

(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  
2021年7月8日 (08.07.2021)



(10) 国际公布号  
WO 2021/136521 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/195 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01) C07K 1/06 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/142229

(22) 国际申请日: 2020年12月31日 (31.12.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202010003240.2 2020年1月2日 (02.01.2020) CN

(71) 申请人: 东莞市东阳光生物药研发有限公司 (DONGGUAN HEC BIOPHARMACEUTICAL R&D CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省东莞市长安镇长安振安中路368号7号楼102室, Guangdong 523871 (CN)。

(72) 发明人: 李利佳(LI, Lijia); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 古想娣(GU, Xiangdi); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 吴都(WU, Du); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 郭林峰(GUO, Linfeng); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李晓平(LI, Xiaoping); 中国广东省东莞市长安

镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 胡育龙(HU, Yulong); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李宇晟(LI, Yusheng); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李玉(LI, Yu); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 许玲华(XU, Linghua); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李静(LI, Jing); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 陈小锋(CHEN, Xiaofeng); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李文佳(LI, Wenjia); 中国广东省东莞市长安镇上沙振安路368号东阳光科技园, Guangdong 523871 (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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: POLYPEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 多肽及其应用

(57) Abstract: Disclosed is a polypeptide. The polypeptide has a modification at the N-terminus compared with polypeptides having the following amino acid sequences: (1) a polypeptide having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 1 to 6; or (2) a polypeptide having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, or at least 99% identity to (1); or (3) a polypeptide with substitution, deletion and/or addition of one or more amino acids compared with (1), wherein the modification comprises at least one modification selected from addition, methylation, formylation, carbamylation, succinylation, cyclization, lysine propionylation, hexadecanoylation, myristylation, and acetylation of N-terminal amino acids. The polypeptide not only maintains the activity of BefA proteins to promote the proliferation of beta-cells, but also has the characteristics of higher stability and difficult degradation. Furthermore, the polypeptide also has the potential to lower glucose, promote weight loss, and protect the liver.

(57) 摘要: 一种多肽, 其与具有下列氨基酸序列的多肽相比, 其N端具有修饰, 所述修饰包括选自N端氨基酸的增加、甲基化、甲酰化、氨甲酰化、琥珀酰化、环化、丙酰化、十六烷酰化、十四烷化和乙酰化的至少之一, (1)具有SEQ ID NO: 1-6所示氨基酸序列的多肽; 或(2)与(1)相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%同一性的多肽; 或(3)与(1)相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的多肽。上述多肽既保持了BefA蛋白促进β细胞增殖的活性, 又具有更高的稳定性, 不易降解的特性, 并且具有降糖、减重及保护肝脏的潜能。

WO 2021/136521 A1

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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



## 多肽及其应用

### 优先权信息

本发明请求于 2020 年 1 月 2 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号 CN202010003240.2、申请名称为“多肽及其应用”的中国专利申请的优先权，并且其全部内容通过引用并入本发明。

### 技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体地，本发明涉及多肽及其应用，更具体地，本发明涉及多肽、提高 BefA 蛋白稳定性或制备 BefA 蛋白突变体的方法、融合蛋白、核酸、重组细胞和药物组合物及其在糖尿病等代谢疾病领域的应用。

### 背景技术

胰岛素分泌细胞的缺失一直被认为是 I 型糖尿病的病因之一。在 I 型糖尿病中，免疫系统错误地攻击和破坏  $\beta$  细胞。近年来，研究者发现，缺乏具有功能的  $\beta$  细胞也是 II 型糖尿病的一个重要诱因，II 型糖尿病病人晚期胰岛功能逐渐下降。因此，开发能够增加健康  $\beta$  细胞数量的药物对于解决 I 型糖尿病或 II 型糖尿病晚期是非常重要的，是糖尿病研究的主要重点。同时，糖尿病病人常伴随着肥胖、脂肪肝、肝功能受损等代谢综合征，所以，开发临床获益更多的药物，如减重，保护肝功等的药物，也是非常必要的。目前市场上的降糖生物药主要包括：胰岛素及其类似物、GLP-1 和 GLP-1 类似物，如利拉鲁肽，杜拉糖肽。胰岛素及其类似物作用机制是一个针对 I 型糖尿病的直接补充胰岛素（或类似物）作用，达到胰岛素降糖的作用，但是存在低血糖风险，且其没有降低 2 型糖尿病患者体重，保护肝功能的作用。GLP-1 及其类似物，是 GLP-1 的受体激动剂，通过激动 GLP-1 的受体而发挥降糖作用。GLP-1 的作用方式是增加胰岛素的分泌，抑制高血糖素的分泌、延缓胃排空，减少进食量。但该类药物半衰期短，有恶心、呕吐等消化道不良反应。以上药物，虽能起到降糖作用，但是无法完全逆转受损的胰岛，患者往往需要长期给药，增加了医药支出和降低了患者用药体验，长期服药也有可能致药物耐受现象。

为了改善现有降糖药物的治疗效果，减少副作用，开发出具有改善或者逆转受损胰岛组织的药物，从根本上逆转糖尿病的发展，显得尤为关键，治疗糖尿病的药物仍需要进一步开发。

Jennifer Hampton Hill 等在研究斑马鱼早期幼虫发育过程中，发现胰腺  $\beta$  细胞群的正常扩增需要肠道微生物群，而特定的细菌可以恢复  $\beta$  细胞数量到正常水平。经过实验筛查发现这

些细菌共享一类以前未被描述的蛋白质，命名为 BefA ( $\beta$  细胞增殖因子 A)。BefA 蛋白可以促进斑马鱼幼虫发育过程中  $\beta$  细胞增殖的活性，故对 BefA 蛋白进行研究。

## 发明内容

本申请是基于发明人对以下事实和问题的发现和认识作出的：

现有技术中，体外原核细胞表达的 BefA 蛋白具有促进  $\beta$  细胞增殖的活性，但 BefA 容易降解，难以得到高纯度的完整分子量的 BefA 蛋白，因此大大限制了 BefA 蛋白的体内外药效研究以及临床应用。本申请的研发人员在 BefA 蛋白药物的开发过程中意外而惊喜地发现，对 BefA 蛋白的 N 端进行修饰，包括在 N 端增加氨基酸，或使 N 端氨基酸甲基化、甲酰化、氨甲酰化、琥珀酰化、环化、丙酰化、十六烷酰化、十四烷化和乙酰化，可大幅提高 BefA 蛋白的稳定性，纯化后 BefA 蛋白纯度可达 95% 以上，且获得的该 BefA 蛋白突变体具有促进  $\beta$  细胞增殖的活性。

为此，在本发明的第一方面，本发明提出了一种多肽。根据本发明的实施例，所述与具有下列氨基酸序列的多肽相比，其 N 端具有修饰，所述修饰包括选自 N 端氨基酸的增加、甲基化、甲酰化、氨甲酰化、琥珀酰化、环化、丙酰化、十六烷酰化、十四烷化和乙酰化的至少之一。

(1) 具有 SEQ ID NO: 1-6 所示氨基酸序列的多肽；或

(2) 与 (1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的多肽；或

(3) 与 (1) 相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的多肽。

DWAKVKAAATELGNAVSDTSKEAWQSVTDFSKATWASVSQWGSEAFNTAGAWTDKSVATGKEWLAVADKKLDEM LEPKTAD EARLALNTMADTALVRLFN EQPSAKLLFDKAYGYAVFDSRKFSMLHTNQGAGVAVNRATGKHTYMKMFGAGLAAGLGGKFYQQVILFEDKARF DAFVSQGW EATSEVGAVAGKESAELTAKYNGGMAIYQIGEKGLLLDANISGSKYWVDKDL TR (SEQ ID NO:1)。

DWAKLKAAASDLGAAVSETSKEVWQDVSDFSKKS WASISAWGEEAFNTAGVWTDKSIATGKEWLKAADKELNEMLNPKTAKEARIAINTMADTALIRLFNEQPSAKLLFDKAYGYAVFDSRKFSMLHTNQGAGVAVNRKTGKHTYMKMFGAGLAAGIGGKFYQQVILFEDKARFDAFVTQGW EATSEVGVVAGKESAELTAKYNGGMAIYQIGEKGLLLDANISGSKYWIDKDLTETSR (SEQ ID NO:2)。

DWAKLKAAASDLGAAVSETSKEVWQDVSDFSKKS WASISAWGEDAFNTAGVWTDKSIATGKEWLKAADKELNEMLNPKTAKEARIALNTMADTALIRLFNEQPSAKLLFDKAYGYAVFDSRKFSMLHTNQGAGVAVNRKTGKHTYMKMFGAGLAAGIGGKFYQQVILFEDKARFD



AFVTQGWEATSEVGVVAGKESAELTAKYNGGMAIYQIGEKGLLLDANISGSKYWIDKDLTE  
TSR (SEQ ID NO:3)。

DWAKVKAAATELGNAVSDTSKEAWQSVTDFSKATWASVSQWGEEAFNTAGAWTDKS  
VATGKEWLAVADKKLDEMLEPKTAD EARLALNTMADTALVRLFNEQPSAKLLFDKAYGYA  
VFDSRKFSLMLHTNQGAGVAVNRATGKHTYMKMFGAGLAAGLGGKFYQQVILFEDKARF  
DAFVSQGWWEATSEVGAVAGKESAELTAKYNGGMAIYQIGEKGLLLDANISGSKYWVDKDL  
TR (SEQ ID NO:4)。

GCSAQGDTASQQRASIQKMRNETLTKLYTLQPEARSDIQHAKGYAVFANNSSKILLFGF  
GSGYGVVRDTASGKDTYMKMAQGGAGLGIGIKQQRVTLVFDKAALDRFIRQGYMVG  
DANAAKYDDKGIPIAASANGVAKDTSSLPSKVNVEITDKGLAAQAMVNGYKYWPDD  
ELNP (SEQ ID NO:5)。

SWEEIKKAASDLGQKVSEGSKKAWEDVTDFSETWDSVSEWGEDAFNTAGEWTDASIE  
KGKEWLEAGEAKLNEMLEPETPEEARLALDTMSDTALVRLFNEEPSAKLLFDTAYGYAVFD  
SRKFSLMLHTNQGAGVAVDRKTGKRTYMKMFGGLALGLGGKFYQQLIFFEDKKTDFDSFVK  
DGWEATSEAGAVAGTESAELTAKYNGGMAIYQIGEKGLLLDANISGSKYWVDEDLTQ (SEQ  
ID NO:6)。

根据本发明实施例的多肽保持了 BefA 蛋白促进  $\beta$  细胞增殖的活性，相比于具有 (1)、(2) 或 (3) 序列的多肽，具有更高的稳定性。

根据本发明的实施例，上述多肽还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述 N 端氨基酸的增加包括 N 端增加一个或一个以上的氨基酸，且增加的氨基酸至少有一个甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、组氨酸或脯氨酸；优选甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸或异亮氨酸；更优选甘氨酸。

根据本发明的实施例，所述的 N 端氨基酸的增加为 N 端增加一个氨基酸，所述氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、组氨酸或脯氨酸；优选甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸或异亮氨酸；更优选甘氨酸。

根据本发明的实施例，所述多肽具有 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

GDWAKVKAAATELGNAVSDTSKEAWQSVTDFSKATWASVSQWGSEAFNTAGAWTDK  
SVATGKEWLAVADKKLDEMLEPKTAD EARLALNTMADTALVRLFNEQPSAKLLFDKAYGY  
AVFDSRKFSLMLHTNQGAGVAVNRATGKHTYMKMFGAGLAAGLGGKFYQQVILFEDKAR  
FDAFVSQGWWEATSEVGAVAGKESAELTAKYNGGMAIYQIGEKGLLLDANISGSKYWVDKD  
LTR (SEQ ID NO:7)。

根据本发明实施例的上述具有 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列的多肽，稳定性高、不易



降解，纯化后的纯度可达 99%。

在本发明的第二方面，本发明提出了一种提高 BefA 蛋白稳定性或制备 BefA 蛋白突变体的方法。根据本发明的实施例，对 BefA 蛋白氨基酸序列的 N 端进行修饰，所述修饰包括选自 N 端氨基酸的增加、甲基化、甲酰化，氨甲酰化、琥珀酰化、环化、丙酰化、十六烷酰化、十四烷化和乙酰化的至少之一。根据本发明实施例的方法大幅提高了 BefA 蛋白的稳定性，且制备得到的 BefA 蛋白突变体不仅稳定性高，又保持了 BefA 蛋白显著促进  $\beta$  细胞增殖的活性。

根据本发明的实施例，上述方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述 BefA 蛋白具有 (1) SEQ ID NO: 1~6 所示氨基酸序列；或 (2) 与 (1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的；或 (3) 与 (1) 相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的氨基酸序列。

根据本发明的实施例，使 BefA 蛋白氨基酸序列的 N 端增加一个或一个以上的氨基酸可通过基因克隆的方式实现，以便获得 BefA 蛋白突变体。例如，本领域技术人员可通过预先合成能够表达 N 端增加一个或一个以上的氨基酸的 BefA 蛋白突变体的核酸，进而将该核酸导入受体细胞中进行表达，获得 N 端增加一个或一个以上氨基酸的 BefA 蛋白突变体。根据本发明再一实施例，所述 BefA 蛋白突变体还可进一步通过连接肽与伴侣蛋白连接，所述连接肽适于被蛋白酶切割，以便再次形成游离的 BefA 蛋白突变体。BefA 蛋白突变体进一步通过连接肽与伴侣蛋白连接，可显著提高了 BefA 蛋白突变体的产量，但之后还需要再在适宜蛋白酶的作用下，将伴侣蛋白和连接肽完全切除，以再次形成游离的 BefA 蛋白突变体。

根据本发明的实施例，使 BefA 蛋白氨基酸序列的 N 端增加一个或一个以上的氨基酸可通过基因克隆和酶切引入的方式实现，以便获得 BefA 蛋白突变体。例如，本领域技术人员可通过预先合成能够表达 N 端增加了部分氨基酸的第一 BefA 蛋白突变体的核酸，进而将该核酸导入受体细胞中进行表达，获得 N 端增加了部分氨基酸的第一 BefA 蛋白突变体；将该第一 BefA 蛋白突变体进一步通过连接肽与伴侣蛋白连接，此时伴侣蛋白和连接肽需要设置于第一 BefA 蛋白突变体的 N 端，所述连接肽适于被蛋白酶切割，进而在适宜蛋白酶的酶切作用下，将伴侣蛋白和部分连接肽切除，以便在第一 BefA 蛋白突变体的 N 端再多保留部分氨基酸，此时，酶切后剩余的部分连接肽以及最先通过基因克隆方式增加的部分氨基酸共同构成了 BefA 蛋白的 N 端增加的氨基酸。

根据本发明的实施例，使 BefA 蛋白氨基酸序列的 N 端增加一个或一个以上的氨基酸也可通过酶切引入的方式实现。例如，本领域技术人员可直接构建伴侣蛋白与所述 BefA 蛋白的融合蛋白，所述伴侣蛋白与所述 BefA 蛋白之间设置有连接肽，所述连接肽的 N 端与所述伴侣蛋白的 C 端连接，所述连接肽的 C 端与所述 BefA 蛋白的 N 端连接，所述连接肽适于被



蛋白酶切割，以便形成游离的目标蛋白，所述游离的目标蛋白的 N 端相比于所述 BefA 蛋白，增加了一个或多个氨基酸，该游离的目标蛋白即为 BefA 蛋白突变体。也就是说游离的目标蛋白的 N 端所增加的氨基酸为连接肽上的至少部分氨基酸。换句话说，通过引入了具有酶切位点的连接肽的方式在 BefA 蛋白的 N 端引入了新的氨基酸。

根据本发明实施例的上述使 BefA 蛋白氨基酸序列的 N 端增加一个或一个以上的氨基酸的方法，成功实现了在 BefA 蛋白的 N 端连接至少一个氨基酸。

根据本发明的实施例，所述伴侣蛋白包括选自麦芽糖结合蛋白、CBP、GST、SUMO、Trx、NusA 的至少之一，任选地，所述伴侣蛋白含有或不含有 His 标签、Flag 标签。

根据本发明的实施例，所述蛋白酶为烟草蚀纹病毒的半胱氨酸蛋白酶、肠激酶、凝血酶、Xa 因子蛋白酶、人鼻病毒 3C 蛋白酶、SUMO 酶或 KEX-2。

根据本发明的实施例，所述融合蛋白具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

MEIKTGARILALSALTTMMFSASALAKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTG  
IKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTW  
DAVRYNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYF  
TWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEA  
AFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELA  
KEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMS  
AFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSNNNNNNNNNNNLGHHHHHHHHHHENLY  
FQGDWAKVKAAATELGNAVSDTSKEAWQSVTDFSKATWASVSQWGSEAFNTAGAWTDKS  
VATGKEWLAVADKKLDEMLEPKTAD EARLALNTMADTALVRLFNEQPSAKLLFDKAYGYA  
VFDSRKFSMLHTNQGAGVAVNRATGKHTYMKMFGAGLAAGLGGKFYQQVILFEDKARF  
DAFVSQGW EATSEVGAVAGKESAELTAKYNGGMAIYQIGEKGLLLDANISGSKYWVDKDL  
TR (SEQ ID NO:8)。

