

(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
2012 年 11 月 15 日 (15.11.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/152175 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 1/30 (2006.01) *B01D 9/02* (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/074392
- (22) 国际申请日: 2012 年 4 月 19 日 (19.04.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201110118026.2 2011 年 5 月 9 日 (09.05.2011) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **甘李药业股份有限公司 (GAN & LEE PHARMACEUTICALS)** [CN/CN]; 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街 8 号, Beijing 101102 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **王大梅 (WANG, DAMEI)** [CN/CN]; 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街 8 号, Beijing 101102 (CN)。 **李文杰 (LI, Wenjie)** [CN/CN]; 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科

技产业基地景盛北三街 8 号, Beijing 101102 (CN)。
张金磊 (ZHANG, Jinlei) [CN/CN]; 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街 8 号, Beijing 101102 (CN)。

- (74) 代理人: **北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P.C.)**; 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 A 座 16 层, Beijing 100098 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

[见续页]

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR INSULIN GLARGINE CRYSTAL

(54) 发明名称: 甘精胰岛素结晶的制备方法

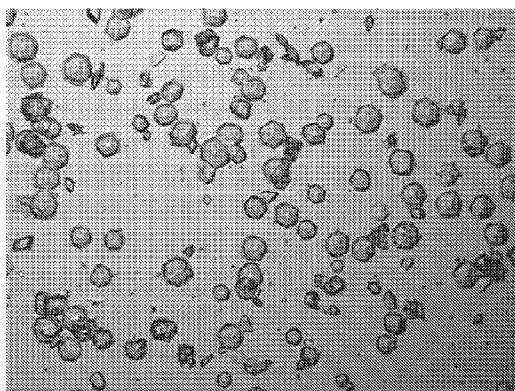


图 2 / Fig. 2

(57) Abstract: Disclosed is a preparation method for an insulin glargine (Gly^{A21}-Arg^{B31}-Arg^{B32}-human insulin) crystal, comprising crystallizing the insulin glargine in the crystal solution containing a recombinant insulin glargine, an organic solvent of a 10-30% concentration by volume, a zinc compound, a phenol derivative, a salt and an organic acid with a condition of pH 7.0-9.0.

(57) 摘要:

公开了一种甘精胰岛素 (即 Gly^{A21}-Arg^{B31}-Arg^{B32}-人胰岛素) 晶体的制备方法, 包括在含重组甘精胰岛素、体积百分浓度为 10-30% 的有机溶剂、锌化合物、酚衍生物、盐以及有机酸的结晶液中, 在 pH7.0-9.0 的条件下使所述甘精胰岛素结晶。



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, 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))。

甘精胰岛素结晶的制备方法

技术领域

本发明涉及人胰岛素类似物结晶的制备方法，具体地讲，涉及一种重组甘精胰岛素（重组 Gly^{A21}-Arg^{B31}-Arg^{B32}-人胰岛素）结晶的制备方法。

5 背景技术

糖尿病是一种常见的内分泌代谢疾病。近年来，全世界糖尿病的患病率都在迅猛增长。而在中国，随着人民生活方式的改变和老龄化进程的加速，糖尿病的患病率呈快速上升趋势，在 2010 年中国糖尿病患者总数已突破 9000 万人，成为继心脑血管疾病、肿瘤之后的另一个严重危害人民健康的重要慢性非传染性疾病。糖尿病

10 性并发症，尤其是慢性病并发症累及多个器官，致残、致死率高，严重影响患者的身心健康，并给个人、家庭和社会带来沉重的负担。

胰岛素治疗一直被当作是治疗糖尿病并使血糖得到良好控制的重要手段。近年来，随着胰岛素技术的不断发展，人们开发出了具有不同作用时间的新一代胰岛素，即胰岛素类似物。其中一种新开发的长效胰岛素类似物—甘精胰岛素，正在越来越多被医生

15 和患者所接受和使用。

重组甘精胰岛素（或重组 Gly^{A21}-Arg^{B31}-Arg^{B32}-人胰岛素，或重组 Gly^{A21}-人胰岛素-Arg^{B31}-Arg^{B31}-OH），是通过将人胰岛素 A 链 A21 位的天冬酰胺(Asn)突变为甘氨酸(Gly)，并且在 B 链羧基末端增加两个精氨酸(Arg)而得到的（参见美国专利 US5656722）。重组甘精胰岛素由于能够模拟生理基础胰岛素分泌，平稳无峰，在控制

20 血糖轻易达标的同时几乎没有低血糖风险，且持续时间为 24 小时左右，符合人类生活作息周期，每天只需注射一次，而被患者和医生所青睐。

在现有的重组甘精胰岛素产品中，重组甘精胰岛素大多以溶液形式或无定形干粉形式存在，而没有形成结晶。但是，结晶形式的重组甘精胰岛素由于具有均一稳定的固体分子形式，并且沉降体积小，易与上清分离，离心时间及冻干时间短，生产效率

25 高，是更好的重组甘精胰岛素的应用形式。因此，现在亟需将重组甘精胰岛素制备成结晶，再应用到胰岛素药物制剂中。

现有技术中有很多胰岛素的结晶方法，例如在 Abel J. J, PNAS, 12:132(1926)，美国专利 US2920104，中国专利 CN95106555.6 等中所描述的那些方法。但是，发明人通过对各类胰岛素及类似物的结晶工艺的广泛研究发现，应用现有的胰岛素结晶方法，并不能使重组甘精胰岛素形成结晶：1) 在人胰岛素的结晶条件下：0.25M 乙酸、1.6-2.1 克/L 人胰岛素、2% 锌、pH5.95-6.05，甘精胰岛素不能形成六面体结晶，只以无定形沉淀形式存在；2) 在重组赖脯胰岛素 (Lys^{B28}-Pro^{B29}-人胰岛素) 的结晶条件下：1M 乙酸、1.8-2.5 克/重组赖脯胰岛素、100-300mg 锌、0.2% 苯酚、pH5.9-6.2，甘精胰岛素仍不能形成六面体结晶，仍以无定形沉淀形式存在。

用现有的胰岛素结晶方法不能使重组甘精胰岛素结晶的原因可能是由于：重组甘精胰岛素在其 B 链末端多两个碱性氨基酸 (Arg^{B31}-Arg^{B32})，导致其等电点较天然人胰岛素高，从而使其在现有胰岛素结晶的条件下，仅能以无定形状态存在，不能形成稳定的六面体结晶。

发明内容

本发明的目的是解决现有上述问题，提供一种重组甘精胰岛素晶体的制备方法，该方法可大规模地制备高质量和高收率的甘精胰岛素-锌结晶。该晶体具有稳定的固体分子形式，易于大批生产操作，沉降体积小，易与上清分离，离心时间及冻干时间短，生产效率高。

因此，为了实现本发明的目的，本发明提供一种重组甘精胰岛素晶体的制备方法，该方法包括：从含有重组甘精胰岛素、有机溶剂、锌化合物、酚衍生物、盐以及有机酸的结晶液中，在 pH7.0-9.0 的条件下使重组甘精胰岛素结晶，其中所述有机溶剂的体积百分浓度为 10-30%。

