



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102770440 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201180011823. 9

(22) 申请日 2011. 03. 01

(30) 优先权数据

10155023. 4 2010. 03. 01 EP

61/309642 2010. 03. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/052964 2011. 03. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02011/107447 EN 2011. 09. 09

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 X. 吴 A. 博格斯内斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 孔青 权陆军

(51) Int. Cl.

C07K 1/20(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 5 页

(54) 发明名称

纯化肽的制备性 RP-HPLC 方法

(57) 摘要

描述了在 RP-HPLC 系统上将目标多肽与至少一种不想要的成分分离的方法, 其中至少一个洗脱步骤在或接近目标肽的 pI 值下进行。

1. 在 RP-HPLC 系统上将液体混合物中的目标多肽与至少一种不想要的成分分离的方法,所述方法包括:

a. 在 RP-HPLC 系统中引入含有目标多肽的混合物,该混合物溶解于流动相,其中该流动相的 pH 值与目标多肽的 pI 值相差至少 1 个单位;

b. 将流动相的 pH 调节至与目标多肽的 pI 值相差小于 1 个单位的 pH 值,其中调节 pH 通过分段过程或采用 pH 梯度进行;

c. 洗脱目标多肽从而获得其纯化的组合物。

2. 如权利要求 1 所述的方法,在步骤 b 和步骤 c 之间增加一个步骤,其中, pH 再次被调节至与待纯化的肽或蛋白质的 pI 值相差至少 1 个单位的 pH 值,其中所述调节通过分段过程或采用 pH 梯度进行。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述步骤 a 中的 pH 值高于待纯化的肽或蛋白质的 pI 值。

4. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述步骤 a 中的 pH 值为 5.5-9.0。

5. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述步骤 b 中的 pH 值为 3.5-5.5。

6. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述步骤 b 中流动相 pH 的调节采用 pH 梯度进行。

7. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述方法包括与步骤 b 同时应用有机修饰物梯度,以去除不想要的杂质而同时在 RP-HPLC 系统上保留目标肽。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述步骤 b 中有机修饰物梯度为约 25%-约 48%,且流动相 pH 的调节采用 pH 7.4-4.5 的 pH 梯度进行。

9. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述步骤 b 中将流动相的 pH 由约 7.4 调节至约 4.5。

10. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述反相胶上的温度为 20-70°C。

11. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中 RP-HPLC 系统中使用的吸附剂选自:取代的二氧化硅例如 C-4 二氧化硅、C-6 二氧化硅、C-12 二氧化硅、C-18 二氧化硅和基于苯基的二氧化硅,聚合物材料例如聚苯乙烯、膜、整体材料和过滤器。

12. 如权利要求 7-11 中任一项所述的方法,其中所述有机修饰剂选自乙醇、甲醇、丙醇和乙腈。

13. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述目标多肽为适用于治疗糖尿病的多肽。

14. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述目标多肽是胰高血糖素样肽或 GLP-1 激动剂。

15. 如前述权利要求任一项所述的方法,其中所述至少一种不想要的成分是所述多肽的其它形式,例如是所述多肽的糖基化形式、脱酰胺形式或氧化形式。

纯化肽的制备性 RP-HPLC 方法

发明领域

[0001] 本发明涉及在 RP-HPLC 系统上将目标多肽与至少一种不想要的成分分离的方法，其中至少一个洗脱步骤在或接近目标肽的 pI 值下进行。

背景技术

[0002] 对于蛋白质和肽（多肽）的纯化（即与杂质分离）和分析，色谱是一种熟知且广泛使用的方法。可以应用多个不同的色谱原理，反相高效液相色谱（RP-HPLC）就是其中之一。RP-HPLC 的分离原理基于多肽溶液和色谱树脂表面上的疏水性配体之间的疏水缔合。RP-HPLC 纯化通常由一个或多个下面的部分组成：平衡、加载、洗涤、洗脱和再生。

[0003] 传统的 RP-HPLC 是在液相的 pH 低于或高于待纯化目标分子的 pI 下进行的，一些杂质很难被分离。由于存在无法控制产品（即目标肽）沉降的风险，在 pI 下进行洗脱一般不是优选的操作模式。ScienceDirect, Talanta 75 (2008), 第 76-82 页披露了用于分离肽的 pH 梯度。在此通过重复从 2.5 到 10.5 的相同的 pH 梯度，应用了重复 pH 梯度。

[0004] 已经描述了多种制备性反相色谱法。US2009036652 涉及使用制备性反相色谱法纯化蛋白质，W02007071767 涉及使用制备性反相色谱法纯化维生素 K 依赖性多肽，US20060211616 涉及纯化胰高血糖素样肽。

[0005] 然而，需要优化的 RP-HPLC 纯化方法，其中获得好的纯化效果而无需使用包括重复 pH 梯度的粗放方法

发明概述

本发明涉及在 RP-HPLC 系统上将液体混合物中的目标的多肽与至少一种不想要的成分分离的方法，所述方法包括：

- a. 在 RP-HPLC 系统中引入含有目标多肽的混合物，该混合物溶解于流动相，其中该流动相的 pH 值与目标多肽的 pI 值相差至少 1 个单位；
- b. 将流动相的 pH 调节至与目标多肽的 pI 值相差小于 1 个单位的 pH 值，其中调节 pH 通过分段过程或采用 pH 梯度进行；
- c. 洗脱目标多肽从而获得其纯化的组合物 (composition)。

[0006] 本发明的一个方面，在步骤 b 和步骤 c 之间又增加了一个步骤，其中，pH 被再次调节至与待纯化肽或蛋白质的 pI 值相差至少 1 个单位的 pH 值，其中所述的调节通过分段过程或采用 pH 梯度进行。

[0007] 本发明的一个方面，所述方法包括与步骤 b 同时应用有机修饰剂梯度，以在 RP-HPLC 系统上保留目标肽的同时去除不想要的杂质。

附图说明

[0008] 图 1. 制备性分离的 AU₂₈₀ 对时间的色谱图，洗脱在 pH 4.5 下进行；

图 2. 分离的 AU₂₈₀ 对时间的色谱图，洗脱在 pH 5.2 下进行；

图 3. 分离的 AU₂₈₀ 对时间的色谱图，洗脱在 pH 5.5 下进行；

图 4. 在不同的 pH4.5、5.2 和 5.5 下进行实验的重叠的色谱图；

图 5. 分离的 AU₂₈₀ 对时间的色谱图。洗脱如下进行：首先在 pH（从中性至 pI 或接近 pI）和 EtOH 梯度（刚好在目标肽峰出现之前）的组合下进行，然后用从 4.5 到中性的 pH 梯度洗脱。

[0009] 图 6. 分离的 AU₂₈₀ 对时间的 DesB30 人胰岛素色谱图。洗脱如下进行：首先在 pH（从 4.0 提高至 pI 或接近 pI）和 EtOH 梯度（刚好在目标肽峰出现之前）的组合下进行，接下来在 pI 或接近 pI 的 pH 下、然后在从 5.8 到 8.0 的 pH 梯度下分段洗脱。

[0010] 图 7. 分离的 AU₂₈₀ 对时间的 Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-十六酰))) -GLP-1(7-37) 肽的色谱图。洗脱如下进行：首先在 pH（从 pH8.0 降低至 pI 或接近 pI）和 EtOH 梯度（刚好在目标肽峰出现之前）的组合下进行，接下来在 pI 或接近 pI 的 pH 下、然后在从 5.1 到 4.0 的 pH 梯度下分段洗脱。

[0011] 发明描述

本发明涉及用于纯化多肽的制备性反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)，其中至少一个洗脱步骤在或接近目标肽的 pI 值下进行。

[0012] 更特别地，本发明涉及用于纯化含有目标多肽的混合物的制备性 RP-HPLC，所述方法包括以下步骤：

a. 在 RP-HPLC 系统中引入含有目标多肽的混合物，该混合物溶解于流动相，其中该流动相的 pH 值与目标多肽的 pI 值相差至少 1 个单位；

b. 将 RP-HPLC 系统的 pH 调节至与目标多肽的 pI 值相差小于 1 个单位的 pH 值，其中调节 pH 通过分段过程或采用 pH 梯度进行；

c. 洗脱目标多肽从而获得其纯化的组合物。

[0013] 本发明的一个方面，在步骤 b 中使用 pH 梯度来调节 pH。

[0014] 发明人发现：当采用本发明的方法时，获得了从目标肽中分离杂质的出乎意料地好的分离效果。特别是已经可能分离那些由传统的 RP-HPLC 方法难以去除的杂质，例如相关杂质。

[0015] 另外，通过应用本发明的纯化方法，避免了需要达到从至少一种不想要的成分中进行目标多肽的所需分离的复杂纯化方法。

[0016] 本文使用的术语“色谱”是指用于混合物和组分的化学分离的任何方法，其依赖于混合物的组分对固定相的选择性吸引。实例包括吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、尺寸排阻色谱和亲和色谱。

[0017] 本文使用的术语“RP-HPLC”是指反相高效液相色谱或反相高压液相色谱。HPLC 用于基于化合物的极性以及与色谱柱固定相的相互作用来分离化合物。反相色谱是应用在液相色谱中的洗脱过程，在该过程中流动相比固定相显著地具有更高的极性。

[0018] 本文使用的术语“引入液体混合物”是指在流动相液体中引入含有目标多肽和至少一种不想要的成分的混合物。

[0019] 本文使用的术语“pI”是指等电点，是特定的分子（例如多肽）不带净电荷时的 pH。

[0020] 在其 pI 下的蛋白质不具有净电荷，因而水溶性此时最低。因此，增高蛋白质浓度时存在着沉淀的风险。在比 pI 高或低一个 pH 单位的情况下，静电荷显著增加（取决于涉

及的氨基酸,净电荷增加至最大净电荷的 90%),溶解性可设想达到约 10 倍,因此蛋白质不大倾向于沉淀。一般认为在与肽或蛋白质的 pI 值相差约 1.5-2 个单位的 pH 值下可最好地避免沉淀,其中特定的蛋白质结构域以及其它的特点可能影响这些值。

[0021] 本文使用的与目标的多肽的 pI 值相关的术语“单位”是指用作测定 pH 的标准的确定的量值。举例来说,若目标的多肽的 pI 值为 4.5,与该多肽的 pI 值相差一个单位则为 3.5 或 5.5,与该多肽的 pI 值相差 1.5 个单位则为 3.0 或 6.0。

[0022] 本文使用的与色谱(例如 RP-HPLC)相关的术语“制备性”是指经色谱纯化足量的物质(例如多肽)以便以纯化的形式进一步应用。因此制备性色谱法与分析性色谱法相对,分析性色谱法仅用于分析目的。

[0023] 在本发明的一个方面,所述方法中应用 pH 和有机修饰剂梯度的组合作为第一步,于所述肽的 pI 值或接近该 pI 值开始的 pH 梯度用作第二步。按照这样的方面,应用了如下的方法:其中第一步包括与有机修饰剂梯度相结合的 pH 梯度,其中所述 pH 梯度开始于与目标多肽的 pI 值相差至少 1 个单位的 pH 值、并且变至与所述目标多肽的 pI 值相等或接近的 pH,直到一种或多种杂质(其比目标多肽洗脱得要快)由 RP-HPLC 系统洗脱下来,而目标多肽则保留在该系统上;第二步进一步应用 pH 梯度,其中所述 pH 梯度从与所述目标多肽的 pI 值相等或接近的 pH 变为与所述目标多肽的 pI 值相差至少 1 个单位的 pH。发明人发现了通过 pH 和有机修饰剂调节的这种组合达到了特别理想的纯化。

[0024] 本发明的一个方面,在 pH 等于或接近目标多肽的 pI 值的步骤后,在附加的步骤中将流动相的 pH 调节到高于目标多肽的 pI 值至少 1 个单位。发明人发现该附加步骤甚至进一步将不想要的产品沉降最小化。

[0025] 本文使用的术语“流动相”是指引入色谱柱中的溶剂。

[0026] 本发明的一个方面,在至少一个洗脱步骤中使用涉及 pH 和 / 或有机修饰剂浓度的等度洗脱。

[0027] 本文使用的涉及 pH 和 / 或有机修饰剂浓度中使用的术语“等度洗脱”是指在一定条件下的洗脱,在该条件下洗脱组合物中的 pH 和有机修饰剂的浓度在整个过程中分别保持恒定。

[0028] 本发明的一个方面,HPLC 方法在 20°C 或更高的温度下进行。在另一个方面,HPLC 方法在升高的温度下进行,即在高于室温的温度例如在 30°C 和 70°C 之间进行。在另一方面,所述温度在 40°C 和 60°C 之间。在再一个方面,所述温度约 50°C。在一个方面,所述温度约为室温。

[0029] 本发明使用的固定相可以是任何合适的材质,例如取代的硅胶或多聚基质材料。在本发明的一个方面,所述固定相选自具有多至 20 个碳原子(C₂₀)的直链或支链烷基链的硅胶、或者苯基或苯取代的硅胶。在另一个方面,所述固定相是反相(RP)胶(RP gel),即任何可用有机溶剂洗脱的固定相。RP 胶是本领域技术人员所知的,包括例如聚苯乙烯硅胶或聚二乙基苯基硅胶。在另一个方面,所述反相胶是 ODDMS(十八烷基-二甲基甲硅烷基,C₁₈-)取代的硅胶。

[0030] 本文使用的术语“固定相”是指应用于色谱中的固定相,流动相成分对其表现出选择性亲和性。因为这样的亲和性除了吸附以外可采用多种形式(包括尺寸排阻或络合),所以该术语是指吸附液体混合物中组分的固定相、以及在技术上不吸附流动相组分但是通

过在色谱系统中减慢一种组分相对于另一种组分的移动速率而仍然作为吸附剂的固定相。吸附剂（即色谱固定相材料）的非限制性实例为例如取代的二氧化硅，例如 C-4 二氧化硅、C-6 二氧化硅、C-12 二氧化硅、C-18 二氧化硅和基于苯基的二氧化硅，以及多聚材料例如聚苯乙烯。色谱固定相的其它实例是膜、整体材料和过滤器。

[0031] 当使用反相胶作为固定相时，它可以被配体取代。在一个方面，该反相胶被选自下面的配体所取代： C_4 -、 C_6 -、 C_8 -、 C_{12} -、 C_{16} -、 C_{18} -、 C_{20} - 配体。在一个方面，该反相胶被 C18（十八烷基-二甲基甲硅烷基）配体所取代。

[0032] 当固定相为反相胶时，颗粒的直径可为 2-200 μm 。在本发明的一个方面，该反相胶的颗粒直径约为 15 μm 。该反相胶的孔径为 100Å 到 1000Å。在一个方面，该反相胶的孔径为 50Å 到 150Å，例如孔径约为 100Å。

[0033] 当涉及组分或部分时术语“纯化的”表明其相对浓度（组分或部分的重量除以液体混合物中所有组分或部分的重量）至少提高 20%。在一个系列的方面中，相对浓度至少提高 40%、50%、60%、75%、100%、150% 或 200%、300%、400% 或 500%。与其纯化分离的组分的相对浓度（与其纯化分离的组分或部分的重量除以液体混合物中所有组分或部分的重量）下降至少 20%、40%、50%、60%、75%、85%、95%、98% 或 100% 时，也可说组分或部分被纯化了。在另一个系列的方面中，该组分或部分被纯化到相对浓度至少为 50%、65%、75%、85%、90%、97%、98% 或 99%。在一些方面中，当称组分或部分与其它组分或部分“分离”时，可理解为该组分或部分被“纯化”。

[0034] 本文使用的术语“目标多肽”是指任何需要具有纯化形式的肽、多肽或蛋白质。该术语包括合成的、半重组的或重组的肽、多肽以及蛋白质。在一些方面，“目标多肽”是适合于治疗糖尿病的肽、多肽或蛋白质，例如胰岛素肽（例如人胰岛素、胰岛素类似物或胰岛素衍生物）、胰高血糖素样肽、GLP-1 肽（例如人 GLP-1、GLP-1 类似物或 GLP-1 衍生物）或支链淀粉肽。

[0035] 本发明的一个方面，该目标多肽是胰高血糖素样肽，例如 GLP-1、GLP-1 类似物、GLP-1 衍生物、毒蜥外泌素 -4 或毒蜥外泌素 -3。本发明的一个方面，该目标多肽是 GLP-1 类似物或衍生物。本发明的一个方面，该目标多肽是 GLP-1 衍生物。本发明的一个方面，该目标多肽通过重组技术制得。

[0036] 本文使用的术语“杂质”是指出现在含有目标蛋白质的液体混合物中的成分，其不是目标蛋白质并且需要与目标蛋白质分离。该“杂质”可包括宿主细胞蛋白、多肽或肽，重组多肽的其它不想要的形式（例如糖基化形式、脱酰胺形式或氧化形式），以及液体混合物中出现的其它组分。

[0037] 在一些方面，该杂质为重组蛋白。在一些方面，该“杂质”是类似于目标多肽的肽、多肽或蛋白质（本文也称为“相对杂质”），其结构与目标多肽类似，例如所述目标多肽的糖基化形式、脱酰胺形式、截短形式、延伸形式、脱酰胺形式、不正确的折叠形式或氧化形式、具有不想要的糖基化的形式、由外消旋产生的形式、在肽内链（intra-peptide chain）中缺乏氨基酸的形式、在肽内链中具有额外氨基酸的形式、以及在不希望的另一个残基上发生酰化的形式。在一些方面，该相对杂质是类似于目标多肽的具有疏水性的肽、多肽或蛋白质。在一些方面，该相对杂质是与目标多肽类似的具有结构相似性和疏水性的肽、多肽或蛋白质。

[0038] 按照本发明的方法,待纯化液体混合物中“目标多肽”和“不想要的成分”之间的关系可以为例如至少 1:1 例如 2:1,即当液体混合物中存在 1 当量“不想要的成分”时,存在至少 2 当量“目标多肽”。在本发明的一个方面,液体混合物中“目标多肽”和“不想要的成分”之间的关系是至少 4:1,在另一个方面该关系是至少 6:1,在另一个方面该关系是至少 8:1,在另一个方面该关系是至少 9:1,在另一个方面该关系是至少 14:1,在另一个方面该关系是至少 19:1,在另一个方面该关系是至少 20:1,在另一个方面该关系是至少 50:1,在又一个方面该关系是至少 90:1。

[0039] 本文使用的术语“约 (about)”或“接近、大约 (approximately)”是指所给出数值的合理的接近,例如加或减 10%,或对于 pH 值为加或减 0.2。