在本发明的第三方面，本发明提出了一种融合蛋白。根据本发明的实施例，所述融合蛋白包括伴侣蛋白、连接肽以及 BefA 蛋白，所述连接肽的 N 端与所述伴侣蛋白的 C 端相连，所述连接肽的 C 端与所述 BefA 蛋白的 N 端相连，所述连接肽适于被蛋白酶切割，以便形成游离的 BefA 蛋白突变体，所述游离的 BefA 蛋白突变体的 N 端相比于 BefA 蛋白，增加了一个或多个氨基酸。根据本发明实施例的融合蛋白表达量高，且在适宜消化酶的作用下，可成功获得 N 端至少增加一个氨基酸的 BefA 蛋白突变体。

根据本发明的实施例，所述融合蛋白还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述伴侣蛋白包括选自麦芽糖结合蛋白、CBP、GST、SUMO、Trx、NusA 的至少之一，任选地，所述伴侣蛋白含有或不含有 His 标签、Flag 标签。

根据本发明的实施例，所述蛋白酶为烟草蚀纹病毒的半胱氨酸蛋白酶、肠激酶、凝血酶、



Xa 因子蛋白酶、人鼻病毒 3C 蛋白酶、SUMO 酶或 KEX-2。

根据本发明的实施例，所述融合蛋白具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

在本发明的第四方面，本发明提出了一种核酸。根据本发明的实施例，所述核酸编码前面所述的多肽或前面所述的融合蛋白。

根据本发明的实施例，所述核酸还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述核酸具有 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列或 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列。

GGAGATTGGGCAAAAGTGAAAGCCGCCGCAACCGAACTGGGCAATGCAGTGAGCG  
ATACCAGTAAAGAAGCATGGCAGAGCGTGACCGATTTTAGCAAAGCCACCTGGGCCAG  
CGTGAGCCAGTGGGGTAGCGAAGCATTTAATACCGCAGGTGCCTGGACCGATAAAAGTG  
TTGCAACCGGTAAAGAATGGCTGGCAGTTGCCGATAAAAAAACTGGATGAAATGCTGGA  
ACCGAAAACCGCAGATGAAGCCCGCCTGGCCCTGAATACAATGGCTGATACCGCACTGG  
TTCGTCTGTTTAATGAACAGCCGAGCGCCAAACTGCTGTTTGATAAAGCCTATGGTTATG  
CCGTGTTTGATAGCCGTAAATTTAGCCTGATGCTGCATACCAATCAGGGTGCCGGCGTGG  
CCGTGAATCGTGCAACCGGTAAGCATACCTATATGAAAATGTTTGGCGCAGGCCTGGCA  
GCCGGCCTGGGTGGTAAATTTTATCAGCAGGTTATTCTGTTTGAGGATAAAGCACGTTTT  
GATGCATTTGTTAGCCAGGGTTGGGAAGCAACCAGTGAAGTGGGCGCCGTGGCCGGCA  
AAGAAAGTGCAGAACTGACCGCAAATATAATGGTGGTATGGCCATTTATCAGATTGGTG  
AAAAAGGTCTGCTGCTGGATGCCAATATTAGCGGTAGCAAATATTGGGTGATAAAGATC  
TGACCCGTTAA (SEQ ID NO:9)。

ATGGAAATAAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATG  
TTTTCCGCCTCGGCTCTCGCCAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGG  
CGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATAACCGGAA  
TTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGCA  
ACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAA  
TCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTT  
TACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGC  
GTTATCGCTGATTTATAACAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGA  
TCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCT  
GCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGT  
ATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGC  
GGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTA AAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATT  
ACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCG



TGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGAC  
CTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCG  
CCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGA  
AGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTAC  
GAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCCAGAAAG  
GTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGG  
TGATCAACGCCGCCAGCGGTTCGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGAC  
TAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGGCACCATCACC  
ATCACCATCACCATCACCATGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGATTGGGCAAAGTGAAA  
GCCGCCGCAACCGAACTGGGCAATGCAGTGAGCGATACCAGTAAAGAAGCATGGCAGA  
GCGTGACCGATTTTAGCAAAGCCACCTGGGCCAGCGTGAGCCAGTGGGGTAGCGAAGC  
ATTTAATACCGCAGGTGCCTGGACCGATAAAAGTGTTGCAACCGGTAAAGAATGGCTGG  
CAGTTGCCGATAAAAACTGGATGAAATGCTGGAACCGAAAACCGCAGATGAAGCCCG  
CCTGGCCCTGAATACAATGGCTGATACCGCACTGGTTCGTCTGTTTAATGAACAGCCGAG  
CGCCAAACTGCTGTTTGATAAAGCCTATGGTTATGCCGTGTTTGATAGCCGTAAATTTAGC  
CTGATGCTGCATACCAATCAGGGTGCCGGCGTGGCCGTGAATCGTGCAACCGGTAAGCA  
TACCTATATGAAAATGTTTGGCGCAGGCCTGGCAGCCGGCCTGGGTGGTAAATTTTATCA  
GCAGGTTATTCTGTTTGAGGATAAAGCACGTTTTGATGCATTTGTTAGCCAGGGTTGGGA  
AGCAACCAGTGAAGTGGGCGCCGTGGCCGGCAAAGAAAGTGCAGAACTGACCGCAA  
ATATAATGGTGGTATGGCCATTTATCAGATTGGTGAAAAAGGTCTGCTGCTGGATGCCAAT  
ATTAGCGGTAGCAAATATTGGGTTGATAAAGATCTGACCCGTTAA (SEQ ID NO:10)。

具有 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列的核酸编码具有 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列的多肽，具有 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列的核酸编码具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列的融合蛋白。

在本发明的第五方面，本发明提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例，所述重组细胞携带前面所述的核酸。根据本发明实施例的重组细胞可表达前面所述的多肽或融合蛋白。

根据本发明的实施例，上述重组细胞还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述重组细胞为大肠杆菌、酵母菌或哺乳动物细胞。

在本发明的第六方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物包括前面所述的多肽。根据本发明实施例的药物组合物可用于糖尿病的治疗或预防。

根据本发明的实施例，上述药物组合物还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述药物组合物进一步包括药学上可接受的辅剂。进而所述药物组合物可制备成特定的药物制剂，通过特定的方式给与患者。



在本发明的第七方面，本发明提出了前面所述的多肽或前面所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于促进 $\beta$ 细胞增殖。

在本发明的第八方面，本发明提出了前面所述的多肽或前面所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防糖尿病或保护肝功。

本发明所述的 BefA 蛋白是指 $\beta$ 细胞增殖因子 A (Beta Cell Expansion Factor A, BefA)。

## 附图说明

图 1 是根据本发明实施例的重组表达质粒 pET28a-BefA 的示意图；

图 2 是根据本发明实施例的 pET28a-BefA 阳性克隆 PCR 鉴定示意图；

图 3 是根据本发明实施例的重组表达质粒 pET28a-MBP-BefA 的示意图；

图 4 是根据本发明实施例的 pET28a-MBP-BefA 阳性克隆 PCR 鉴定的示意图；

图 5A 是根据本发明实施例的 BefA 镍柱亲和层析样品 SDS-PAGE 图谱；

图 5B 是根据本发明实施例的 BefA 镍柱亲和层析样品质谱检测结果；

图 5C 是根据本发明实施例的 BefA 离子交换层析样品 SDS-PAGE 图谱；

图 6A 是根据本发明实施例的 BefA 突变体 SDS-PAGE 的示意图；

图 6B 是根据本发明实施例的 BefA 突变体质谱检测结果；

图 7 是根据本发明实施例的 BefA 蛋白促 INS-1 细胞增殖的示意图；

图 8 是根据本发明实施例的 BefA 突变体促 INS-1 细胞增殖的示意图；

图 9 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白后 ob/ob 小鼠随机血糖变化曲线；

图 10 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白后 ob/ob 小鼠体重变化曲线；

图 11 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白后 ob/ob 小鼠肝绝对重量的示意图；

图 12 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白后 ob/ob 小鼠谷草转氨酶(AST)活性的示意图；

图 13 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白后 ob/ob 小鼠谷丙转氨酶(ALT)活性的示意图；

图 14 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白突变体后 db/db 小鼠随机血糖变化曲线的示意图；

图 15 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白突变体后 db/db 小鼠体重变化曲线；

图 16 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白突变体后 db/db 小鼠肝绝对重量的示意图；

图 17 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白突变体后 db/db 小鼠谷丙转氨酶(ALT)活性的示意图；

图 18 是根据本发明实施例的注射 BefA 蛋白突变体后 db/db 小鼠谷草转氨酶(AST)活性的示意图。



## 具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，如无特别说明，本申请所述的“肽键”是指在氨基酸相互连接形成蛋白质时，各个氨基酸之间相互连接的那个化学键，就称为肽键，换句话说，肽键是在两个氨基酸连接时，由一个氨基酸的羧基（-COOH）与另一个氨基酸的氨基（-NH<sub>2</sub>）相互连接所形成的化学键（-NH-CO-）。多肽中以羧基结尾的端叫 C 端，以氨基结尾的端叫 N 端。

本申请所述的多肽与多肽的“相连”或“连接”，既可以是直接相连，也可是间接相连。例如，当采用间接相连时，多肽与多肽之间可通过短肽或氨基酸相连。

根据文献(Jennifer Hampton Hill, A conserved bacterial protein induces pancreatic beta cell expansion during zebrafish development, elifesciences, Dec.2016)的氨基酸序列，重组工程菌经诱导表达纯化得到的 BefA 蛋白出现严重的降解。

本发明克服了上述 BefA 蛋白易降解以及应用研究范围小等问题，提供了一种高纯度 BefA 蛋白的制备方法。即通过构建 BefA 融合蛋白，并在融合蛋白内设计蛋白酶切位点，具有形如 A-B-C 结构的基因序列，其中 A 为伴侣 MBP(麦芽糖结合蛋白)蛋白基因，B 为编码包含 TEV(烟草蚀纹病毒的半胱氨酸蛋白酶)酶切位点和连接肽的核苷酸序列，C 为 BefA 蛋白基因。重组工程菌经诱导表达后，融合蛋白纯化后经 TEV 蛋白酶酶切，可以获得 N 端多一个甘氨酸(G)的 BefA 突变体，纯化后蛋白纯度达 95%以上，经检测具备生物活性。

BefA 蛋白以及 BefA 突变体在体外均具有一定程度地促进 INS-1(大鼠胰岛素瘤细胞)细胞增殖的作用，BefA 蛋白能改善 ob/ob 小鼠的肝功能，且 BefA 突变体能改善 db/db 小鼠的肝功能。

### 实施例 1 重组表达质粒 pET28a-BefA, pET28a-MBP-B 的构建

#### 1、β 细胞增殖因子 A(BefA), MBP 伴侣蛋白的全基因合成

根据文献(Jennifer Hampton Hill, A conserved bacterial protein induces pancreatic beta cell expansion during zebrafish development, elifesciences, Dec.2016)公布的人肠道微生物 *Enterococcus gallinaru* 菌株分泌的 BefA 氨基酸序列(共 258aa)，按照大肠杆菌(BL21(DE3))的优化原则，对核酸序列进行优化。同时对序列中的酶切位点进行严格限定，序列 3' 端添加终止密码子(TAA)，获得编码基因 BefA，最终交给基因合成公司进行全基因合成(pUC57-BefA)。

MBP 伴侣基因与编码包含 TEV(烟草蚀纹病毒的半胱氨酸蛋白酶)酶切位点和连接肽(共 425aa)，按照大肠杆菌(BL21(DE3))的优化原则，对核酸序列进行优化，获得编码基因 MBP，最终交给基因合成公司进行全基因合成(pET28a-MBP)。

#### 2、重组 pET28a-BefA 表达菌株构建



以合成的质粒 pUC57-BefA 为模板, 通过上游引物 F1: GCTCTAGAAATAATTTTGTTTA ACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAGATCCGTTTTCTGG, 含有 *XbaI* 酶切位点; 下游引物 R1: CCGCTCGAGTT AATGGTGATGATGATGATGAC, 含有 *XhoI* 酶切位点和 6×His 标签。加入其它反应液进行 PCR, 扩增得到含有 BefA 的片段 A(844bp)。片段 A 经 *XhoI* 和 *XbaI* 双酶切获得片段 B(792bp), 片段 B 与 pET28a 质粒经 *XhoI* 和 *XbaI* 双酶切回收的载体片段(5236bp)进行连接, 得到质粒 pET28a-BefA, 见图 1。质粒 pET28a-BefA 通过化学转化法转化至大肠杆菌 BL21(DE3)。在卡那抗生素平板上对克隆进行抗性筛选, 挑选的克隆, 通过引物 F1 和 R1 为模板进行 PCR 扩增, 得到与理论大小(792bp)相符的 DNA 片段, 见图 2。利用 BefA 基因片段的两端设计引物进行测序, 测序结果显示克隆基因片段与理论一致。

### 3、重组 pET28a-MBP-BefA 表达菌株构建

以合成的质粒 pET28a-MBP 为模板, 通过上游引物 F2: CATGCCATGGAAATAAAAACA GGTGCACG, 含有 *NcoI* 酶切位点; 下游引物 R2: GCTTTCACCTTTTGCCCAATCT CCCTGAAAATACAGGTTTT。加入其它反应液进行 PCR, 扩增得到含有 MBP 的片段 B(1301bp), 以合成质粒 pUC57-BefA 为模板, 通过上游引物 F3: AAAACCTGTATT TTCAGGGAGATTGGGCAAAAGTGAAAGC, 下游引物 R3: CCGCTCGAGTTAACGGG TCAGATCTTTAT, 含有 *XhoI* 酶切位点。加入其它反应液进行 PCR, 扩增得到含有 BefA 的片段 C(743bp)。以 PCR 扩增获得的片段 B 和片段 C 为模板, 通过上游引物 F2, 下游引物 R3, 加入其它反应液进行 Overlap PCR, 扩增得到含有 MBP-BefA 的片段(约 2000bp)。片段 MBP-BefA 与 pET28a 质粒经 *NcoI* 和 *XhoI* 双酶切回收的载体片段(5231bp)进行连接, 得到质粒 pET28a-MBP-BefA, 见图 3。质粒 pET28a-MBP-BefA 通过化学转化法转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 在卡那抗生素平板上对克隆进行抗性筛选, 挑选的克隆, 通过引物 F2 和 R3 为模板进行 PCR 扩增, 得到与理论大小相符的 DNA 片段, 见图 4。利用 MBP-BefA 基因片段的两端设计引物进行测序, 测序结果显示克隆基因片段与理论一致。

## 实施例 2 工程细胞表达生产 BefA/BefA 突变体

### 1、摇瓶发酵 BefA/MBP-BefA 蛋白

以筛选与鉴定得到的阳性菌株甘油管, 按 0.2%接种量接种至 5mL 含 50 $\mu$ g/mL 卡那霉素 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 250rpm 活化过夜; 按 2%接种量接种至含 50 $\mu$ g/mL 卡那霉素 LB 液体培养基的 2000mL 三角瓶中, 装液量 20%, 37 $^{\circ}$ C 250rpm 培养至 OD<sub>600</sub>=0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1mM, 37 $^{\circ}$ C 250rpm 诱导表达 4~6h; 发酵液经过离心(8000rpm 10min), 收集菌体。菌体用纯化水重悬后, 破碎菌体(超声波破碎或匀浆破碎), 破碎液经过低温高速离心(12000rpm 30min 4 $^{\circ}$ C), 获得上清液进行纯化。

### 2、纯化 BefA 蛋白

BefA 蛋白使用镍柱亲和层析和离子交换层析, BefA 蛋白均发生了降解, 均未能得到纯



度较高的 BefA 蛋白。

方法一：BefA 破碎液上清镍柱亲和层析具体纯化步骤如下：

HisTrap FF column(GE)使用 5 个柱体积的 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5, 100 mM ~200mM NaCl 缓冲液冲洗柱子，将破碎液上清上柱，使用 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5, 100 mM ~200mM NaCl, 30mM 咪唑缓冲液洗去未结合的杂质，接着用 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5, 0~200mM NaCl, 50mM~500mM 咪唑缓冲液将目的蛋白洗脱下来。

