〔19〕中华人民共和国专利局

〔11〕公开号 CN 1045793A

〔12〕发明专利申请公开说明书

〔21〕申请号 90101564.4

〔51〕Int.Cl⁵
C07K 7/40

〔43〕公开日 1990年10月3日

〔22〕申请日 90.3.19

〔30〕优先权

〔32〕89.3.20 〔33〕DK 〔31〕1341/89

〔71〕申请人 洛沃工业公司

地址 丹麦鲍斯韦

〔72〕发明人 佩·巴尔·施米特

芬恩·贝内德·汉森

〔74〕专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 曹恒兴

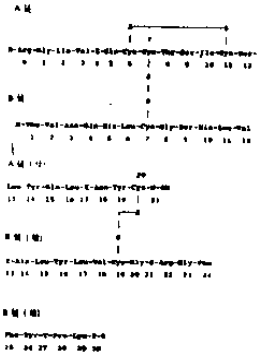
说明书页数: 25 附图页数: 3

〔54〕发明名称 新的胰岛素化合物及其制备方法

〔57〕摘要

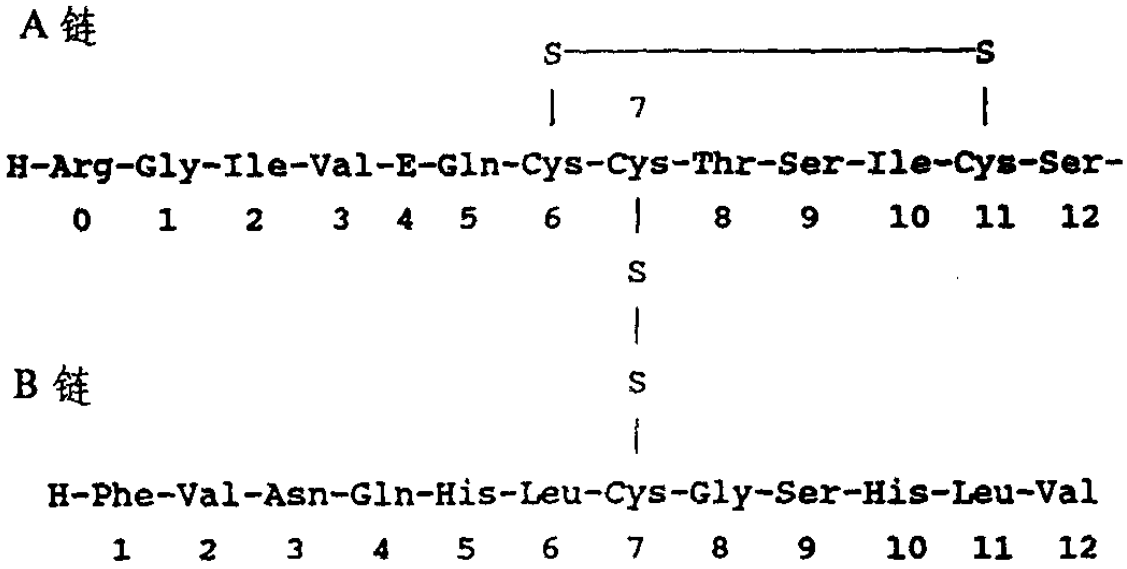
本发明提供了新的具有理想的胰岛素作用和/或抗原性的胰岛素化合物。

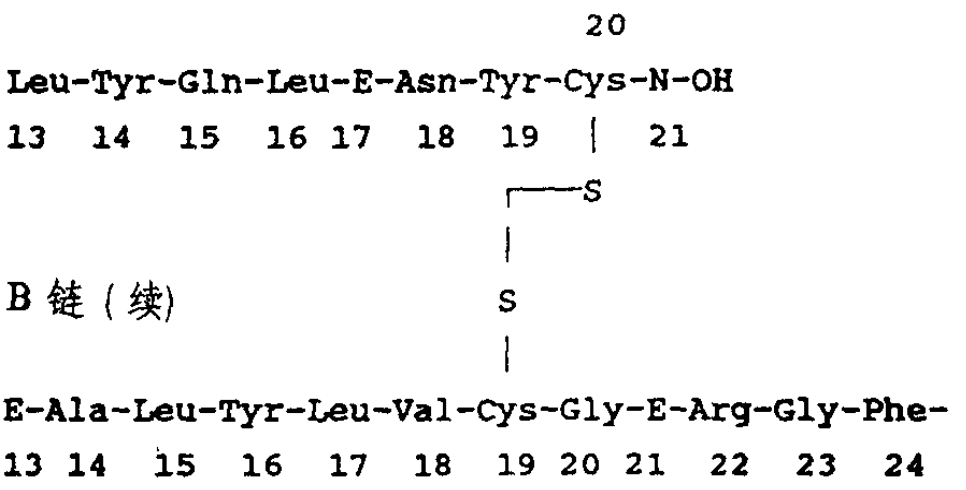
新的胰岛素化合物用式Ⅱ表示，式中 E，N，R，R^1，R^2，T，X 和 Y 的含意与说明书中所述相同。