重组甘精胰岛素因其等电点与其他胰岛素差异较大，所以结晶较为困难，结晶过程中有机溶剂剂的加入以及 pH 值的调节是影响结晶效果的关键因素。

本发明中所述的有机溶剂是重组甘精胰岛素形成结晶的关键因素之一。其他胰岛素可以在没有有机溶剂的条件下结晶，但重组甘精胰岛素在没有有机溶剂的条件下，只能是絮状的无定形沉淀，无法形成结晶。发明人经大量实验研究发现，只有当结晶液中存在有体积百分浓度为 10-30% 的有机溶剂时，重组甘精胰岛素才能开始形成结晶。这可能是由于结晶液中的有机溶剂能够降低重组甘精胰岛素的溶解度的缘故：(1) 当结晶液中存在有机溶剂时，能降低结晶液的电解常数，增加甘精胰岛素分子上不同

电荷之间的相互引力，导致甘精胰岛素溶解度的降低；(2) 有机溶剂与水之间的相互作用能够破坏甘精胰岛素的水化膜，也可以降低甘精胰岛素的溶解度。

有机溶剂降低了结晶液中重组甘精胰岛素的溶解度，促使甘精胰岛素结晶的形成，因此结晶液中有机溶剂的体积百分浓度不宜低于 10% (体积/体积)，否则难以达到上述效果。同时，如果有机溶剂的浓度过高，又会容易引起蛋白质变性失活，因此结晶液中有机溶剂的体积百分浓度也不宜超过 30% (体积/体积)。在本发明中，所述有机溶剂可以为乙腈、乙醇、正丙醇、异丙醇等任何本领域技术人员所公知的易溶于水的有机溶剂。其中优选的有机溶剂为乙醇。

另外，由于重组甘精胰岛素的等电点较高在 pH6-8 之间，而其他胰岛素的等电点通常在 pH5-5.5 之间，所以重组甘精胰岛素在其他胰岛素的结晶 pH 值 (例如 pH6) 时只是略显混浊，不足以开始结晶过程，只有当 pH 跃过 7 以后结晶过程才能开始，因此本发明中结晶的条件是 pH7.0-9.0，而在此 pH 值其他胰岛素已基本澄清无法结晶。此外，发明人经研究发现，如果在重组甘精胰岛素的结晶过程中，将结晶液的初始 pH 值调节至 pH8.0-9.0，结晶过程中的 pH 值调节至 pH7.0-8.0，能形成粒径更大、结构更规则且更为均一的结晶。本发明结晶液的 pH 值可通过使用碱等本领域技术人员所公知的方法进行调节，优选使用氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵 (浓氨水) 进行调节。

优选地，所述结晶液中重组甘精胰岛素的浓度为 2-4 g/L，更优选为 2.8-3.2 g/L。甘精胰岛素浓度太低，会加大结晶液的体积，不利于大规模生产，如果浓度过高超过甘精胰岛素的溶解度，会使溶液混浊。

优选地，所述锌化合物是以锌盐的形式加入的，选自能够在水中解离出锌离子的锌盐，具有代表性的锌盐的实例有氯化锌、氧化锌、乙酸锌、溴化锌、硫酸锌等。本领域技术人员应该知道，还有许多其他的锌盐也可以用于本发明的方法；本发明结晶液中锌的浓度优选为 20-200mg/L。本发明更优选的锌为氯化锌；浓度为 70-100mg/L。由于锌化合物参与甘精胰岛素结晶过程，如果锌化合物的浓度过低会使甘精胰岛素结晶不完全，如果锌化合物浓度过高，会使结晶初期的晶核增多，从而使结晶的颗粒变小。

优选地，所述酚衍生物是指能够提供酚羟基的物质，选自苯酚、间甲苯酚或对羟基苯甲酸甲酯或它们的混合物；结晶液中酚衍生物的浓度为 0.05-0.5g/100ml (即 0.05-0.5%，质量/体积)。更优选的酚衍生物为苯酚；浓度为 0.1-0.2g/100ml (即 0.1-0.2%，

质量/体积)。酚衍生物也参与甘精胰岛素结晶过程，如果酚衍生物浓度过低则不利于晶体生成，酚衍生物浓度过高虽然不对结晶过程本身造成影响，但是会增加生产成本。

优选地，所述盐是指易溶于水的强电解质盐，选自氯化钠、乙酸钠或柠檬酸钠；结晶液中盐的浓度为 0.1-0.5M。更优选的盐为氯化钠；浓度为 0.3-0.4M。盐浓度低于 0.1M 时，结晶液在 pH7.0-9.0 的条件下为混浊溶液，不能有效形成晶体，而盐浓度高于 0.5M 时，结晶液在 pH7.0-9.0 的条件下始终是澄清液体，这样也不能析出形成晶体。

优选地，所述有机酸是指易溶于水的短链羧酸，选自乙酸、柠檬酸或甘氨酸；结晶过程中有机酸浓度过高易造成结晶过程中放热过多而影响产品的稳定性，浓度过低会使重组甘精胰岛素溶解效果不好，因此结晶液中有机酸的浓度优选为 0.3-0.8M。更优选的有机酸为乙酸；浓度为 0.4-0.6M。

结晶的温度不是关键性的，可以接受的温度范围为约 1-30℃。优选的结晶液初始温度为室温（10-30℃），该温度能够增加重组甘精胰岛素结晶前的溶解度；优选的结晶过程中的温度为 2-8℃，该温度能够促进重组甘精胰岛素在低温下溶解度的降低，加快结晶速度。

优选的，本发明采用以下步骤对重组甘精胰岛素进行结晶：（1）在室温下制备含有上述组分和含量的结晶液，并调节结晶液初始 pH 值至 8.0-8.5；（2）将上述结晶液降温至 2-8℃，并调节 pH 值至 7.1-7.8，然后结晶至少 3 小时。

重组甘精胰岛素溶于结晶液中的方式，以及结晶液中各组分加入的顺序对本发明来说也不是关键性的。例如，可以分别将有机溶剂、锌、酚衍生物、有机酸以及盐加入到重组甘精胰岛素溶液中，也可以先将锌、酚衍生物、有机酸和盐配制成溶液，再加入到包含重组甘精胰岛素和有机溶剂的溶液中。

在工业化生产过程中，为了使结晶胰岛素更纯，可以选择重结晶工艺，为了降低结晶中的其他溶剂含量，也可以采取水洗结晶的方法。

本发明的重组甘精胰岛素可以通过商购获得，也可以采用任何一种公认的肽合成技术制备，例如溶液法、固相合成法（J. Stewart 等,《固相肽合成》，Freeman and Co., San Francisco, 1969）、半合成法、基因工程法、DNA 重组法(美国专利 US5656722)等。