镍柱亲和层析得到的样品进行 SDS-PAGE 检测和 MS 分析，其结果如图 5A 和图 5B 所示以及表 1 所示。根据图 5A SDS-PAGE 结果可以看出，纯化得到的样品除主条带(26KD)外，还有一些杂带；根据图 5B 可以看出主峰分子量为 26489，与 BefA 蛋白理论分子量一致，说明纯化得到的样品主要成分是 BefA 蛋白。根据表 1 可以看出，纯化样品中 BefA 蛋白约占 66%，其余大部分为 BefA 蛋白降解产物。说明使用镍柱亲和层析未能得到高纯度的 BefA 蛋白。

表 1：

降解位置	氨基酸	分子量	百分比%	备注：
1	M	28629.20	8.34	完整信号肽残留
11	A	27384.39	0.47	信号肽残留
12	L	27271.23	0.41	
13	A	27200.15	0.37	
20	L	26560.40	0.98	
21	A	26489.32	66.86	目标产物
22	D	26374.23	0.37	N 端降解产物(只统计部分浓度较高的降解蛋白)
24	A	26116.94	1.66	
25	K	25988.76	1.09	
26	V	25889.63	2.78	
27	K	25761.45	1.16	
28	A	25690.38	2.00	
29	A	25619.30	0.76	
37	V	24863.47	0.51	
47	S	23743.33	0.87	
48	V	23644.19	3.67	
55	T	22893.38	1.77	
57	A	22636.66	5.94	

方法二：BefA 破碎液上清阳离子交换层析具体纯化步骤如下：

SP550C(博格隆) 使用 5 个柱体积的 20mM~50mM 乙酸-乙酸钠, pH3.0~5.0 缓冲液冲洗柱子，菌体使用 20mM~50mM 乙酸-乙酸钠, pH3.0~5.0 缓冲液重悬后破碎，将破碎液上清上柱，使用 20mM~50mM 乙酸-乙酸钠, pH3.0~5.0, 100mM~500mM NaCl 缓冲液咪唑缓冲液洗去未结合的杂质，用 20mM~50mM 乙酸-乙酸钠, pH3.0~5.0, 500mM~1M NaCl 缓冲液将目的蛋白洗脱下来。离子交换层析得到的样品进行 SDS-PAGE 检测，其结果如图 5C 所示。

根据图 5C 可以看出，离子交换层析得到的样品，除主要条带(约 25KD)，还存在较多的杂带，说明纯化得到的 BefA 蛋白纯度较低，使用离子交换层析未能得到高纯度的 BefA 蛋白。

说明 BefA 蛋白稳定性较差。

### 3、纯化 MBP-BefA 蛋白突变体

MBP-BefA 破碎液上清经过亲和层析一-酶切-亲和层析二-离子交换层析，得到 BefA 突变体，其结果见图 6。具体纯化步骤如下：

#### (1)亲和层析一

HisTrap FF column(GE)使用 5 个柱体积的 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5, 0~200mM NaCl 缓冲液冲洗柱子,将 MBP-BefA 破碎液上清上柱,使用 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5, 0~200mM NaCl, 10~100mM 咪唑缓冲液洗去未结合的杂质,接着用 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5, 0~200mM NaCl, 200mM~500mM 咪唑缓冲液将目的蛋白 MBP-BefA 洗脱下来。将 MBP-BefA 蛋白透析换液至 20mM~50mM Tris, pH7.4~8.5 缓冲液。

#### (2)TEV 酶酶切

1mg 重组 TEV 蛋白酶在 4℃~30℃, 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5, 0~0.5mM EDTA, 0~1M DTT 条件下 4~15h, 可以完全切割 100mg MBP-BefA 融合蛋白。

#### (3)镍柱亲和层析二

HisTrap FF column(GE)使用 5 个柱体积的 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5 缓冲液冲洗柱子,将 MBP-BefA 酶切样品上柱,收集穿透液进行离子交换层析。

#### (4)离子交换层析

Q Sepharose FF(博格隆)使用 5 个柱体积的 20mM~50mM Tris, pH7.0~8.5 缓冲液冲洗柱子,将亲和层析二穿透液上柱,收集穿透液,得到 BefA 突变体。纯化得到的样品进行 SDS-PAGE 检测和 MS 分析结果如图 6A 和 6B 以及表 2 所示。

根据图 6A SDS-PAGE 结果可以看出,纯化得到的样品(约 25KD)仅有一条条带,说明得到的蛋白纯度很高;根据图 6B 可以看出纯化得到的样品分子量为 25724,与 BefA 突变体理论分子量一致,说明纯化得到的样品为 BefA 突变体;根据表 2 可以看出,纯化得到的 BefA 突变体纯度约 99%。

结论:与 BefA 蛋白相比,纯化得到的 BefA 蛋白突变体降解较少,蛋白纯度较高。说明 BefA 蛋白突变体稳定性较好。

表 2:

化合物数目		待测 MV	丰度	所占%	备注	
目标产品及不同修饰产物		25724.5	1420841.2	80.33	98.94	加钠
		25747.1	188573.24	10.66		脱水
		25705.4	96981.24	5.48		乙酰化
		25767.7	43604.53	2.47		乙酰化
N 端-降解产物	42W	21226.7	635.05	0.04	1.06	
	39V	21628.1	700.63	0.04		
	28V	22822.6	2334.31	0.13		



9A	24796.8	2320.33	0.13
7K	24939.8	5391.94	0.30
5K	25166.6	1589.29	0.09
4A	25295	4402.83	0.25
1G	25667.2	1378.94	0.08

### 实施例3 BefA 及 BefA 突变体活性检测

#### 1、INS-1 细胞增殖实验

INS-1(大鼠胰岛细胞瘤细胞)细胞按  $3 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$  cells/mL, 按 100 $\mu$ L/well 铺板至 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养 48h。换液至无糖 1640+0.1%BSA, 饥饿 24h。弃去饥饿培养基, 加入 1640+1%FBS 培养基稀释至  $10^{-9}$  M~ $10^{-7}$ M 的 BefA 蛋白(或 BefA 突变体 BefA modification)刺激, 100 $\mu$ L/well。37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养 72h。加入 CCK8 试剂, 10 $\mu$ L/well, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2h 后, 检测 OD<sub>450</sub>。结果见图 7-8。BefA 蛋白及 BefA 突变体均能显著促进 INS-1 细胞的增殖。

#### 2、小鼠药效实验

##### (1)BefA 蛋白 ob/ob 小鼠药效实验

ob/ob 小鼠分 2 组, 每组 8 只动物, 分别皮下注射 30mg/kg 的 BefA 蛋白和 PBS 缓冲液, 每天给药 1 次, 给药 4 周, 其中在给药第 7 天进行口服糖耐量 OGTT 测试, 即动物禁食 16 h, D7 给药的同时灌胃给予葡萄糖 2 g/kg, 在给予葡萄糖前以及给药葡萄糖后 15 min、30 min、1 h 及 2 h 检测动物血糖水平。实验过程中监测动物体重变化, 在实验结束的当天动物取全血制备血浆检测血浆 ALT/AST 水平, 动物解剖取其肝脏称重。BefA 蛋白对 ob/ob 小鼠的糖耐量、体重、肝重、肝脏指标 ALT、AST 的影响见图 9-13。图 9 结果显示: 试验结果显示, BefA 蛋白能够显著降低给糖后的血糖水平, 改善糖耐量; 图 10~11 结果显示: BefA 蛋白对 ob/ob 小鼠体重在不同的天具有显著降低效应, 且对肝绝对重量也具有明显的降低效应; 图 12~13 结果显示: BefA 蛋白对 ob/ob 小鼠的肝功指标 ALT、AST 有显著降低。

##### (2) BefA 突变体 db/db 小鼠药效实验

自发性糖尿病 db/db 小鼠分 2 组, 每组 8 只动物, 分别皮下注射 30mg/kg 的 BefA 突变体及对照组皮下注射 PBS 缓冲液, 给药 4 周, 其中实验第一天检测给药前及给药后 1、2、4、6、8 和 24 h 随机血糖。实验过程中监测动物体重变化, 在实验结束的当天动物取全血制备血浆检测血浆 ALT/AST 水平, 动物解剖取其肝脏称重。见图 14-18。图 14 结果显示, 在给药的第一天 BefA 突变体在给药后 4-6h 能够显著降低动物随机血糖水平; 图 15~16 结果显示: BefA 突变体对 db/db 小鼠体重具有一定降低趋势, 对肝绝对重量具有明显的降低效应; 图 17~18 结果显示: BefA 突变体对 db/db 小鼠的肝功指标 ALT、AST 有显著降低。

结论: BefA 蛋白及 BefA 突变体均能显著促进 INS-1 细胞的增殖, 明显降低血糖或改善

糖耐量；BefA 蛋白及 BefA 突变体均能降低体重或具有降低体重趋势；BefA 蛋白及 BefA 突变体均能降低动物绝对肝、降低肝 ALT/AST 水平。BefA 蛋白及 BefA 突变体均具有降低血糖，降低体重且具有肝功保护功能，即 BefA 突变体保留了 BefA 蛋白的药理活性。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。



## 权 利 要 求 书

1、一种多肽，其特征在于，所述多肽与具有下列氨基酸序列的多肽相比，其 N 端具有修饰，所述修饰包括选自 N 端氨基酸的增加、甲基化、甲酰化、氨甲酰化、琥珀酰化、环化、丙酰化、十六烷酰化、十四烷化和乙酰化的至少之一，

(1) 具有 SEQ ID NO: 1-6 所示氨基酸序列的多肽；或

(2) 与 (1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的多肽；或

(3) 与 (1) 相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的多肽。

2、根据权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，所述 N 端氨基酸的增加包括 N 端增加一个或一个以上的氨基酸，且增加的氨基酸至少有一个甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、组氨酸或脯氨酸；优选甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸或异亮氨酸；更优选甘氨酸。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的多肽，其特征在于，所述的 N 端氨基酸的增加为 N 端增加一个氨基酸，所述氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、组氨酸或脯氨酸；优选甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸或异亮氨酸；更优选甘氨酸。

4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的多肽，其特征在于，所述多肽具有 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

5、一种提高 BefA 蛋白稳定性或制备 BefA 蛋白突变体的方法，其特征在于，对 BefA 蛋白氨基酸序列的 N 端进行修饰，所述修饰包括选自 N 端氨基酸的增加、甲基化、甲酰化、氨甲酰化、琥珀酰化、环化、丙酰化、十六烷酰化、十四烷化和乙酰化的至少之一。

6、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述 BefA 蛋白具有

(1) SEQ ID NO: 1-6 所示氨基酸序列；或

(2) 与 (1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的序列；或

(3) 与 (1) 相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的氨基酸序列。

7、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述 N 端氨基酸的增加包括 N 端增加一个或一个以上的氨基酸，且增加的氨基酸至少有一个甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、组氨酸或脯氨酸；优选甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸或异亮氨酸；更优选甘氨酸。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述的 N 端氨基酸的增加为 N 端增加一个氨基酸，所述氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、组氨酸或脯氨酸；优选甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸或异亮氨酸；更优选甘

氨酸。

9、一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白包括伴侣蛋白、连接肽以及 BefA 蛋白，所述连接肽的 N 端与所述伴侣蛋白的 C 端相连，所述连接肽的 C 端与所述 BefA 蛋白的 N 端相连，所述连接肽适于被蛋白酶切割，以便形成游离的 BefA 蛋白突变体，所述游离的 BefA 蛋白突变体的 N 端相比于 BefA 蛋白，增加了一个或多个氨基酸。

10、根据权利要求 9 所述的融合蛋白，其特征在于，所述伴侣蛋白包括选自麦芽糖结合蛋白、CBP、GST、SUMO、Trx、NusA 的至少之一，任选地，所述伴侣蛋白含有或不含有 His 标签、Flag 标签；

任选地，所述蛋白酶为烟草蚀纹病毒的半胱氨酸蛋白酶、肠激酶、凝血酶、Xa 因子蛋白酶、人鼻病毒 3C 蛋白酶、SUMO 酶或 KEX-2；

任选地，所述融合蛋白具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

11、一种核酸，其特征在于，编码权利要求 1~4 任一项所述的多肽或权利要求 9~10 任一项所述的融合蛋白。

12、根据权利要求 11 所述的核酸，其特征在于，所述核酸具有 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列或 SEQ ID NO:10 所示的核苷酸序列。

13、一种重组细胞，其特征在于，携带权利要求 11 或 12 所述的核酸。

14、根据权利要求 13 所述的重组细胞，其特征在于，所述重组细胞为大肠杆菌、酵母菌或哺乳动物细胞。

15、一种药物组合物，其特征在于，包括权利要求 1~4 任一项所述的多肽。

16、根据权利要求 15 所述的药物组合物，其特征在于，进一步包括药学上可接受的辅剂。

17、权利要求 1~4 所述的多肽或权利要求 15 或 16 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于促进  $\beta$  细胞增殖。

18、权利要求 1~4 所述的多肽或权利要求 15 或 16 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或预防糖尿病、肥胖或保护肝功。



