



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101490082 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 200780026138.7

(22) 申请日 2007.07.05

(30) 优先权数据

102006031955.9 2006.07.11 DE

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.01.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/005933 2007.07.05

(87) PCT申请的公布数据

W02008/006497 DE 2008.01.17

(73) 专利权人 塞诺菲-安万特德国有限公司

地址 德国美因河畔法兰克福

(72) 发明人 P·哈伯曼 F·措赫尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C07K 14/62 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 0140084 A1, 1985.05.08, 说明书第7-8页, 权利要求1-8.

EP 0254515 A2, 1988.01.27, 全文.

W0 03/044210 A2, 2003.05.30, 全文.

审查员 张彬

权利要求书1页 说明书12页

序列表7页

(54) 发明名称

产生具有二碱基B链末端的胰岛素类似物的方法

(57) 摘要

本发明涉及产生胰岛素类型的方法,所述方法通过遗传改造胰岛素类型的前体并且将所述前体在与赖氨酸酰胺或精氨酸酰胺的酶催化的连接反应或者用经保护基修饰的赖氨酸或精氨酸的酶催化的连接反应中转化为各自的胰岛素,以及任选地随后水解。

1. 制备 Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) 人胰岛素的方法, 其中,
被酰胺化或用 Boc 保护基 C- 末端保护的精氨酸, 在具有胰蛋白酶的生物学活性的酶存在时被添加
到 Gly (A21), Arg (B31) 人胰岛素的 B 链的 C- 末端氨基酸上,
并且将得到的 Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) 人胰岛素纯化。
2. 权利要求 1 的方法, 还包括消除所添加的精氨酸的酰胺基团或 C- 末端 Boc 保护基。
3. 权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中 Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) 人胰岛素的 B 链的 C 末端被酰胺化。
4. 权利要求 1 所述的方法, 其中 Gly (A21), Arg (B31) 人胰岛素通过重组表达前体蛋白质来制备, 所述前体蛋白质包含 Gly (A21), Arg (B31) 人胰岛素的 A 链和 B 链。
5. 权利要求 4 所述的方法, 其中作为复制子一部分的基因被表达。
6. 权利要求 4 或 5 中任一项所述的方法, 其中使用细菌或酵母作为宿主细胞。
7. 权利要求 4 所述的方法, 其中前体蛋白质在表达后被分泌。
8. 权利要求 7 所述的方法, 其中前体蛋白质分离自细菌或酵母的细胞上清液。
9. 如权利要求 6 所述的方法, 其中前体蛋白质分离自细菌周质。
10. 权利要求 4 所述的方法, 其中对获得的前体蛋白质实施折叠过程和酶促切割。
11. 权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中 Gly (A21), Arg (B31) 人胰岛素通过重组定向表达制备。
12. 权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中具有胰蛋白酶生物学活性的酶选自人胰蛋白酶、猪胰蛋白酶、牛胰蛋白酶。
13. 权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中酶具有赖氨酰内肽酶活性。
14. 权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中 Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) 人胰岛素的 B 链的 C 末端随后在水解反应中被脱保护。

产生具有二碱基 B 链末端的胰岛素类似物的方法

[0001] 描述

[0002] 本发明涉及制备具有二碱基链末端的胰岛素的方法,这是通过生物技术制备其前体,以及随后在具有赖氨酸酰胺 (lysineamide) 或精氨酸酰胺 (arginineamide),或者由保护基修饰的赖氨酸或精氨酸的酶促催化连接反应中转化,以及任选地随后水解,以给出该胰岛素。

[0003] 世界上大约 1 亿 7 千 7 百万的人患有糖尿病。这包括大约 1 千 7 百万的 I 型糖尿病,对于这些患者而言,替换缺陷的内分泌的胰岛素分泌是现今唯一可能的治疗方法。这些受感染的患者终生依赖于一天通常几次的胰岛素注射。II 型糖尿病与 I 型糖尿病相反,不总是缺乏胰岛素,但是在很多病例中,特别是在晚期,用胰岛素治疗(根据需要与口服抗糖尿病药组合)被认为是最有利的治疗类型。

[0004] 在健康人中,胰岛素释放严格匹配血糖浓度。血糖水平升高(例如饭后发生的那些)由相应的胰岛素分泌升高来迅速补偿。在禁食状态中,血浆胰岛素水平下降到基线值以足以确保葡萄糖持续供应给胰岛素敏感性器官和组织以及在夜间保持低的肝葡萄糖产量。外源,通常皮下施用胰岛素代替内源胰岛素分泌一般无法接近上述血糖的生理调节质量。通常会过高或过低地调节血糖水平,其最严重的形式会威胁生命。但是,此外,常年的升高的血糖水平会产生(即使没有初始症状)相当大的健康风险。在美国大规模的 DCCT 研究(The Diabetes Control and Complications Trial Research Group(1993) N. Engl. J. Med. 329, 977-986)明确证明了长期升高的血糖水平充分作用于后期糖尿病并发症的发展。后期的糖尿病并发症以及在一些情形中的微血管和大血管损伤会表现为视网膜病变、肾病或神经病并且导致失明、肾衰竭以及截肢,并且与心血管病症的增加的危险相关。由此可以推断改进的糖尿病疗法的首要目的是将血糖尽可能接近地保持在生理范围内。强化胰岛素治疗策略希望通过一天几次注射速效和长效胰岛素制品来实现这一目标。在用餐时间给予速效制剂以补偿血糖的餐后升高。长效基础胰岛素希望确保胰岛素的基本供应,特别是在夜间,同时避免导致低血糖。

[0005] 胰岛素是包含 51 个氨基酸的多肽,所述氨基酸被分成 2 个氨基酸链:具有 21 个氨基酸的 A 链和具有 30 个氨基酸的 B 链。所述链由 2 个二硫桥连接在一起。已经使用了很多年的胰岛素制品用于糖尿病治疗。此外,不仅使用了天然存在的胰岛素,最近也使用了胰岛素衍生物和类似物。

[0006] 胰岛素类似物是天然存在的胰岛素(即人胰岛素或动物胰岛素)的类似物,其与相应(或者完全相同)的天然存在的胰岛素的不同之处在于由其它氨基酸残基替换了至少一个天然存在的氨基酸残基和/或添加/缺失了至少一个氨基酸残基。例如 US 5,656,722 描述了 des-Phe^(B1)-胰岛素衍生物。已经添加的和/或替换的氨基酸残基也可以是天然不存在的氨基酸残基。