本发明重组甘精胰岛素结晶的制备方法具有以下优点：可以结晶出均一稳定的重组甘精胰岛素六面体结晶，晶体的透明度高，沉降体积小，离心干燥时间短，生产效率高。

附图说明

- 5 图 1 示出了实施例 1 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 2 示出了实施例 2 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 3 示出了实施例 3 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 4 示出了实施例 4 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 5 示出了实施例 5 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
10 图 6 示出了实施例 6 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 7 示出了对比例 1 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 8 示出了对比例 2 重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 9 示出了对比例 3 第一份重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；
图 10 示出了对比例 3 第二份重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图；以
15 及
图 11 示出了对比例 3 第三份重组甘精胰岛素结晶后在显微镜下 160 倍放大图。

具体实施方式

材料

甘精胰岛素：甘李药业有限公司提供，批号 GLGB09001。

- 20 氯化锌购自北京安迪永富，批号 71770；苯酚购自江门市恒建药业，批号 081001；
乙酸购自台山新宁制药有限公司，批号 20081007；氯化钠购自北京燕京药业，批号
080522；浓氨水购自北京华腾，批号 20080513；乙醇购自天津市科密欧化学试剂有限

公司，批号 091005，醋酸铵购于上海科彤化工有限公司，批号 20081101；乙腈购自上海星可，批号 20091005；乙酸钠购自天津市科密欧化学试剂有限公司，批号 090504。

实施例 1

制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：3.5g/L，乙腈：20%，乙酸：0.7M，苯酚：0.4%，氯化锌：120mg/L，乙酸钠：0.5M。

称取 6.3g 重组甘精胰岛素溶于 1L 纯净水中，制成重组甘精胰岛素混悬液；另将乙腈 360ml，冰乙酸 72.09ml，10%的苯酚溶液 72ml，5.08 g/100ml（即 5.08%，质量/体积）的氯化锌溶液 4.25ml，4M 的乙酸钠溶液 225ml，混合后加水至终体积 0.6L。将上述 0.6 L 溶液加入到上述 1L 重组甘精胰岛素混悬液中，并补水至终体积 1.8L，制成结晶液。

将上述结晶液初始温度调到 20-25℃，用氢氧化铵调节 pH7.8-8.2，搅拌 10 分钟至溶液微混，放入 2-8℃静置结晶约 3 小时。然后取上清液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量为 0.05mg/ml，符合要求。

搅起结晶混悬液后镜检，放大 160 倍可见明显的六面体结晶，透明度较高（见图 1）。

实施例 2

制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：3g/L，乙醇：15%，乙酸：0.5M，氯化锌：90mg/L，苯酚：0.2%，氯化钠：0.3M。

称取 251.8g 重组甘精胰岛素装在已清洁的不锈钢桶中，加入 96%乙醇 13.1L，纯冰乙酸 2.4L，5.08 g/100ml（即 5.08%，质量/体积）的氯化锌溶液 148.6ml，10%的苯酚溶液 1678ml，氯化钠 1472g，加水至终体积 83.9L。

将上述溶液的初始温度调到 23±2℃，用浓氨水调节 pH 至 8.0-8.5，搅拌约 10 分钟至溶液微混，然后于 2-8℃放置 1 小时降温后取出，再用冰乙酸调 pH 至 7.1-7.6，搅拌约 10 分钟，再于 2-8℃静置 10 小时。然后取上清液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量已低至 0.02mg/ml，符合要求。

倾出上清液约 77L，将剩余约 7L 混悬液分别放入 1L 离心瓶中，用离心机 4000 转/分钟离心 10 分钟，将所有离心瓶中的结晶沉淀取出，按 20g/L 的浓度混悬于 0.02M

的醋酸铵溶液中，调 pH 值 7.8 洗涤，再次离心收集沉淀，重复洗涤一次，再次离心去除上清，进行冷冻干燥，40 小时后得到冻干粉末 245.6 克，含水量 2.3%。将冻干粉末加水制成悬浮液后镜检，放大 160 倍可见大量均一的、规则的六面体结晶，透明度很高（见图 2）。

5 实施例 3

应用与实施例 1 相同的方法制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：2g/L，正丙醇：10%，乙酸：0.3M，间甲酚：0.05%，氧化锌：20mg/L，乙酸钠：0.1M。

10 将上述结晶液初始温度调到 4℃，用氢氧化铵调节 pH7.5-8.5，继续在 4℃下静置结晶约 10 小时。然后取上清液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量为 0.05mg/ml，符合要求。

搅起结晶混悬液后镜检，放大 160 倍可见明显的六面体结晶，透明度较高（见图 3）。

实施例 4

15 应用与实施例 1 相同的方法制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：4g/L，甲醇：30%，柠檬酸：0.8M，对羟基苯甲酸甲酯：0.5%，乙酸锌：200mg/L，柠檬酸钠：0.5M。

20 将上述结晶液初始温度调到室温，用氢氧化铵调节 pH8.5-9.0，放入 2-8℃放置 1 小时降温后取出，再用冰乙酸调 pH 至 7.5-8.0，再于 2-8℃静置 8 小时。然后取上清液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量为 0.04mg/ml，符合要求。

搅起结晶混悬液后镜检，放大 160 倍可见明显的六面体结晶，透明度较高（见图 4）。

实施例 5

25 应用与实施例 1 相同的方法制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：2.8g/L，异丙醇：15%，丙酸：0.4M，对羟基苯甲酸乙酯：0.1%，溴化锌：70mg/L，氯化钠：0.3M。

将上述结晶液初始温度调到 20-25℃，用氢氧化铵调节 pH7.1-7.8，搅拌 10 分钟至溶液微混，放入 2-8℃静置结晶约 6 小时。然后取上清液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量为 0.03mg/ml，符合要求。

5 5)。
搅起结晶混悬液后镜检，放大 160 倍可见明显的六面体结晶，透明度较高（见图

实施例 6

应用与实施例 1 相同的方法制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：3.2g/L，叔丁醇：20%，异丁酸：0.6M，苯酚：0.1%，间甲酚：0.1%，硫酸锌：100mg/L，硫酸钠：0.4M。将上述结晶液初始温度调到室温，
10 用氢氧化铵调节 pH8.5，继续在室温下静置结晶约 12 小时。然后取上清液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量为 0.05mg/ml，符合要求。

搅起结晶混悬液后镜检，放大 160 倍可见明显的六面体结晶，透明度较高（见图 6）。

对比例 1

15 应用与实施例 1 相同的方法制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：1g/L，乙醇：5%，乙酸：0.1M，氯化锌：10mg/L，苯酚：0.01%，氯化钠：0.1M。

将上述结晶液初始温度调到 20-25℃，用氢氧化铵调节 pH8.1-8.8，放入 2-8℃放置 1 小时降温后取出，再用冰乙酸调 pH 至 7.1-7.8，再于 2-8℃静置 5 小时。然后取上清
20 液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量为 0.2mg/ml。

搅起结晶混悬液后镜检，放大 160 倍可见六面体结晶数量很少，且结构不均（见图 7）。

对比例 2

应用与实施例 1 相同的方法制备重组甘精胰岛素结晶液，该结晶液中所包含的组分和浓度为：重组甘精胰岛素：30g/L，乙醇：50%，乙酸：3M，氯化锌：300mg/L，
25 苯酚：2%，氯化钠：1M。