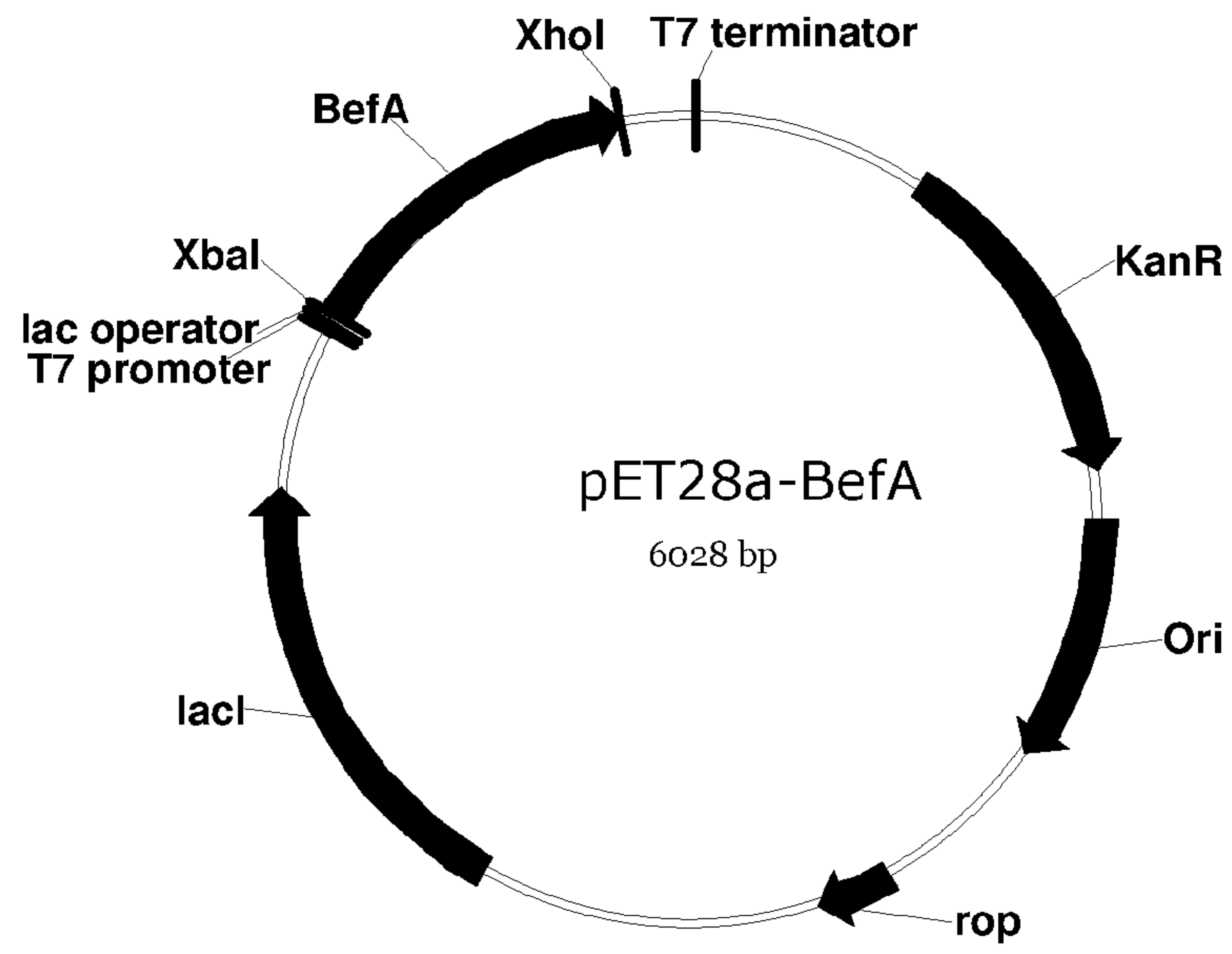


图 1

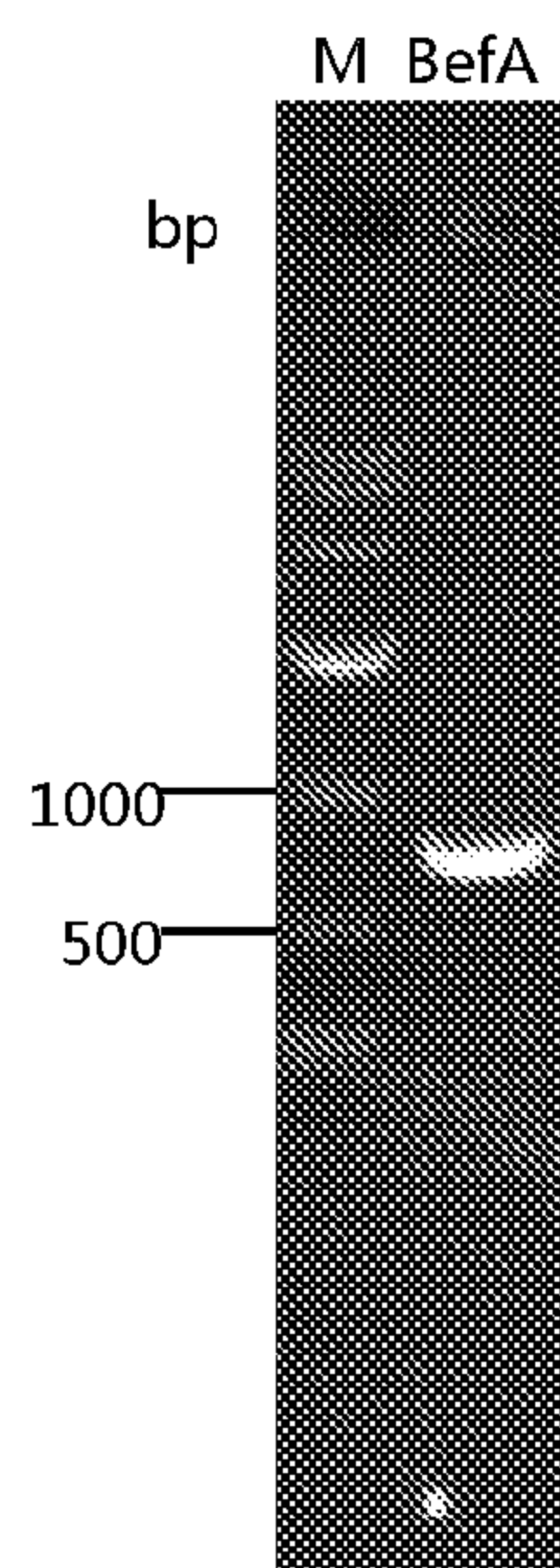


图 2

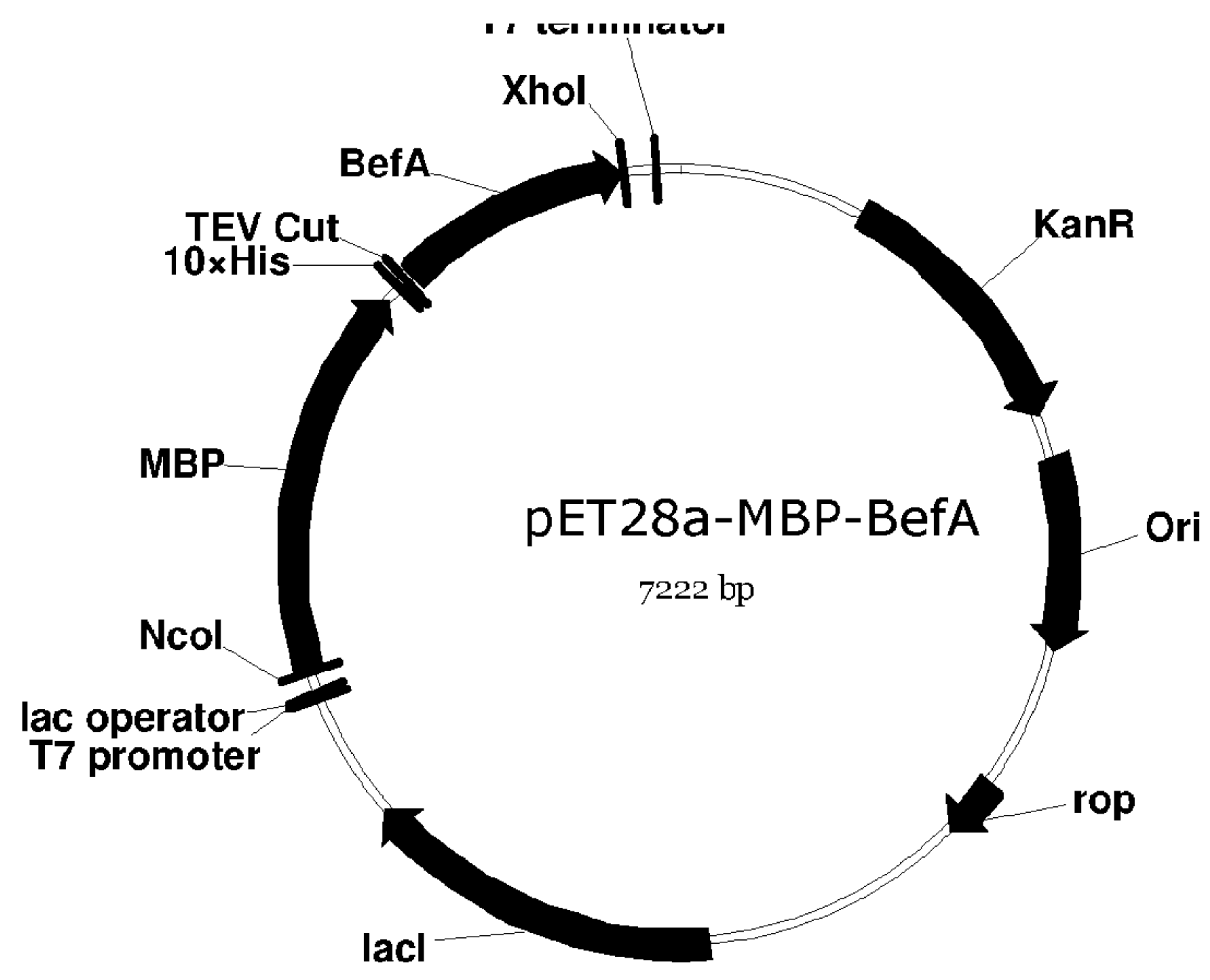


图 3

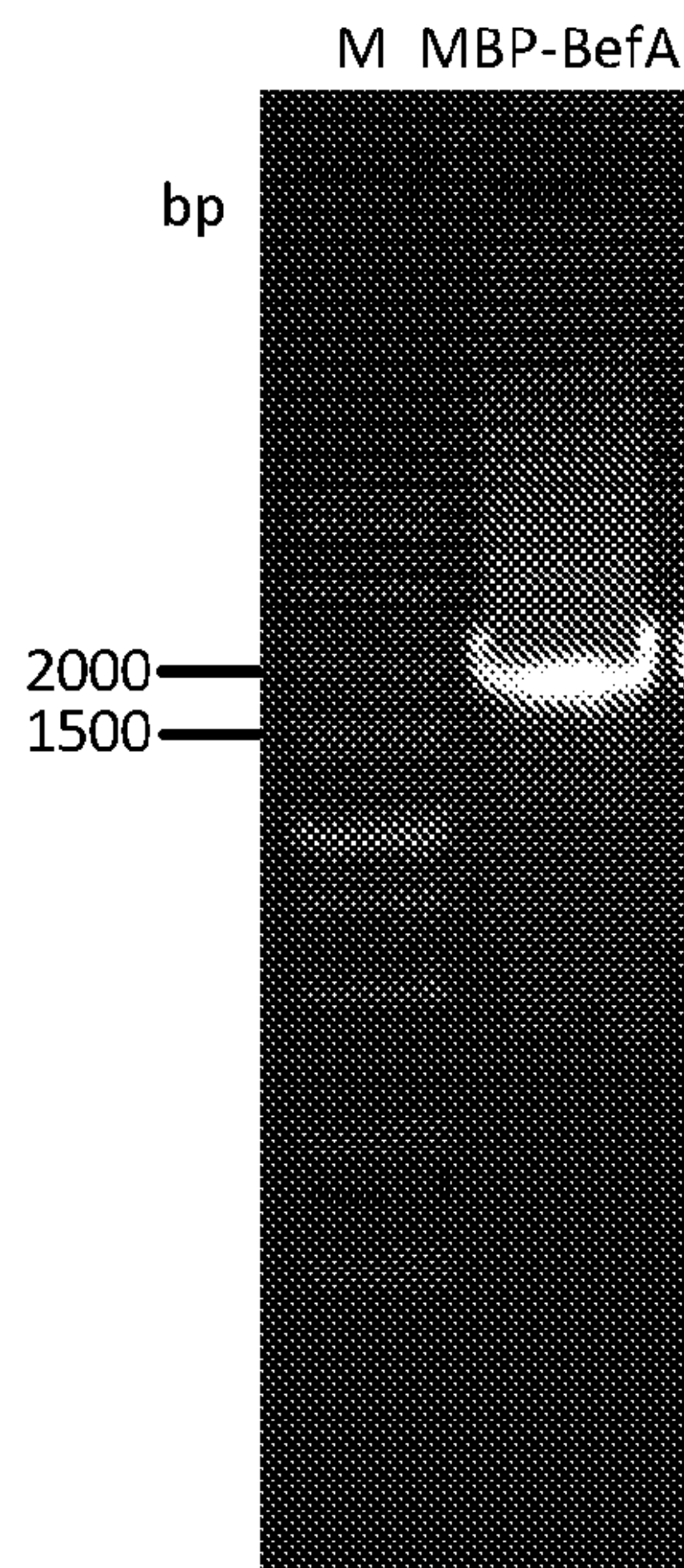


图 4



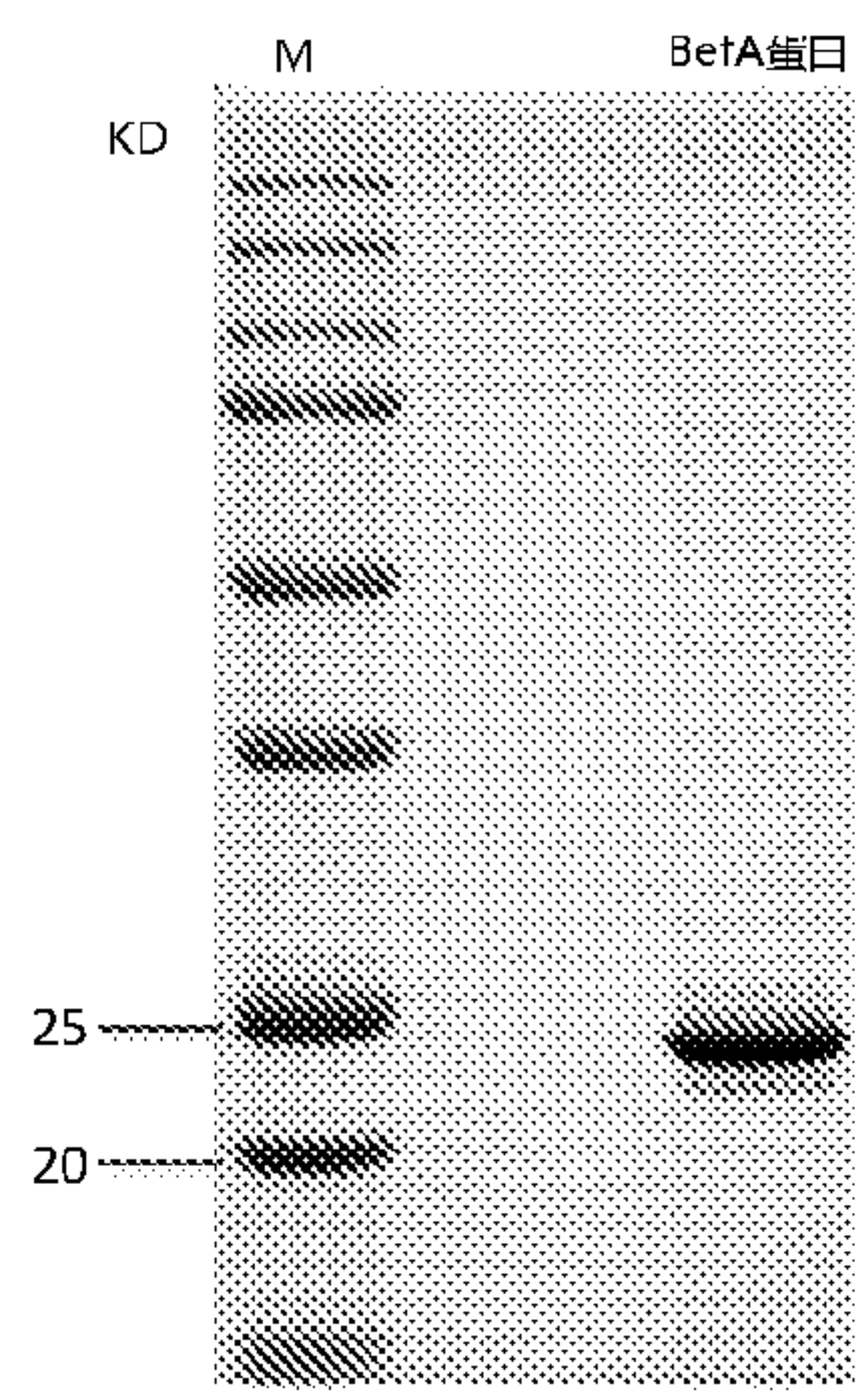


图 5A

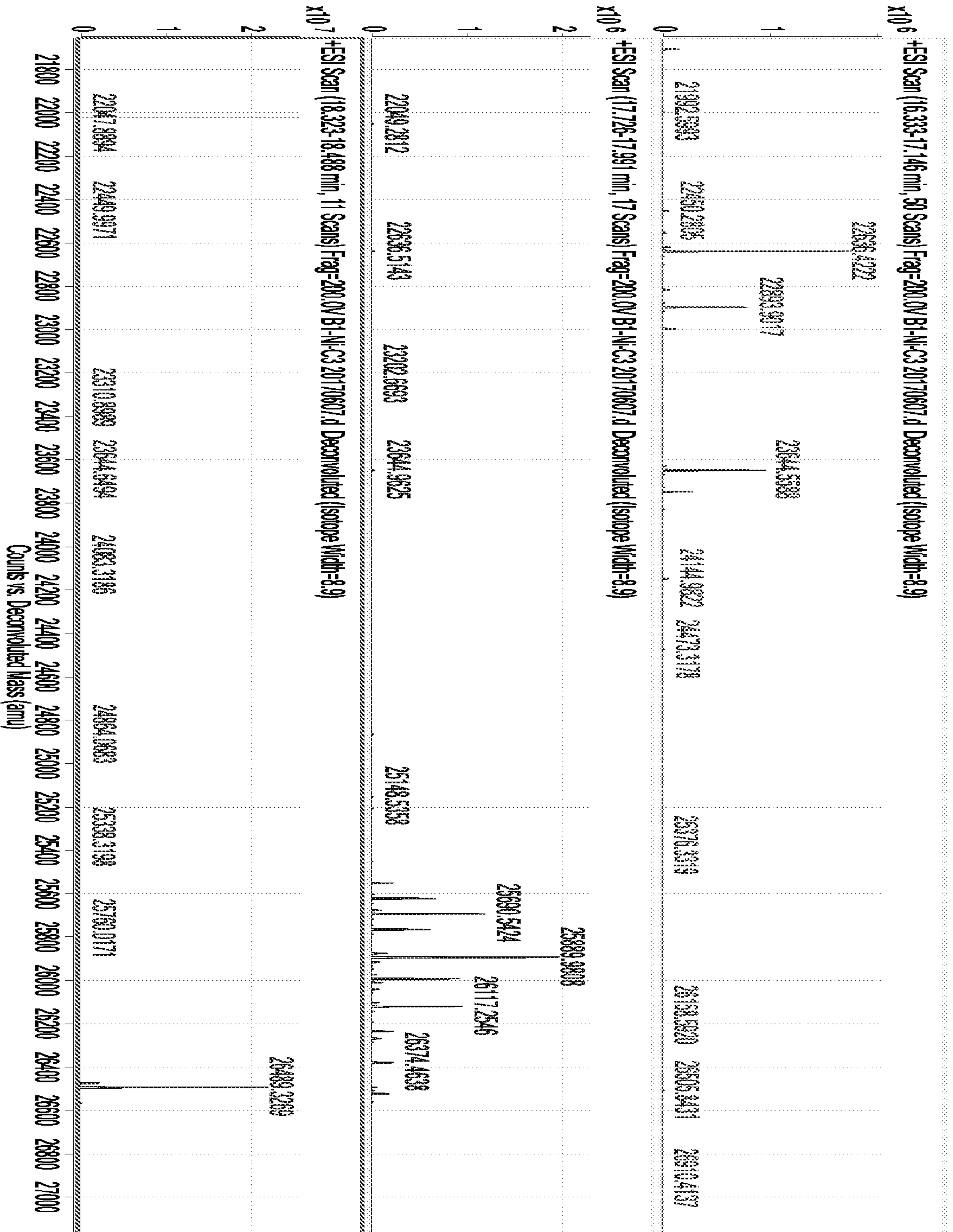


图 5B



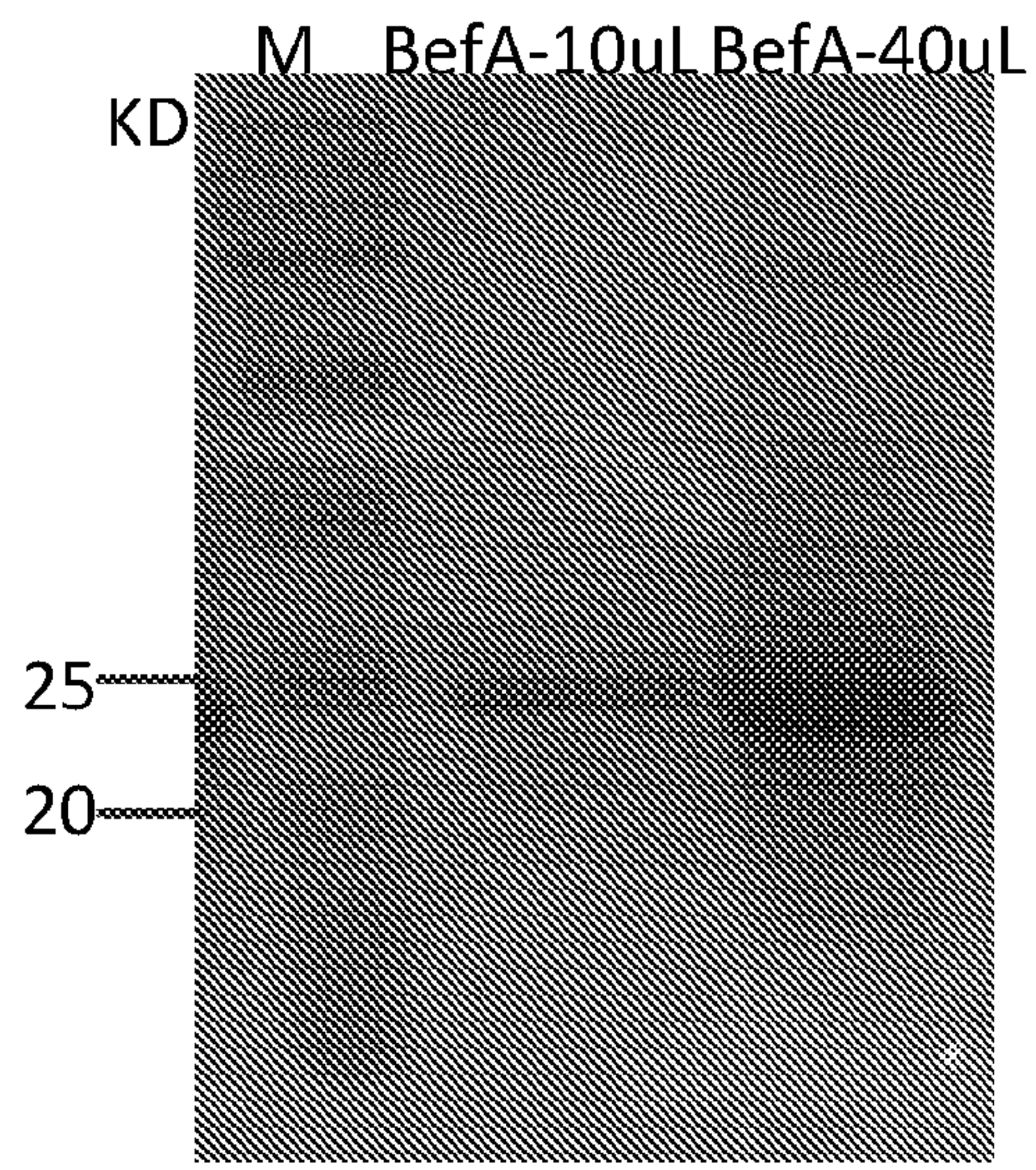


图 5C

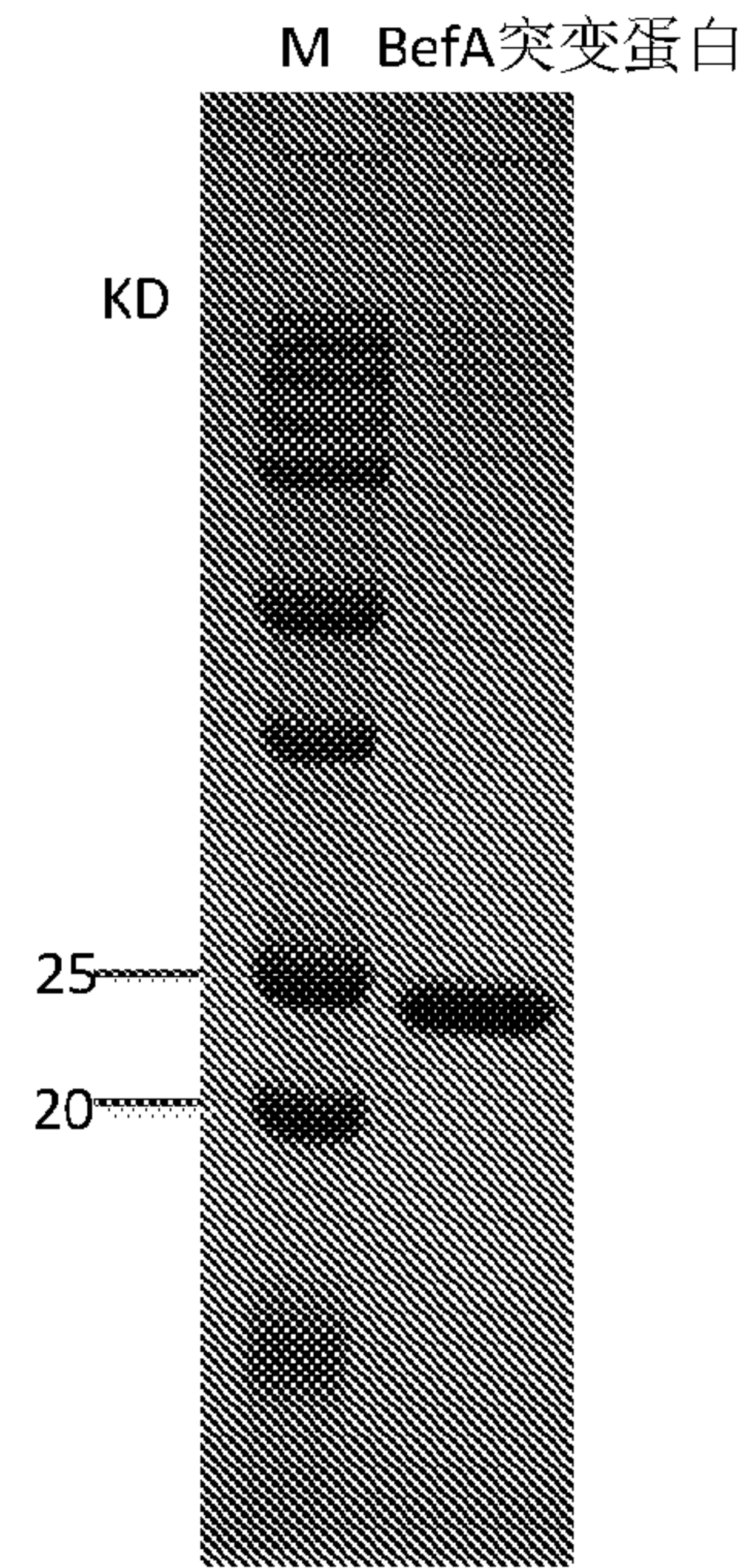


图 6A

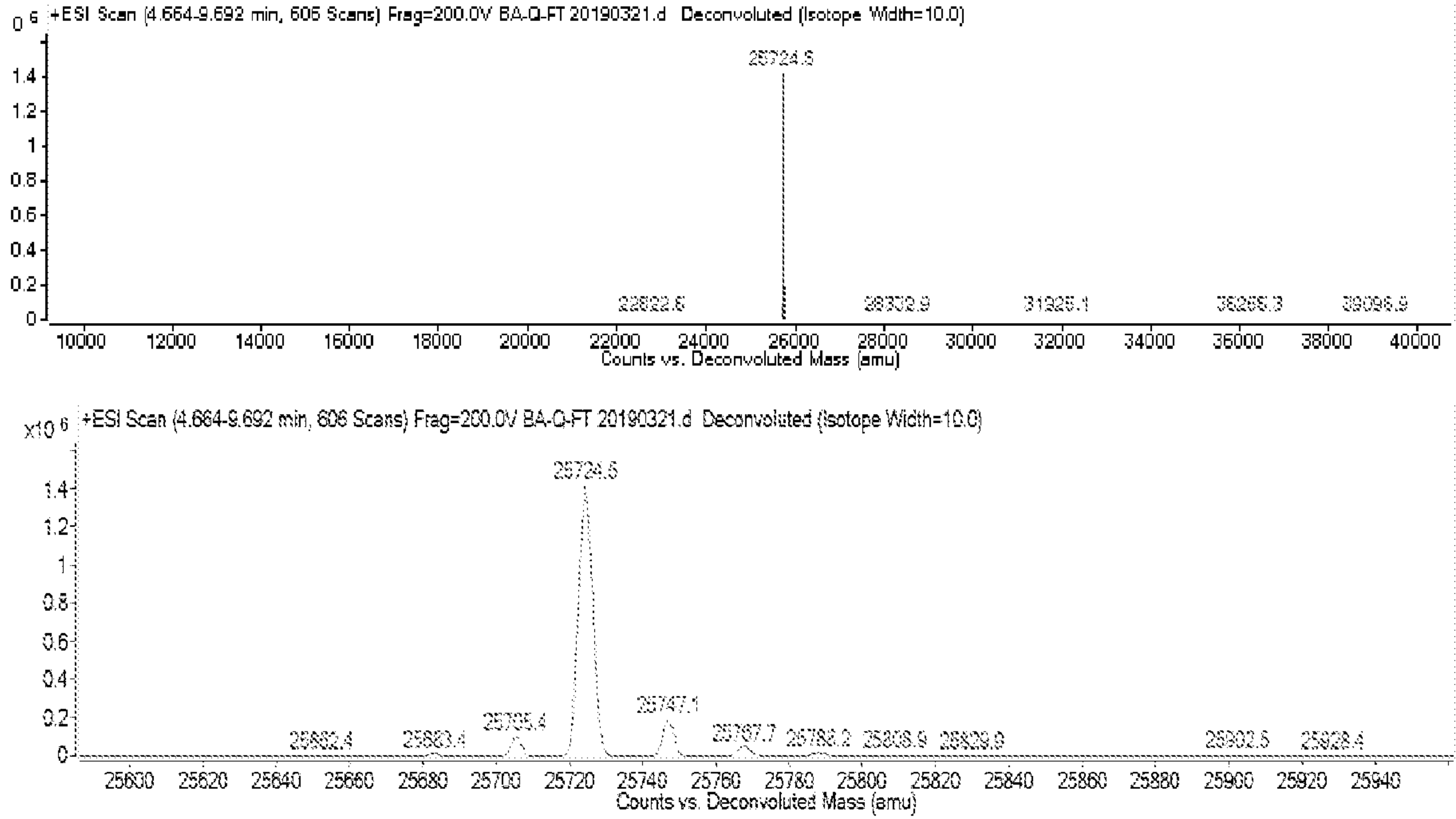


图 6B



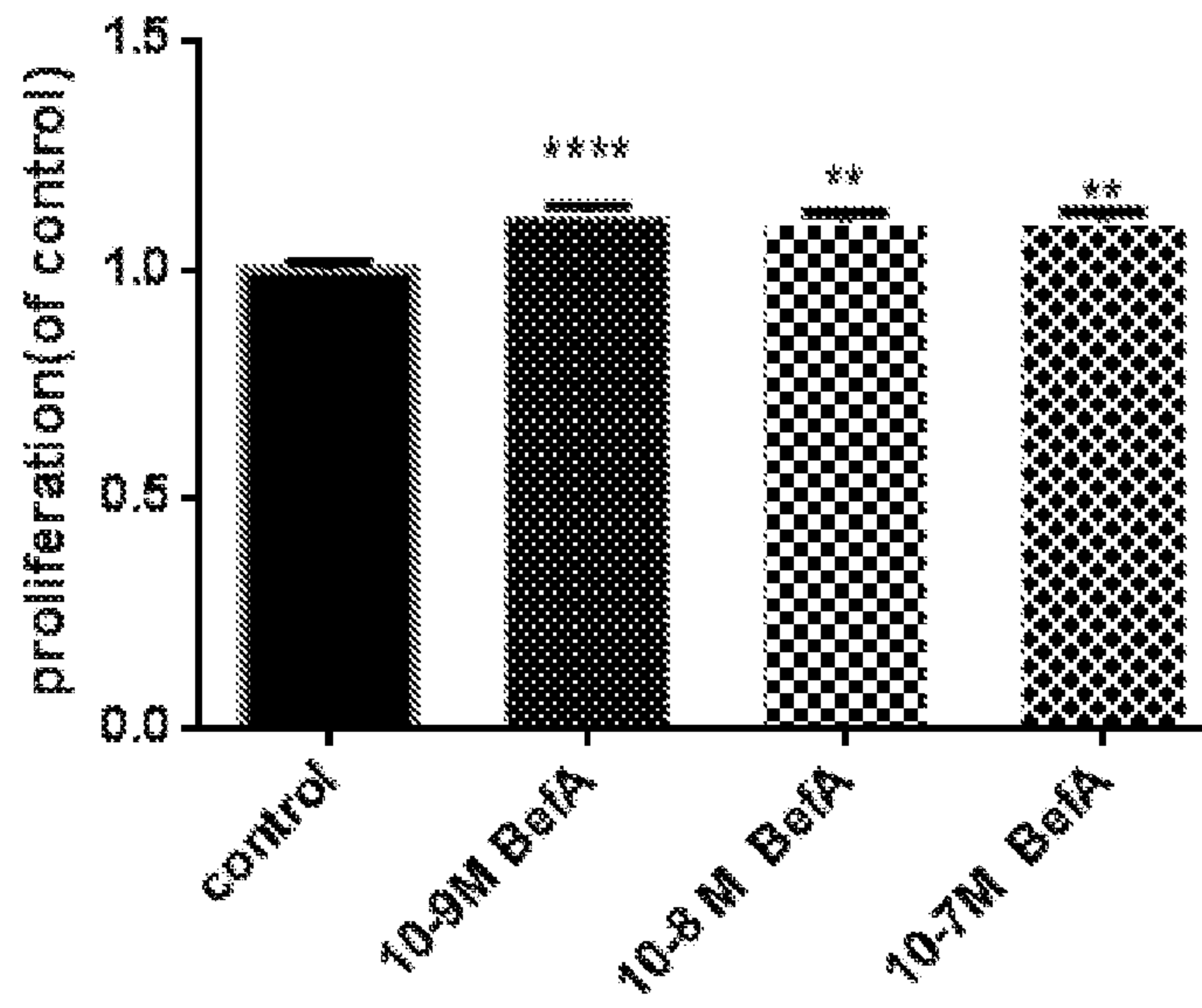


图 7

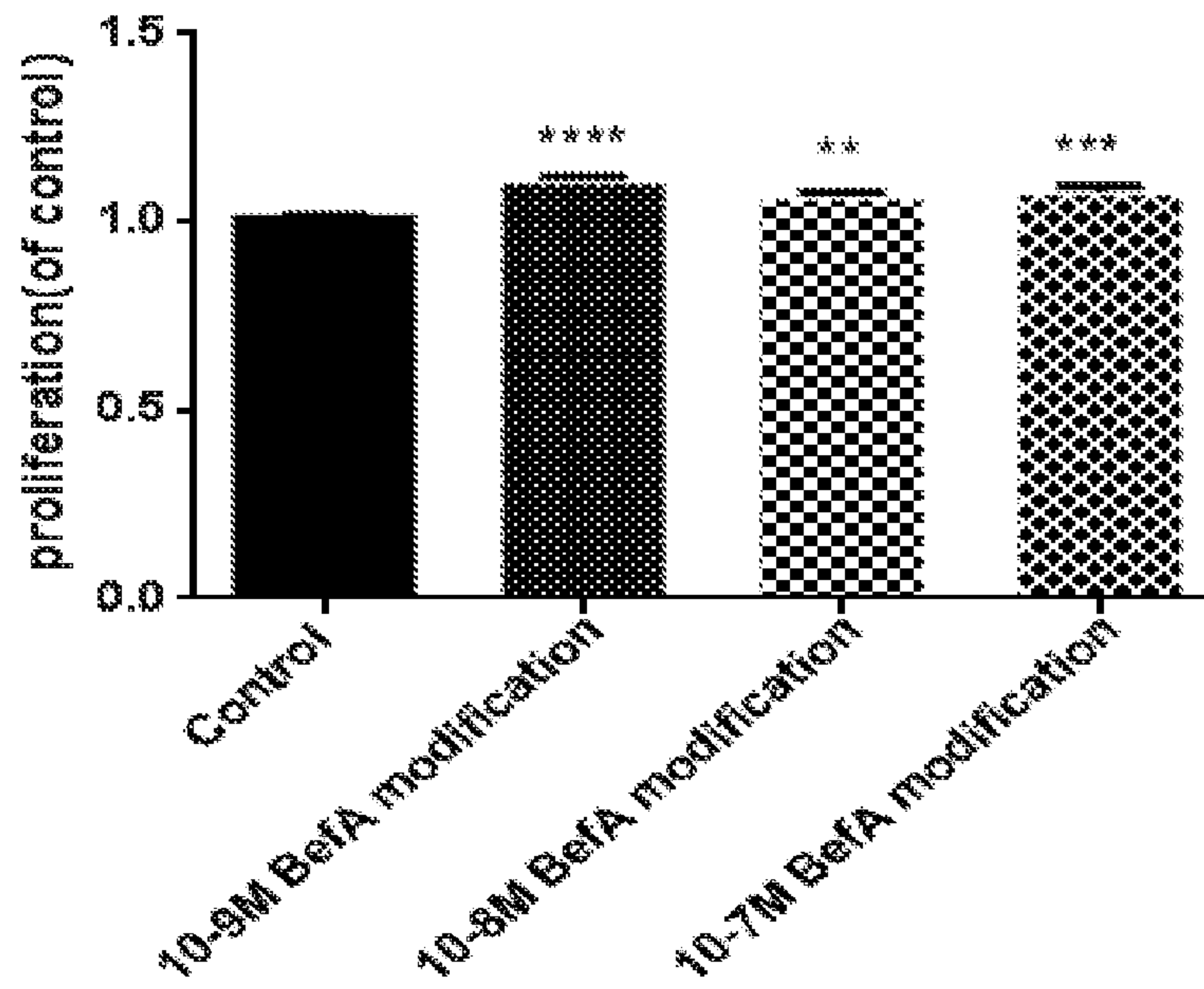


图 8

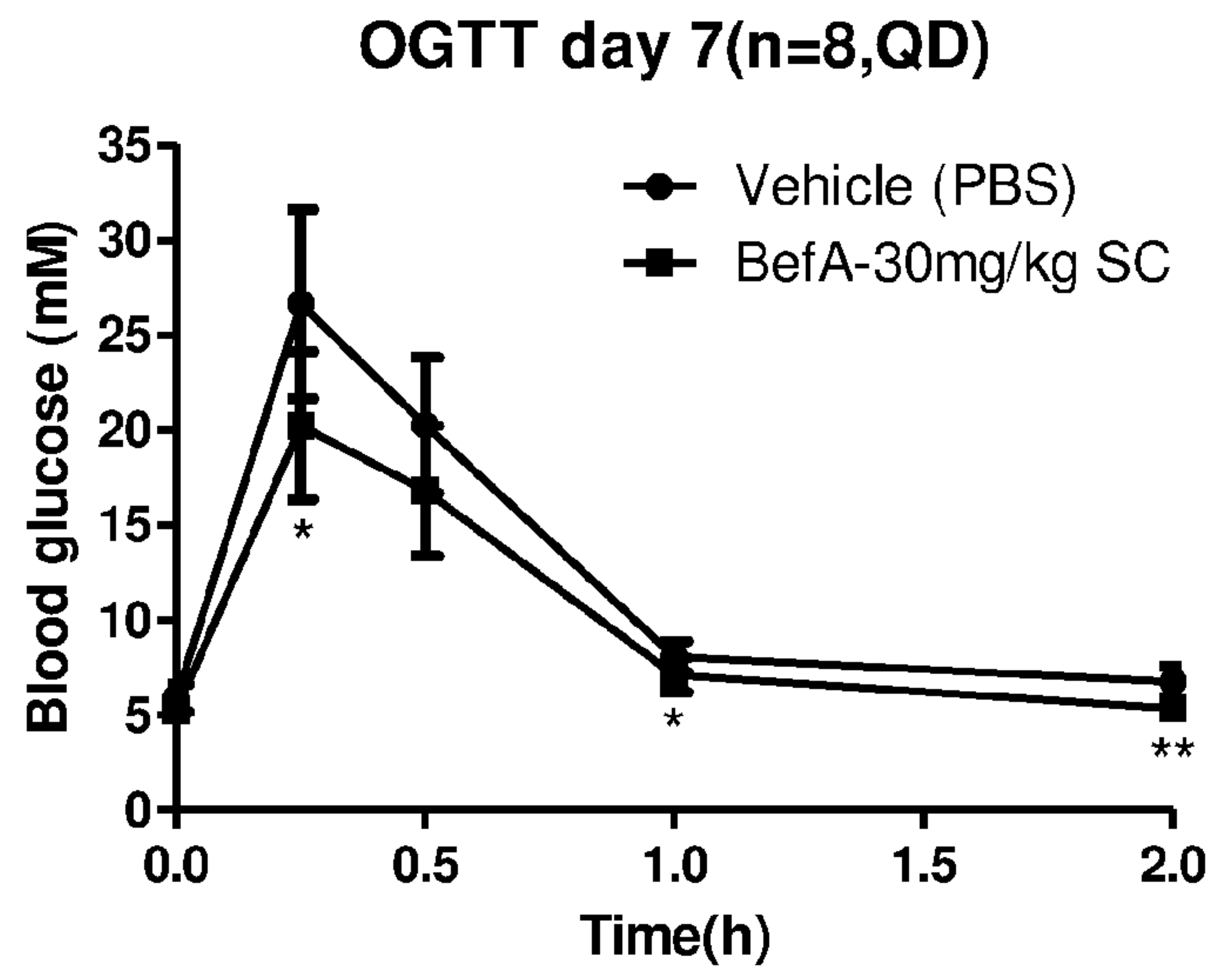


图 9



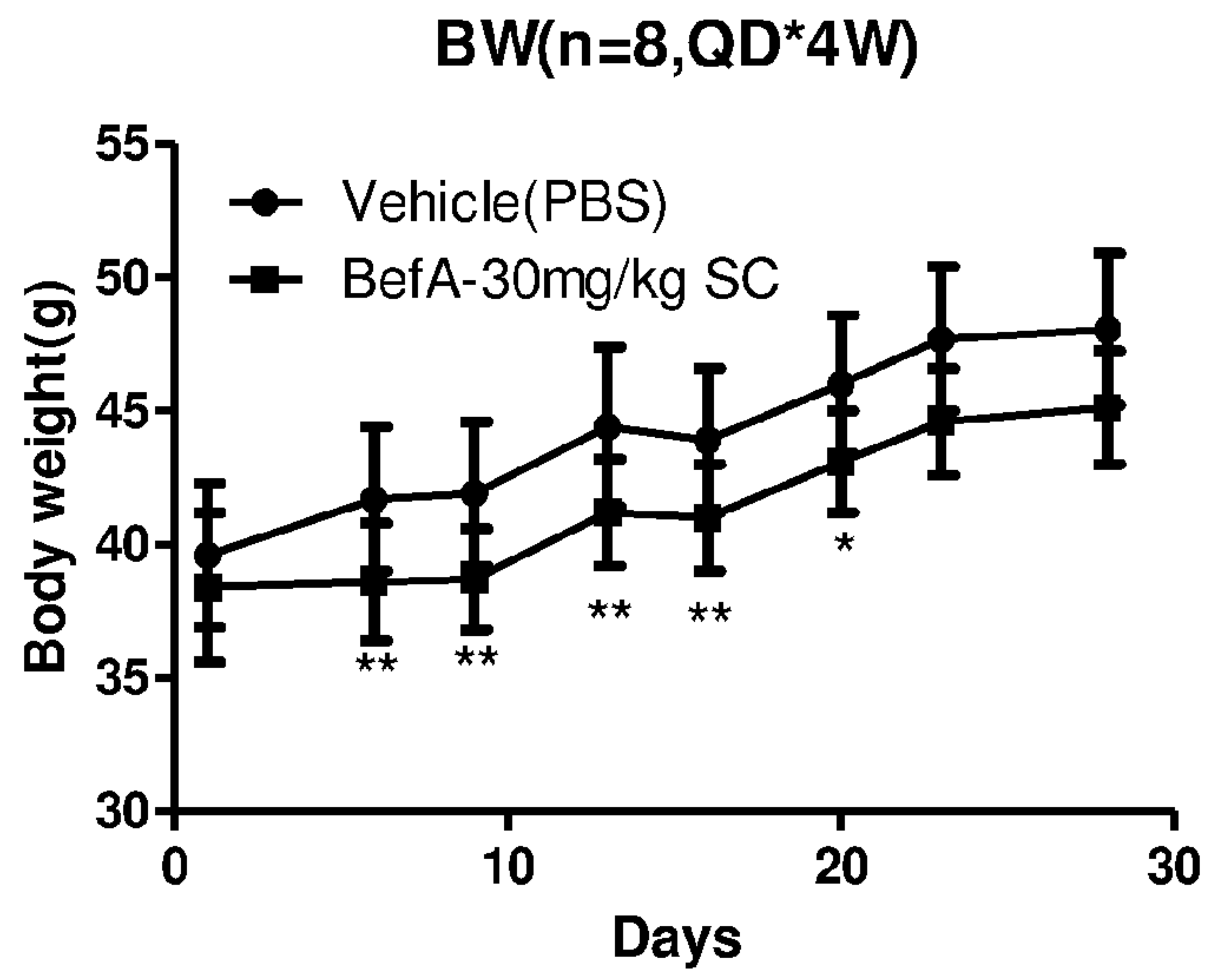


图 10

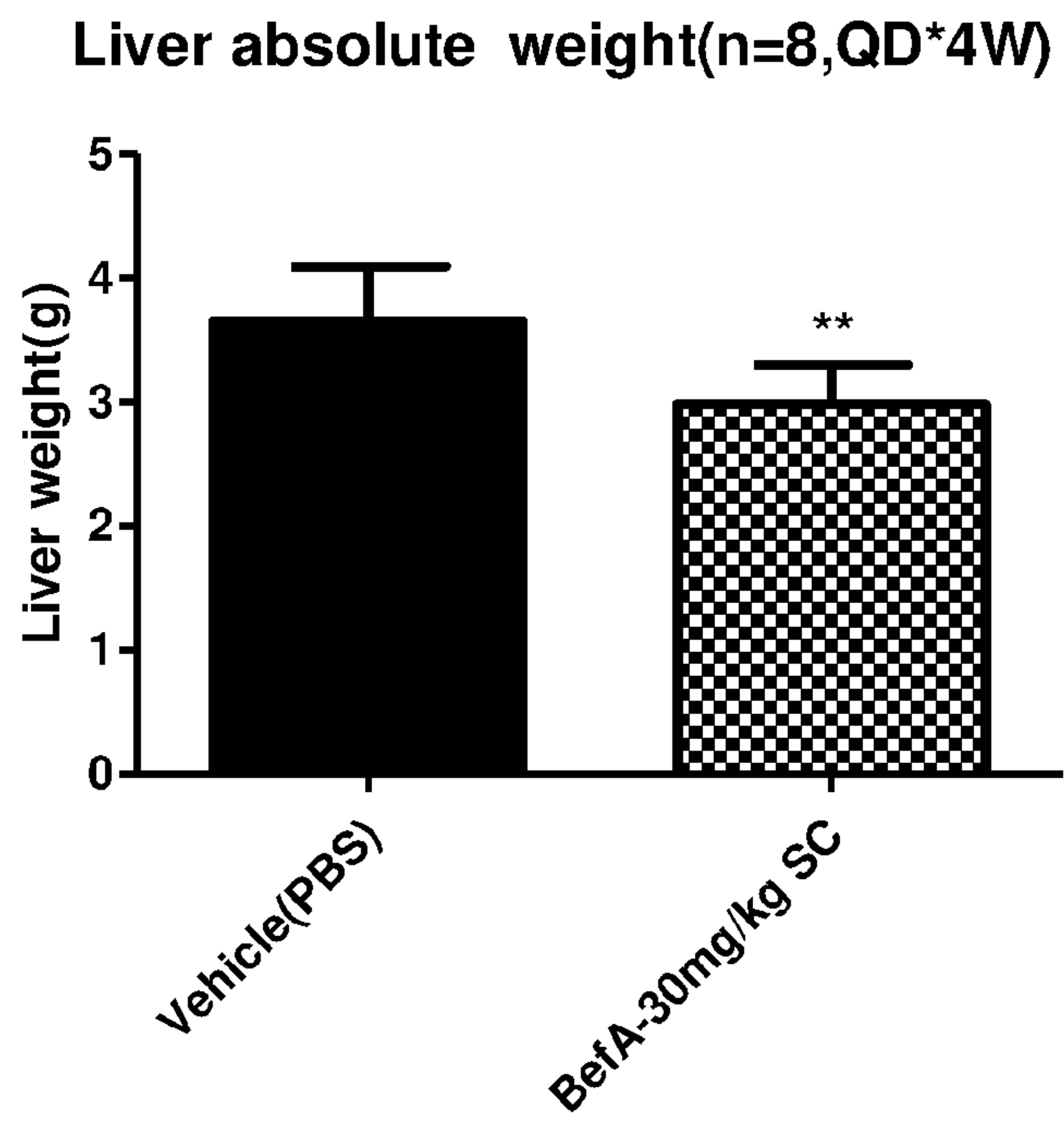


图 11

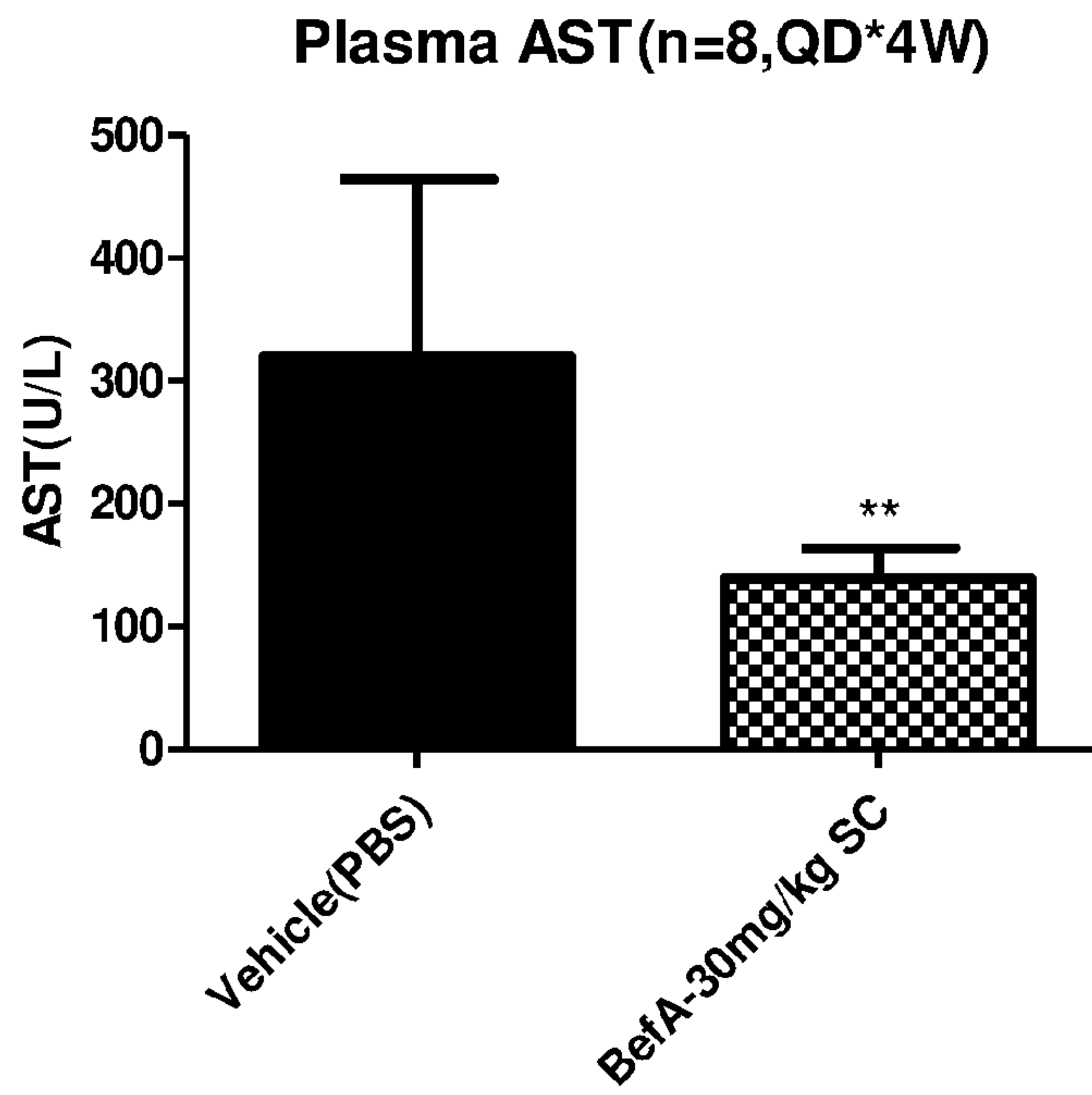


图 12

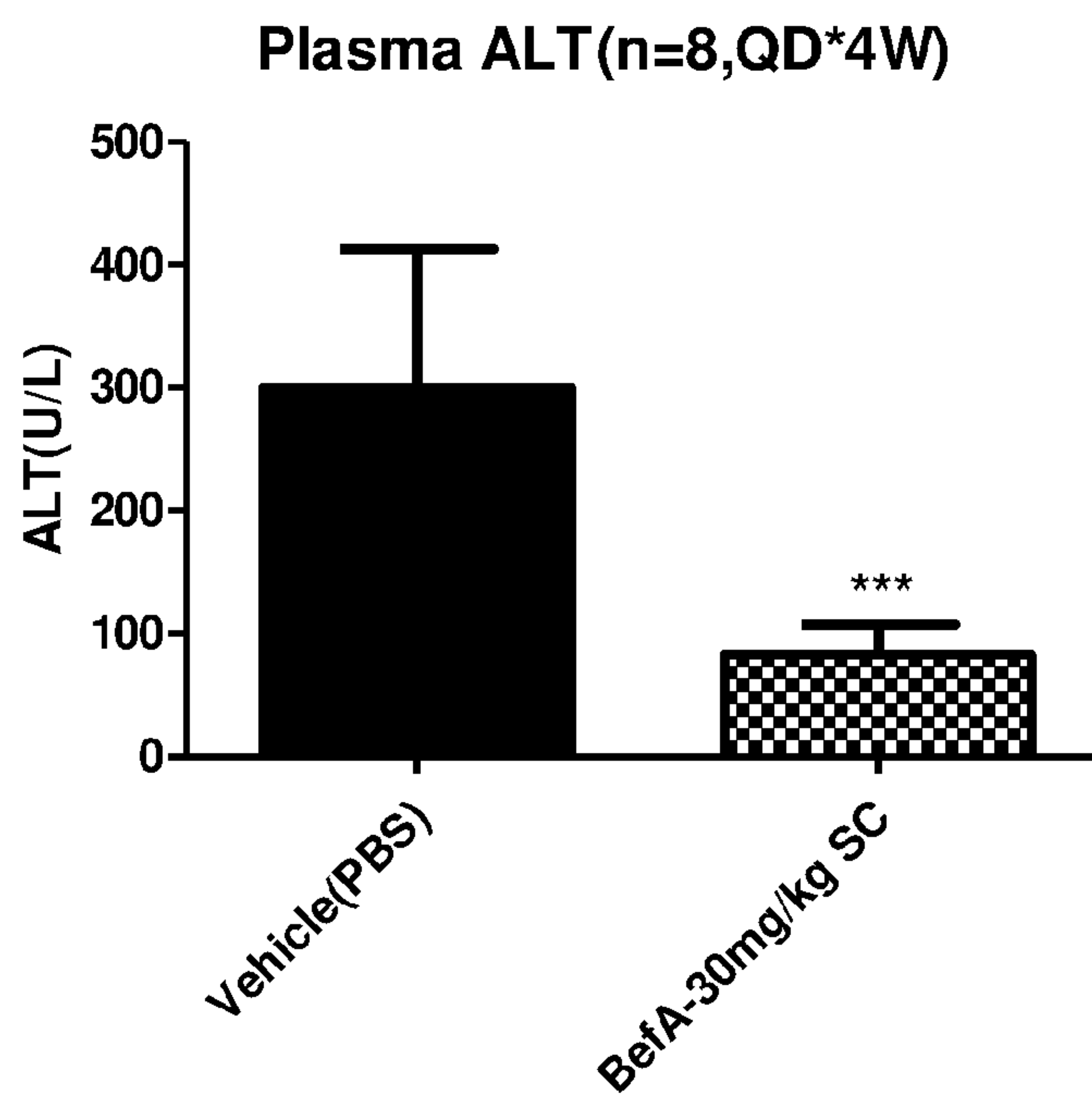


图 13



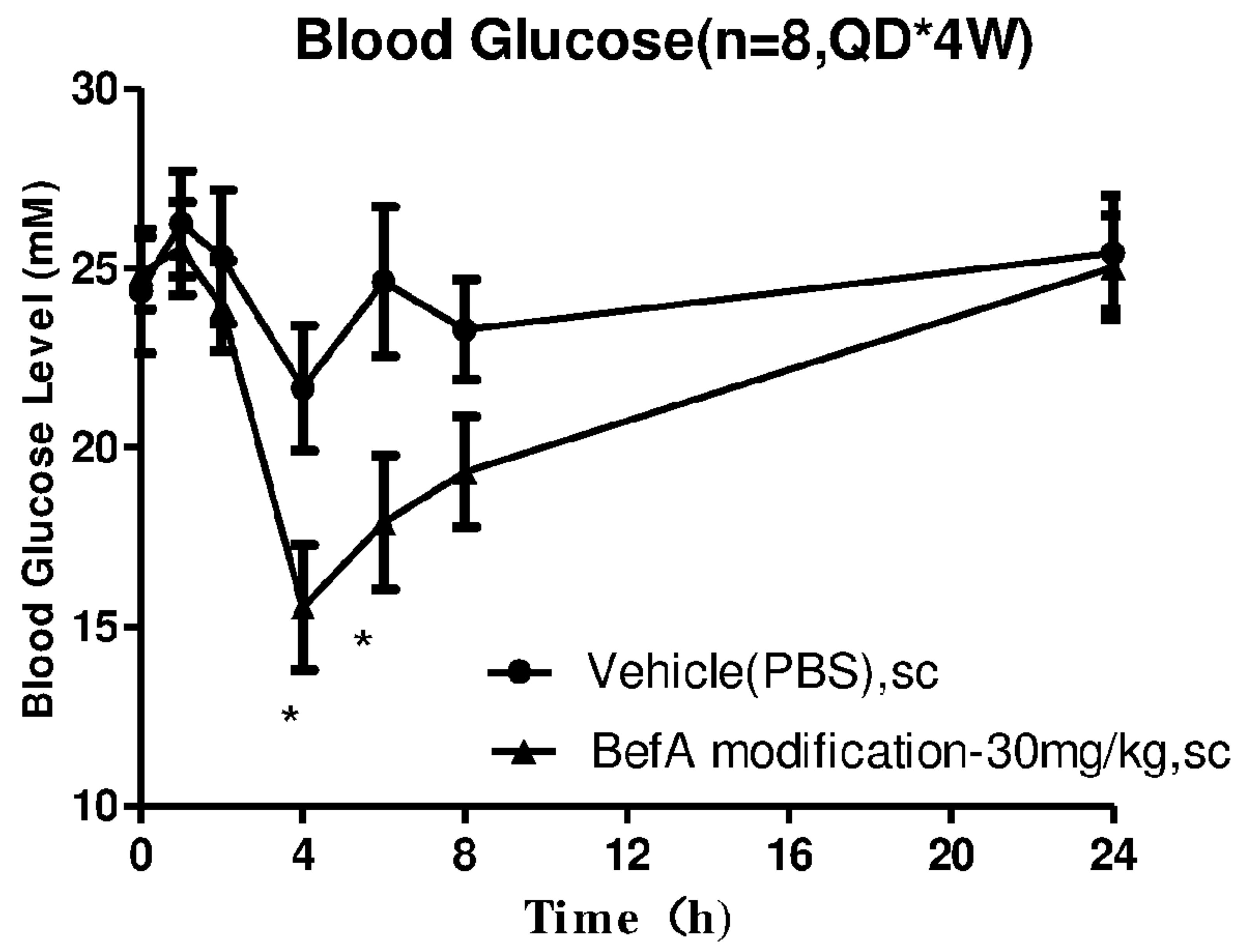


图 14

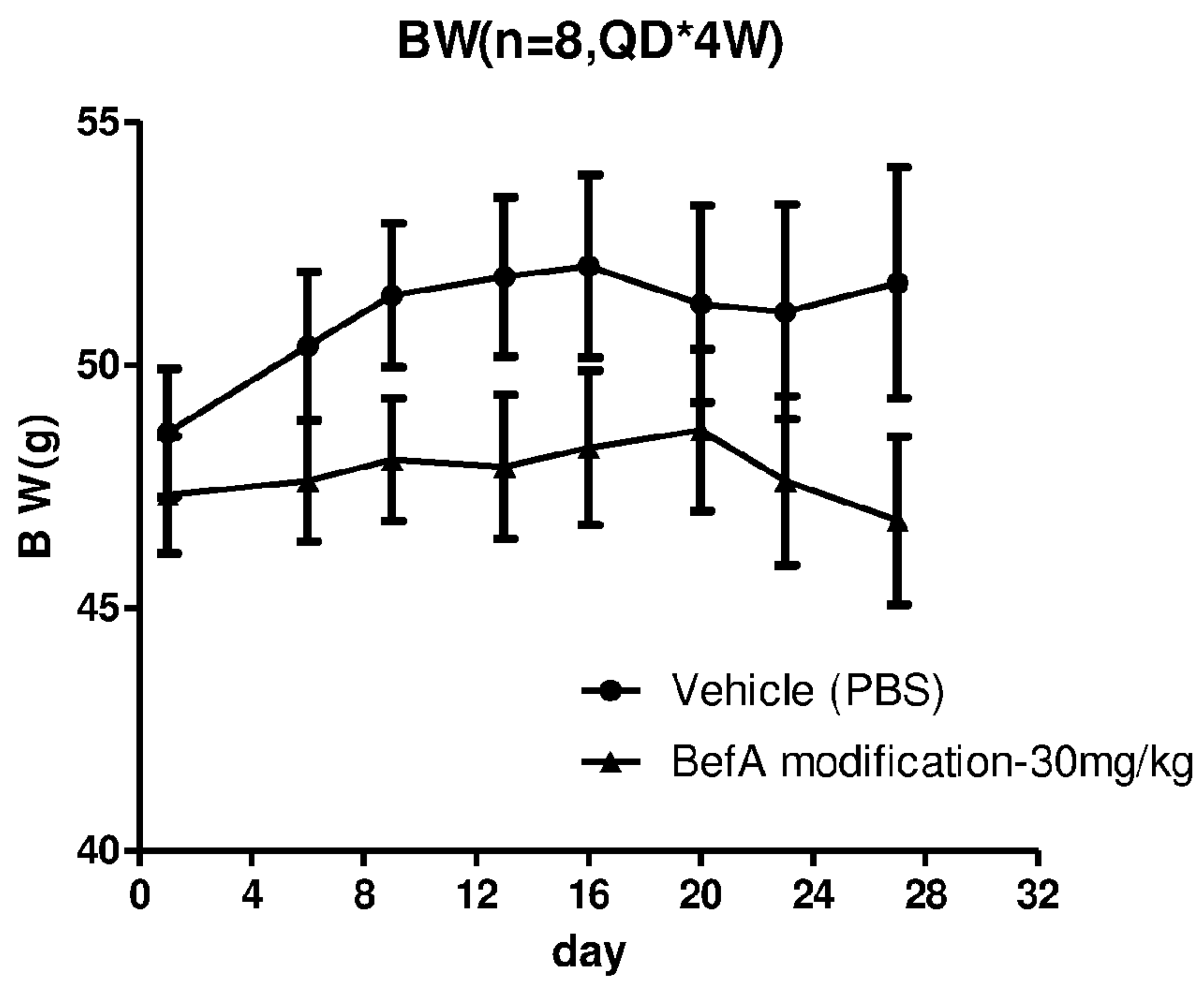


图 15

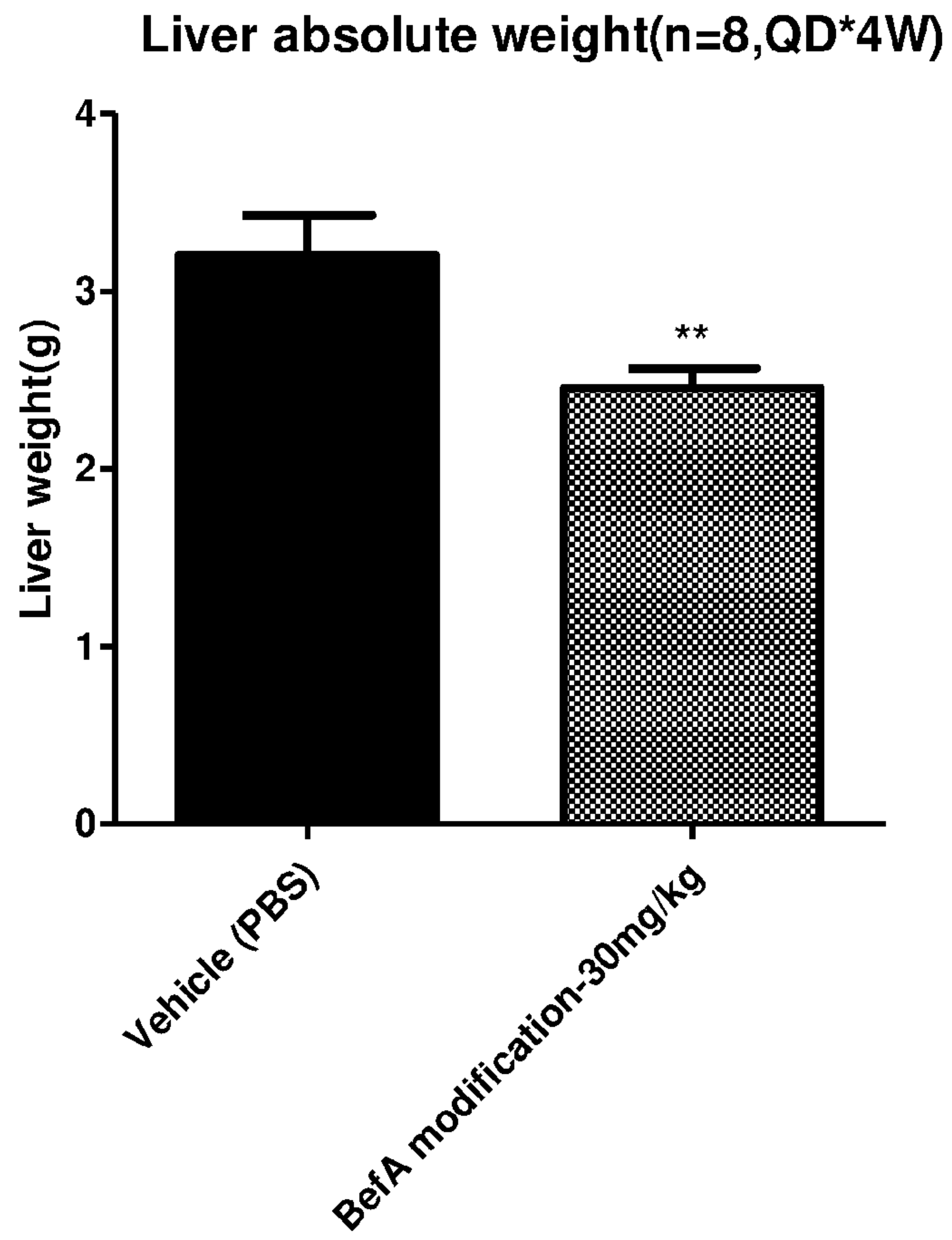


图 16



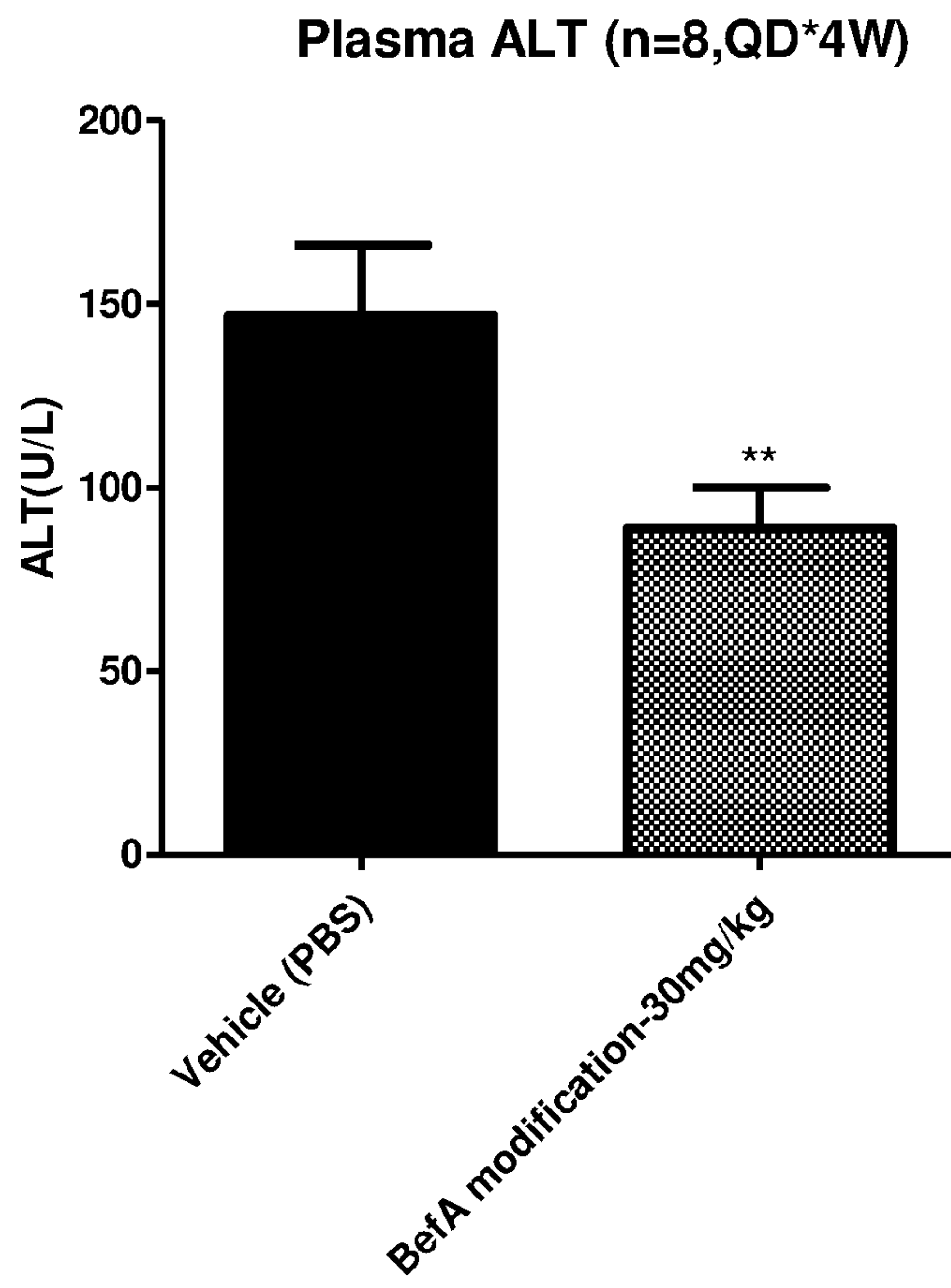


图 17

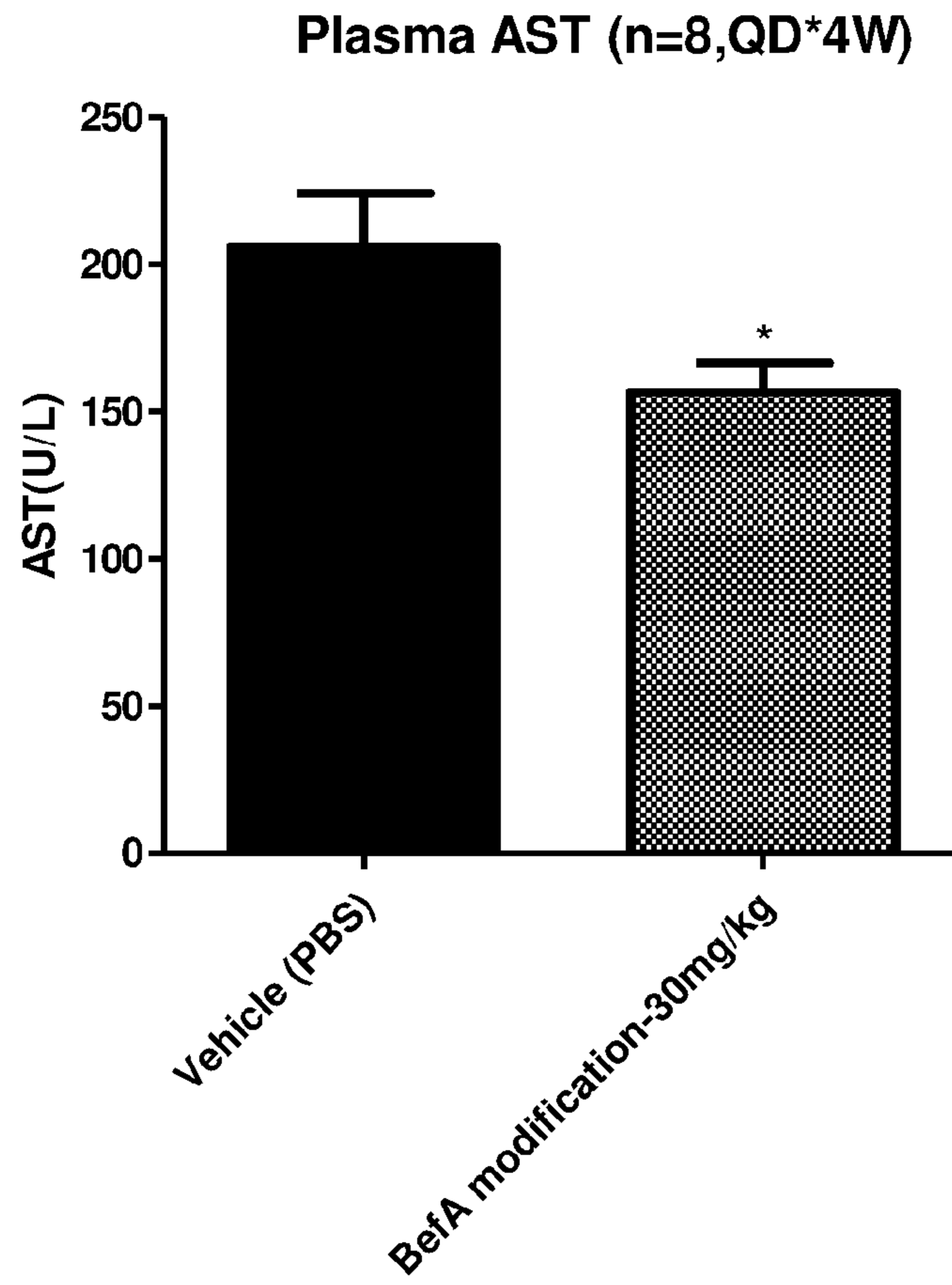


图 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2020/142229**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 14/195(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C07K 1/06(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; C12N;		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀: SEQ ID Nos: 1-10, 烷化, 甲基化, 酰化, 环化, 修饰, 蛋白, 多肽, $\beta$ 细胞, 增殖, INS-1, 胰岛素, 糖尿病, 稳定, 体重, 肝功, 伴侣蛋白, 麦芽糖结合蛋白, MBP, CBP, GST, SUMO, Trx, NusA, His, Flag, 蛋白酶, TEV, Alkylation, methylation, butylation, cyclization, modification, protein, recombination, $\beta$ -cell, proliferation, insulin, diabetes, stability, body weight, liver function, chaperone protein, maltose binding protein, protease.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 12 October 2017 (2017-10-12) claims 26-40, description, paragraphs 89-90, 115-168, sequence table	1-3, 11, 13-14, 17-18