权　利　要　求　书

1．制备胰岛素制剂的方法，包括将作为活性组份的通式II的至少一种胰岛素化合物溶解在与血清相等渗压的水介质中，溶液的pH值为2至5.5，





B 链（续）

Phe-Tyr-T-Pro-Lys-X-Y
25 26 27 28 29 30

式中E 各表示Glu 或能由核苷酸顺序编码的天然氨基酸残基，

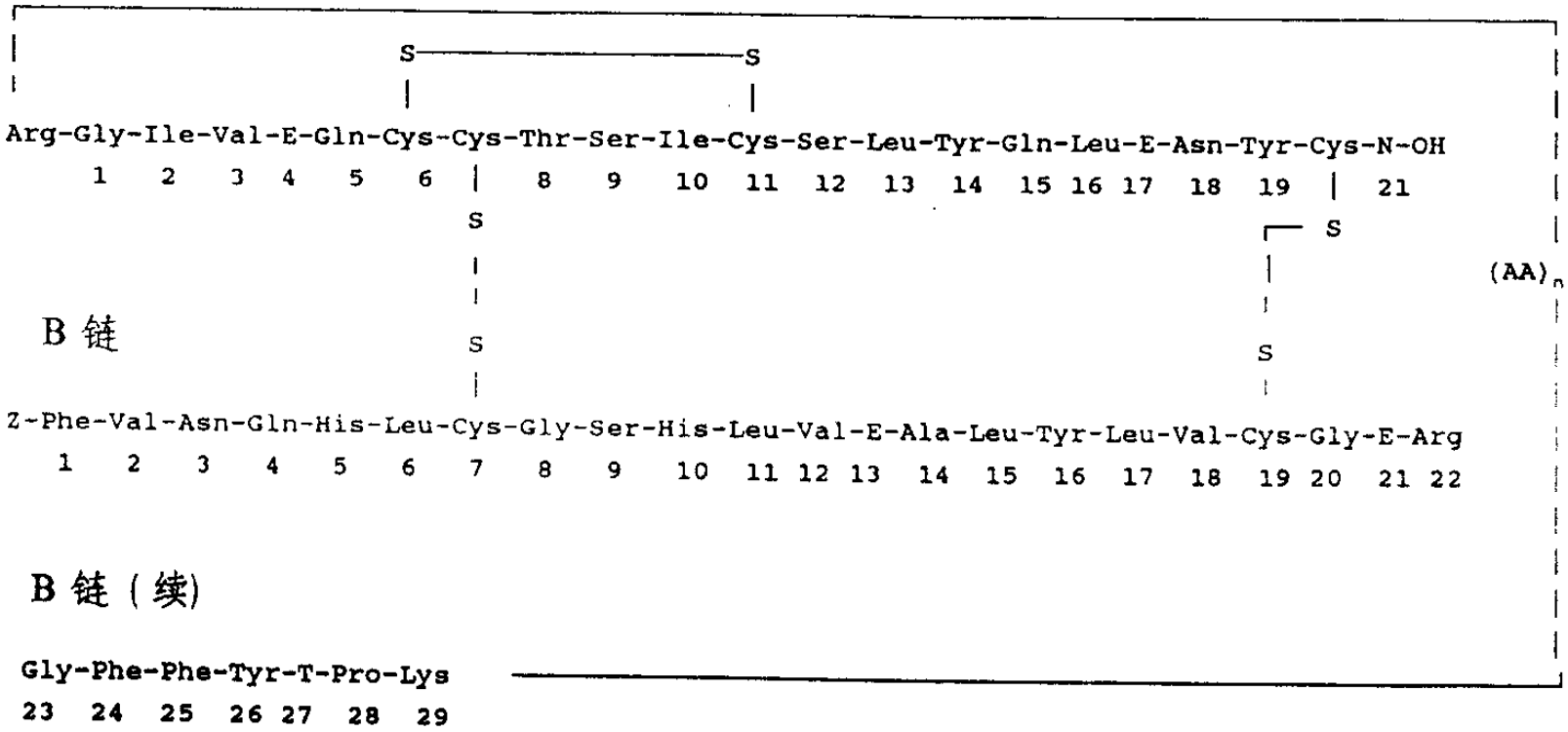
N 表示能由核苷酸顺序编码的氨基酸残基，

T 表示Thr 或Arg ，

X 表示Thr ，Ser ，Ala 或OH，

Y 表示OR或NR^1R^2 ，其中R，R^1和R^2各表示氢或低级烷基，但当X 表示OH时Y 不存在，

其中通式II的胰岛素化合物的制备方法包括将通式III的胰岛素前体通过转肽作用或由对赖氨酸残基的羧端裂解具有唯一特异性的肽链内切酶进行裂解，


S
S
Arg-Gly-Ile-Val-E-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-E-Asn-Tyr-Cys-N-OH
1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 21
S
S
S
S
(AA)n
B 链
Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-E-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-E-Arg
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
B 链 (续)
Gly-Phe-Phe-Tyr-T-Pro-Lys
23 24 25 26 27 28 29