将上述结晶液初始温度调到 20-25℃，用氢氧化铵调节 pH8.1-8.8，放入 2-8℃放置 1 小时降温后取出，再用冰乙酸调 pH 至 7.1-7.8，再于 2-8℃静置 5 小时。然后取上清液进行 HPLC 检测，上清液中重组甘精胰岛素的含量为 0.2mg/ml。

5 搅起结晶混悬液后镜检，放大 160 倍可见六面体结晶数量很少，且结构不均（见图 8）。

对比例 3

称取 9g 重组甘精胰岛素溶于 1.8L 纯净水中，制成重组甘精胰岛素溶液。将该溶液等分成三份，分别按人胰岛素、赖脯胰岛素和甘精胰岛素的方法制备甘精胰岛素结晶。即在第一份溶液中加入冰乙酸、氯化锌和水，使乙酸浓度为 0.25M，甘精胰岛素浓度为 1.6-2.1g/L，锌含量达到 63.5mg/L，然后用 4M 氢氧化铵调 pH 至 5.95-6.05；第二份加入冰乙酸、氯化锌、苯酚和水，使乙酸浓度为 1M，甘精胰岛素浓度为 1.8-2.5g/L，含锌量为 200mg/L，苯酚含量为 0.2%，然后用浓氢氧化铵调 pH 至 5.9-6.2；第三份按实施例 2 的结晶液的组分和含量配制。结果第一、二份甘精胰岛素溶液只形成了絮状沉淀，未能形成正六面体结晶（见图 9、图 10），第三份甘精胰岛素形成了正六面体结晶（见图 11）。

10

15

权 利 要 求 书

1. 一种重组甘精胰岛素晶体的制备方法，其特征在于，所述方法包括：从含有重组甘精胰岛素、有机溶剂、锌化合物、酚衍生物、盐以及有机酸的结晶液中，在 pH7.0-9.0 的条件下使所述重组甘精胰岛素结晶，其中，所述有机溶剂的体积百分浓度为 10-30%。
2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述有机溶剂选自乙腈、乙醇、正丙醇或异丙醇。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法，其特征在于，所述结晶液的初始 pH 值为 8.0-9.0，在结晶过程中所述结晶液的 pH 值为 7.0-8.0。
4. 根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，所述结晶液的初始 pH 值为 8.0-8.5，在结晶过程中所述结晶液的 pH 值为 7.1-7.8。
5. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述结晶的温度为 1-30℃。
6. 根据权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于，所述结晶液的初始温度为 10-30℃，所述结晶过程中的温度为 2-8℃。
7. 根据权利要求 1，2 和 4-6 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述结晶液中所述重组甘精胰岛素的浓度为 2-4 g/L。
8. 根据权利要求 1，2 和 4-6 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述酚衍生物选自苯酚、间甲苯酚和对羟基苯甲酸甲酯或它们的混合物，所述结晶液中所述酚衍生物的浓度为 0.05-0.5g/100ml。
9. 根据权利要求 1，2 和 4-6 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述锌化合物选自氯化锌、氧化锌、乙酸锌、溴化锌或硫酸锌，所述结晶液中所述锌化合物的浓度为 20-200mg/L。
10. 根据权利要求 1，2 和 4-6 中任一项所述的制备方法，其特征在于，所述盐选自氯化钠、乙酸钠或柠檬酸钠，所述结晶液中所述盐的浓度为 0.1-0.5M。

11. 根据权利要求 1, 2 和 4-6 中任一项所述的制备方法, 其特征在于, 所述有机酸选自乙酸、柠檬酸或甘氨酸, 所述结晶液中所述盐的浓度为 0.3-0.8M。
12. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法包括以下步骤:
 - 1) 在室温下, 制备含 2.8-3.2 g/L 重组甘精胰岛素、乙醇、0.1-0.2 g/100ml 苯酚、0.4-0.6M 乙酸、70-100mg/L 氯化锌、0.3-0.4M 氯化钠的结晶液, 其中, 所述乙醇的体积百分浓度为 10-30%;
 - 2) 将所述结晶液的 pH 值调节至 8.0-8.5;
 - 3) 将所述结晶液降温至 2-8℃, 并调节 pH 值至 7.1-7.8, 然后结晶至少 3 小时, 制得所述重组甘精胰岛素晶体。
13. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法进一步包括:

将所述重组甘精胰岛素晶体以 20g/L 的浓度混悬于 0.02M 的醋酸铵溶液中, 调节 pH 值至 7.8, 离心收集沉淀物得到精制后的重组甘精胰岛素晶体。
14. 根据权利要求 13 所述的制备方法, 其中, 包括以下步骤:

称取 251.8g 重组甘精胰岛素, 加入 96%乙醇 13.1L, 纯冰乙酸 2.4L, 5.08 g/100ml 的氯化锌溶液, 148.6ml 10%的苯酚溶液 1678ml, 氯化钠 1472g, 加水至终体积 83.9L;

将上述溶液的温度调到 23±2℃, 用浓氨水调节 pH 至 8.0-8.5, 搅拌约 10 分钟至溶液微混, 然后于 2-8℃放置 1 小时降温后取出, 再用冰乙酸调 pH 至 7.1-7.6, 搅拌约 10 分钟, 再于 2-8℃静置 10 小时;

倾出上清液约 77L, 将剩余约 7L 混悬液分别放入 1L 离心瓶中, 用离心机 4000 转/分钟离心 10 分钟, 将所有离心瓶中的结晶沉淀取出, 按 20g/L 的浓度混悬于 0.02M 的醋酸铵溶液中, 调 pH 值 7.8 洗涤, 再次离心收集沉淀, 重复洗涤一次, 再次离心去除上清, 进行冷冻干燥 40 小时。

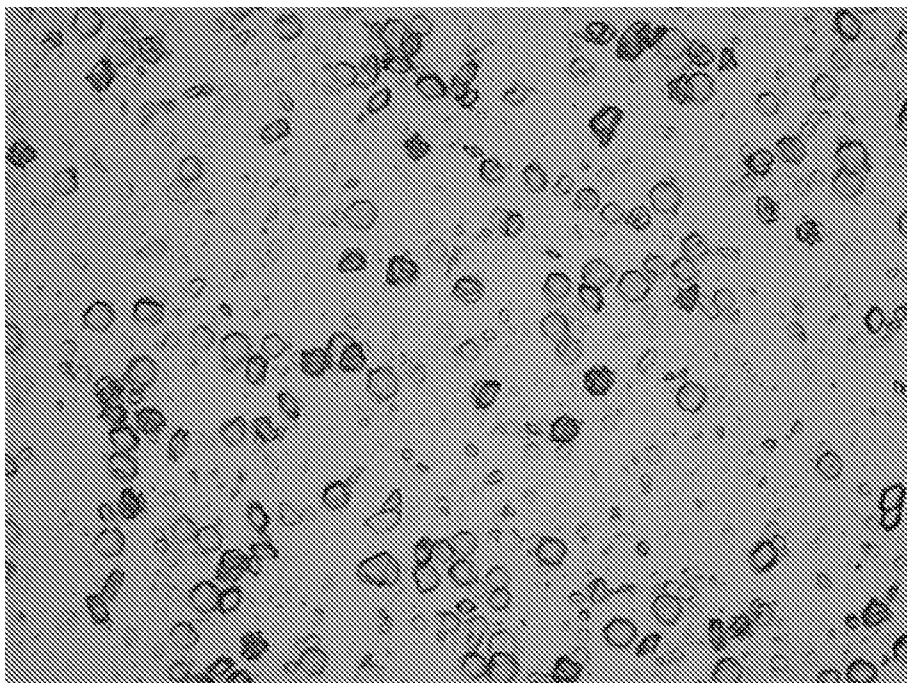


图 1

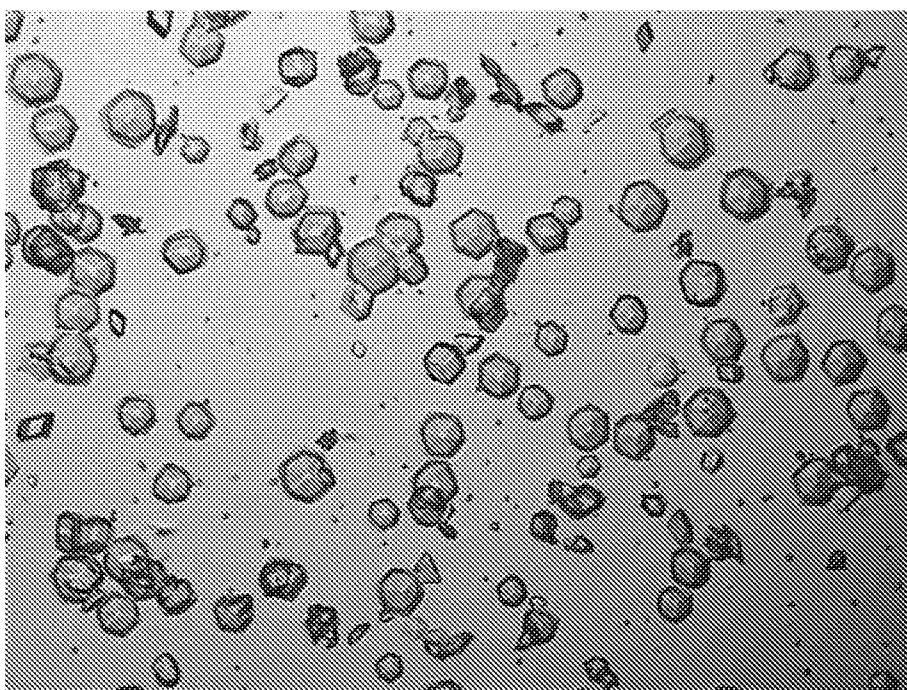


图 2

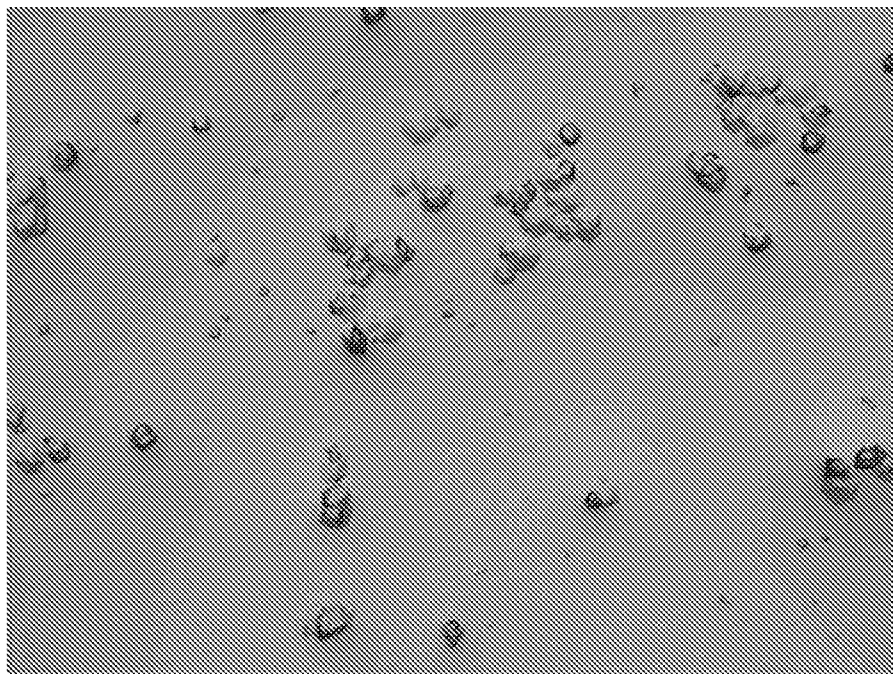


图 3

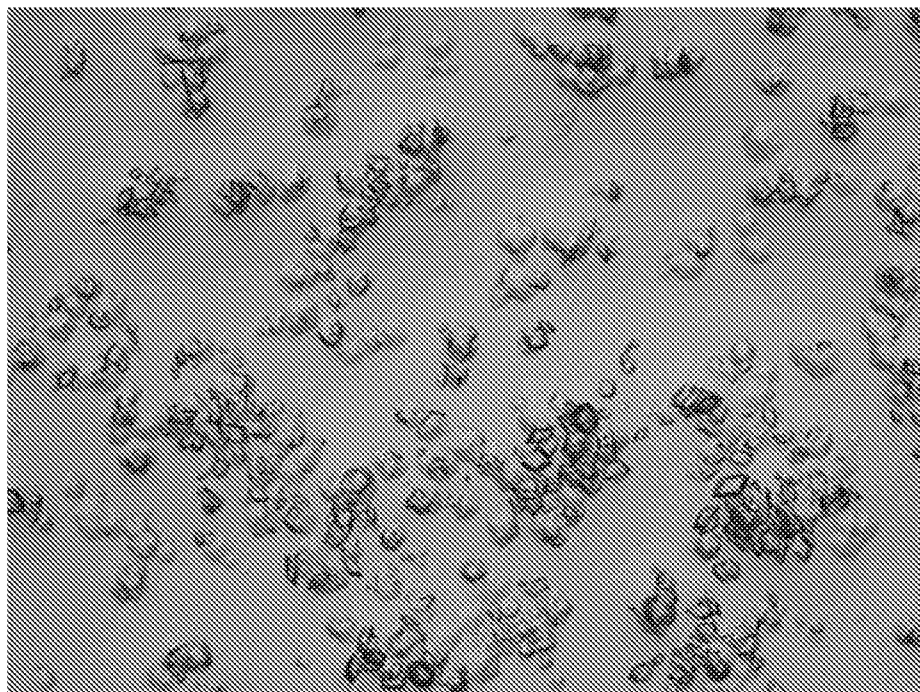


图 4



图 5

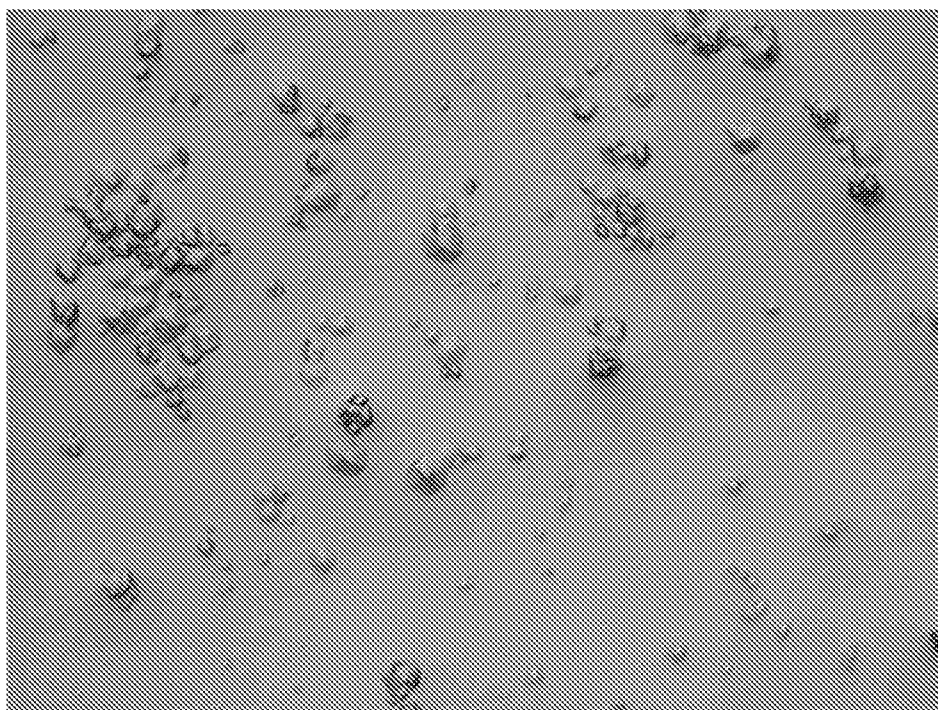


图 6

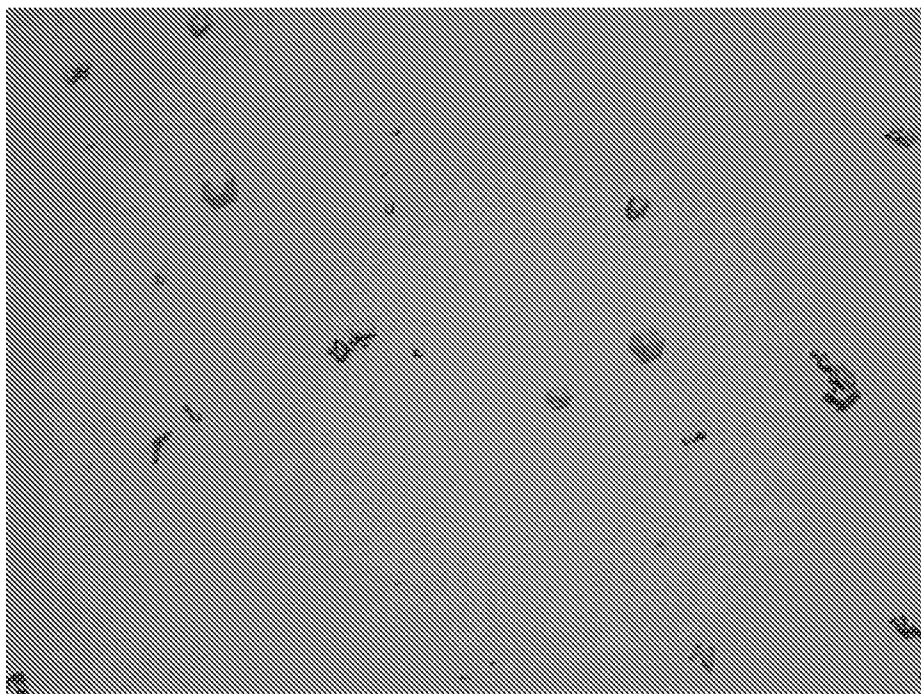


图 7



图 8

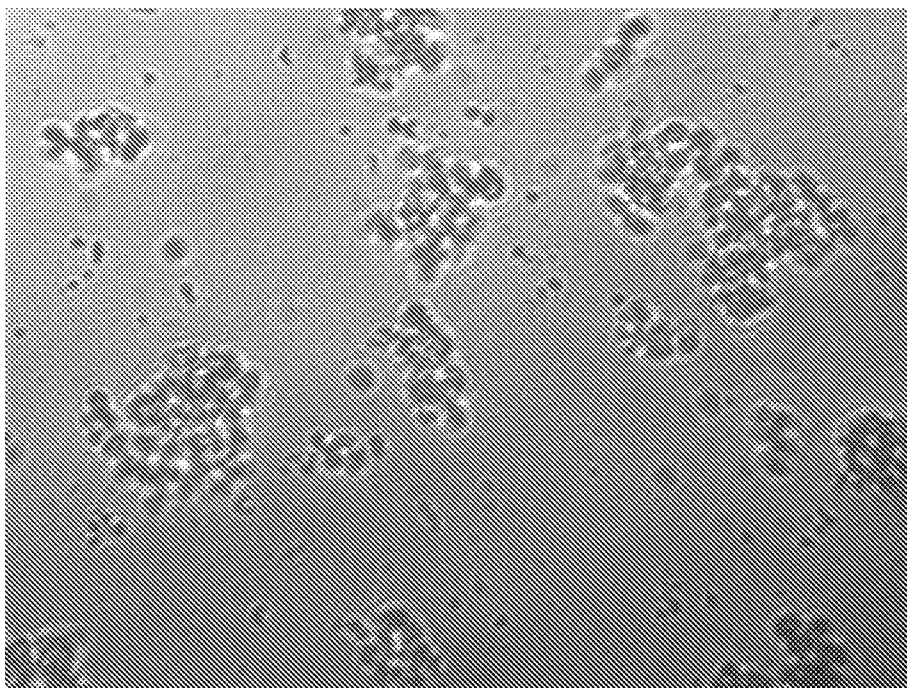


图 9

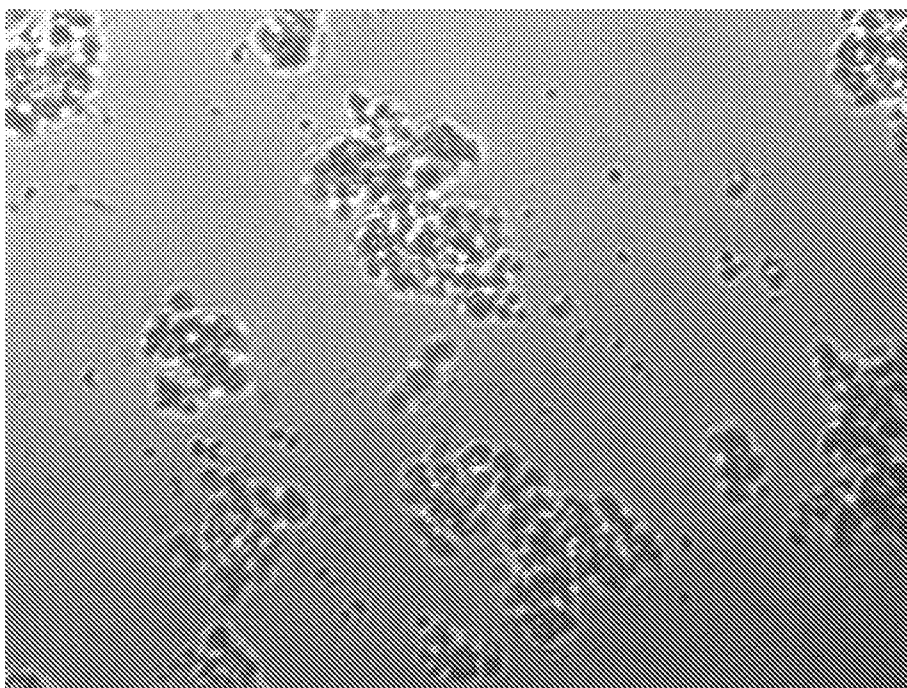


图 10

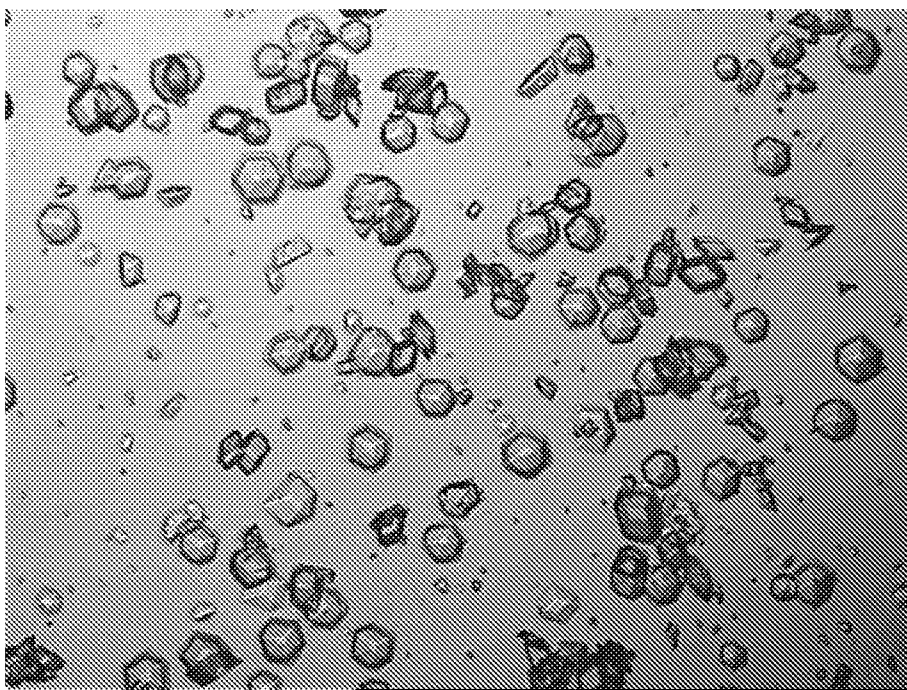


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074392**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; A61P; B01D

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)

WPI; EPODPC; ISI web of knowledge; Medline and key words: insulin, derivative, Gly-Ary-insulin, Arg, crystall+, organic solvent, ethanol, alcohol

CPRS; CNKI and key words: insulin, derivative, insulin glargine, arginine, crystal, crystallization, organic solvent, ethanol, alcohol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	CN 102219851 A (GAN & LEE PHARMACEUTICALS), 19 October 2011 (19.10.2011), claims 1-9, and description, paragraphs 13-20 and 39-42	1-14
Y	CN 88102311 A (ELI LILLY AND COMPANY), 09 November 1988 (09.11.1988), claims 1-11	1-14
Y	CN 1128271 A (ELI LILLY AND COMPANY), 07 August 1996 (07.08.1996), claims 1-3	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05 July 2012 (05.07.2012)	Date of mailing of the international search report 26 July 2012 (26.07.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer SUN, Shangyu Telephone No.: (86-10) 62412136

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074392

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5656722 A (HOECHST AG), 12 August 1997 (12.08.1997), description, column 4, line 37	1-14
Y	MARKUSSEN, J. et al. Soluble, prolonged-acting insulin derivatives. I. Degree of protraction and crystallizability of insulins substituted in the termini of the B-chain. PROTEIN ENGINEERING, March 1987, vol. 1, no. 3, pages 205-213, page 205, right column, paragraph 2, and page 207, right column, paragraph 2	1-14
A	WO 2008006496 A1 (SANOFI-AVENTIS DEUT GMBH), 17 January 2008 (17.01.2008), the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/074392

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102219851 A	19.10.2011	None	
CN 88102311 A	09.11.1988	US 4764592 A	16.08.1988
		EP 0288273 A	26.10.1988
		HUT 46705 A	28.11.1988
		JP 63280100 A	17.11.1988
		AU 1474788 A	10.11.1988
		DK 8802101 A	03.01.1989
		PT 87265 A	12.05.1989
		ZA 8802714 A	27.12.1989
		IL 86094 A	10.06.1993
		EP 0288273 B1	08.02.1995
		DE 3852963 G	23.03.1995
		ES 2068826 T3	01.05.1995
		IE 65952 B	29.11.1995
		JP 2602529 B2	23.04.1997
		CA 1339045 C	01.04.1997
		KR 0126477 B1	19.12.1997
		CN 1030988 C	14.02.1996
CN 1128271 A	07.08.1996	EP 0692489 A1	17.01.1996
		AU 2168195 A	04.01.1996
		NO 952334 A	18.12.1995
		FI 952930 A	17.12.1995
		CZ 9501541 A3	14.02.1996
		CA 2151563 A	17.12.1995
		US 5504188 A	02.04.1996
		BR 9502798 A	04.06.1996
		JP 8169899 A	02.07.1996
		HUT 73495 A	28.08.1996
		NZ 272358 A	20.12.1996
		ZA 9504942 A	26.02.1997
		RO 113529 B1	28.08.1998
		MX 186429 B	14.10.1997
		AU 697794 B	15.10.1998
		CZ 286066 B6	12.01.2000
		IL 114152 A	31.12.1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/074392

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 5656722 A	12.08.1997	TW 379228 A	11.01.2000
		RU 2156257 C2	20.09.2000
		PH 32025 A	02.06.1999
		EP 0692489 B1	26.02.2003
		DE 69529708 E	03.04.2003
		ES 2188637 T3	01.07.2003
		KR 100369951 B	28.03.2003
		JP 3595607 B2	02.12.2004
		CN 1184234 C	12.01.2005
		CA 2151563 C	07.08.2007
		DE 3837825 A	10.05.1990
		EP 0368187 A	16.05.1990
		AU 4441289 A	17.05.1990
		PT 92220 A	31.05.1990
		NO 894424 A	05.06.1990
		DK 8905547 A	09.05.1990
		ZA 8908456 A	27.06.1990
		FI 895259 A	09.05.1990
		HUT 52549 A	30.07.1990
		JP 2218696 A	31.08.1990
		NZ 231272 A	25.11.1992
		EP 0368187 B1	01.09.1993
		DE 58905456 G	07.10.1993
		ES 2059676 T3	16.11.1994
		IE 63338 B	19.04.1995
		NO 177963 B	18.09.1995
		CA 1339044 C	01.04.1997
		HU 213018 B	28.01.1997
		FI 100185 B1	15.10.1997
		JP 2680145 B2	19.11.1997
		BR 1100640 A3	28.04.1998
		IL 92222 A	22.09.1999
		DK 173196 B	13.03.2000
		KR 0158197 B1	01.12.1998
		US 6100376 A	08.08.2000
		PH 30695 A	16.09.1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/074392

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2008006496 A1	17.01.2008	DE 102006031962 A1	17.01.2008
		TW 200817432 A	16.04.2008
		EP 2041169 A1	01.04.2009
		US 2009176692 A1	09.07.2009
		JP 2009542741 A	03.12.2009
		EP 2041169 B1	31.08.2011
		US 8048854 B2	01.11.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074392

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/30 (2006.01) i

C07K 14/62 (2006.01) i

B01D 9/02 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) n

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61P; B01D

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI; EPODPC; ISI web of knowledge; Medline 和关键词: insulin, derivative, Gly-Ary-insulin, Arg, crystall+, organic solvent, ethanol, alcohol

CPRS; CNKI 和关键词: 胰岛素, 衍生物, 甘精胰岛素, 精氨酸, 晶体, 结晶, 有机溶剂, 乙醇, 酒精

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
P, X	CN 102219851 A (甘李药业有限公司) 19.10 月 2011 (19.10.2011) 权利要求 1-9, 说明书第 13-20 段、第 39-42 段	1-14
Y	CN 88102311 A (伊莱利利公司) 09.11 月 1988 (09.11.1988) 权利要求 1-11	1-14
Y	CN 1128271 A (伊莱利利公司) 07.8 月 1996 (07.08.1996) 权利要求 1-3	1-14

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

05.7 月 2012 (05.07.2012)

国际检索报告邮寄日期

26.7 月 2012 (26.07.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

孙尚瑜

电话号码: (86-10) 62412136

C(续). 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
Y	US 5656722 A (HOECHST AG) 12.8 月 1997 (12.08.1997) 说明书第 4 栏第 37 行	1-14
Y	MARKUSSEN, J. et al. Soluble, prolonged-acting insulin derivatives. I. Degree of protraction and crystallizability of insulins substituted in the termini of the B-chain. Protein Engineering, 3 月 1987, 第 1 卷, 第 3 期, 第 205-213 页 第 205 页右栏第 2 段, 第 207 页右栏第 2 段	1-14
A	WO 2008006496 A1 (SANOFI-AVENTIS DEUT GMBH) 17.1 月 2008 (17.01.2008) 全文	1-14

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2012/074392

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102219851 A	19.10.2011	无	
CN 88102311 A	09.11.1988	US4764592 A	16.08.1988
		EP0288273 A	26.10.1988
		HUT46705 A	28.11.1988
		JP63280100 A	17.11.1988
		AU1474788 A	10.11.1988
		DK8802101 A	03.01.1989
		PT87265 A	12.05.1989
		ZA8802714 A	27.12.1989
		IL86094 A	10.06.1993
		EP0288273 B1	08.02.1995
		DE3852963 G	23.03.1995
		ES2068826 T3	01.05.1995
		IE65952 B	29.11.1995
		JP2602529 B2	23.04.1997
		CA1339045 C	01.04.1997
		KR0126477 B1	19.12.1997
		CN1030988 C	14.02.1996
CN 1128271 A	07.08.1996	EP0692489 A1	17. 01.1996
		AU2168195 A	04. 01.1996
		NO952334 A	18. 12.1995
		FI952930 A	17. 12.1995
		CZ9501541 A3	14. 02.1996
		CA2151563 A	17. 12.1995
		US5504188 A	02. 04.1996
		BR9502798 A	04. 06.1996
		JP8169899 A	02. 07.1996
		HUT73495 A	28. 08.1996
		NZ272358 A	20. 12.1996
		ZA9504942 A	26. 02.1997
		RO113529 B1	28. 08.1998
		MX186429 B	14. 10.1997
		AU697794 B	15. 10.1998
		CZ286066 B6	12. 01.2000
		IL114152 A	31. 12.1999

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/074392

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		TW379228 A	11. 01.2000
		RU2156257 C2	20. 09.2000
		PH32025 A	02. 06.1999
		EP0692489 B1	26. 02.2003
		DE69529708 E	03. 04.2003
		ES2188637 T3	01. 07.2003
		KR100369951 B	28. 03.2003
		JP3595607 B2	02. 12.2004
		CN1184234 C	12. 01.2005
		CA2151563 C	07. 08.2007
US 5656722 A	12.08.1997	DE3837825 A	10. 05.1990
		EP0368187 A	16. 05.1990
		AU4441289 A	17. 05.1990
		PT92220 A	31. 05.1990
		NO894424 A	05. 06.1990
		DK8905547 A	09. 05.1990
		ZA8908456 A	27. 06.1990
		FI895259 A	09. 05.1990
		HUT52549 A	30. 07.1990
		JP2218696 A	31. 08.1990
		NZ231272 A	25. 11.1992
		EP0368187 B1	01. 09.1993
		DE58905456 G	07. 10.1993
		ES2059676 T3	16. 11.1994
		IE63338 B	19. 04.1995
		NO177963 B	18. 09.1995
		CA1339044 C	01. 04.1997
		HU213018 B	28. 01.1997
		FI100185 B1	15. 10.1997
		JP2680145 B2	19. 11.1997
		BR1100640 A3	28. 04.1998
		IL92222 A	22. 09.1999
		DK173196 B	13. 03.2000
		KR0158197 B1	01. 12.1998
		US6100376 A	08. 08.2000
		PH30695 A	16. 09.1997

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/074392

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 2008006496 A1	17.01.2008	DE102006031962 A1	17. 01.2008
		TW200817432 A	16. 04.2008
		EP2041169 A1	01. 04.2009
		US2009176692 A1	09. 07.2009
		JP2009542741 A	03. 12.2009
		EP2041169 B1	31. 08.2011
		US8048854 B2	01. 11.2011

主题的分类

C07K 1/30 (2006.01) i

C07K 14/62 (2006.01) i

B01D 9/02 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) n