Y	US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 12 October 2017 (2017-10-12) claims 26-40, description, paragraphs 89-90, 115-168, sequence table	1-18
Y	CN 101500592 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 05 August 2009 (2009-08-05) description, paragraph 197	1-18
Y	CN 107245494 A (TIANJIN UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY) 13 October 2017 (2017-10-13) description, paragraphs 9-83	9-14
X	GenBank. "lipoprotein [Aeromonas hydrophila], NCBI Reference Sequence: WP_043124314.1." NCBI, 23 February 2015 (2015-02-23), sequence part	1-3, 11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>11 March 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>31 March 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/142229

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105669833 A (TIANJIN UNIVERSITY OF COMMERCE) 15 June 2016 (2016-06-15) entire document	1-18
A	CN 105753945 A (WUUXI RESEARCH INSTITUTE OF APPLIED TECHNOLOGIES TSINGHUA UNIVERSITY) 13 July 2016 (2016-07-13) entire document	1-18
A	HILL, J. H. et al. "A conserved bacterial protein induces pancreatic beta cell expansion during zebrafish development." <i>ELIFE</i> , No. 5, 13 December 2016 (2016-12-13), pp. 1-18	1-18
A	胡美霖 等 (HU, Meilin et al.). "胰岛β细胞再生: 糖尿病治疗新策略 (Regeneration of Islet β cells: A New Strategy for Diabetes)" <i>中国糖尿病杂志 (Chinese Journal of Diabetes)</i> , Vol. 24, No. 12, 31 December 2016 (2016-12-31), pp. 1148-1152	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/142229

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

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/142229**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2017292115	A1	12 October 2017	EP	3197473	A1	02 August 2017
				US	10563174	B2	18 February 2020
				CA	2961550	A1	31 March 2016
				US	2020172872	A1	04 June 2020
				WO	2016049200	A1	31 March 2016
<hr/>							
CN	101500592	A	05 August 2009	EP	1945261	A4	12 May 2010
				JP	2009514895	A	09 April 2009
				EA	014900	B1	28 February 2011
				AU	2006311661	B2	26 May 2011
				IL	191321	A	31 May 2012
				ZA	200804082	A	24 February 2010
				WO	2007056352	A2	18 May 2007
				CA	2628238	A1	18 May 2007
				ZA	200804082	B	24 February 2010
				AU	2006311661	A1	18 May 2007
				WO	2007056352	A3	30 April 2009
				NZ	568762	A	25 November 2011
				EP	1945261	A2	23 July 2008
				EA	200801276	A1	28 August 2009
				JP	5191392	B2	08 May 2013
				UA	94922	C2	25 June 2011
				US	2010028358	A1	04 February 2010
BR	PI0618338	A2	23 August 2011				
<hr/>							
CN	107245494	A	13 October 2017	CN	107245494	B	24 July 2020
<hr/>							
CN	105669833	A	15 June 2016	None			
<hr/>							
CN	105753945	A	13 July 2016	CN	105753945	B	09 April 2019
<hr/>							



<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 14/195(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C07K 1/06(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K; C12N;</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀:SEQ ID Nos: 1-10, 烷化, 甲基化, 酰化, 环化, 修饰, 蛋白, 多肽, β细胞, 增殖, INS-1, 胰岛素, 糖尿病, 稳定, 体重, 肝功, 伴侣蛋白, 麦芽糖结合蛋白, MBP, CBP, GST, SUMO, Trx, NusA, His, Flag, 蛋白酶, TEV, Alkylation, methylation, butylation, cyclization, modification, protein, recombination, β-cell, proliferation, insulin, diabetes, stability, body weight, liver function, chaperone protein, maltose binding protein, protease.</p>																				
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 权利要求26-40, 说明书第89-90、115-168段, 序列表</td> <td>1-3、11、 13-14、17-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 权利要求26-40, 说明书第89-90、115-168段, 序列表</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101500592 A (斯克利普斯研究院) 2009年 8月 5日 (2009 - 08 - 05) 说明书第197段</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 107245494 A (天津科技大学) 2017年 10月 13日 (2017 - 10 - 13) 