式中E, N 和T 的含意如上所述,

(AA)n 表示具有C 端残基为Lys 和n 氨基酸残基的肽链, 或n=0 时表示肽键,

Z 表示氢或具有C 端残基为Lys 的任意长度的肽链。

2. 按权利要求1 的方法, 在制剂中可任意含有缓冲液和/ 或防腐剂和速效胰岛素。

3. 按权利要求2 的方法, 其中所述速效胰岛素系人胰岛素, 家畜胰岛素或它们的衍生物或类似物。

4. 按权利要求1 的方法, 其中式III中的E 各为Glu 或Gln , N 为Asn , Asp , Ser 或Gly , T 为Thr 或Arg , 制取X 为Thr 和Y 为NH_2 的式II胰岛素化合物。

5. 按权利要求1 的方法, 其中式III中的E 均为Glu , N 为Asn , T 为Thr , 制取X 为Thr 和Y 为NH_2 的式II胰岛素化合物。

6. 按权利要求1 的方法, 其中式III中的E 均为Glu , N 为Ser , T 为Thr , 制取X 为Thr 和Y 为NH_2 的式II胰岛素化合物。

7. 按权利要求1 的方法, 其中式III中的B13 位上的E 为Gln , 其余E 均为Glu , N 为Asn , T 为Thr , 制取X 为Thr 和Y 为NH_2 的式II胰岛素化合物。

8. 按权利要求1 的方法, 其中式III中A4位上的E 为Gln , 其余E 均为Glu , N 为Asp , T 为Thr , 制取X 为Thr 和Y 为NH_2 的式II胰岛素化合物。

9. 按权利要求1 的方法, 其中式III中E 均为Glu , N 为Asn , T 为Arg , 制取X 为OH的式II胰岛素化合物。

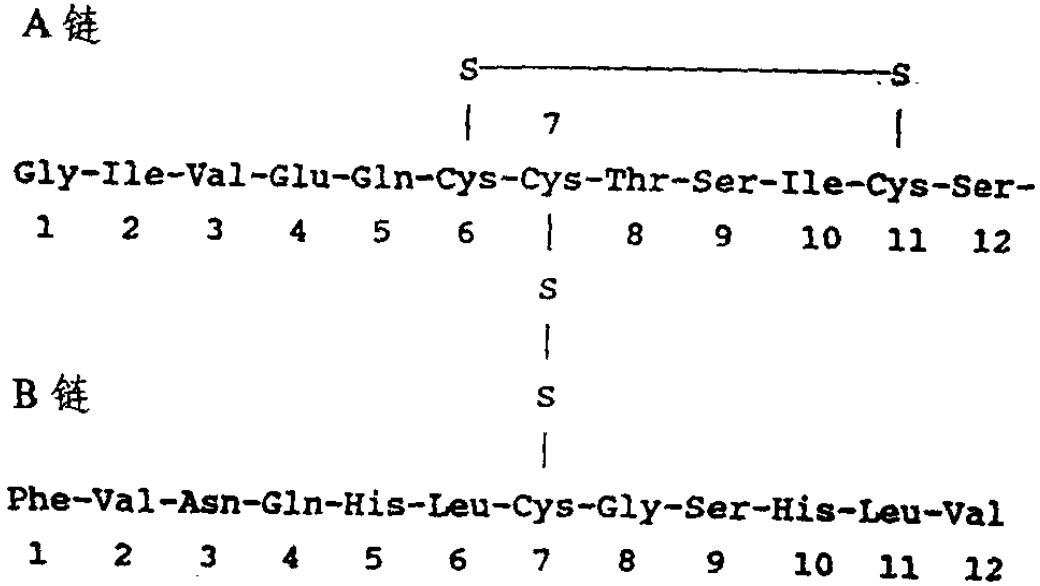
说　　明　　书

新的胰岛素化合物及其制备方法

本发明涉及新的胰岛素化合物及其制备方法，还涉及具有长效并且至少含有一种本发明新的胰岛素化合物，需要时还可含一种速效胰岛素的药物制剂。

自从1922年发现胰岛素以来，已有许多种胰岛素用于治疗糖尿病。在开始时，仅仅使用那种胰岛素活性迅速而又很快终止的胰岛素溶液，但在后来通过引入锌盐和/或鱼精蛋白，降低了胰岛素的溶解度，研制了一种活性很宽的胰岛素制剂。由于生物利用度的原因，所用胰岛素都按传统常规的方法，由家畜的胰腺提取，最常用的家畜是牛，猪和羊。然而近来所用的制剂，含有由生物技术制取的人胰岛素，并且已经见诸于市。