[0007] 胰岛素衍生物是天然存在的胰岛素或胰岛素类似物的衍生物,其中已经由官能团替换了一个或多个氨基酸残基和/或 A 和/或 B 链的 N 或 C 末端。官能团选自酰胺残基、胺残基、羧基残基、烷基残基、醇残基和烷氧基残基。

[0008] 有效的胰岛素疗法使用所谓的基本胰岛素。这意思是使得缓慢持续释放外源施用的胰岛素成为可能的制剂。以这种方式,在漫长的时期内达到体内的基线胰岛素浓度,其对于患有糖尿病的患者生理病况有有利影响。

[0009] 关于这一点,重组胰岛素类似物 Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) 人胰岛素(甘精胰岛素)是著名的,因为仅需要每 24 小时供应给机体——即仅一天一次——以实现基础作用。一天一次施用改善了生活质量。改善的生理状况导致例如 HbA1c 水平的减少并且可以预期由于该改善,使得即使有糖尿病的后遗症,也会相当的靠后,从而使得可能延长相关的糖尿病患者的预期寿命。

[0010] 对于该胰岛素类似物的要求是相当高的。由于糖尿病患者的数量持续增加,有更多的经济兴趣来减少制备相应类似物的花费。US 5,656,722 描述了通过前胰岛素原融合蛋白的可能的胰岛素类似物的制备,所述前胰岛素原融合蛋白由融合部分(“前部分”)和猴的胰岛素原变体组成。描述的类似物之一在第 A(21) 位包含甘氨酸而非天冬酰胺。相应的融合蛋白是用于制备甘精胰岛素的肽前体变体。方法提供了通过与胰蛋白酶反应来从该融合蛋白缺失前部分和 C 肽。EP-A 0 668 292 描述了这样的融合蛋白,其按照相同的原理,但是允许甘精胰岛素通过优于 US 5,656,722 的方法来制备。就此而言,本领域技术人员很清楚特别是在胰岛素 B 链和 C 链的边界处部分切割是可能的,所述边界是由二碱基结构 Arg-Arg 所定义的,并且所述部分切割产生了 B31 单-arg 人胰岛素类似物。必需从实际的目的化合物中移除这一错误的产物。这导致显著的产量损失。可以如下避免该问题:重组制备胰岛素原以及其与特异性内切蛋白酶(例如赖氨酰内肽酶)的反应,以及将得到的 des-B30 人胰岛素(类似物)在半合成肽化学方法中与三肽 Thr-Arg-Arg 反应。EP-A 0 132 769 和 WO 2003/044210 描述了在反应过程中保护三肽反应基团的需要。反应后消除保护基。伴随这一途径的花销是由于化学合成制备三肽和引入保护基。因此,希望有这样的方法,其允许待制备的 Arg(B31), Arg(B32)-胰岛素类似物来自 Arg(B31) 人胰岛素前体。

[0011] 德国专利申请号 No. 10 2005 046 113.1(未公开)描述了这样的方法,其包括具有 C-末端酰胺化的氨基酸被胰蛋白酶催化地连接到其 C 末端氨基酸由赖氨酸或精氨酸组成的肽上。在该情形中观察到的产量令人惊讶地很高并且此外可能不用带上保护基来实施该偶联反应。该反应在非水性介质中发生。现在已经令人惊讶地发现精氨酸酰胺或赖氨酸酰胺与 B31 胰岛素类似物的偶联可能具有高产量。还可能令人惊讶地控制反应因此优先形成 Arg(B31), Arg(B32)-人胰岛素酰胺形式的胰岛素类似物或者 Arg(B31), Lys(B32)-人胰岛素酰胺形式的类似物。而且该产量大于 60%。可以通过反应结束时的酸性水解来消除酰胺基。同样令人惊讶地发现作为赖氨酸酰胺或精氨酸酰胺的备选物在反应中使用可能具有保护基的精氨酸或赖氨酸是可能的。可以作为实例提及的保护基为叔丁氧羰基(Boc)或二甲氧基苯基丙基氧基羰基(DZZ)。由于在文献中有描述,特别地,被保护的精氨酸衍生物可以在多种溶剂中是不稳定的,本领域技术人员很清楚会继续发展出在肽化学中具有改善的稳定性作用的新的保护基。通过根据保护基或酰胺基团改变反应条件来对产量产生正面影响是可能的。这是本领域技术人员熟知的并且本发明也涉及此。在从前胰岛素原前体中制备甘精胰岛素或相当的 Arg(B31), Arg(B32)-胰岛素类似物中(US 5,656,722)部分切割产物 B(31) 人胰岛素因此有效用于制备有价值的产物。在该情形中,相应的融合蛋白不需要细胞内制备。本领域技术人员很清楚也可以通过细菌表达,然后分泌到周质和/或分泌到

培养上清液中来制备胰岛素原类似物。欧洲专利申请 EP-A 1 364 029 通过实施例描述了这一方法。本发明还涉及使用 Arg(B31)-人胰岛素前体,其在从此类细菌方法表达后直接产生。

[0012] 此外,本发明同样涉及方法的另一技术方面。欧洲专利申请 EP-A 0 347 781,以及欧洲专利申请 EP-A 1 364 030 和 EP-A 1 364 032 描述了用于制备高产量微小胰岛素原(miniproinsulin)的基于酵母的方法。扩展此类方法或类似的方法以制备微小胰岛素原允许这些微小胰岛素原在切割成二-链胰岛素后被立即转化成 Arg(B31), Arg(B32)-胰岛素类似物,所述微小胰岛素原在第 A21 位具有在美国专利 5,656,722 中描述的氨基酸残基,即 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Met、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asp 或 Glu。

[0013] 如果如 EP-A 1 364 032 中所述的,通过融合蛋白发生表达,最好不用胰蛋白酶或类似的内切蛋白酶消除前部分。相反,掺入为不切割胰岛素衍生物的特异性内切蛋白酶所识别的切割位点,来适当地消除前或融合部分。以实例方式提及了肠激酶(DDDDK)或 Xa 因子(IEGR)。本发明也涉及此。而且技术人员清楚可以在一锅反应中进行这两个切割反应。另一可能性是仅在随后的步骤中消除融合部分。在该情形中,可以将融合蛋白部分选为大量有效分泌的蛋白质的衍生物。对于细菌可以提及的实例是 DHFR(二氢叶酸还原酶)、谷胱甘肽 S-转移酶和蛭素。可以用于酵母分泌的实例是清蛋白或其衍生物、超氧化物歧化酶或其衍生物、白细胞介素 2 或其衍生物,以及蛭素或其衍生物。在本申请中,例如,蛭素衍生物被用作融合部分用于细菌表达和用于酵母表达。关于这一点已经令人惊讶地发现,可以进一步通过引入连续的组氨酸的肽序列和/或 DDDDK 肽序列(代表肠激酶的识别位点)来修饰蛭素序列,而不会负面影响微小胰岛素原部分的折叠。因此亲和层析的方法可以是有效的。本发明也涉及此。

[0014] 本领域技术人员还熟知下述事实:即举例描述的表达系统仅代表一小部分的开发用于蛋白质的重组制备的宿主/载体系统。允许制备靶肽的宿主/载体系统因此也构成了本发明的部分。

[0015] 本发明因此涉及制备胰岛素类似物,其特征在于存在氨基酸残基 Arg(B31), Arg(B32) 或 Arg(B31), Lys(B32), 所述氨基酸残基来自与精氨酸或赖氨酸经由胰蛋白酶催化连接的类似物的 Arg(B31)-人胰岛素前体。就此而言,本领域技术人员很清楚,由于反应的令人惊讶的选择性,也可以在多个反应循环中重复连接反应,从而使得可获得在第 B31 位和 B32 位之外具有另一碱性氨基酸赖氨酸或精氨酸的胰岛素类似物。这通过以下来实现:进行偶联反应、脱酰胺化或脱保护末端氨基酸,并且在适当的后续反应循环中再次使用该产物。此类产物同样可以通过使用已经具有 Arg(B31), Arg(B32) 或 Arg(B31), Lys(B32) 的类似物作为前体来获得。同样可能制备在 B31 位及其后包含任何遗传可编码的氨基酸的类似物,其在序列上不必是精氨酸或赖氨酸,但是其 C-末端的特征在于二碱基序列 Arg-Arg、Arg-Lys、Lys-Lys 或 Lys-Arg。而且该反应不限于使用胰蛋白酶作为催化剂。本领域技术人员了解,除了已知的可商购大鼠、牛、猪或人胰蛋白酶或其它同功酶或其衍生物或变体外,也可能使用下列酶:组织蛋白酶、来自尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和来自链霉菌属(*Streptomyces*)(灰色链霉菌(*S. griseus*)、脱叶链霉菌(*S. exfoliatus*)、红霉素链霉菌(*S. erythraeus*)、弗氏链霉菌(*S. fradiae*)和微白黄链霉菌(*S. albidoflavus*))的胰蛋白酶、类胰蛋白酶、mastin、顶体蛋白、激肽释放酶、hepsin、前列腺蛋白酶 I(prostasin

I)、赖氨酰内肽酶(溶素-C)和内切蛋白酶 Arg-C(梭菌蛋白酶)。

[0016] 本发明因此涉及制备胰岛素类似物或其衍生物的方法,其中,

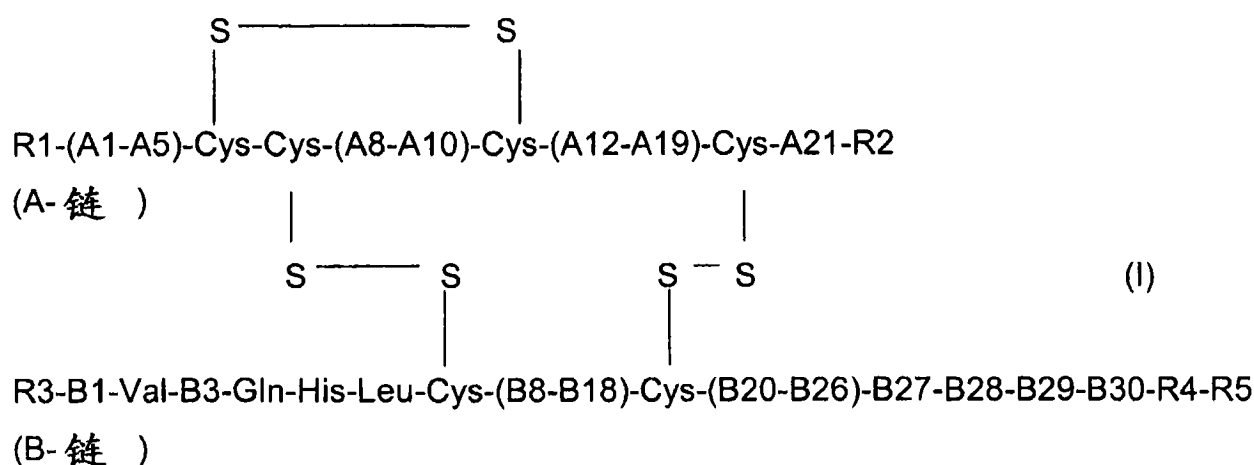
[0017] 被酰胺化或用保护基 C- 末端保护的天然存在的碱性氨基酸或包含天然存在的碱性氨基酸或其类似物或衍生物并且 C- 末端被酰胺化或者用保护基保护的肽,在具有胰蛋白酶的生物学活性的酶存在时被添加

[0018] 到其 A 和 / 或 B 链的 C- 末端氨基酸选自天然存在的、碱性氨基酸或其类似物或衍生物的初始胰岛素类似物或其衍生物上,到所述 C- 末端氨基酸之一上,

[0019] 并且将得到的经修饰的胰岛素类似物纯化并且任选地消除所添加的氨基酸或所添加的肽的酰胺基团或 C- 末端保护基。

[0020] 本发明还涉及上述方法,其中胰岛素类似物的特征在于通式 I:

[0021]



[0022] 其中含义是

[0023] (A1-A5) 人胰岛素或动物胰岛素的 A 链第 A1 至 A5 位中的氨基酸残基,

[0024] (A12-A19) 人胰岛素或动物胰岛素的 A 链第 A12 至 A19 位中的氨基酸残基,

[0025] A21 天然存在的氨基酸残基,

[0026] (B8-B18) 人胰岛素或动物胰岛素的 B 链的第 B8 至第 B18 位中的氨基酸残基,

[0027] (B20-B26) 人胰岛素或动物胰岛素的 B 链的第 B20 至第 B26 位中的氨基酸残基,

[0028] (A8-A10) 人胰岛素或动物胰岛素的 A 链第 A8 至 A10 位中的氨基酸残基,

[0029] B30 化学键或天然存在的氨基酸残基,

[0030] B1 化学键或天然存在的氨基酸残基,

[0031] B3 天然存在的氨基酸残基,

[0032] B27、B28

[0033] 和 B29 天然存在的氨基酸残基,

[0034] R1 氨基或 1 至 3 个天然存在的氨基酸残基,

[0035] R2 羧基或 1 至 3 个天然存在的氨基酸残基,

[0036] R3 氨基或 1 至 3 个天然存在的氨基酸残基,

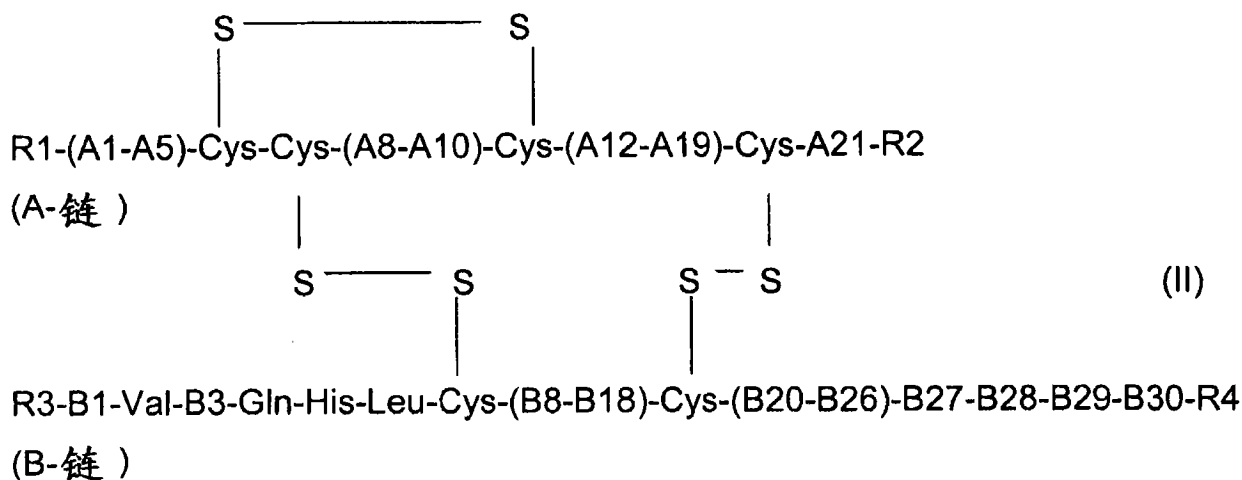
[0037] R4 化学键或 1 至 3 个天然存在的氨基酸残基,其中 C- 末端存在的氨基酸残基代表碱性氨基酸,

[0038] R5 1 或 2 个碱性氨基酸残基,其 C 末端是自由的或酰胺化的,

[0039] 其中其 C 末端与 R5 的 N 末端相连的氨基酸残基选自天然存在的碱性氨基酸。

[0040] 本发明还涉及上述方法,其中初始胰岛素类似物特征在于通式 II

[0041]



[0055] 本发明还涉及通过上述方法可获得的胰岛素类似物或其衍生物,所述胰岛素类似物或其衍生物的 A 和 / 或 B 链的 C 末端氨基酸被酰胺化。

[0056] 下面通过一些方法实施例更详细地解释了本发明。这些方法实施例没有限制作用。

[0057] 实施例 1:在体外折叠后从融合蛋白制备 Arg(B31), Gly(A21) 胰岛素。

[0058] 美国专利 5,663,291 在其中的实施例 1 中描述了获得下述结构的正确折叠的胰岛素融合蛋白。

[0059] MATTSTGNSA RFVNQHLCGS HLVEALYLVC GERGFFYTPK TRREAEDPQV

[0060] GQVELGGGPG AGSLQPLALE GSLQKRGIVE QCCTSICSLY QLENYCG (SEQ ID NO. :1)

[0061] 根据美国专利 5,227,293 的实施例 V,通过与胰蛋白酶反应,将这一材料转化成二-链胰岛素,并且分离 Arg(B31), Arg(B31), Gly(A21) 胰岛素和 Arg(B31), Gly(A21) 胰岛素。

[0062] 因此可能直接获得 Arg(B31), Arg(B31), Gly(A21)-胰岛素类似物,尽管在与经修饰的精氨酸或赖氨酸的胰蛋白酶催化的连接中可以使用 Arg(B31), Gly(A21) 副产品作为前体。

[0063] 实施例 2:从通过分泌获得并且包含正确折叠的胰岛素原的融合蛋白制备 Arg(B31), Gly(A21) 胰岛素。

[0064] 作为实施例 1 的备选,也可以通过在细菌系统中分泌制备融合蛋白。在这一情形中,作为融合蛋白部分的胰岛素原结构被正确折叠,并且可以省却“体外”重折叠步骤。专利申请 WO 02/068660 建议了这一类型的系统。例如,如果在该国际专利申请的实施例 1 中描述的质粒 pBpfuHir_Ins 中将 Asn(A21) 的密码子替换成 Gly(A21) 的密码子,结果是这样的融合蛋白,从其中可以获得甘精胰岛素(作为举例),而且可以分离 Arg(B31), Gly(A21) 人胰岛素作为副产品,如实施例 1 中所述的。

[0065] 为了制备该序列,需要具有下述结构的新引物 insu_a21_gly_rev: 5' -TTTTTTAAGCTTGTCTGACTCATTAGCC GCAGTAGTTCTCCAGCTG-3' (SEQ ID NO. :2)

[0066] 与专利申请 WO 02/068660 类似使用该引物,在 PCR 中在质粒 pBpfuHir_ins 的 DNA 上用引物 pfu1。可以从 PCR 产物分离能够根据专利申请 WO 02/068660 的实例克隆的 BamH1/Hind3 片段。在表达后,分离融合蛋白并且根据本申请的实施例 1 进一步对其进行处理。

[0067] 本领域的技术人员很清楚也可以通过融合蛋白的细菌分泌直接获得前体 Arg(B31), Gly(A21) 人胰岛素。本发明也涉及此。

[0068] 实施例 3:通过与精氨酸酰胺偶联从 Arg(B31), Gly(A21)-前体制备 Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21)-胰岛素。

[0069] 将 100mg 的 21A-Gly-30B(L-Arg-胰岛素)溶解在 0.95ml 的精氨酸酰胺溶液中(446g/L),并且添加 0.13ml 的 M 乙酸钠缓冲液(pH5.8)和 2ml 的 DMF。将反应混合物冷却到 12°C 并且通过添加 0.094ml 的胰蛋白酶(0.075mg,罗切诊断公司(Roche Diagnostics))来起始。

[0070] 在 8 小时后,通过添加 TFA 至 pH2.5 将反应终止,并且通过 HPLC 分析。形成 > 60% -Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) 人胰岛素。添加胰蛋白酶抑制剂溶液,然后与 US

5, 656, 722 类似纯化酰胺化类似物。然后在存在酸时将酰胺化胰岛素类似物水解几小时以给出 Arg(B31), Arg(B32), -Gly(A21) 人胰岛素。

[0071] 实施例 4: 通过与赖氨酸酰胺偶联从 Arg(B31), Gly(A21) 人胰岛素前体制备 Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) 人胰岛素。

[0072] 将 100mg 的 21A-Gly-30B(L-Arg- 胰岛素) 溶解在 0.93ml 的赖氨酸酰胺溶液 (400g/L) 中, 并且添加 0.13mL 的 M 乙酸钠缓冲液 (pH5.8) 和 2ml 的 DMF。将反应混合物冷却到 12°C 并且通过添加 0.094ml 的胰蛋白酶 (0.075mg, 罗切诊断公司 (Roche Diagnostics)) 来起始。

[0073] 在 8 小时后, 通过添加 TFA 至 pH2.5 将反应终止, 并且通过 HPLC 分析。形成 Arg(B31), Lys(B32)-NH₂, Gly(A21) 人胰岛素并且与 US 5, 656, 722 类似在添加胰蛋白酶抑制剂溶液后将其纯化。然后在存在酸时将酰胺化胰岛素类似物水解几小时以给出 Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) 人胰岛素。

[0074] 实施例 5: 通过与 H-Arg(Boc)2-OH 偶联从 Arg(B31), Gly(A21) 前体制备 Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21)- 胰岛素

[0075] 将 0.25mg 的 Arg(B31), Gly(A21) 人胰岛素在 Eppendorf 容器中与 11 μl 的 0.1M 乙酸吡啶 (pyridine acetate) 缓冲液 (pH5.6)、60 μl 的 130g/L 的在 0.1M 乙酸吡啶缓冲液 (pH5.6) 中的 H-Arg(Boc)2-OH x HCl 的溶液以及 119 μl 的 DMF 混合, 并且在 12°C 与胰蛋白酶 (罗切诊断公司 (RocheDiagnostics)) 孵育数小时。

[0076] 将反应通过添加 25% 的水、25% 的乙腈和 50% 的三氟乙酸的混合物来终止。将混合物冻干, 消除保护基, 溶解在 1ml 的 TFA 中, 并且在室温下静置大约 3 小时。通过举例, 与 US 5, 656, 722 类似进行 Arg(B31), Arg(B32)-NH₂, Gly(A21) 人胰岛素的纯化。

[0077] 实施例 6: 通过与 H-Lys(Boc)-OtBu 偶联从 Arg(B31), Gly(A21) 前体制备 Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) 胰岛素

[0078] 将 50mg 的 Arg(B31), -Gly(A21) 人胰岛素溶解在 0.62ml 的 H-Lys(Boc)-OtBu 溶液 (0.5g/mL, pH5) 中, 并且添加 1ml 的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。将混合物冷却到 12°C 并且添加 2mg 的胰蛋白酶 (罗切诊断 (Roche Diagnostics))。

[0079] 在超过 10 个小时后, 通过添加 2ml 的 50% 强度的乙腈 / 水混合物和 1ml 的 TFA(100%) 来终止反应。将混合物冻干, 并且消除 Boc 保护基, 溶解在 1ml 的 TFA 中, 并且室温下静置约 3 小时。例如, 与 US 5, 656, 722 类似地, 进行 Arg(B31), Lys(B32), OH 纯化。

[0080] 实施例 7: 用于通过面包酵母分泌蛭素 Arg(B31), Gly(A21) 胰岛素融合蛋白的基因序列

[0081] 专利申请 EP-A 1 364 032 提出了蛭素作为融合伙伴蛋白用于在酵母中表达和分泌有价值的其它可药用目的蛋白的用途。

[0082] 专利申请 EP-A 1 364 032 的实施例 1 描述了用于制备融合蛋白的宿主-载体系统, 所述融合蛋白由蛭素衍生物和微小胰岛素原组成。该系统可以用于例如通过 US 5, 656, 722 中描述的氨基酸制备微小胰岛素原, 其第 A21 位为氨基酸天冬酰胺。

[0083] 与专利申请 EP-A 1 364 032 的实例类似地, 构建表达载体, 如果引物 insncolrev 被替换并且被设计使得第 A21 位密码子被改变。

[0084] 为了制备编码 Arg(B31), Gly A(21) 人胰岛素的序列, 例如合成下列引物:

[0085] ins_gly_a21_rev

[0086] 5'-TTTTTCCATGGGTCGACTATCAGCCACAGTAGTTTCCAGCTGG-3' (SEQ ID NO. :3)

[0087] 在该情形中引物完全覆盖编码胰岛素类似物的氨基酸 A15-A21 的基因区段。将本引物与来自所述申请实施例 1 的 SEQ ID NO :4 的引物组合,并且使用质粒 pADH2Hir_ins 作为模板,允许通过 PCR 生成 DNA 片段,所述 DNA 片段在用限制酶 KpnI 和 NcoI 消化后,被插入到相应打开的表达载体中并且包含想要的融合蛋白。

[0088] 载体被称作 pADH2Hir_ins_glyA21。根据专利申请 EP-A 1 364 032 表达并且处理融合蛋白,以给出 Gly (A21)-微小胰岛素原,其根据实施例 2 被转化为 Arg (B31),Lys (B32), Gly (A21) 人胰岛素。

[0089] 实施例 8 :用于通过面包酵母直接分泌 Arg (B31), Gly (A21) 前体的基因序列

[0090] 描述在实施例 7 中的质粒 pADH2Hir_ins_glyA21 的 DNA 被用于制备用来直接分泌 Arg (B31), Gly A (21) 人胰岛素的载体构建体。

[0091] 合成下列引物。

[0092] α _insf1

[0093] 5' -TTTTTGGATCCTTTGGAATAAAAGATTTGTTAACCAACACTTGTGTG-3' (SEQ ID NO. : 4)

[0094] 其覆盖 α -因子的 C 末端 (Lys-Arg 的密码子) 和微小胰岛素原序列的 N-末端的序列。

[0095] ins_gly_rev2

[0096] 5' -TTTTTCCAT GGGTCGCTAT CAGCCACAGT AGTTTCCAG CTGG-3' (SEQ ID NO. :5)

[0097] 引物与克隆到质粒 pADH2Hir_ins_glyA21 中的胰岛素类似物序列的 3' 端杂交。PCR (标准条件) 生成 DNA 片段,所述 DNA 片段在用限制酶 KpnI 和 NcoI 消化后,被插入到对应打开的表达载体中并且包含想要的融合蛋白。转化酵母菌株 Y79 的感受态细胞。随后按照实施例 7 所述表达转化体。通过已知方法 (EP-A 0 229 998) 分离 Arg (B31), Gly (A21)-微小胰岛素原,并且将其如实施例 2 所述转化为 Arg (B31), Lys (B32), Gly (A21) 人胰岛素。

[0098] 实施例 9 :用于通过巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris) 分泌蛭素 -Arg (B31), Gly (A21) 人胰岛素融合蛋白的基因序列

[0099] 与专利申请 EP-A 1 364 032 的实施例 4 类似进行表达载体的克隆。在本案中使用引物 ins_gly_rev2 而非序列引物 pichia_H_Irev2,所述 ins_gly_rev2 引物随后使得用 PCR 产物表达 Gly (A21) 人胰岛素成为可能 :

[0100] 5' -TTTTTGGCGCCGAATTCCTACTATTAGCCACAGTAGTTTCCAGCTGG-3' (SEQ ID NO. : 6)

[0101] 得到的质粒被称作 pPich_Hir_ins-GlyA21。如所述纯化 Arg (B31), Gly (A21)-微小胰岛素原作为起始材料用于产生具有二碱基链末端的类似物。

[0102] 实施例 10 :用于通过巴斯德毕赤酵母直接分泌 Arg (B31), Gly (A21) 前体的基因序列

[0103] 类似于实施例 7 构建适当的表达载体。需要质粒 pPich_Hir_ins-GlyA21 和两条引物 pich_insgly_dirf 与 pich_insgly_dirrev 的 DNA。

[0104] pich_insgly_dirf

[0105] 5' -TTTTTCTCGAGAAAAGATTTGTTAACCAACACTTGTGTG-3' (SEQ ID NO. :7)

[0106] pich_insgly_dirrev

[0107] 5' -TTTTTT GGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCAC-3' (SEQ ID NO. :8)

[0108] 实施例 11 :从融合蛋白制备 Arg(B31), Gly(A21)-胰岛素, 所述融合蛋白通过酵母分泌获得, 包含正确折叠的胰岛素原, 并且其融合部分包含 His₆ 氨基酸序列

[0109] 质粒 pADH2Hir_ins_glyA21 的 DNA 作用为模板。合成两条引物:

[0110] α_LT_H6_hirf 和 α_LT_H6_hirrev

[0111] α_LT_H6_hirf1:

[0112] 5' -GCACCATCATCACCATCACTATACTGACTGCACTGAATC-3' (SEQ ID NO. :9)

[0113] 该引物包含 6 个串联的组氨酸以及 Refludan[®] 序列的氨基酸 3-8 和 9 (部分) 的密码子。

[0114] α_LT_H6_hirf2:

[0115] 5' -GAAGGGTACCTTTGGATAAAAGACTTACGCACCATCATCACCATCAC-3' (SEQ ID NO. :10)

[0116] 该引物包含串联的 6 个组氨酸的密码子、来匹卢定序列的氨基酸 1 和 2 和 α-因子序列 (包括 Lys-Arg 加工位点) 的密码子, 并且覆盖限制酶 KpnI 的识别位点。在标准 PCR 中, 质粒 pADH2Hir_ins_glyA21 的 DNA 作用为模板, 引物为 α_LT_H6_hirf1 和来自本申请实施例 7 的 ins_gly_a21_rev。分离反应产物并且将等分试样用作模板用于第二次 PCR, 其中引物为 α_LT_H6_hirf2 和 ins_gly_a21_rev。如所述用 KPN1 和 NcoI 加工反应产物, 然后克隆。结果是质粒 pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21; 然后用质粒的 DNA 转化 Y79, 表达融合蛋白。通过离心将细胞从上清液分离, 并且通过膜滤器 (例如来自萨图林公司 (Sartorius)), 然后通过 Ni²⁺ 亲和层析, 其后是 Invitrogen ProBond[™] 纯化系统的步骤来浓缩上清液。在通过透析和 / 或过滤或作为备选的凝胶过滤移除洗脱缓冲液后, 以已知方式处理融合蛋白以给出 Arg(B31), Gly(A21) 人胰岛素, 然后转化为甘精胰岛素。

[0117] 实施例 12 :从融合蛋白制备 Arg(B31), Gly(A21) 人胰岛素, 所述融合蛋白通过酵母分泌获得, 并且包含正确折叠的胰岛素原, 并且其融合蛋白用肠激酶消除

[0118] 质粒 pADH2Hir_ins_glyA21 的 DNA 用作为起始材料。使用来自本发明实施例 7 的引物 ins_gly_a21_rev 和来自申请 WO 02/070722 A1 的实施例 1 的 hirf1。为此目的, 制备两条新的引物:

[0119] Hir_entero_insf

[0120] 5' -CTTCAG GACGATGACGATAAATTTGTTAACCAACACTTGTGTGG-3' (SEQ ID NO. :11)

[0121] 引物覆盖微小胰岛素原序列的氨基酸 B1-B7 和 B8 (部分), 并且包含氨基酸序列 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 的密码子, 其代表肠激酶的识别位点。

[0122] Hir_entero_insrev

[0123] 5' -TTTATCGTCATCGTCCTGAAGGCTGAAGGTATTCCTCAGGG-3' (SEQ ID NO. :12)

[0124] 反向引物覆盖来匹卢定序列的氨基酸 60-65, 并且包含氨基酸序列 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO. :13) 的密码子, 其代表肠激酶的识别位点。首先用引物对 hirf1/Hir_entero_insrev 和 Hir_entero_insf/ins_gly_a21_rev 进行两个 PCR。分离

反应产物。混合材料的等分试样并且在第三个 PCR 中使用该混合物作为引物对 hirf1/ins_gly_a21_rev 的模板。如所述克隆反应产物。结果是载体 pADH2Hir_ins_glyA21。如所述制备融合蛋白。

[0125] 用肠激酶切割融合蛋白。该酶是可商购的。

[0126] 切割反应在肠激酶缓冲液 (20mM Tris/HCl, 50mM NaCl, 2mM CaCl₂ pH7.4) 中, 使用对应于特定厂商信息的一定量的酶进行。切割通常在移除宿主细胞以及后续工作组 (workup) 步骤后发生。但是, 在调整了最优反应条件后, 其也可以在发酵后在上清液中直接发生。

[0127] 实施例 13: 从融合蛋白制备 Arg (B31), Gly (A21) 人胰岛素, 所述融合蛋白已经通过酵母分泌获得, 并且包含正确折叠的胰岛素原, 并且其融合部分被用肠激酶消除并且包含多聚组氨酸序列。

[0128] 使用质粒

[0129] pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21 的 DNA 和引物 Hir_entero_insrev, Hir_entero_insf 和 ins_gly_a21_rev, 并且引物 hirf1 被具有下述序列的引物 α _lt_enterof 所替换:

[0130] 5' -GAAGGGGTACCTTTGGATAAAAG-3' (SEQ ID NO. :13)

[0131] 然后, 与实施例 12 类似, 构建载体 pADH2_LT_H6_Hir_etero_ins_glyA21, 其编码融合蛋白, 所述融合蛋白的蛭素融合部分从 N 末端第 3 位开始被 6 个组氨酸所延伸, 并且在 C 末端从第 72 位被序列 DDDDK (SEQ ID NO. :14) 所延伸。

[0132] 然后通过组合实施例 11 和 12 中描述的方法制备 Arg (B31), Gly (A21) 人胰岛素。

[0133] 实施例 14: 通过面包酵母分泌蛭素 des-Phe (B1), Arg (B31), Gly (A21) 胰岛素融合蛋白的基因序列

[0134] 类似于实施例 7 进行转化和表达。

[0135] 合成两条引物序列:

[0136] Desphef1:

[0137] 5' -CTTCAGGGAAATTCGGCACGAGTTAACCAACACTTGTGTGGTTC-3' (SEQ ID NO. :15)

[0138] 和 Desphe_rev1:

[0139] 5' -GAACCACACA AGTGTGTTGGTT AACTCGTGCC GAATTTCCCT GAAG-3' (SEQ ID NO. :16)

[0140] 来自实施例 7 的质粒 pADH2Hir_ins_glyA21 的 DNA 作用为模板。彼此独立进行两个聚合酶链式反应。在反应 1 中, 使用引物 Desphe_rev1 和来自申请 EP-A 1 364 032 的实施例 1 的引物 SEQ ID NO :4, 在反应 2 中使用来自本申请实施例 7 的 ins_gly_a21_rev 和引物 Desphef1。分离两个反应的反应产物并且在第三个反应中组合产物的等分试样, 将其用作引物对的模板, 所述引物对由来自申请 EP-A 1 364 032 的实施例 1 的引物 SEQ ID NO :4 和 ins_gly_a21_rev 组成。如实施例 7 中所述, 将第三个反应的反应产物克隆、转化并且表达。将得到的融合蛋白用作为起始材料用于制备相应的具有二碱基链末端的胰岛素类似物。

[0141] 实施例 15: 通过面包酵母分泌蛭素 Ala (B31), Arg (B32), Gly (A21) 胰岛素融合蛋白的基因序列。

[0142] 合成两条引物序列:

[0143] Ala_b31f1:

[0144] 5'-CTTCTACACTCCAAAGACGgctCGTGGTATCGTTGAACAATGTTG-3' (SEQ ID NO. :17)

[0145] 和 Ala_b31rev1 :

[0146] 5'-CAACATTGTT CAACGATACC ACGagcCGTC TTTGGAGTGT AGAAG-3' (SEQ ID NO. :18)

[0147] 来自实施例 7 的质粒 pADH2Hir_ins_glyA21 的 DNA 作用为模板。彼此独立进行两个聚合酶链式反应。在反应 1 中,使用引物 Ala_b31rev1 和来自申请 EP-A 1 364 032 的实施例 1 的引物 SEQ ID NO :4,在反应 2 中使用来自本申请实施例 7 的引物 ins_gly_a21_rev 和引物 Ala_b31f1。分离两个反应的反应产物并且在第三个反应中组合产物的等分试样,将其用作引物对的模板,所述引物对由来自申请 EP-A 1 364 032 的实施例 1 的引物 SEQ ID NO :4 和 ins_gly_a21_rev 组成。如实施例 7 中所述,将第三个反应的反应产物克隆、转化并且表达。将得到的融合蛋白用作起始材料用于制备相应的具有二碱基链末端的胰岛素类似物。

[0148] 实施例 16 :通过面包酵母直接分泌 Lys (B31) 前体的基因序列合成两条引物 :

[0149] Lys_b31f

[0150] 5' -CTTCTACACTCCAAAGACGAAAGGTATCGTTGAACAATGTTG-3' (SEQ ID NO. :19)

[0151] 和 Lys_b31rev

[0152] 5' -CAACATTGTT CAACGATACC TTTCGTCTTT GGAGTGTAGA AG-3 (SEQ ID NO. :20)

[0153] 来自申请 WO 02/070722A1 的实施例 1 的质粒 pADH2Hir_ins 的 DNA 用作模板用于两个聚合酶链式反应。在反应 1 中,使用引物 Lys_b31f1 和 insncolrev (Seq ID NO :6,来自 WO 02/070722A1),并且在反应 2 中,使用引物 Lys_b31rev 和来自本申请实施例 7 的 α _insf1。进行标准反应并且分离得到的 PCR 片段。组合两次产物的等分试样并且将其用作模板用于第三个反应,其引物为 insncolrev 和来自 WO 02/070722A1 的 Seq ID NO :6。如实施例 8 所述克隆并且表达获得的 PCR 片段。结果是 Lys (B31)- 微小胰岛素原,用赖氨酰内肽酶将其转化成 B(1-29)-A(1-21) 分裂胰岛素 (splitinsulin) 并且作为制备 B30- 精氨酸酰胺胰岛素或 B30 赖氨酸酰胺-胰岛素的中间体,所述 B30- 精氨酸酰胺胰岛素或 B30 赖氨酸酰胺-胰岛素可以随后被转化为各自的二碱基类似物。

[0154] 实施例 17 :用赖氨酰内肽酶切割

[0155] 如 DE3844211 所述,将胰岛素前体与赖氨酰内肽酶 (LEP) 反应 (实施例 1)。为此目的,将 10mg 的 Lys (B31)- 微小胰岛素原溶解在 Tris 缓冲液 (pH8.0) 中,并且添加来自产酶溶杆菌 (*Lysobacter enzymogenes*) 的 LEP (0.01ml 的浓度为 1mg/ml 的水中的溶液,默克生物科学公司 (Merckbiosciences))。在室温温育 2 小时,并且通过 RP-HPLC (Nucleosil 120-5 柱) 纯化。结果是 B(1-29)-A(1-21) 分裂胰岛素。

[0156] 实施例 18 :通过与精氨酸酰胺偶联从 B(1-29)-A(1-21) 分裂胰岛素前体制备 Arg (B30)- 胰岛素。

[0157] 将 100mg 的 B(1-29)-A(1-21) 分裂胰岛素溶解在 0.95ml 的精氨酸酰胺溶液 (446g/L) 中,并且添加 0.13ml 的 M 乙酸钠缓冲液 (pH5.8) 和 2ml 的 DMF。将反应混合物冷却至 12°C 并且通过添加 0.094ml 的胰蛋白酶 (0.075mg, 罗切诊断公司 (Roche Diagnostics)) 来起始。

[0158] 在 8 小时后,通过添加 TFA 至 pH2.5 将反应终止,并且通过 HPLC 分析。形成 >

60% -Arg(B30)-胰岛素酰胺。添加胰蛋白酶抑制剂溶液,然后与 US5,656,722 类似纯化酰胺化类似物。然后在存在酸时将酰胺化胰岛素类似物水解几小时以给出 Arg(B30) 胰岛素,或者该酰胺可以直接用作为药物。

[0159] 实施例 19:通过与赖氨酸酰胺偶联从 B(1-29)-A(1-21) 分裂胰岛素前体制备 Lys(B30)-胰岛素。

[0160] 将 100mg 的 B(1-29)-A(1-21) 分裂胰岛素溶解在 0.93ml 的赖氨酸酰胺溶液 (400g/L) 中,并且添加 0.13mL 的 M 乙酸钠缓冲液 (pH5.8) 和 2ml 的 DMF。将反应混合物冷却到 12℃ 并且通过添加 0.094ml 的胰蛋白酶 (0.075mg, 罗切诊断公司 (Roche Diagnostics)) 来起始。在 8 小时后,通过添加 TFA 至 pH2.5 将反应终止,并且通过 HPLC 分析。形成 Lys(B30)-胰岛素酰胺并且与 US 5,656,722 类似在添加胰蛋白酶抑制剂溶液后将其纯化。然后在存在酸时将酰胺化胰岛素类似物水解几小时以给出 Lys(B30)-胰岛素,或者直接将其用作药物。

序列表

<110> 塞诺菲 - 安万特德国有限公司 (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH)

<120> 产生具有二碱基 B 链末端的胰岛素类似物的方法

<130>DE2006/025

<140>10 2006 031 955.9

<141>2006-07-11

<160>20

<170>PatentIn 版本 3.3

<210>1

<211>97

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 胰岛素融合蛋白

<400>1

Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	Arg	Phe	Val	Asn	Gln	His
1				5					10					15	
Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu
			20					25					30		
Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Arg	Arg	Glu	Ala	Glu	Asp	Pro
		35					40				45				
Gln	Val	Gly	Gln	Val	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Ser	Leu
	50					55				60					
Gln	Pro	Leu	Ala	Leu	Glu	Gly	Ser	Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Val	Glu
65					70					75				80	
Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys
				85					90					95	
Gly															

<210>2

<211>45

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 insu_a21_gly_rev

<400>2

ttttttaagc ttgtcgactc attagccgca gtagttctcc agctg

45

<210>3

<211>45

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 ins_gly_a21_rev

<400>3

ttttttccat gggtcgactatcagccacag tagttttcca gctgg

45

<210>4

<211>48

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 α _insf1

<400>4

ttttttggat ccttttggat aaaagatttg ttaaccaaca cttgtgtg

48

<210>5

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 ins_gly_rev2

<400>5

ttttttccat gggtegctat cagccacagt agttttccag ctgg

44

<210>6

<211>49

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 ins_gly_rev2

<400>6

tttttggcgc cgaattcact actattagcc acagtagttt tccagctgg

49

<210>7

<211>40

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 pich_insgly_dirf

<400>7

ttttttctcg agaaaagatt tgttaaccaa cacttggtgtg

40

<210>8

<211>33

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 pich_insgly_dirrev

<400>8

ttttttggcg ccgaattcactactattagc cac

33

<210>9

<211>39

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 α _LT_H6_hirf1

<400>9

gcaccatcatcaccatcact atactgactg cactgaatc

39

<210>10

<211>48

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 α _LT_H6_hirf2

<400>10

gaaggggtac ctttgataa aagacttacg caccatcatc accatcac

48

<210>11

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Hir_entero_insf

<400>11

cttcaggacg atgacgataa atttggttaac caacacttggtg

44

<210>12

<211>41

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Hir_entero_insrev

<400>12

tttatcgtea tcgtcctgaa ggctgaaggt attcctcagg g

41

<210>13

<211>23

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 α _lt_enterof

<400>13

gaaggggtac ctttgataa aag

23

<210>14

<211>5

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 识别序列

<400>14

Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210>15

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Desphef1

<400>15

cttcagggaattcggcacg agttaaccaa cacttggtgtg gttc

44

<210>16

<211>44

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Desphe_rev1

<400>16

gaaccacaca agtggttggtt aactcgtgcc gaatttcct gaag 44

<210>17

<211>45

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Ala_b31f1

<400>17

cttctacact ccaaagacgg ctctgtgtat cgttgaacaa tggtg 45

<210>18

<211>45

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Ala_b31rev1

<400>18

caacattggtt caacgatacc acgagccgtc tttggagtgt agaag 45

<210>19

<211>42

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Lys_b31f

<400>19

cttctacact ccaaagacga aaggatcgt tgaacaatgt tg 42

<210>20

<211>42

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 Lys_b31rev

<400>20

caacattggt caacgatacc ttctgtcttt ggagtgtaga ag 42