

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00806080.0

[51] Int. Cl.

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100362105C

[22] 申请日 2000.3.23 [21] 申请号 00806080.0
[30] 优先权

[32] 1999.4.9 [33] DE [31] 19915938.6

[86] 国际申请 PCT/EP2000/002571 2000.3.23

[87] 国际公布 WO2000/061727 德 2000.10.19

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.9

[73] 专利权人 萨诺费—阿文蒂斯德国有限公司
地址 德国法兰克福

[72] 发明人 P·哈勃曼

[56] 参考文献

EP0347781B1 1994.2.16

US5672496A 1997.9.30

审查员 曾繁辉

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

胰羧肽酶原 B、其同工型和突变蛋白的制备及应用

[57] 摘要

本发明涉及胰羧肽酶 B 或羧肽酶 B 同工型或突变蛋白的制备方法，其中：(a) 在微生物中以分泌形式表达羧肽酶 B 的天然或非天然前体形式；(b) 纯化以分泌形式表达的该前体形式；并 (c) 通过酶处理将纯化的前体形式转化成有活性的羧肽酶 B 或其同工型或突变蛋白。本发明还涉及一种核酸结构、其在所述方法中的用途及制备方法。本发明还涉及一种宿主细胞、其制备方法以及在制备胰羧肽酶原 B 或其同工型或突变蛋白的方法中的用途。

1. 一种生产成熟胰岛素的方法，包括

(a) 在宿主细胞中表达羧肽酶 B 的前体形式，其中所述宿主细胞包含核酸构建体，所述核酸构建体包含：

(i) 编码羧肽酶 B 的天然前体形式的序列，其中该前体形式包含分泌信号序列，没有酶活性，并且能够通过酶处理转化成具有酶活性的形式，和

(ii) 与所述编码序列可操作地连接的启动子，其中所述启动子能够在微生物中表达，

(b) 纯化羧肽酶 B 的前体形式，

(c) 将所述纯化的羧肽酶 B 的前体形式、胰蛋白酶、和包含胰岛素的 B、C 和 A 链的胰岛素前体一起加到一个反应混合物中，由此将所述纯化的前体形式转化为活性羧肽酶 B 和产生成熟胰岛素，和

(d) 从反应混合物中分离该成熟胰岛素。

胰羧肽酶原 B、其同工型和突变蛋白的制备及应用

本发明涉及羧肽酶 B 和羧肽酶原 B 的制备以及羧肽酶原 B 在制备生物技术方法中有用的羧肽酶 B 中的用途。

羧肽酶是一组含锌的切割蛋白质和多肽的酶(蛋白酶)，它从待降解蛋白或肽的羧基端逐个水解去除单个氨基酸。因此羧肽酶属于外肽酶。动物羧肽酶在胰腺中以前体(羧肽酶原)形式形成，并在小肠中经胰蛋白酶水解成活性形式，在小肠中动物羧肽酶对蛋白质初级裂解产物多肽的消化非常重要。不同羧肽酶间存在底物特异性上的差异。

例如，羧肽酶 B 只释放碱性氨基酸，如精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸。羧肽酶有助于蛋白质和多肽的序列分析，有助于确定羧基端氨基酸。而且可用羧肽酶 B 来测量蛋白。

羧肽酶 B 应用的工业实例是制备一种重要药物胰岛素，欧洲专利申请 EP-A 0 489 780 中描述了这种多肽激素的制备。在这个申请中，羧肽酶 B 用在将胰蛋白酶打开的胰岛素原转变成胰岛素的一个重要步骤中。

通常，这类工业方法中使用的羧肽酶 B 来源于可经商业途径获得的羧肽酶原 B 制品。优选该制品从猪胰腺中获得(Folk, J.E., Meth.Enzym.: 19, 504, 1970)

然而，动物来源酶的一个缺陷是有被动物病毒污染的危险，而无病毒检测既复杂又是计算制备成本的一个重要因素。如果这种酶用于大规模工业生产，例如工业生产胰岛素，另一个不利的因素是获得和储藏冷冻胰腺的高后勤成本。

除了从胰腺组织中提取羧肽酶 B，用生物技术生产羧肽酶 B 是另一替代方法。这一方法中有一些已知的路线，例如直接胞内表达或在细菌中以融合蛋白形式，如以 β -半乳糖苷酶-羧肽酶 B 融合蛋白形式表达，或在酵母中进行相应表达。这一方法的另一替代方法是表达羧肽酶 B 前体，即羧肽酶原 B，它包括羧肽酶 B 的氨基酸序列和一段引导表达产物分泌的