人胰岛素的结构示于式Ⅰ



A 链（续）

```
                                   20
Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
 13   14   15   16   17   18   19       21
                                  S
```

B 链（续）

```
                        S
Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-
 13   14   15   16   17   18   19   20   21   22   23   24
```

B 链（续）

```
Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr
 25   26   27   28   29   30
```

从某些家畜中得到的胰岛素在结构上非常与人胰岛素相似。狗和猪的胰岛素与人胰岛素的区别仅在B 链30位上是Ala，而不是Thr，兔胰岛素的区别则仅在同一位置上是Ser 。这些胰岛素按Morihara等(Nature 280，1979，412-13)和Marcussen (US-Patent No.4343898)所述半合成方法，用Thr 取代B30-氨基酸残基即可转化为人胰岛素。

含胰岛素的溶液制剂通常都是速效制剂，但在注射后几个小时胰岛素的活性即终止。因此需要频繁地进行注射，一般每天要注射若干次，使糖尿病患者得以维持正常的血糖水平。

为了克服这种缺陷，配制的长效胰岛素制剂应使胰岛素活性保持几个小时，以至24小时，甚至更长时间。使用这种长效制剂，一些糖尿病患者每天仅需要少量注射，例如24小时内注射1 次或2 次。

将胰岛素转化为略可溶解的盐，例如锌胰岛素或鱼精蛋白胰岛素，即可获得上述长效胰岛素。所用的这种略可溶解的胰岛素盐是一种悬浮液，经皮下或肌肉注射后，从中逐渐释放出胰岛素。

最近采用了其他一些方法获得了长效胰岛素，其中一例则是将胰岛素结晶包在聚合血清清蛋白中。另一个例子则是连续作用的胰岛素装置，即所谓的胰岛素泵，然而这可能会使患者感到不适和带来危险。

欧洲专利公报No.EP-132770，EP-132769 和EP-135720 的说明书公开了胰岛素衍生物的制备和用途，这种衍生物中，B 链的C 端由至少带1 个正电荷(尤以Arg-OH或Arg-Arg-OH为佳) 使有机基团延长。含有这种胰岛素衍生物悬浮液制剂具有长效作用。然而这种胰岛素化合物并不非常适用于配制新的有用的长效胰岛素制剂，因已发现，这种长效非常有限(J/Markussen et al., Protein Engineering,1,205-213,1987)。

B 链的N 端由二肽Arg-Arg 延长的胰岛素衍生物的性质已由R.Geige & F.Enzmann 作过介绍(Proceedings of the Symposium on Proinsulin, Insulin and C-peptide, Tokushima, 1978; Excerpta, Medica, Amsterdam, 1979, p.306-310)。已经发现，按等电点为基础的这种胰岛素化合物的溶解度高于一般的胰岛素。

为了改进胰岛素在治疗糖尿病中的活性构形，可以将取代基引入胰岛素分子。欧洲专利公报No.EP-194864公开了例如用Gln 一次或多次取代Glu 和/ 或用与以酯或酰胺形式的C 端羧基的封阻相结合的Arg 取代Thr^{B27}，以注射后缓慢释放的方式，使胰岛素沉淀区移位。

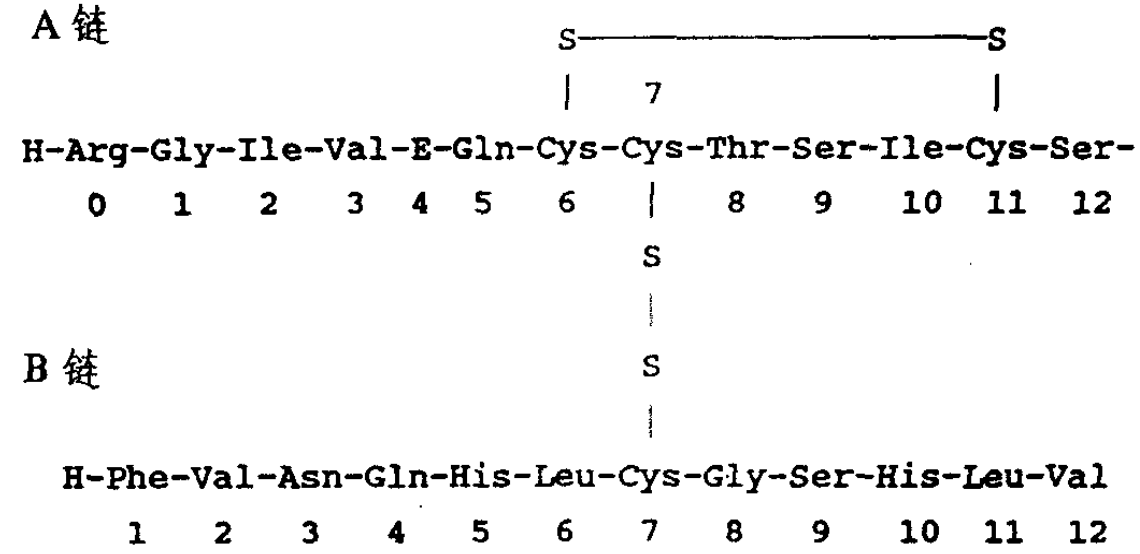
使用这种含内氨基酸取代基的胰岛素化合物的制剂长期治疗糖尿病，意味着会给患者带来激活免疫系统的严重威胁，导致胰岛素抗体进入血液。