[0040] 本文使用的术语“胰高血糖素样肽”是指胰高血糖素家族的肽、毒蜥外泌素 (exendin) 及其类似物和衍生物。胰高血糖素家族的肽由前胰高血糖素原基因编码,包括 3 种具有高度同源性的短肽,即胰高血糖素 (1-29)、GLP-1 (1-37) 和 GLP-2 (1-33)。毒蜥外泌素是表达于蜥蜴的肽且与 GLP-1 相似,为促胰岛素的。毒蜥外泌素的实例有毒蜥外泌素 -3 和毒蜥外泌素 -4。

[0041] 本文使用的术语“类似物”是指修饰的胰高血糖素样肽,其中该胰高血糖素样肽的一个或多个氨基酸残基被另外的氨基酸残基所取代,和 / 或一个或多个氨基酸残基从胰高血糖素样肽上缺失,和 / 或一个或多个氨基酸残基添加在胰高血糖素样肽上。这样的氨基酸残基的添加或缺失可发生在例如胰高血糖素样肽的 N-末端和 / 或该肽的 C-末端。采用简单的系统来描述类似物:例如 Arg³⁴-GLP-1 (7-37) 表示 GLP-1 (7-37) 的类似物,其中在 34 位上天然存在的赖氨酸被精氨酸取代。如果没有另外指出光学异构体,则术语“氨基酸”任何时候使用都应理解为表示 L 异构体。

[0042] 术语“氨基酸”包括蛋白质来源的氨基酸 (由遗传密码编码,包括天然氨基酸和标准氨基酸),和非蛋白质来源的 (未在蛋白质中发现的,和 / 或没有在标准遗传密码中编码的) 氨基酸,以及合成氨基酸。因此,所述氨基酸可选自蛋白质来源的氨基酸、非蛋白质来源的氨基酸和合成氨基酸。

[0043] 不由遗传密码编码的氨基酸的非限制性实例为 γ -羧基谷氨酸盐、鸟氨酸和磷酸丝氨酸。合成氨基酸的非限制性实例为氨基酸的 D 异构体,例如 D-丙氨酸和 D-亮氨酸、Aib (α -氨基异丁酸)、 β -丙氨酸和脱氨基组氨酸 (desH, 或者称为咪唑并丙酸,也缩写为 Imp)。

[0044] 同样地,按照 IUPAC-IUB 命名法使用氨基酸的标准单字母缩写。

[0045] 在一个方面,本发明的类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括多至 17 个修饰 (取代、缺失、添加)。在一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 16 个修饰 (取代、缺失、添加)。在一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 15 个修饰 (取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 14 个修饰 (取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 13 个修饰 (取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 12 个修饰 (取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 11 个修饰 (取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 10 个修饰 (取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 9 个修饰 (取代、缺

失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 8 个修饰(取代、缺失、添加)。在一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 7 个修饰(取代、缺失、添加)。在一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 6 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 5 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 4 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 3 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个方面,类似物相对于胰高血糖素样蛋白包括少于 2 个修饰(取代、缺失、添加)。

[0046] 本文使用的术语“亲脂性修饰的肽”是指含有共价连接于所述肽的一个或多个氨基酸的一个或多个亲脂性基团(例如亲脂性侧链)的肽。本发明的一个方面,亲脂性基团为亲脂性侧链。亲脂性修饰的肽可通过任何合适的方法来制备,例如通过缀合化学(例如烷基化、酰化、酯形成、酰胺形成或马来酰亚胺偶联)来连接亲脂性基团。本发明的一个方面,本发明的亲脂性修饰的肽相对于未经亲脂性修饰的相同的肽具有基本相同的活性。

[0047] 在一个方面,本发明的药学组合物中所含有的亲脂性修饰的肽为 GLP-1 激动剂,该激动剂包含通过肽键连接的至少 5 个成分氨基酸和所连接的酰基。

[0048] 本文使用的术语“GLP-1 激动剂”是指任何亲脂性修饰的胰高血糖素样肽,其完全或部分激活人 GLP-1 受体。在优选的方面,该“GLP-1 激动剂”是任何结合 GLP-1 受体的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽,优选具有由本领域已知的方法(参见例如 WO 98/08871)所测得的低于 $1 \mu\text{M}$ (例如低于 100nM)的亲和常数(KD)或效价(EC_{50}),并且表现出促胰岛素活性,其中促胰岛素活性可由本领域一般技术人员所知的体内或体外测定所检测。举例来说,该 GLP-1 激动剂可给予动物并且随时间的流逝检测胰岛素的浓度。

[0049] 在一个方面,本发明的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽被酰化(即其具有连接的酰基)作为亲脂性修饰。

[0050] 酰基(IUPAC 名称为 alkanoyl(烷酰基))是从酮酸去除一个或多个羟基所得到的官能团。在有机化学中,酰基通常由 RCOOH 形式的羧酸衍生。因此其具有 $\text{RC}(=\text{O})-$ 的结构式,在碳原子和氧原子之间具有双键(即羰基),在 R 和碳之间具有单键。酰基也可由其它类型的酸例如磺酸、磷酸和其它酸衍生。

[0051] 在本发明的酰化修饰的胰高血糖素样肽中,酰基含有官能团,该官能团可连接于母体胰高血糖素样肽的氨基酸的一个下述的官能团:

- (a) 连接到 N-末端氨基酸 α -碳的氨基,
- (b) 连接到 C-末端氨基酸 α -碳的羧基,
- (c) 任何赖氨酸残基的 ϵ -氨基,
- (d) 任何天冬氨酸和谷氨酸残基的 R 基的羧基,
- (e) 任何酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基的 R 基的羟基,
- (f) 任何色氨酸、天门冬酰胺、谷酰胺、精氨酸和组氨酸残基的 R 基的氨基,或
- (g) 任何半胱氨酸残基的 R 基的巯基。

[0052] 在一个方面,酰基连接到 R 基的羧基,即任何天冬氨酸和谷氨酸残基的侧链。在另一个方面,酰基连接到与 C-末端氨基酸的 α -碳连接的羧基上。在又一个方面,酰基连接到任何赖氨酸残基的 ϵ -氨基上。

[0053] 本发明的一个方面, 酰基借助间隔区连接到母体胰高血糖素样肽。间隔区必须含有至少两个官能团, 一个连接到酰基的官能团上, 另一个连接到母体胰高血糖素样肽的官能团上。

[0054] 在一个方面, 酰基是直链或支链脂肪酸。在一个方面, 酰基具有 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 的结构式, 其中 n 为 4-38 的整数, 例如 12-38 的整数。在一个方面, 酰基选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。在另一个方面, 酰基为十四烷酰基。在又一个方面, 酰基为十六烷酰基。

[0055] 在本发明的另外方面, 酰基具有带负电荷的基团, 例如羧酸基团。举例来说, 酰基可以是式 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ 的直链或支链的烷烃 α, ω -二羧酸, 其中 m 是 4-38 的整数, 例如 12-38 的整数。在一个方面, 酰基选自 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 或 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。

[0056] 在一个方面, 间隔区是二肽 (例如 Gly-Lys) 或是除了 Cys 或 Met 的氨基酸残基。就本发明而言, 短语“例如 Gly-Lys 的二肽”是指除了 Cys 或 Met 之外的任何两个氨基酸的组合, 在一个方面, 二肽的 C-末端氨基酸残基是 Lys、His 或 Trp (例如 Lys), N-末端氨基酸残基是 Ala、Arg、Asp、Asn、Gly、Glu、Gln、Ile、Leu、Val、Phe、Pro、Ser、Tyr、Thr、Lys、His 和 Trp。在一个方面, 母体肽的氨基与氨基酸残基或二肽间隔区的羧基形成了酰胺键, 氨基酸残基或二肽间隔区的氨基与酰基的羧基形成酰胺键。

[0057] 本发明间隔区的实例包括赖氨酰、谷氨酰、天冬酰胺酰、甘氨酰、 β -丙氨酰和 γ -氨基丁酰, 它们中的每个都构成独立的方面。在一个方面, 间隔区是谷氨酰和 β -丙氨酰。当间隔区是 Lys、Glu 或 Asp 时, 其羧基可与氨基酸残基的氨基形成酰胺键, 其氨基可与酰基的羧基形成酰胺键。当 Lys 用作间隔区时, 在一些例子中可在 Lys 的 ϵ -氨基和酰基之间插入另外的间隔区。在一个方面, 这样的另外的间隔区是琥珀酸, 其与 Lys 的 ϵ -氨基和酰基中存在的氨基形成酰胺键。在另一方面, 这样的另外的间隔区是 Glu 或 Asp, 其与 Lys 的 ϵ -氨基形成酰胺键, 与酰基中的羧基形成另一个酰胺键, 换句话说, 该酰基是 N^ϵ -酰化的赖氨酸残基。

[0058] 在另一个方面, 该间隔区是具有 1-7 个亚甲基的无支链的烷烃 α, ω -二羧酸基团, 该间隔区在母体肽的氨基和取代基的氨基之间形成桥。在一个方面, 该间隔区是琥珀酸。

[0059] 在又一个方面, 具有连接的间隔区的酰基是式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_p\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_q\text{CO}-$ 的基团, 其中 p 是 8-33 的整数, 或者 12-28 的整数, 且 q 是 1-6 的整数, 或者是 2。

[0060] 在又一个方面, 具有连接的间隔区的酰基是式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 的基团, 其中 r 是 4-24 的整数, 例如 10-24 的整数。

[0061] 在又一个方面, 具有连接的间隔区的酰基是式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_s\text{CO}-\text{NHCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{CO}-$ 的基团, 其中 s 是 4-24 的整数, 例如 10-24 的整数。

[0062] 在又一个方面, 该酰基是式 $\text{COOH}(\text{CH}_2)_t\text{CO}-$ 的基团, 其中 t 是 6-24 的整数。

[0063] 在又一个方面, 具有连接的间隔区的酰基是式 $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_u\text{CH}_3$ 的基团, 其中 u 是 8-18 的整数

在又一个方面, 具有连接的间隔区的酰基是式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_v\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_z-\text{CO}$ 的基团, 其中 v 是 4-24 的整数且 z 是 1-6 的整数。

[0064] 在又一个方面,具有连接的间隔区的酰基是式 $\text{-NHCH(COOH)(CH}_2)_4\text{NH-COCH((CH}_2)_2\text{COOH)NH-CO(CH}_2)_w\text{CH}_3$ 的基团,其中 w 是 10-16 的整数。

[0065] 在又一个方面,具有连接的间隔区的酰基是式 $\text{-NHCH(COOH)(CH}_2)_4\text{NH-CO(CH}_2)_2\text{CH(COOH)NHC(O)(CH}_2)_x\text{CH}_3$ 的基团,其中 x 是 0 或 1-22 的整数,例如 10-16 的整数。

[0066] 本发明还提供亲脂性修饰的胰高血糖素样肽,其中所述胰高血糖素样肽是 GLP-1(7-37) 类似物,其选自 $\text{Arg}^{34}\text{GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^{8,22,35}\text{GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^{8,35}\text{GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^{8,22}\text{GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^{8,22,35}\text{Lys}^{37}\text{GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^{8,35}\text{Lys}^{37}\text{GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Aib}^8\text{Arg}^{34}\text{GLP-1(7-37)}$ 和 $\text{Aib}^{8,22}\text{Lys}^{37}\text{GLP-1(7-38)}$ 、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1(7-37)}$ 酰胺、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Arg}^{34}]\text{GLP-1-(7-37)}$ 、 $[\text{Aib}^8, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1-(7-37)}$ 酰胺、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Phe(m-CF}_3)_2^8]\text{GLP-1-(7-37)}$ 酰胺、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}]\text{GLP-1-(7-37)-Lys}$ 、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}]\text{GLP-1-(7-37)-Lys}$ 、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1-(7-37)}$ 酰胺、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1-(7-37)}$ 酰胺、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1-(7-37)}$ 、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1-(7-37)}$ 、 $[\text{脱氨基 His}^7, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Glu}^{30}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1-(7-37)}$ 、 $[\text{Aib}^8, \text{Glu}^{22}, \text{Arg}^{26}, \text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{37}]\text{GLP-1-(7-37)-Lys}$ 和 $\text{Gly}^8\text{-GLP-1(7-36)}$,其中所述 GLP-1 类似物是被酰化的。

[0067] 在另外的方面,本文使用的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽是指酰化的 GLP-1(7-37) 及其促胰岛素类似物。GLP-1 类似物以及酰化 GLP-1 类似物的非限制性实例是 GLP-1(7-36) 酰胺、 $\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Gly}^8\text{-GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Val}^8\text{-GLP-1(7-36)-}$ 酰胺、 $\text{Val}^8\text{Asp}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{脱氨基-His}^7, \text{Arg}^{26}, \text{Lys}^{34}(\text{N}^\epsilon\text{-}(\gamma\text{-Glu}(\text{N}^\alpha\text{-十六烷酰基})))\text{-GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{脱氨基-His}^7, \text{Arg}^{26}, \text{Lys}^{34}(\text{N}^\epsilon\text{-辛酰基})\text{-GLP-1(7-37)}$ 、 $\text{Arg}^{26,34}, \text{Lys}^{38}(\text{N}^\epsilon\text{-}(\omega\text{-羧基十五烷酰基}))\text{-GLP-1(7-38)}$ 、 $\text{Arg}^{26,34}, \text{Lys}^{36}(\text{N}^\epsilon\text{-}(\gamma\text{-Glu}(\text{N}^\alpha\text{-十六烷酰基})))\text{-GLP-1(7-36)}$ 和 $\text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-}(\gamma\text{-Glu}(\text{N}^\alpha\text{-十六烷酰基})))\text{-GLP-1(7-37)}$ 。

[0068] 在一个方面,本发明的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽是二肽基氨基肽酶 IV 防护的。本文使用的术语“二肽基氨基肽酶 IV 防护的”是指化合物(例如酰化的 GLP-1 类似物)对二肽基氨基肽酶 IV(DPP-IV)较天然化合物(例如 GLP-1(7-37))具有更高的抵抗性。亲脂性修饰的胰高血糖素样肽对二肽基氨基肽酶 IV 降解的抵抗性由下述的降解测试方法所检测。

[0069] 在 37°C、100 μl 的 0.1M 的三乙胺-HCl 缓冲液, pH 7.4 中,将亲脂性修饰的胰高血糖素样肽等分样(5nmol)与 1 μl 纯化的二肽基氨基肽酶 IV(相应的酶活性为 5mU)孵育 10-180 分钟。通过加入 5 μl 的 10% 的三氟乙酸终止酶反应,分离肽降解产物并使用 HPLC 对其进行定量。进行该分析的一个方法中,将该混合物加载在 Vydac C18 宽孔(30nm 的孔,5 μm 的颗粒) 250x4.6mm 柱(C₁₈-取代的(十八烷基-二甲基甲硅烷基)二氧化硅树脂)上,按照 Siegel 等 [Regul. Pept. (1999) 79:93-102] 和 Mentlein 等 [Eur. J. Biochem. (1993) 214:829-35] 的描述,采用在 0.1% 三氟乙酸中的乙腈的线性分段梯度(0% 乙腈 3min、0-24% 乙腈 17min、24-48% 乙腈 1min)进行洗脱,流速为 1ml/min。通过 220nm(肽键)或 280nm(芳香氨基酸)的吸光度来监测肽以及其降解产物,并通过相对于标准的峰

区的峰区积分来进行定量。评估了在孵育期的被二肽基氨基肽酶 IV 水解的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽的水解率,结果显示低于 10% 的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽被水解。

[0070] 在另外的方面,本发明的药物组合物所含有的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽是亲脂性修饰的 GLP-2 或其类似物。当本发明的药物组合物所含有的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽是亲脂性修饰的 GLP-2 或其类似物时,亲脂性修饰的 GLP-2 或其类似物的浓度为约 1mg/ml- 约 100mg/ml,优选浓度为 1mg/ml- 约 10mg/ml。

[0071] 在另外的方面,亲脂性修饰的胰高血糖素样肽是亲脂性修饰的毒蜥外泌素 -4 或亲脂性修饰的毒蜥外泌素 -3 或其类似物。本发明所包括的毒蜥外泌素及其类似物的实例是 WO 97/46584、US 5424286 和 WO 01/04156 中披露的毒蜥外泌素及其类似物。US 5424286 描述了用毒蜥外泌素肽刺激胰岛素释放的方法。WO 97/46584 描述了截短形式的毒蜥外泌素肽。这些披露的肽提高胰岛素的分泌和生物合成,但降低胰高血糖素的分泌和生物合成。WO 01/04156 描述了毒蜥外泌素 -4 类似物和衍生物以及这些分子的制备。

[0072] 这里使用的术语“毒蜥外泌素 -4 肽”是指毒蜥外泌素 -4(1-39)、毒蜥外泌素 -4(1-39) 类似物、毒蜥外泌素 -4(1-39) 衍生物或毒蜥外泌素 -4(1-39) 类似物的衍生物、其促胰岛素片段、其促胰岛素类似物以及其促胰岛素衍生物。毒蜥外泌素 -4 的促胰岛素片段是完整序列可在毒蜥外泌素 -4 中发现的促胰岛素肽,并且其缺失至少一个末端氨基酸。毒蜥外泌素 -4(1-39) 的促胰岛素片段的实例为毒蜥外泌素 -4(1-38) 和毒蜥外泌素 -4(1-31)。

[0073] 可通过本领域已知的体内或体外测定方法来检测化合物的促胰岛素活性。举例来说,可将该化合物给予动物并监测随时间流逝的胰岛素的浓度。毒蜥外泌素 -4(1-39) 的促胰岛素类似物是指其中一个或多个氨基酸残基被另外的氨基酸残基所取代和 / 或一个或多个氨基酸残基缺失和 / 或一个或多个氨基酸残基添加的相应分子,条件是该类似物是促胰岛素的或者是促胰岛素化合物的药物前体。毒蜥外泌素 -4(1-39) 的促胰岛素类似物的实例为 Ser²Asp³-毒蜥外泌素 -4(1-39),其中 2 位和 3 位的氨基酸残基分别被丝氨酸和天冬氨酸取代(这种特定的类似物在本领域中也称为毒蜥外泌素 -3)。毒蜥外泌素 -4(1-39) 及其类似物的促胰岛素衍生物是本领域技术人员所认为的这些肽的衍生物,即具有至少一个在母体肽分子中不存在的取代基的衍生物,条件是所述的类似物是促胰岛素的或者是促胰岛素化合物的药物前体。取代基的实例是酰胺、糖类、烷基、酯和亲脂性取代基。因此毒蜥外泌素 -4(1-39) 及其类似物的促胰岛素衍生物的实例为 Tyr³¹-毒蜥外泌素 -4(1-31)-酰胺。

[0074] 这里使用的术语“稳定的毒蜥外泌素 -4 化合物”是指化学修饰的毒蜥外泌素 -4(1-39),即酰化的毒蜥外泌素 -3 或酰化的毒蜥外泌素 -4 类似物,经常规方法检测,其表现出在人体中至少 10 小时的体内血浆排除半寿期。

[0075] 在一个方面,本发明的亲脂性修饰的胰高血糖素样肽是促胰岛素的。本文使用涉及亲脂性修饰的胰高血糖素样肽的术语“促胰岛素的”是指应答于升高的血糖水平的刺激胰岛素分泌的能力。促胰岛素的肽和化合物是 GLP-1 受体激动剂。化合物的促胰岛素活性可通过本领域已知的体内或体外的测定方法来检测。可采用下面的体外测定方法来检测化合物(例如肽)的促胰岛素性质。在下面的测定中,优选促胰岛素的化合物表现出小于 5nM 的 EC₅₀ 值,更优选 EC₅₀ 值小于 500pM。

[0076] 让表达克隆的人 GLP-1 受体的幼仓鼠肾细胞 (BHK) (BHK 467-12A) 生长在添加 100IU/ml 青霉素、100 μ l/ml 链霉素、10% 胎牛血清和 1mg/ml 遗传霉素 G-418 (Life Technologies) 的 DMEM 培养基上。在缓冲液 (10mM Tris-HCl、30mM NaCl 和 1mM 二硫苏糖醇, pH 7.4, 另外含有 5mg/ml 亮肽酶素 (leupeptin, Sigma)、5mg/l 抑肽素 (pepstatin, Sigma)、100mg/l 杆菌肽 (bacitracin, Sigma) 和 16mg/l 抑肽酶 (aprotinin, Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)) 中进行匀浆化制备质膜。将匀浆置于 41%w/w 蔗糖层的顶部进行离心。位于两层之间的白色条带经缓冲液稀释后离心。质膜在 -80°C 下储存备用。

[0077] 通过检测作为对促胰岛素肽或促胰岛素化合物刺激的应答的 cAMP 来进行功能受体测定。孵育在总体积 140ml 的 96 孔微量滴定板上进行, 并具有下面的终浓度: 50mM Tris-HCl、1mM EGTA、1.5mM MgSO₄、1.7mM ATP、20mM GTP、2mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、0.01%w/v Tween-20、pH 7.4。化合物用缓冲液溶解并稀释。新鲜制备 GTP 用于每个实验: 在每个孔内加入 2.5 μ g 的膜, 混合物在室温、暗处、摇动下孵育 90min。加入 25ml、0.5M 的 HCl 终止反应。形成的 cAMP 经邻近闪烁分析 (RPA 542, Amersham, UK) 来检测。绘制该化合物的剂量反应曲线并使用 GraphPad Prism 软件计算 EC₅₀ 值。

[0078] 现有技术中熟知多肽和肽 (例如待进行亲脂性修饰的胰高血糖素样肽) 的制备。举例来说, 多肽或肽可通过经典的肽合成制得, 例如使用 t-Boc 或 Fmoc 化学的固相肽合成或者其它成熟的技术, 参见例如 Greene 和 Wuts [Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons (1999)]。多肽和肽还可通过下面的方法获得, 该方法包括在允许表达该肽的条件下在合适的营养培养基中培养含有编码该肽或多肽并且能够表达该肽或多肽的 DNA 序列的宿主细胞。对于含有非天然氨基酸残基的肽或多肽来说, 重组细胞应该经过修饰, 使得这样该非天然氨基酸例如通过使用 tRNA 突变体被加入该肽或多肽中。

[0079] 本文使用的术语“利拉糖肽 (liraglutide)”用于胰高血糖素样肽 (GLP-1) 衍生物—Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ -Glu(N^α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)。

[0080] 本发明进一步概括为下面的内容:

1. 在 RP-HPLC 系统上将液体混合物中的目标多肽与至少一种不想要的成分分离的方法, 所述方法包括:

a. 在 RP-HPLC 系统中引入含有目标多肽的混合物, 该混合物溶解于流动相, 其中该流动相的 pH 值与目标多肽的 pI 值相差至少 1 个单位;

b. 将流动相的 pH 调节至与目标多肽的 pI 值相差小于 1 个单位的 pH 值, 其中调节 pH 通过分段过程或采用 pH 梯度进行;

c. 洗脱目标多肽从而获得其纯化的组合物。

[0081] 2. 按照方面 1 的方法, 其中还在步骤 b 和步骤 c 之间增加一个步骤, 其中, 再次将 pH 调节至与待纯化的肽或蛋白质的 pI 值相差至少 1 个单位的 pH 值, 其中所述调节通过分段过程或采用 pH 梯度进行。

[0082] 3. 按照方面 1 或 2 所述的方法, 其中步骤 a 中的 pH 值与待纯化的肽或蛋白质的 pI 值相差至少 1.5 个单位。

[0083] 4. 按照前述任一方面所述的方法, 其中步骤 a 中的 pH 值与待纯化的肽或蛋白质

的 pI 值相差至少 2 个单位。

[0084] 5. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值与待纯化的肽或蛋白质的 pI 值相差至少 2.5 个单位。

[0085] 6. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值高于待纯化的肽或蛋白质的 pI 值。

[0086] 7. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为 5.5-9.0。

[0087] 8. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为 6.0-8.5。

[0088] 9. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为 7.0-8.0。

[0089] 10. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为 7.0-9.0。

[0090] 11. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为大约 8.0。

[0091] 12. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为 2.5-5.0。

[0092] 13. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为 2.5-4.0。

[0093] 14. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 a 中的 pH 值为 2.5-3.5。

[0094] 15. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值与待纯化的肽或蛋白质的 pI 值相差小于 0.8 个单位。

[0095] 16. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值与待纯化的肽或蛋白质的 pI 值相差小于 0.6 个单位。

[0096] 17. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值与待纯化的肽或蛋白质的 pI 值相差小于 0.5 个单位。

[0097] 18. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值高于待纯化的肽或蛋白质的 pI 值。

[0098] 19. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值为 3.5-5.5。

[0099] 20. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值为 4.0-5.5。

[0100] 21. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值为 4.5-5.2。

[0101] 22. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值为 4.5-7.0。

[0102] 23. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值为 4.8-6.5。

[0103] 24. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中的 pH 值为 5.0-6.0。

[0104] 25. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b 中采用 pH 梯度来调节流动相的 pH。

[0105] 26. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述方法包括与步骤 b 同时应用有机修饰剂梯度以去除不想要的杂质,同时在 RP-HPLC 系统中保留目标肽。

[0106] 27. 按照方面 26 所述的方法,其中步骤 b 中的有机修饰剂梯度从约 25%-约 48%,且 pH 梯度从 pH 7.4-4.5。

[0107] 28. 按照前述任一方面所述的方法,其中步骤 b) 中的 pH 梯度从约 7.4 至约 4.5。

[0108] 29. 按照前述任一方面所述的方法,其中将所述反相胶上的温度升高。

[0109] 30. 按照前述方面 1-28 所述的方法,其中所述反相胶上的温度为 20-70°C。

[0110] 31. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述反相胶上的温度升高为 40-60°C。

[0111] 32. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述反相胶上的温度升高为约 50°C。

[0112] 33. 按照前述方面 1-28 中任一个所述的方法,其中所述反相胶上的温度约为室

温。

[0113] 34. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述在 RP HPLC 系统中使用的吸收剂选自下面的组:取代的二氧化硅例如 C-4 二氧化硅、C-6 二氧化硅、C-12 二氧化硅、C-18 二氧化硅和基于苯基的二氧化硅,聚合体材料例如聚苯乙烯、膜、整体材料和过滤器。

[0114] 35. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述在 RP HPLC 系统中使用的吸收剂是被 C18 (十八烷基-二甲基甲硅烷基)配体取代的凝胶体,其具有约 15 μm 的颗粒且孔径约 100Å。

[0115] 36. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述肽或蛋白质选自 GLP-1 肽、毒蜥外泌素肽或 GLP-1 衍生物。

[0116] 37. 按照方面 26 和 27 所述的方法,其中所述有机修饰剂选自乙醇、甲醇、丙醇和乙腈。

[0117] 38. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽是适于治疗糖尿病的多肽。

[0118] 39. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽是胰高血糖素样肽或 GLP-1 激动剂。

[0119] 40. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽是 GLP-1 (1-37) 或其类似物或衍生物。

[0120] 41. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述 GLP-1 (1-37) 或其类似物或衍生物是重组得到的。

[0121] 42. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述至少一种不想要的成分是所述多肽的其它形式,例如是所述多肽的糖基化形式、脱酰胺形式或氧化形式。

[0122] 43. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽与所述至少一种不想要的成分的关系为至少 4:1。

[0123] 44. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽与所述至少一种不想要的成分的关系为至少 10:1。

[0124] 45. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽与所述至少一种不想要的成分的关系为至少 20:1。

[0125] 46. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽与所述至少一种不想要的成分的关系为至少 50:1。

[0126] 47. 按照前述任一方面所述的方法,其中所述目标多肽与所述至少一种不想要的成分的关系为至少 80:1。

实施例

[0127] 实施例 1

用 RP HPLC 方法纯化 N- ϵ ²⁶-[2-(-2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib⁸,Arg³⁴] GLP-1(7-37) 肽

合成制备了 N- ϵ ²⁶-[2-(-2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib⁸,Arg³⁴]

10mmol/kg 的柠檬酸缓冲液,50mmol/kg 的 NaCl 和 25%w/w 的乙醇, pH 5.5 平衡。色谱柱经 60ml 平衡溶液洗涤,用 400ml 38-43%w/w 乙醇的线性梯度(10mmol/kg 的柠檬酸缓冲液,50mmol/kg 的 NaCl)洗脱。色谱温度保持在 50℃。

[0132] 制备性纯化的色谱图如图 3 所示。从该色谱图中可以看到杂质 2 与目标肽峰分离。杂质 2 相对于目标肽的相对保留体积约为 0.96。结果表明:在在或接近 pI 值的 pH 获得了杂质 2 与目标肽的最佳分离。在 pH 高于 5.5 时则没有观察到杂质 2 与目标肽的分离(图未显示)。

[0133] 实施例 4

RP HPLC 法纯化 N- ϵ ²⁶-[2-(-2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1(7-37) 肽

合成制备了 N- ϵ ²⁶-[2-(-2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1(7-37) 肽。该酰化的混合物首先经传统的离子交换进行纯化,然后得到的含有 N- ϵ ²⁶-[2-(-2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1(7-37) 肽和相关杂质的合并物经水稀释。在 20ml C₁₈-取代的(二甲基甲硅烷基)二氧化硅脂(颗粒尺寸:15 μm)上装入 10ml 该液体混合物(4.5mg/ml),该二氧化硅树脂经约 40ml 的 10mmol/kg 的柠檬酸缓冲液,125mmol/kg 的 NaCl 和 25%w/w 的乙醇, pH 7.4 平衡。色谱柱经 60ml 的 25-48%w/w 乙醇的线性梯度(10mmol/kg 的柠檬酸缓冲液,125mmol/kg 的 NaCl, pH 4.5)洗涤,然后经 48%w/w 的 EtOH 和 pH 4.5 的等度洗涤液 40ml(10mmol/kg 的柠檬酸缓冲液,50mmol/kg 的 NaCl)。然后目标多肽经 300ml 的 pH 4.5 至 7.4(10mmol/kg 柠檬酸缓冲液,125mmol/kg NaCl, EtOH 48%w/w)的线性 pH 梯度洗脱。色谱温度保持在 50℃。

[0134] 制备性纯化的色谱图如图 5 所示。从该色谱图中可以看到杂质 2 与目标肽峰分离。杂质 2 相对于目标肽的相对保留体积约为 0.96-0.97,在用开始于 pI 值的 pH 梯度获得了杂质 2 与目标肽的满意的分离。

[0135] 实施例 5

RP HPLC 法纯化胰岛素 ASPART

通过 ALP 酶切人胰岛素 aspart 前体制得了人胰岛素 aspart desB 30,人胰岛素 aspart 前体由酵母发酵得到。将含有胰岛素 aspart desB 30 以及相关杂质的 0.52g 晶体溶解于 40ml 的 20mmol/kg 柠檬酸缓冲液、16%w/w 乙醇, pH 4.0 中,并将 pH 调节至约 3.7 以溶解 desB30。在 20ml C₁₈-取代的(十八烷基-二甲基甲硅烷基)二氧化硅树脂(颗粒尺寸:15 μm)上装入 20ml 液体混合物(11mg/ml),该二氧化硅树脂经约 60ml 的 20mmol/kg 柠檬酸缓冲液、16%w/w 的乙醇, pH 4.0 平衡。色谱柱经 20ml 平衡溶液洗涤,经 200ml 的 16-29%w/w 乙醇的线性梯度(20mmol/kg 柠檬酸缓冲液, pH 5.8)洗脱,然后经 29%w/w 的 EtOH 且 pH 5.8 的等度洗涤液 40ml(20mmol/kg 的柠檬酸缓冲液, pH 5.8)。然后目标人胰岛素 desB30 经 pH 5.8-8.0(20mmol/kg Tris 缓冲液, EtOH 29%w/w, pH 8.0)的 200ml 线性 pH 梯度洗脱。色谱温度保持室温。

[0136] 制备性纯化的色谱图如图 6 所示。从该色谱图中可以观察到杂质峰刚好在目标肽

峰之前被洗脱。

[0137] 实施例 6

RP HPLC 法纯化棕榈酰基- γ -Glu-Lys²⁶-Arg³⁴ GLP-1(7-37) 肽

通过酵母发酵制得棕榈酰基- γ -Glu-Lys²⁶-Arg³⁴ GLP-1(7-37) 肽。含有棕榈酰基- γ -Glu-Lys²⁶-Arg³⁴ GLP-1(7-37) 肽和相关杂质的酰化混合物经水稀释。在 20ml C₁₈-取代的(十八烷基-二甲基甲硅烷基)二氧化硅树脂(颗粒尺寸:15 μ m)上装入 36ml 液体混合物(4mg/ml),该二氧化硅树脂经约 60ml 的 20mmol/kg 的 Tris 缓冲液,20%w/w 的乙醇,pH 7.5 平衡。色谱柱经 20ml 平衡溶液洗涤,并经 200ml 的 20-50%w/w 乙醇的线性梯度(20mmol/kg 柠檬酸缓冲液,pH 5.1)洗脱,然后经 50%w/w 的 EtOH 且 pH 5.1 的等度洗涤液 40ml (20mmol/kg 柠檬酸缓冲液,pH 5.1)。然后目标棕榈酰基- γ -Glu-Lys²⁶-Arg³⁴ GLP-1(7-37) 肽经 200ml 的 pH 5.1-4.0 (20mmol/kg 柠檬酸缓冲液,EtOH 50% w/w, pH 4.0) 的线性 pH 梯度洗脱。色谱温度维持在 60°C。

[0138] 制备性纯化的色谱图如图 7 所示。从该色谱图中可以观察到杂质峰与目标肽峰分离。

[0139] 本文所引述的所有的参考文献,包括出版物、专利申请和专利通过全文参照加入本说明书中,并且以每篇参考文献被独立和特定地表明用于参照加入并且以其全文被提出的相同程度(法律所允许的最大程度)加入本说明书中。

[0140] 本文使用的所有标题和副标题仅为了方便的目的,不应解释为任何对本发明的限制。

[0141] 除非另有说明,否则本文使用任何的以及所有的实例或示例性的语言(例如“例如”),其目的仅用于更好地阐释本发明而不是对本发明的范围做出限制。说明书中的语言不应被解释为表明任何未要求保护的要素对本发明的实现是必要的。

[0142] 本文对专利文件的引述和加入仅仅为方便的目的,并不反映对这些专利文件有效性、可专利性和/或可实施性的任何观点。

[0143] 本发明包括对随附的权利要求书中记载的主题的、被适用的法律所允许的所有修改和等同物。

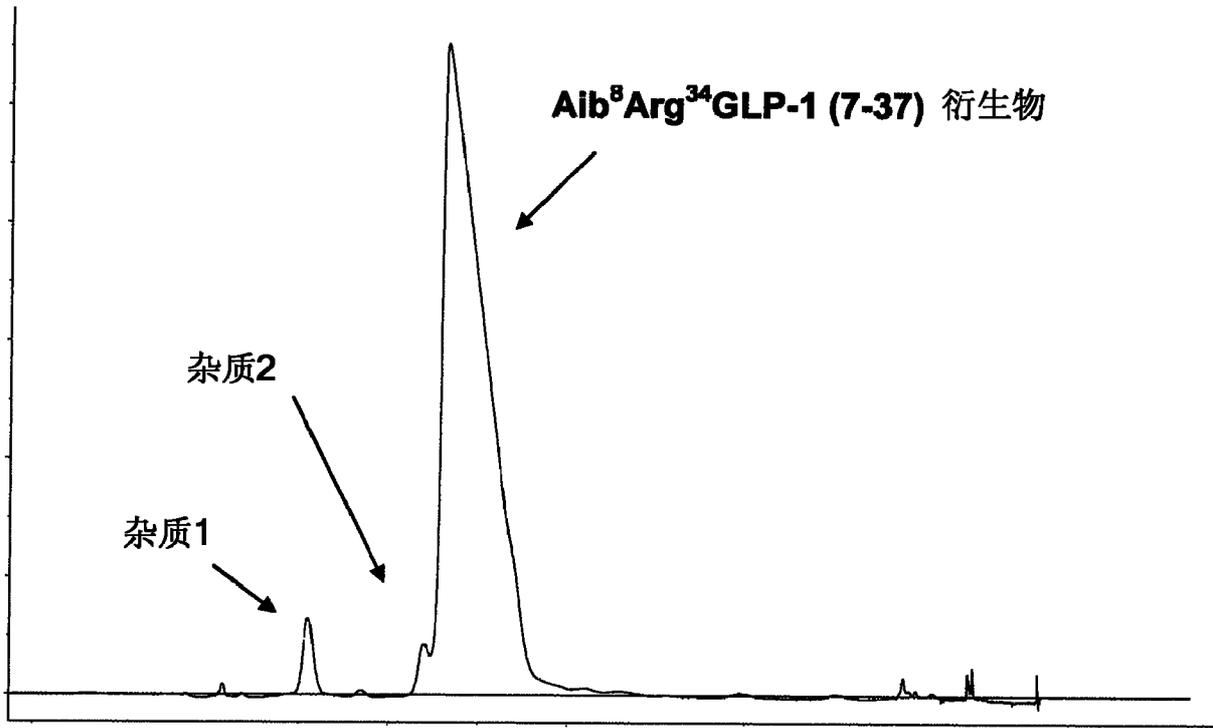


图 1

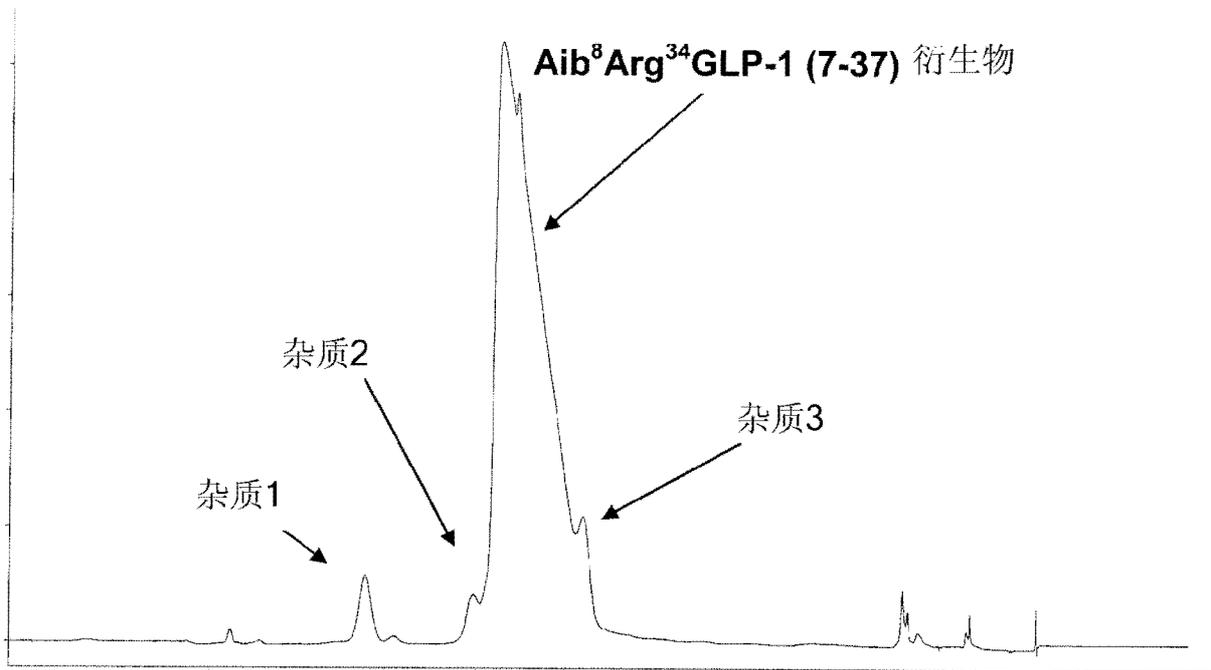


图 2

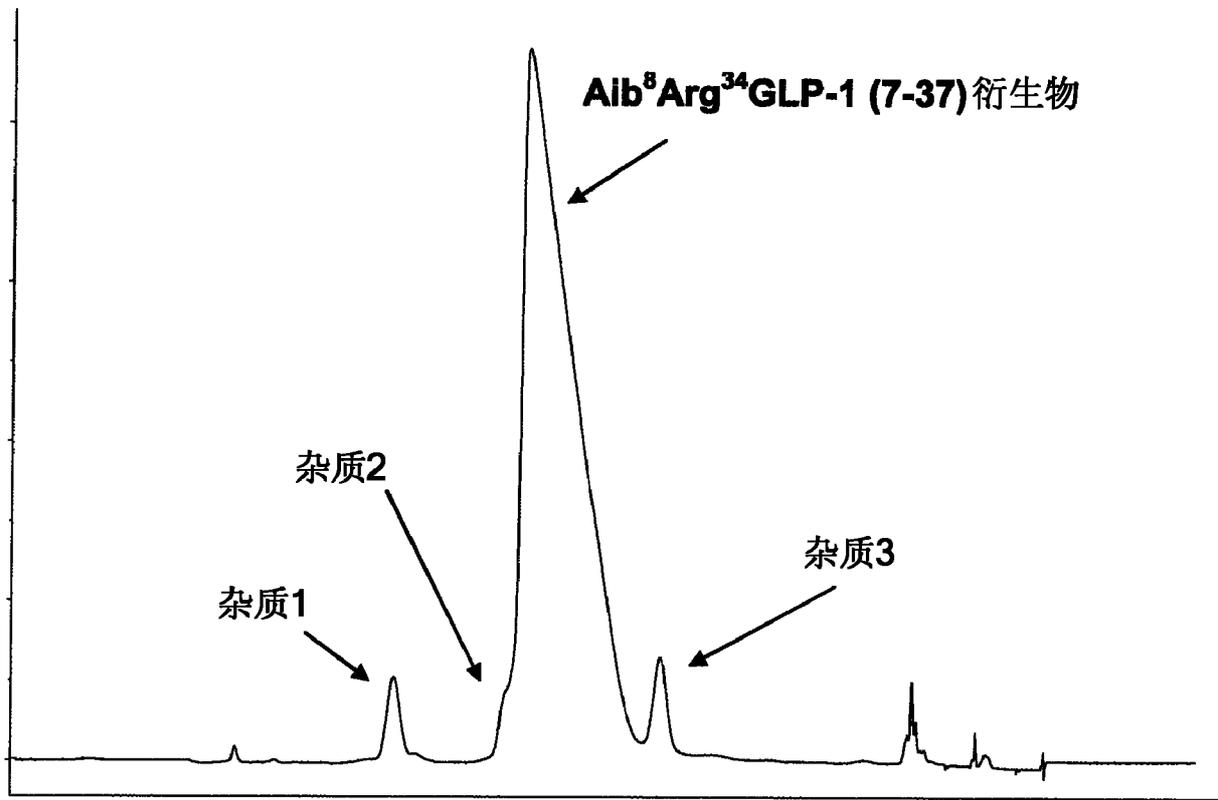


图 3

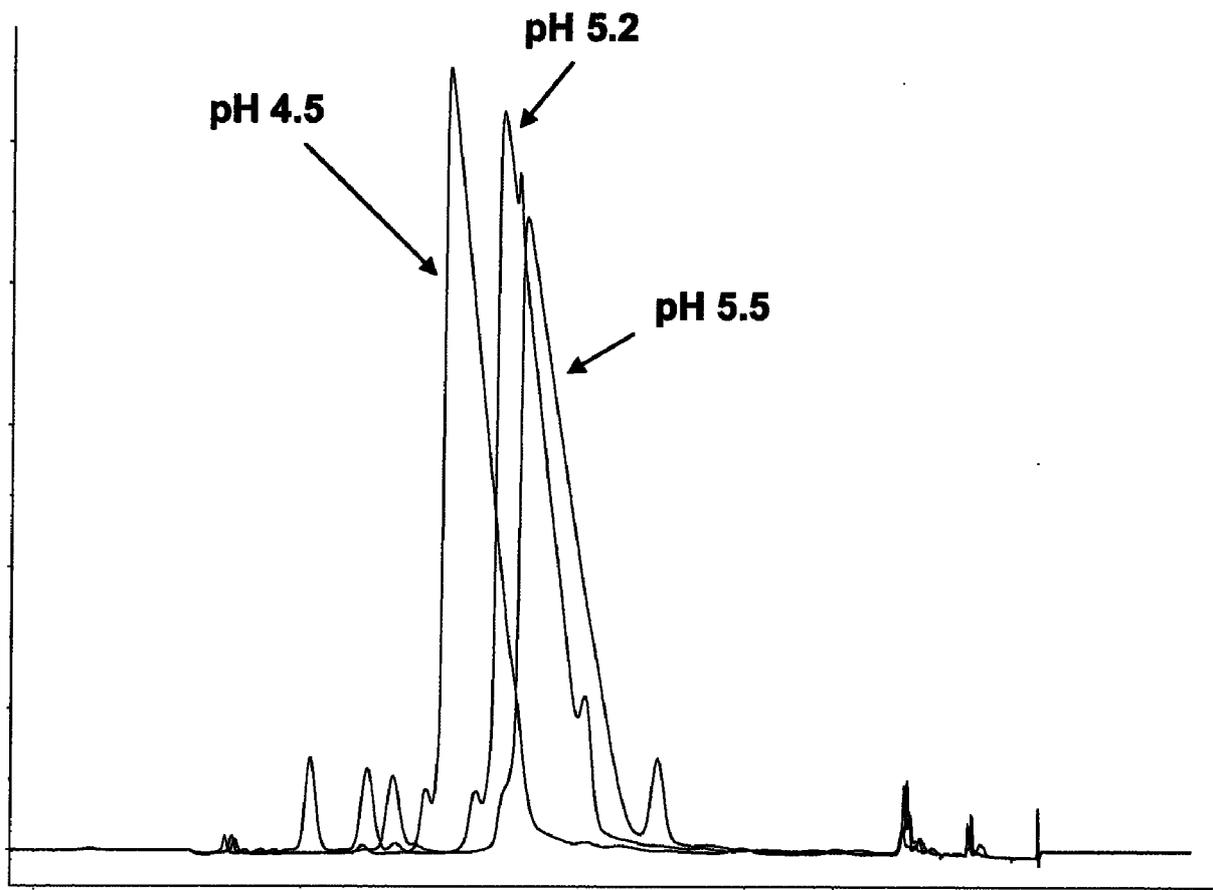


图 4

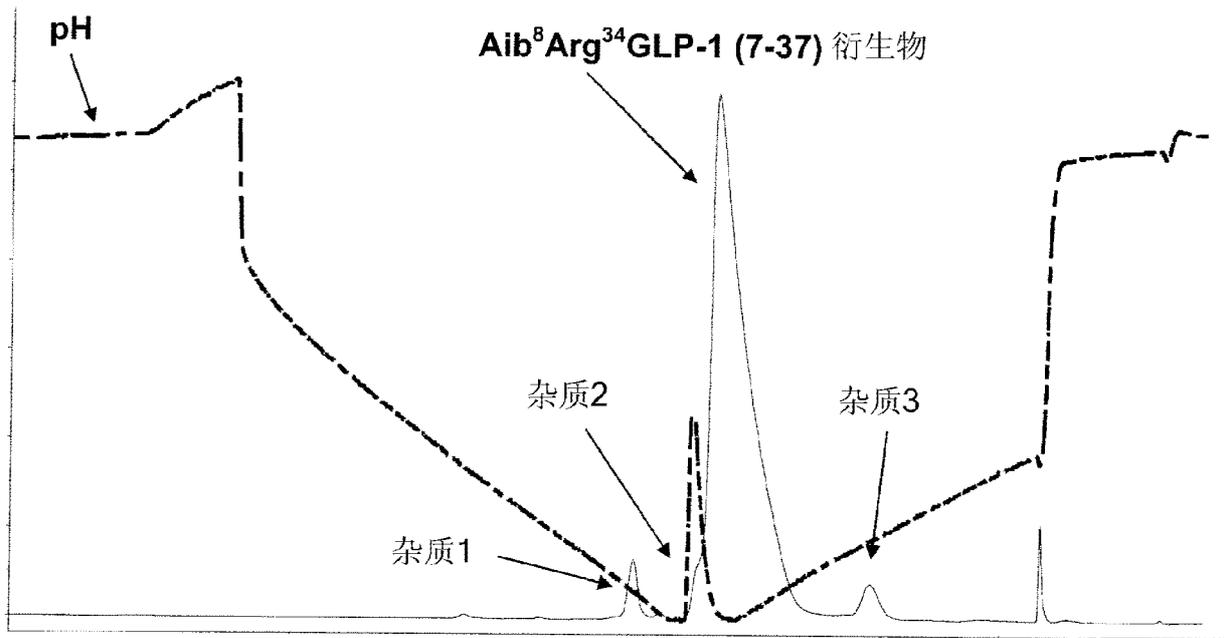


图 5

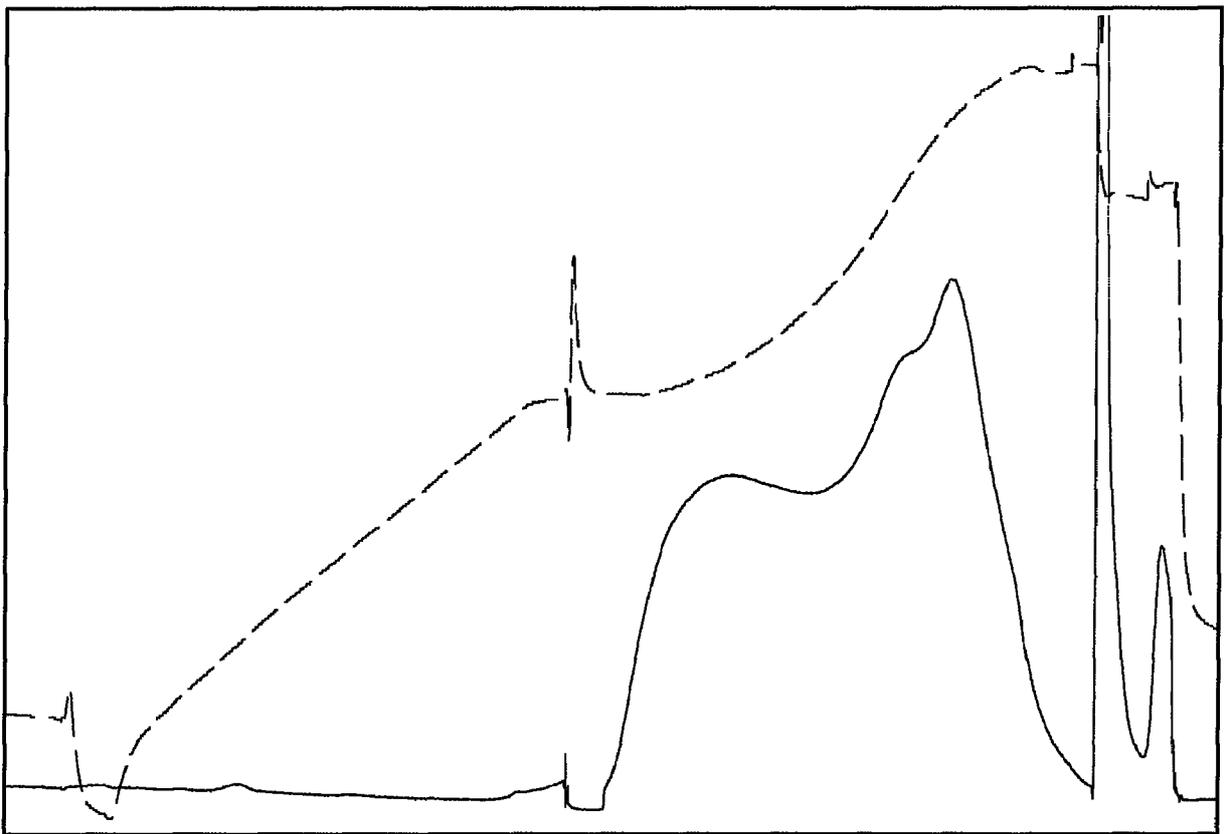


图 6

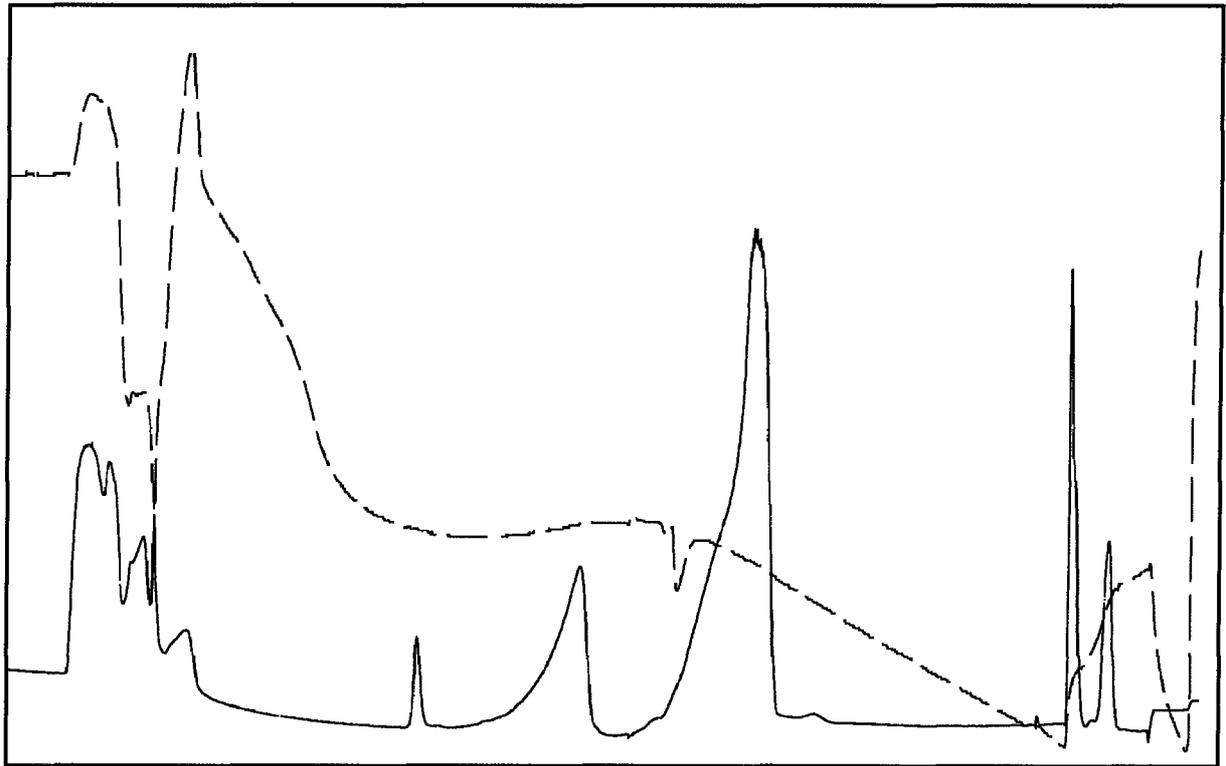


图 7