信号肽序列。对于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 以及酵母属 (*Saccharomyces*)、假丝酵母属 (*Candida*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorphus*) 和巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)，已描述了合适的表达系统，它们有时可以通过商业途径获得。

用表达系统制备羧肽酶 B 的先决条件是有活性的羧肽酶 B 在每种情况下不抑制宿主菌的生长，使得确实有可能第一次得以表达。具有这种性质的宿主菌通常难以发酵，以致扩大培养体积和延长培养时间产量提高相对较低。

胞内表达羧肽酶 B (直接表达或以融合蛋白形式表达) 的一个问题是表达蛋白初始以不正确空间结构存在，因而无活性。需在纯化和处理过程中体外重新折叠。在此过程中，可能会发生错误折叠，而影响酶活性和特异性，难以用于药物制备。

通过分泌成熟而有活性的酶的方式制备羧肽酶 B 也有其缺陷。在发酵过程中，细胞或营养培养基组份中的肽样片段被识别为底物，与羧肽酶 B 相互作用使其不断失活，导致产量的损失。

解决这个难题的方法是表达和分泌没有活性但有正确空间结构的羧肽酶 B。体外经酶催化可从这种前体制备有活性的羧肽酶 B。本文中“活性羧肽酶 B”意为天然存在的羧肽酶 B，如人羧肽酶 B 或其天然存在的同工型。“活性羧肽酶 B”也可能是天然存在羧肽酶 B 的突变蛋白，其中氨基酸序列发生缺失、插入或替换，但突变蛋白酶活性在质量上与天然羧肽酶 B 相当。提及的前体可以是天然的羧肽酶原 B 或其衍生物，例如同工型、突变蛋白或因插入肽序列而失活的羧肽酶 B。下文会详细描述所加蛋白序列的性质。优选羧肽酶原 B 或其衍生物，因为可很容易地控制从这些蛋白制备有活性的羧肽酶 B。而且，提及的羧肽酶原 B 及其衍生物相对能够保存更长时间，而羧肽酶 B 保存时酶活性会丢失。

提及的羧肽酶原 B 衍生物含有羧肽酶 B 氨基酸序列以及 N 末端连接的具有信号肽氨基酸序列的多肽（以从表达用宿主生物中分泌该衍生物）、任选的不超过 100 氨基酸长的任何期望氨基酸序列和使得可以从该

衍生物的羧肽酶 B 部分酶切除去 N 端附加肽段的内肽酶识别序列。这类内肽酶识别序列的实例有胰蛋白酶、Xa 因子、弹性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胶原酶相应的已知识别序列。

令人吃惊的是，发现羧肽酶原 B 能和胰岛素原与胰蛋白酶在单罐反应 (one-pot reaction) 中反应，以致新形成的活性羧肽酶 B 能立即识别和水解胰岛素 B 链羧基末端形成的精氨酸。这种方法得到的羧肽酶 B 比经保存后再加到与胰岛素原的反应中的羧肽酶 B 活性更高。反应混合物里的胰蛋白酶不仅能活化羧肽酶原 B，也特异性切割胰岛素原，因而有利于释放成熟胰岛素。

令人吃惊的是，羧肽酶原 B 或所述衍生物 N 端加入 4 个组氨酸序列对胰蛋白酶活化的动力学无不利影响。加入 4 个组氨酸的优点在于蛋白质可用镍整合复合的亲合层析方法纯化。这种修饰的羧肽酶原 B 的用途也是本发明的主题。

作为本发明实例，可表达人胰羧肽酶原 B 的 cDNA 序列。然而，很明显，由于人来源的酶和例如牛、大鼠、猪或其它形成胰腺组织的种属来源的酶，在 DNA 和蛋白质水平上序列同源性相当高，因此，也可用这些种属 DNA 序列代替人的 DNA 序列。也可以使用编码羧肽酶 B 突变蛋白的相应 DNA。同样地，可使用编码羧肽酶 B 或羧肽酶原 B 天然或人工产生的同工型的 DNA 序列。而且由于遗传密码的简并性而产生的所有那些天然并不存在的 DNA 序列可用来代替上述编码羧肽酶 B、羧肽酶原 B 或各自的突变蛋白的 DNA 序列。

同样，作为实例，用可从 Invitrogen 买到的分泌异源蛋白的巴斯德毕赤酵母表达系统生产人羧肽酶原 B。本领域的技术人员都清楚，也可使用细菌系统，例如大肠杆菌分泌突变体，如欧洲专利申请 EP-A-0 448 093 所描述的，可用羧肽酶原序列取代该申请所述的蛭素序列。另外的替代方案是在链霉菌属中表达人羧肽酶原 B；例如，欧洲专利申请 EP-A 0 504 798 描述过用来表达戊二酰胺酶 (glutarylaminidase) 的系统。

同样清楚的是，除了实施例描述的外，本发明的方法在大规模工业应用中分离相对大量的酶时，也可使用其它的蛋白纯化方法如现有技术。

因此,本发明的一个主题是胰羧肽酶 B 或羧肽酶 B 的同工型或突变蛋白的制备方法,其中:

(a) 在微生物中以分泌形式表达羧肽酶 B 或羧肽酶 B 同工型或突变蛋白的天然或非天然前体形式,

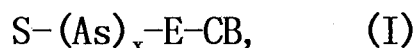
(b) 纯化以分泌形式表达的前体形式,并

(c) 通过酶处理将纯化的前体形式转化为活性羧肽酶 B 或羧肽酶 B 的同工型或突变蛋白;

特别是胰羧肽酶 B 或其同工型来源于人的此类方法,优选天然前体形式相应于羧肽酶原 B 或其同工型的此类方法。

下文提及所述方法时,若未明确指出是另一方法,通常使用“此类方法”。羧肽酶 B 的“天然”和“非天然”前体形式是天然存在的此类分子(“天然前体形式”)或通过氨基酸替换、插入或缺失由天然前体形式而来的此类分子(“非天然前体形式”),但这里的非天然前体形式通过酶处理能转化成有活性的胰羧肽酶或其同工型或突变蛋白。

特别优选的方法是此类方法,其中非天然前体形式具有下述结构:



其中:

S 是导致相应微生物分泌在表达过程中形成的融合蛋白的信号肽;

As 是任何期望的可遗传编码的氨基酸;

E 是由内肽酶识别序列组成的肽接头;

CB 是羧肽酶 B 或羧肽酶 B 的同工型或突变蛋白;

x 是 0-100 的整数

此外,本发明涉及此类方法,其中通过给天然或非天然前体形式连接一个肽序列,使得可通过亲和层析纯化该前体形式。特别优选的是此类方法,其中连接用于通过亲和层析纯化的序列是 1-6 个组氨酸残基,优选 4 个组氨酸残基。

本发明还涉及用巴斯德毕赤酵母作为表达微生物的此类方法。

本发明的另一主题是此类方法,其中使用胰蛋白酶、弹性蛋白酶、Xa 因子、胰凝乳蛋白酶或胶原酶,优选胰蛋白酶,进行酶处理。

而且, 本发明涉及此类方法, 其中步骤(C)在合适的反应条件下、在含有胰岛素 B、C 和 A 链的胰岛素前体形式或胰岛素衍生物存在时进行, 并且在此方法中形成了成熟胰岛素或成熟胰岛素衍生物, 再从反应混合物中分离它们。

本发明的另一主题是羧肽酶原 B 和羧肽酶 B 在此类方法中的用途。

此外, 本发明涉及用于此类方法中的一种核酸结构, 其包含编码羧肽酶 B 或羧肽酶 B 同工型或突变蛋白的天然或非天然前体形式的 DNA 序列, 其中所述编码序列可操作地与使该前体形式可在适合微生物中表达的启动子相接; 优选的是, 本发明涉及一种核酸结构, 其中所述 DNA 序列编码式 I 的蛋白; 此外, 本发明涉及一种核酸结构, 其中另有编码 1-6 个, 优选 4 个组氨酸残基的 DNA 序列与编码羧肽酶 B 或羧肽酶 B 同工型或突变蛋白的天然或非天然前体形式的 DNA 序列相连。

下文提及所述核酸时一般使用“此类核酸结构”, 除非明确指出是另一核酸结构。

本发明还涉及此类核酸结构的制备方法, 其中

- (a) 分离或制备所述 DNA 序列, 并
- (b) 以合适的方式将其插入载体中。

而且, 本发明涉及此类核酸结构在上述制备胰羧肽酶 B 的方法中的用途。

本发明还涉及包含上述核酸结构的宿主细胞, 和用于制备此类宿主细胞的方法, 其中将上述核酸结构包括在一种适合的微生物中。

本发明还涉及这种宿主细胞在上述制备胰羧肽酶 B 的方法中的用途。

本实施例旨在举例说明如何表达和纯化羧肽酶原 B 及 (His)₄-羧肽酶原 B。而且, 解释了羧肽酶原 B 如何用胰蛋白酶活化, 即以分离的形式活化和联合使用胰蛋白酶与羧肽酶原 B, 以制备胰岛素。

实施例 1

本实施例描述了用以分泌人羧肽酶原 B 的重组巴斯德毕赤酵母株的制备。所用起始材料是 cDNA 制品, 例如由从人胰腺组织分离的 RNA 按已知

方法制备的。这种 cDNA 制品是可以买到的,例如可从 Clontech(目录号是 7410-1)买到。为扩增所期望的 cDNA 目的序列,合成了两条引物。用于此目的序列取自 Genbank 数据库。按登记号 M81057,可从该数据库获得人胰羧肽酶 B 的 cDNA 序列。正向引物 P-CPBf22 对应于 22bp-32bp 的区域,反向引物 P-CPBrev1271 对应于 1271bp-1250bp 区域。用标准聚合酶链式反应(PCR)反应进行扩增。凝胶电泳分离 PCR 反应产物并洗脱符合预期大小的约 1250 bp 的 DNA 条带,在连接反应中与 Invitrogen 公司 Original TA Cloning®试剂盒里的 pCR®载体进行连接。用连接混合物转化试剂盒里提供的大肠杆菌 INV α F 感受态细胞,涂布于含 25 毫克/升的氨苄青霉素的 NA 平板上,37℃下培养。次日上午,从长出的菌落中取细胞重悬于 20 微升无菌水中,94℃孵育 10 分钟。向悬液里加入分别含 0.2 微克上述两种引物 P-CPBf22 和 P-CPBrev1271 的 PCR 反应缓冲液,这样可在 100 微升反应体积中进行标准 PCR 反应。凝胶电泳分析反应产物。含有能扩增出大约 1250 bp 片段的 DNA 的转化子被认为是正确的。分离以这种方法确定的一个克隆的质粒 DNA,并通过序列分析完整地确定该插入的 cDNA 序列。可见所确定的序列与 Aloy 等(生物化学(Biol. Chem.)379:149-155,1998)发表的序列完全一致。依据所发表文献,使用编码羧肽酶原-95 到 307 位氨基酸的密码子用于表达。所用表达载体为 Cregg, J.M. 等(Bio/Technologie, 11:905-910, 1993)和 Scorer, C.A. 等(Bio/Technologie, 12:181-184, 1994)描述的质粒 pPIC9。为此,用限制性内切酶 XhoI 和 EcoRI 切开质粒 pPIC9。为将 cDNA 序列插入载体,合成了两条引物。正向引物 PPICCPBf 的序列是

XhoI 羧肽酶原→

5' TTTTCTCTCGAGAAAAGACATCATGGTGGTGAGCAC 3'

(SEQ ID NO. : 1)

反向引物 PPICCPBrev 的序列是

EcoRI 羧肽酶原

5' TTTTGAATTCCTTACTACTAGTACAGGTGTTCCAGGAC 3'

(SEQ ID NO. : 2)

用两条引物进行标准 PCR 反应扩增 cDNA, 纯化后用酶 XhoI 和 EcoRI 消化所获片段。从反应混合物里沉淀用这种方法得到的片段, 用水溶解, 与已切开的载体进行连接反应。用连接混合物转化感受态 INVαF 细胞, 涂布于选择性平板。用上述 PCR 技术鉴定含有期望表达质粒的菌落。从正确的克隆提取质粒 DNA。按 Cregg, J.M. 等所述将该 DNA 导入组氨酸营养缺陷型 (Scorer C.A. 等, 生物技术 (Biotechnology), 12:181-184, 1994) 的巴斯德毕赤酵母 GS115 株。检查转化后变为组氨酸原养型的菌落的羧肽酶原蛋白表达。为此, 表达如 Clare, J.J. 等 (基因 (Gene), 105:205-212, 1991) 所述的 50 个克隆。表达结束时取 1 毫升培养基, 离心去除细胞并冻干上清。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析每份上清。经考马斯亮蓝染色后, 一些上清样品中可以看到一条分子量为 45000 道尔顿大小的清晰条带。未诱导的培养上清中看不到此带。用 Chemicon 公司 (订货号 AB1801) 的抗猪羧肽酶 B 抗体作 Western Blot 分析能清楚地看到此条带。按实施例 2 分离表达羧肽酶原 B 的 100 毫升培养物, 将该实验中产量最好的克隆培养在一个有横向档板的 2 升摇瓶中。

实施例 2

本实施例描述了从实施例 1 培养物上清中纯化人羧肽酶原 B。首先离心去除细胞。用硫酸铵处理澄清的上清, 直到约 55% 饱和度。离心收集沉淀的蛋白, 并用 5ml 含 1mM EDTA 的 50mM Tris HCl (pH7.5) 溶液溶解该沉淀。然后通过 DEAE 纤维素层析分离蛋白质悬浮物。用 0-0.5M 氯化钠梯度作洗脱层析图。通过 Western Blot 分析鉴定含目的蛋白的组分。合并各组分并通过超滤浓缩。用 Bradford 方法确定存留物中的蛋白浓度。用这种方法富集的羧肽酶原或冻干储存或按实施例 4 直接用胰蛋白酶处理活化。凝胶电泳分离物经考马斯亮蓝染色显示在分子量为 45000 道尔顿处有一条带, 约占 60%。此条带对应于 Western Blot 中的相应区域。

实施例 3

本实施例描述了用以合成(His)₄-羧肽酶原 B 的表达载体的制备。按实施例 1 中所述方案构建。使用引物 PPICCPBrev(见实施例 1)。修饰正向引物使其多含有 4 个编码组氨酸的密码子。因此, PCPBHisf 引物序列是

XhoI 羧肽酶原→

5' TTTTCTCTCGAGAAAAGACACCATCACCACCATCATGGTGGTGAGCAC 3'

(His)₄

(SEQ ID NO. : 3)

用这种方法构建的巴斯德毕赤酵母株进行表达, 在溶液中用硫酸氨沉淀后, HIS-羧肽酶原 B 蛋白通过镍亲和层析步骤直接纯化。所用层析支持材料是“ProBond™ 镍螯合树脂”(Invitrogen 目录号 R801-01), 见生产商的详细说明。考马斯亮蓝染色后, 凝胶电泳分析表明实际上只有一条可见条带, 分子量约为 45000 道尔顿。Western Blot 实验中该条带被所用抗体识别。超滤浓缩经这种方法纯化的蛋白。按 Bradford 方法确定蛋白含量后, 或冻干储存或按实施例 4 直接活化。

实施例 4

本实施例描述了与胰蛋白酶反应活化羧肽酶原 B。为此, 用 14 毫升 0.1M Tris HCl 溶液(pH7.8)溶解从实施例 2 中来的 22 毫克冻干蛋白, 加热到 26℃, 并与 15 微升胰蛋白酶溶液(0.1 单位/毫升)混合, 搅拌孵育 3 小时。然后将溶液与大豆胰蛋白酶抑制剂混合。用分子量排除极限为 30000 道尔顿的 Centriprep®滤器 (Amicon)微量过滤从羧肽酶中去除胰蛋白酶、抑制剂、前肽片段以及其它成分。活性羧肽酶 B 冻存于 5mM Tris 缓冲液(pH7.5)中。确定蛋白浓度后按 Folk, J.E. (酶学方法(Meth. Enzym.), 19: 504-508, 1970)所述步骤测定比活性。如果所用起始材料是按实施例 3 制备的, 活化时只用 15 毫克起始物。

实施例 5

本实施例描述了联合应用胰蛋白酶和羧肽酶原 B 从单精氨酸胰岛素(mono-Arg insulin)中制备胰岛素。欧洲专利申请 EP-A 0 347 781 的实

施例 6 中描述了单精氨酸胰岛素与胰蛋白酶和羧肽酶 B 在一个相同的反应容器中反应。本实施例中, 用来自本申请实施例 2 的 15 微克羧肽酶原 B 或来自本申请实施例 3 的 10 微克羧肽酶原 B 代替欧洲专利申请 EP-A 0 347 781 实施例 6 中的羧肽酶 B。在两个反应中, 通过使用 3 μ l 而不是 2.5 μ l 胰蛋白酶贮存液(按照欧洲专利申请 EP-A 0 347 781 实施例 6)来提高胰蛋白酶浓度。