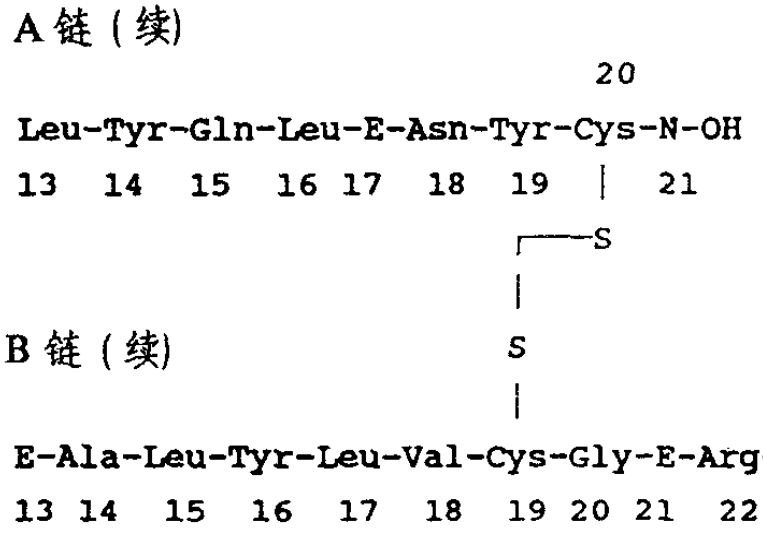
为了获得长效胰岛素，以便取代传统的胰岛素制剂，最近几年来人们已经尽了努力。其起因是由于糖尿病专家们发现，传统的长效胰岛素

制剂作用时间太短，在使用人胰岛素时更是如此，而且使用所谓的胰岛素笔(insulin pen)，已被认为是一种溶解的长效胰岛素。

本发明的目在于提供一种新的具有长效和尽可能低抗原性的胰岛素类似物。

现已令人惊奇地发现。通式II的胰岛素化合物具有理想的长期的胰岛素药效和/ 或抗原性，





B 链 (续)

Phe-Tyr-T-Pro-Lys-X-Y
25 26 27 28 29 30 .

式中E 各表示Glu 或能由核苷酸顺序编码的天然氨基酸残基,

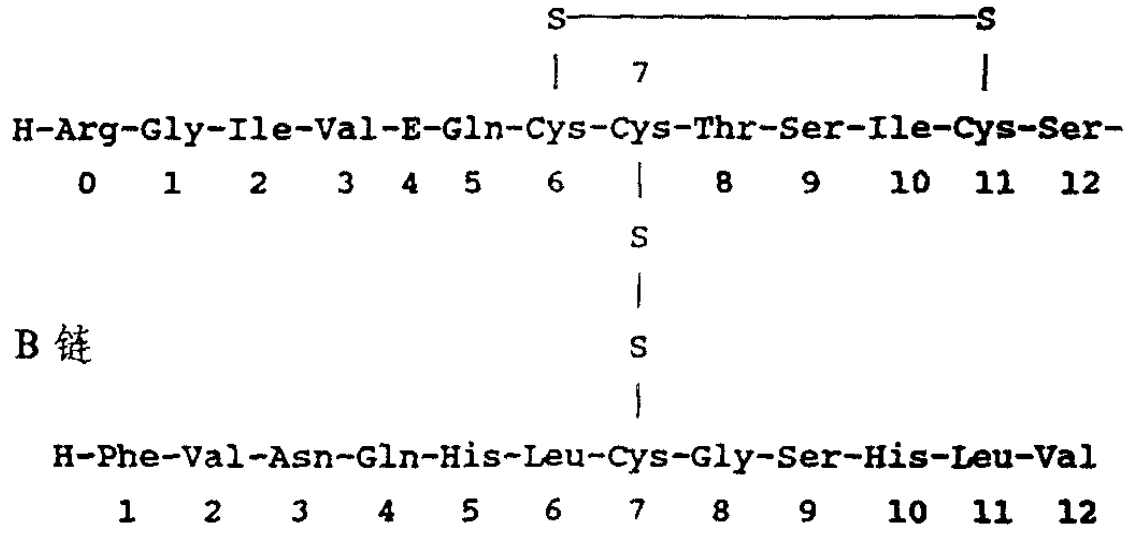
N 表示能由核苷酸顺序编码的氨基酸残基,

T 表示Thr 或Arg ,

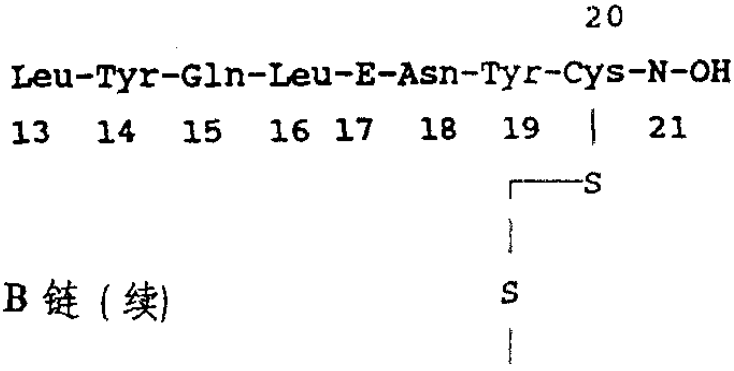
X 表示Thr, Ser, Ala 或OH,

Y 表示OR或$NR'R^2$,其中R, R'和R^2各表示氢或低级烷基, 但当X 表示OH时Y 不存在。

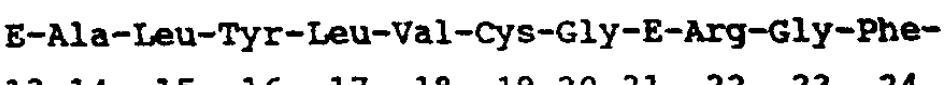
因此, 本发明涉及具有通式II的胰岛素化合物:



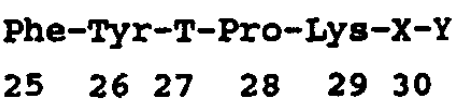
A 链（续）



B 链（续）



B 链（续）



式中E 各表示Glu 或能由核苷酸顺序编码的天然氨基酸残基，

N 表示能由核苷酸顺序编码的氨基酸残基，

T 表示Thr 或Arg ，

X 表示Thr，Ser，Ala 或OH，

Y 表示OR或$NR'R^2$，其中R，R′和R^2各表示氢或低级烷基，但当X 表示OH时Y 不存在。

本文中所述“低级烷基”意指包括1-6 个碳原子的直链或支链烷基。

本发明具体涉及式II的胰岛素化合物，其中E 各表示Glu 或Gln，N表示Asn，Asp，Ser 或Gly，T表示Thr 或Arg，X表示Thr 和Y 表示NH_2 。

本发明更涉及式II的胰岛素化合物，其中当Y 表示OH时，E，N 和T中至少有1 个表示不同于人胰岛素相应残基的氨基酸残基。

本发明特别涉及式II的胰岛素化合物，其中E 均表示Glu，N表示Asn，T 和X 均表示Thr，Y表示NH_2 。

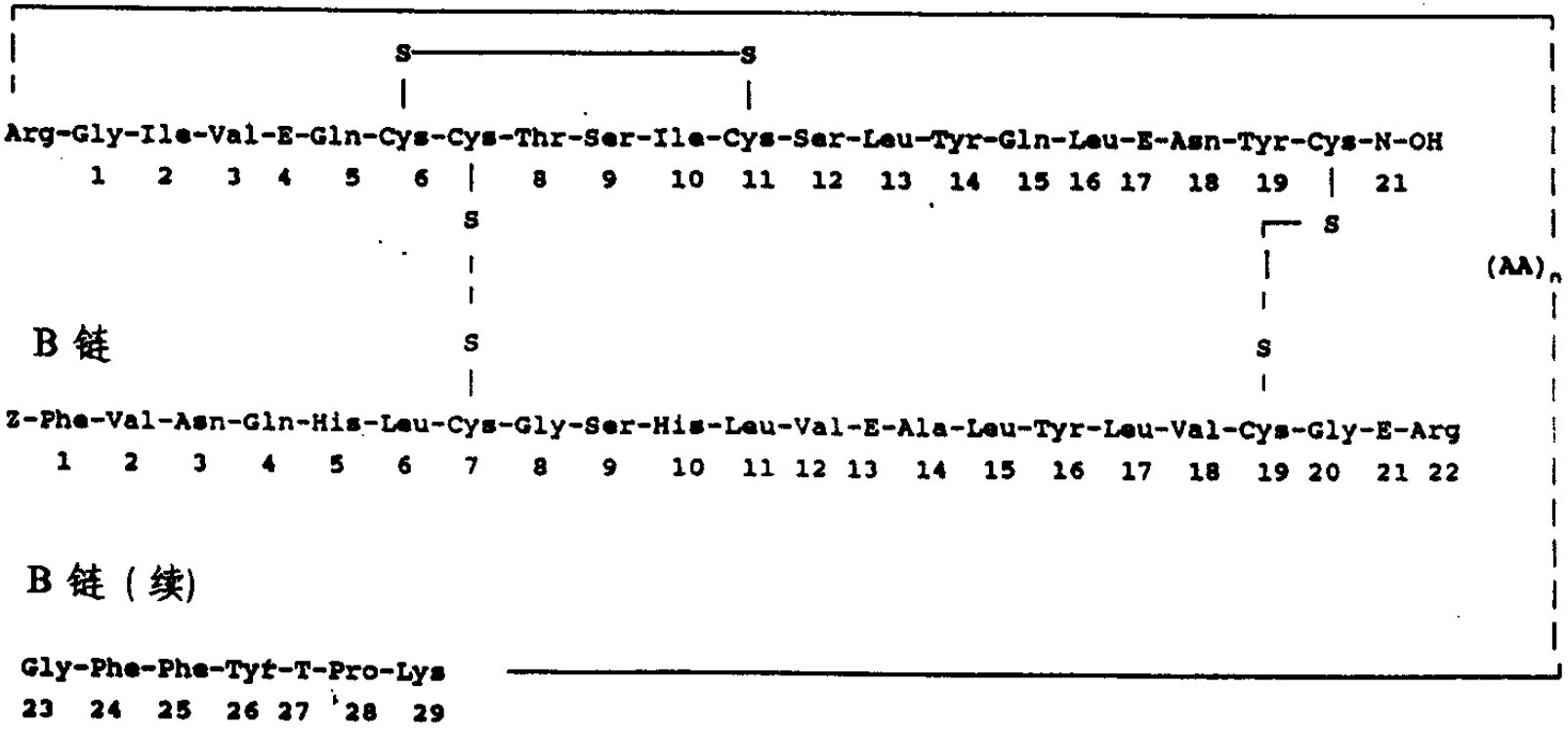
本发明特别涉及式II的胰岛素化合物，其中E 均表示Glu，N表示Ser，R 和X 均表示Thr，Y表示NH_2 。

本发明特别涉及式II的胰岛素化合物，其中在B13 位上的E 表示Gln，其余的E 均表示Glu，N表示Asn，T和X 均表示Thr，Y表示NH_2 。

本发明特别涉及式II的胰岛素化合物，其中A4位上的E 表示Gln ，其余的E 均表示Glu，N表示Asp，T和X 均表示Thr，Y表示NH_2 。

本发明特别涉及式II的胰岛素化合物，其中E 均表示Glu，N表示Asn，T表示Arg，X表示OH。

本发明还涉及制备式II胰岛素化合物的方法，该方法是将通式III的胰岛素前体通过转肽作用或由对赖氨酸残基的羧端裂解具有唯一特异性的肽链内切酶进行裂解。通式III如下:


S S
Arg-Gly-Ile-Val-E-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-E-Asn-Tyr-Cys-N-OH
1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 21
S S
(AA)n
S S
B 链
Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-E-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-E-Arg
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
B 链 (续)
Gly-Phe-Phe-Tyr-T-Pro-Lys
23 24 25 26 27 28 29

式中E, N 和T 的含意如上所述,

(AA)n 表示具有C 端残基为Lys 和n 氨基酸残基的肽链，或n=0 时表示肽键,

Z 表示氢或具有C 端残基为Lys 的任意长度的肽链。

本发明还涉及胰岛素制剂，其至少含有一种式II胰岛素化合物，还可任意含有速效胰岛素，例如人胰岛素、家畜胰岛素，或其衍生物或类似物。这类制剂可以是一种待用溶液或可在使用前用无菌水配制的冷冻干燥制剂。

本发明胰岛素制剂的一个具有特殊优点的例子是一种肠胃施用的长效制剂，含有至少一种本发明的胰岛素化合物的水溶液，与血清等渗压，pH2-5.5 ，可任意含有缓冲液和/ 或防腐剂，如果需要，还可含速效胰岛素。

本发明胰岛素化合物由于对人胰岛素分子略为作了改变，且均为人体所常见，或已经过了几年的试验，都未发现引起免疫反应，因此可以满足糖尿病专家们的要求。本发明胰岛素化合物的主要特征在于它们能如人胰岛素那样描述，其中精氨酸残基与N 端和A 链连接，而其B 链的C 端羧基以酰胺形式封阻。人们总是把胰岛素化合物溶解于弱酸溶液中来使用，而在这些条件下，21位上的天冬酰胺残基能够在制剂贮存期内产生明显脱酰氨基作用，从而减弱长效作用。通过用谷氨酰胺取代1 个或可能2 个谷氨酸残基，则这种影响就能被控制。

在胰岛素依赖糖尿病的治疗中，常用治疗量为每天注射2 次长效胰岛素制剂，即早餐和晚上睡前各1 次，以保持基本的胰岛素水平。另外，在主餐前再注射3 次速效胰岛素制剂。这种治疗的缺点在于第二次注射长效胰岛素制剂可导致夜间低血糖危险。这种危险通过饭前注射长效和速效胰岛素混合制剂可予以避免，即使在晚间会发生低血糖反应，则吃些小吃也就能克服。但是这种治疗方法往往会在早晨引起高血糖，

如广泛使用的长效胰岛素制剂“达缓胰岛素”(Insulatard®)和“单缓胰岛素”(Monotard®)没有足够长的作用时间。因此，需要为糖尿病患者提供作用时间长于目前一般所使用的制剂的胰岛素制剂，尤其是提供一种注射1 次能够作用一天甚至几天的制剂。按本发明制备的胰岛素制剂，比一般所用的长效胰岛素制剂“单缓胰岛素”具有更长的胰岛素作用时间。

本发明较佳的胰岛素化合物用作溶液制剂时具有特殊的优点，因其在pH约5 左右时(在此pH值时，脱酰氨显著较低) ，溶解度较高，甚至在皮下注射后，仍具有长效作用。

本发明特别涉及下列具体的化合物：

〔Arg^{A0}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺)，

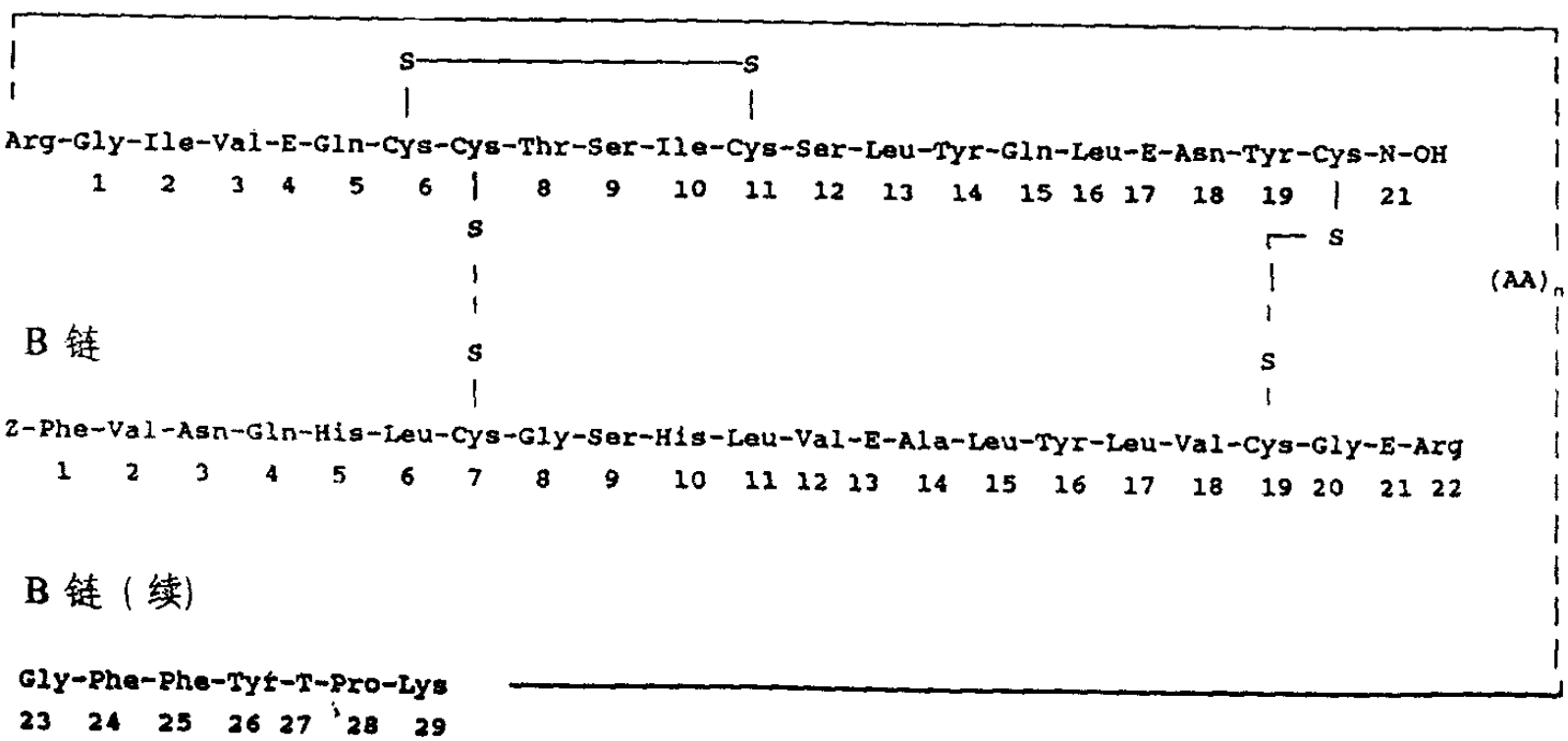
〔Arg^{A0}, Gln^{B13}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺)，

〔Arg^{A0}, