ ID NO 32：

[0413] GCCGCCGCCGCCGCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGC

[0414] CGCCAATTTTCAGCCATTCGATAAAA

[0415] (GLY)₅-GLP-1^{COOH} 的制备所需的 DNA 序列为：

[0416] SEQ ID NO 33：

[0417] GGCGGCGGCGGCGGCCACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCT

[0418] GAGCAAACAGATGGAAGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0419] SEQ ID NO 34：

[0420] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0421] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTGCCGCCGCCGCCG

[0422] SEQ ID NO 35：

[0423] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0424] TCCTCCTAGC

[0425] SEQ ID NO 36：

[0426] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC

[0427] ATTCGATAAAA

[0428] 参考实施例 1 中所述的方法制备 ^{NH₂}GLP-1-(GLY)₅-IgG Fc-(GLY)₅-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的 DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。

[0429] 参考实施例 1 中的操作，对 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。

[0430] 实施例 22：^{NH₂}GLP-1-(ALA)₂-IgG Fc-(ILE)₃-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的制备

[0431] ^{NH₂}GLP-1-(ALA)₂ 制备所需的 DNA 序列为：

- [0432] SEQ ID NO 37 :
[0433] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA
[0434] AGAAGAAGCGGTTAGGCT
[0435] SEQ ID NO 38 :
[0436] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCGCTG
[0437] GTAAAGGTGCCTTCGCCGTG
[0438] SEQ ID NO 39 :
[0439] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC
[0440] TCCTCCTAGCACGACG
[0441] SEQ ID NO 40 :
[0442] CGTCGTGCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCCAATTT
[0443] TCAGCCATTCGATAAA
[0444] (ILE)₃-GLP-1^{COOH} 的制备所需的 DNA 序列为 :
[0445] SEQ ID NO 41 :
[0446] ATCATCATCCACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAA
[0447] ACAGATGGAAGAAGAAGCGGTTAGGCT
[0448] SEQ ID NO 42 :
[0449] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCGCTGGT
[0450] AAAGGTGCCTTCGCCGTGATGATGAT
[0451] SEQ ID NO 43 :
[0452] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC
[0453] TCCTCCTAGC
[0454] SEQ ID NO 44 :
[0455] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCCAATTTTCAGCC
[0456] ATTCGATAAA
[0457] 参考实施例 1 中所述的方法制备^{NH₂}GLP-1-(ALA)₂-IgG Fc-(ILE)₃-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的 DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。参考实施例 1 中的操作,对 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。
- [0458] 实施例 23 :^{NH₂}GLP-1-VAL-IgG Fc-(VAL)₄-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的制备
[0459] ^{NH₂}GLP-1-VAL 制备所需的 DNA 序列为 :
[0460] SEQ ID NO 45 :
[0461] CACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAGCAAACAGATGGA
[0462] AGAAGAAGCGGTTAGGCT
[0463] SEQ ID NO 46 :
[0464] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG
[0465] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTG
[0466] SEQ ID NO 47 :
[0467] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0468] TCCTCCTAGCGAT

[0469] SEQ ID NO 48 :

[0470] ATCGCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCA

[0471] GCCATTCGATAAAA

[0472] (VAL)₄-GLP-1^{COOH} 的制备所需的 DNA 序列为 :

[0473] SEQ ID NO 49 :

[0474] GATGATGATGATCACGGCGAAGGCACCTTTACCAGCGATCTGAG

[0475] CAAACAGATGGAAGAAGAAGCGGTTAGGCT

[0476] SEQ ID NO 50 :

[0477] GATAAACAGCCTAACCGCTTCTTCTTCCATCTGTTTGCTCAGATCG

[0478] CTGGTAAAGGTGCCTTCGCCGTGATCATCATCATC

[0479] SEQ ID NO 51 :

[0480] GTTTATCGAATGGCTGAAAAATTGGCGGCCCTTCGTCGGGCGCGCC

[0481] TCCTCCTAGC

[0482] SEQ ID NO 52 :

[0483] GCTAGGAGGAGGCGCGCCCGACGAAGGGCCGCAATTTTCAGCC

[0484] ATTCGATAAAA

[0485] 参考实施例 1 中所述的方法制备^{NH₂}GLP-1-VAL-IgG Fc-(VAL)₄-GLP-1^{COOH} 融合蛋白的 DNA 序列。参考实施例 1 中融合蛋白的表达及纯化方法对本实施例中的融合蛋白进行表达及纯化。参考实施例 1 中的操作,对 GLP-1 进行蛋白的表征。参考实施例 2 对 IgG Fc 进行蛋白的表征。

[0486] 实施例 24:含融合蛋白的药物组合物冻干制剂的制备

[0487] 取实施例 1 的融合蛋白 10mg,稳定剂精氨酸 0.2g,聚乙二醇 60000.05g 置于容器中,加注射用水 80ml,搅拌使溶解,再加入甘露醇 8g、山梨醇 2g,搅拌使溶解,以 0.1mol/L 的氢氧化钠调节 PH 至 6.0-8.0,补加水至 100ml。加入 0.3g 活性碳,在 10-25℃下搅拌 20 分钟,脱碳,采用微孔滤膜过滤除菌,滤液按每支 1ml 进行分装。预冻 2 小时后,冷冻下减压干燥 18 小时,至样品温度到 15-20℃后,再干燥 5 小时,制得白色疏松块状物,封口即得白色冻干粉针,规格 100ug/支。

[0488] 实施例 25:含融合蛋白的药物组合物冻干制剂的制备

[0489] 取实施例 5 的融合蛋白 25mg,加稳定剂磷酸氢二钾 0.05g,氯化钠 0.9g,置于容器中,加注射用水 70ml 搅拌使溶解,再加甘露醇 12g,乳糖 7g 搅拌使溶解,用 0.1mol/L 的氢氧化钠调节 PH 至 6.5-8.5,补加水至 100ml,加入 0.25g 活性碳,在 10-20℃下搅拌 20 分钟,脱碳,采用微孔滤膜过滤除菌,滤液按每支 2ml 进行分装,预冻 2 小时后,冷冻下减压干燥 15 小时,至样品温度到 15-20℃后,再干燥 5 小时,制得白色疏松块状物,封口即得白色冻干粉针,规格 500ug/支。

[0490] 实施例 26:含融合蛋白的药物组合物溶液注射制剂的制备

[0491] 取实施例 19 的融合蛋白 50mg,加入稳定剂三羟甲基氨基甲烷 0.2g,焦亚硫酸钠 0.1g、氯化钠 0.9g 至容器中,加注射用水 80ml 中搅拌溶解,加入碳酸氢钠调节 PH 为 6-8,补加水至 100ml,加入 0.2g 活性炭,在 10-25℃搅拌吸附 20 分钟,除炭,采用微孔滤膜过滤除

菌,以每支 2ml 灌封,即得融合蛋白注射液,规格 1000ug/ 支。

[0492] 实施例 27:含融合蛋白的药物组合物溶液注射制剂的制备

[0493] 取实施例 22 的融合蛋白 5mg,稳定剂谷氨酸 0.01g、氯化钾 0.09g 至容器中,加注射用水 70ml 搅拌使溶解,加入葡萄糖 2g、半乳糖 1g 搅拌溶解。加氢氧化钠调节 PH 为 7.0-8.5,补加水至 100ml,加入 0.05g 活性炭,在 10-25℃ 搅拌吸附 20 分钟,除炭,采用微孔滤膜过滤除菌,以每支 1ml 灌封、即得融合蛋白注射液,规格 50ug/ 支。

[0494] 实施例 28:融合蛋白的体内药代动力学

[0495] 给大鼠注射 GLP-1、Exendin-4 及其融合蛋白(折合含 GLP-1 或 Exendin-4 为 0.5mg/kg),分别于注射前及注射后 0.5、1、3、6、9、12、24、36 和 48 小时后于眼丛静脉取血约 0.2ml,制备血清备用。

[0496] GLP-1 浓度测定方法:采用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测小鼠血清中融合蛋白的浓度,操作如下:4℃ 离心分离血浆。用羊抗鼠的 GLP-1 浓度测定试剂盒(R&D System Co., Ltd)对鼠血浆中的 GLP-1 融合蛋白的浓度进行测定。将 1:1 稀释后的鼠血浆样品加入 96 孔板,加入同体积的 GLP-1 抗体后,37℃ 孵育 1 小时。使用洗液清洗 96 孔板 3 次,加入 HRP 后孵育 30 分钟。同样的方法对 96 孔板进行清洗,然后加入 50 μl 底物 A 及底物 B,37℃ 孵育 10 分钟。用硫酸中止反应后测定 450-570nm 值,并与标准浓度的 GLP-1 进行比对及根据 ELISA 结果计算药代动力学参数。

[0497] Exendin-4 浓度测定方法:采用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测小鼠血清中融合蛋白的浓度,操作如下:4℃ 离心分离血浆。用 Exendin-4EIA 试剂盒(Phoenix Pharmaceuticals, INC)对鼠血浆中的 Exendin-4 融合蛋白的浓度进行测定。将稀释后的鼠血浆样品加入 96 孔板(50 μl),加入 25 μl Exendin-4 的羊抗鼠一抗后,37℃ 孵育 2 小时。使用洗液清洗 96 孔板 4 次,加入 100 μl SA-HRP 后孵育 1 小时。同样的方法对 96 孔板进行清洗,然后加入 100 μl TMB,37℃ 孵育 1 小时。用 2N 盐酸中止反应后 20 分钟内测定 OD450 值,并与标准浓度的 Exendin-4 进行比对及根据 ELISA 结果计算药代动力学参数。

[0498] 融合蛋白的体内药代动力学结果见表 2,结果显示本发明的融合蛋白在体内的半衰期较单独的 GLP-1、Exendin-4 明显延长,具有长效特性,文献报道 GLP-1 的体内半衰期根据文献仅为 9 分钟。

[0499] 表 2 融合蛋白在大鼠体内的末相半衰期

[0500]

样品来源	半衰期(小时)
GLP-1	0.1
Exendin-4	2.7
实施例 1	5.2
实施例 2	6.8
实施例 4	8.3
实施例 11	15.5
实施例 15	13.2
实施例 16	16.1

[0501] 实施例 29:融合蛋白对大鼠糖耐量的影响

[0502] 给予融合蛋白的大鼠耐糖试验:给过夜(16-18h)绝食的小鼠(C57BL/6)皮下注射不同的融合蛋白,剂量(折合含 GLP-1 或 Exendin-4 为 80 μg/kg),空白和模型对照组注射

生理盐水,注射 30 分钟和 24 小时后,空白组没有给糖,其它组按 3g/kg 体重腹腔注射葡萄糖,并分别与注射后 15,30,60,90,和 120min 后从尾尖采取血样,用血糖仪检测血中葡萄糖水平,以给糖后的血糖的曲线下面积 (AUC) 为指标进行评价。给予 GLP-1 融合蛋白的小鼠耐糖结果见图 2,给予本品发明的融合蛋白后,小鼠的耐糖能力明显增强,并且作用维持 24 小时以上。

[0001]

序列表

- <110> 天津药物研究院
- <120> 含有GLP-1或其类似物的融合蛋白、制备方法及其应用
- <130> DIC10110048
- <160> 56
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 1
 acgcggaagg taccttcacc agcggatgga gcagctatct g 41
- <210> 2
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 2
 tgacctcca gatagctgct cacatcgctg gtgaaggtag cttccgcgtg 50
- <210> 3
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 3
 gaaggtcagg cggcgaaaga atttatcgcg tggctggtga aagtcgtgg c 51
- <210> 4
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 4
 gccacgacct ttcaccagcc acgcgataaa ttctttcgcc gcc 43
- <210> 5
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 5
 ggcacgcgga aggtaccttc accagcgatg tgagcagcta tctg 44
- <210> 6
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 6
 tgacctcca gatagctgct cacatcgctg gtgaaggtag cttccgcgtg gcc 53
- <210> 7
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 7
 gaaggtcagg cggcgaaaga atttatcgcg tggctggtga aagtcgtgg c 51

[0002]

序列表

<210> 8		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 8		
acgaccttc accagccacg cgataaatc ttccgccc		40
<210> 9		
<211> 48		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 9		
gaaggtcagg cggcgaaga attatcgcg tggctggtga aaggtcgt		48
<210> 10		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 10		
acgaccttc accagccacg cgataaatc ttccgccc		40
<210> 11		
<211> 41		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 11		
acgcggaag tacctcacc agcgatgta gcagtatct g		41
<210> 12		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 12		
tgacctcca gatagctgt cacatcgtg gigaaggtac ctccgcgtg		50
<210> 13		
<211> 65		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 13		
ggccacgcg aaggcacctt taccagcat ctgagcaaac agatggaaga agaagcggt		60
aggct		65
<210> 14		
<211> 72		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 14		
gataaacag ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgtgg taaagtgcc		60
ttcgccgtgc cg		72
<210> 15		
<211> 55		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 15		
gtttatcga ttgctgaaa ttggcgccc ttgctgggc gcgcctcctc ctage		55

[0003]

序列表

<210> 16	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
gctaggagga ggcgcgcccc acgaagggcc gccaattttc agccattcga taaa	54
<210> 17	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
cacggcgaag gcacctttac cagcgatctg agcaaacaga tggaagaaga agcggttagg	60
ct	62
<210> 18	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
gataaacagc ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaaggtgcc	60
ttcgccgtg	69
<210> 19	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 19	
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc gcgcctcctc ctageggc	58
<210> 20	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 20	
gccgctagga ggaggcgcgc ccgacgaagg gccgccaatt ttcagccatt cgataaa	57
<210> 21	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 21	
cacggcgaag gcacctttac cagcgatctg agcaaacaga tggaagaaga agcggttagg	60
ct	62
<210> 22	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 22	
gataaacagc ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaaggtgcc	60
ttcgccgtg	69
<210> 23	
<211> 55	
<212> DNA	

[0004]

序列表

<213> 人工序列	
<400> 23	
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc ggcctcctc ctage	55
<210> 24	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 24	
gctaggagga ggcgcgccc acgaaggcc gccaat ttc agccattcga taaa	54
<210> 25	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 25	
cacggcgaag gcacctttac cagc gatctg agcaaacaga tggaagaaga agcggttagg	60
ct	62
<210> 26	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 26	
gataaacagc ctaaccgctt ctcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaagggtgc	60
ttcgccgtg	69
<210> 27	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 27	
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc ggcctcctc ctage	55
<210> 28	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 28	
gctaggagga ggcgcgccc acgaaggcc gccaat ttc agccattcga taaa	54
<210> 29	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 29	
cacggcgaag gcacctttac cagc gatctg agcaaacaga tggaagaaga agcggttagg	60
ct	62
<210> 30	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 30	
gataaacagc ctaaccgctt ctcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaagggtgc	60
ttcgccgtg	69

[0005]

序列表

<210> 31	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 31	
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc ggcctcctc ctagcggcgg	60
cggcggcggc	70
<210> 32	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 32	
gccgccggc cgcggctag gaggaggcgc gcccgacgaa ggccgcccaa tttcagcca	60
ttcgataaa	69
<210> 33	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 33	
ggcggcggcg gcggccacgg cgaaggcacc tttaccagcg atctgagcaa acagatggaa	60
gaagaagcgg ttaggct	77
<210> 34	
<211> 84	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 34	
gataaacagc ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgttg taaaggtgcc	60
ttcgccgtgc cgccgccgc gccg	84
<210> 35	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 35	
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc ggcctcctc ctage	55
<210> 36	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 36	
gctaggagga ggcgccccg acgaaggcc gccaatctc agccattcga taaa	54
<210> 37	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 37	
cacggcgaag gcacctttac cagcgatctg agcaaacaga tggaagaaga agcggtagg	60
ct	62

[0006]

序列表

<210> 38		
<211> 69		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 38		
gataaacagc ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaaggtgcc	60	
ttcgccgtg		69
<210> 39		
<211> 61		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 39		
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc ggcctcctc ctagcacgac	60	
g		61
<210> 40		
<211> 60		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 40		
cgtcgtgcta ggaggaggcg cgcccagca agggccgcca atttcagcc attcgataaa	60	
<210> 41		
<211> 71		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 41		
alcatcatcc acggcgaagg cacctttacc agcgatctga gcaaacagal ggaagaagaa	60	
gcggttaggc t		71
<210> 42		
<211> 78		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 42		
gataaacagc ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaaggtgcc	60	
ttcgccgtgg atgatgat		78
<210> 43		
<211> 55		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 43		
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc ggcctcctc ctage	55	
<210> 44		
<211> 54		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<400> 44		
gctaggagga ggcgccccg acgaagggcc gccaatcttc agccattcga taaa	54	
<210> 45		
<211> 62		
<212> DNA		
<213> 人工序列		

[0007]

序列表

<400> 45	
cacggcgaag gcacctttac cagcgatctg agcaaacaga tggaagaaga agcggttagg	60
ct	62
<210> 46	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 46	
gataaacagc ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaaggtgcc	60
ttcgccgtg	69
<210> 47	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 47	
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc gcgcctcctc cttagcat	58
<210> 48	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 48	
atcgctagga ggaggcgcgc ccgacgaagg gccccaatt ttcagccatt cgataaa	57
<210> 49	
<211> 74	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 49	
gatgatgatg atcacggcga aggcacctt accagcgatc tgagcaaaca gatggaagaa	60
gaagcggtta ggct	71
<210> 50	
<211> 81	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 50	
gataaacagc ctaaccgctt cttcttccat ctgtttgctc agatcgctgg taaaggtgcc	60
ttcgccgtga tcatcatcat c	81
<210> 51	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 51	
gtttatcgaa tggctgaaaa ttggcggccc ttcgtcgggc gcgcctcctc ctage	55
<210> 52	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 52	
gctaggagga ggcgcgcccg acgaagggcc gccaatcttc agccattcga taaa	54

[0008]

序列表

<210> 53
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> GLP-1
 <400> 53
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30
 <210> 54
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Extendin-4
 <400> 54
 Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Ile Gly Gly Pro Ser Ser
 20 25 30
 Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 55
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> HSA
 <400> 55
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30
 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val

[0009]

序列表															
130	135						140								
Asp 145	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys 160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro 175
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys 190
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu 205
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys 220
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val 240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser 255
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly 270
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile 285
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu 300
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp 320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser 335
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly 350
Mct	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val 365
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys 380
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu 400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys 415
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu 430

[0010]

序列表

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605

Leu

<210> 56
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> IgG Fc

<400> 56

Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln
 20 25 30

Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly
 35 40 45

Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser
 50 55 60

Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val
 65 70 75 80

[0011]

序列表

Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser
85 90 95

Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala
100 105 110

Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His
115 120 125

Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly
130 135 140

Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys
145 150 155 160

Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly
165 170 175

Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly
180 185 190

Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val
195 200 205

Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu
210 215 220

Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys
225 230 235 240

Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
245 250

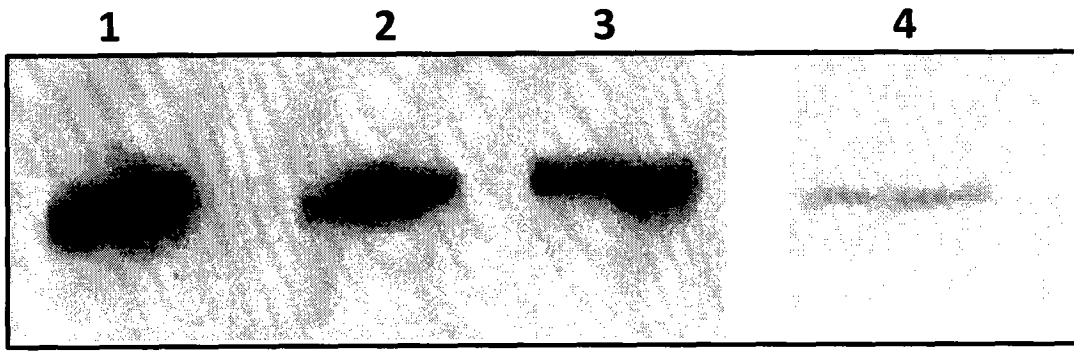


图 1

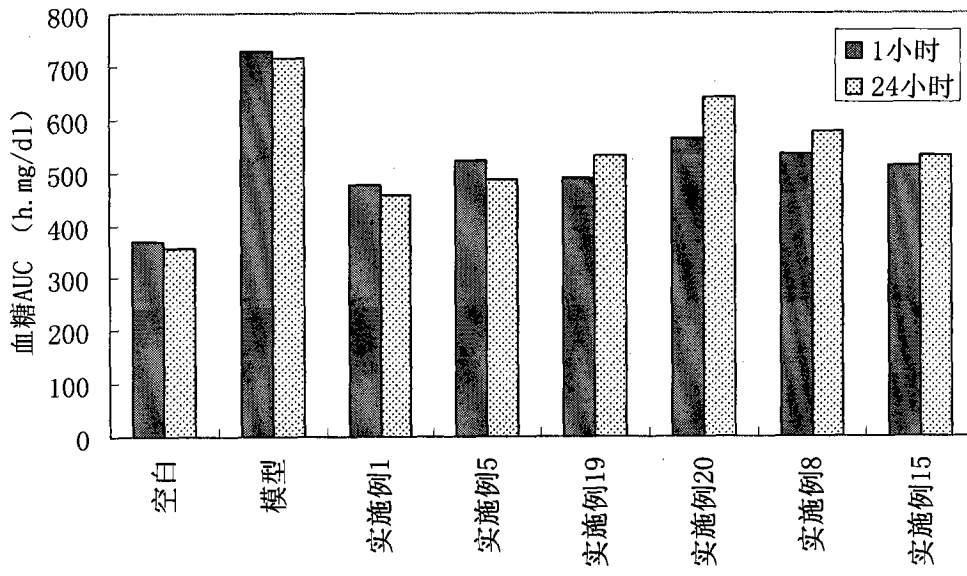


图 2

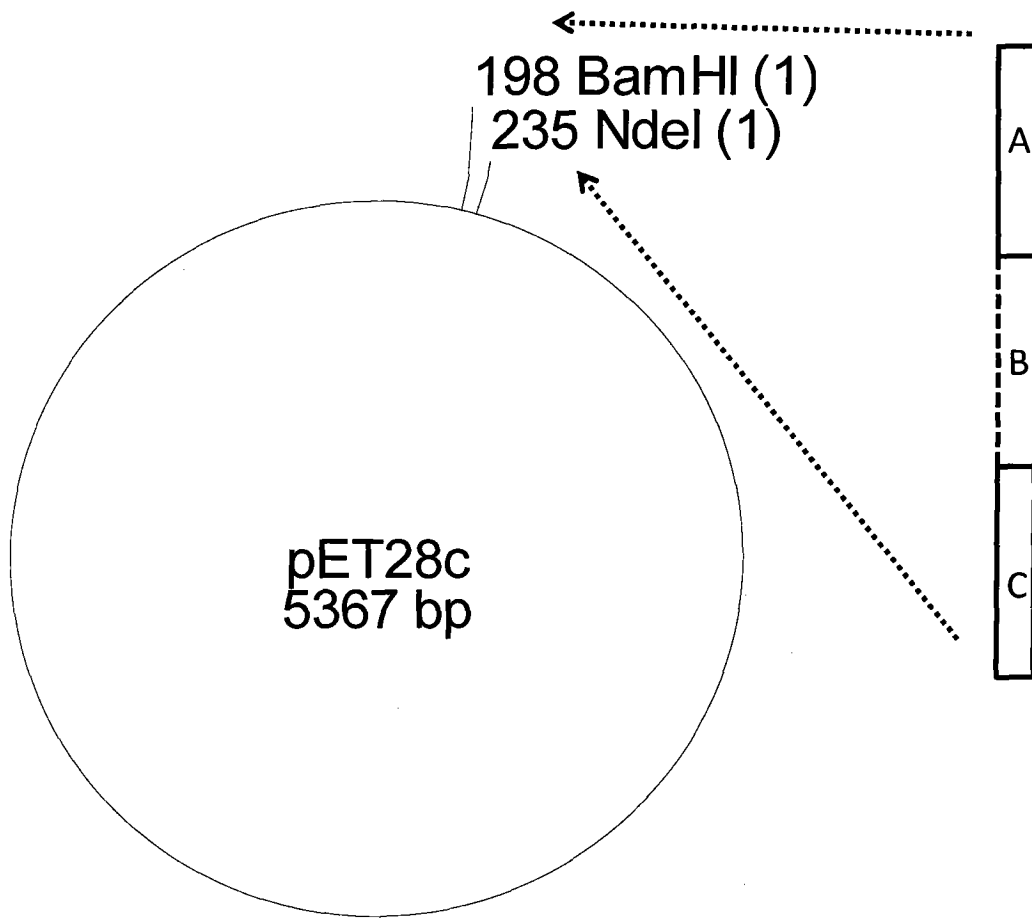


图 3