说明书第9-83段</td> <td>9-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>GenBank. "lipoprotein [Aeromonas hydrophila], NCBI Reference Sequence: WP_043124314.1." NCBI, 2015年 2月 23日 (2015 - 02 - 23), 序列部分</td> <td>1-3, 11</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 权利要求26-40, 说明书第89-90、115-168段, 序列表	1-3、11、 13-14、17-18	Y	US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 权利要求26-40, 说明书第89-90、115-168段, 序列表	1-18	Y	CN 101500592 A (斯克利普斯研究院) 2009年 8月 5日 (2009 - 08 - 05) 说明书第197段	1-18	Y	CN 107245494 A (天津科技大学) 2017年 10月 13日 (2017 - 10 - 13) 说明书第9-83段	9-14	X	GenBank. "lipoprotein [Aeromonas hydrophila], NCBI Reference Sequence: WP_043124314.1." NCBI, 2015年 2月 23日 (2015 - 02 - 23), 序列部分	1-3, 11
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 权利要求26-40, 说明书第89-90、115-168段, 序列表	1-3、11、 13-14、17-18																		
Y	US 2017292115 A1 (UNIVERSITY OF OREGON) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 权利要求26-40, 说明书第89-90、115-168段, 序列表	1-18																		
Y	CN 101500592 A (斯克利普斯研究院) 2009年 8月 5日 (2009 - 08 - 05) 说明书第197段	1-18																		
Y	CN 107245494 A (天津科技大学) 2017年 10月 13日 (2017 - 10 - 13) 说明书第9-83段	9-14																		
X	GenBank. "lipoprotein [Aeromonas hydrophila], NCBI Reference Sequence: WP_043124314.1." NCBI, 2015年 2月 23日 (2015 - 02 - 23), 序列部分	1-3, 11																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:                  "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件                  "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利                  "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)                  "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件                  "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件                  "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了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                  "&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 3月 11日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 3月 31日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>沈晶晶</p> <p>电话号码 86-(10)-53961944</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105669833 A (天津商业大学) 2016年 6月 15日 (2016 - 06 - 15) 全文	1-18
A	CN 105753945 A (清华大学无锡应用技术研究院) 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13) 全文	1-18
A	HILL, J. H. 等. "A conserved bacterial protein induces pancreatic beta cell expansion during zebrafish development." ELIFE, 第5期, 2016年 12月 13日 (2016 - 12 - 13), 第1-18页	1-18
A	胡美霖等. "胰岛β细胞再生: 糖尿病治疗新策略." 中国糖尿病杂志, 第24卷, 第12期, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), 第1148-1152页	1-18

## 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) 和行政法规第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:



国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/142229

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)
US	2017292115	A1	2017年 10月 12日	EP	3197473	A1	2017年 8月 2日
				US	10563174	B2	2020年 2月 18日
				CA	2961550	A1	2016年 3月 31日
				US	2020172872	A1	2020年 6月 4日
				WO	2016049200	A1	2016年 3月 31日
-----							
CN	101500592	A	2009年 8月 5日	EP	1945261	A4	2010年 5月 12日
				JP	2009514895	A	2009年 4月 9日
				EA	014900	B1	2011年 2月 28日
				AU	2006311661	B2	2011年 5月 26日
				IL	191321	A	2012年 5月 31日
				ZA	200804082	A	2010年 2月 24日
				WO	2007056352	A2	2007年 5月 18日
				CA	2628238	A1	2007年 5月 18日
				ZA	200804082	B	2010年 2月 24日
				AU	2006311661	A1	2007年 5月 18日
				WO	2007056352	A3	2009年 4月 30日
				NZ	568762	A	2011年 11月 25日
				EP	1945261	A2	2008年 7月 23日
				EA	200801276	A1	2009年 8月 28日
				JP	5191392	B2	2013年 5月 8日
				UA	94922	C2	2011年 6月 25日
				US	2010028358	A1	2010年 2月 4日
				BR	PI0618338	A2	2011年 8月 23日
-----							
CN	107245494	A	2017年 10月 13日	CN	107245494	B	2020年 7月 24日
-----							
CN	105669833	A	2016年 6月 15日	无			
-----							
CN	105753945	A	2016年 7月 13日	CN	105753945	B	2019年 4月 9日
-----							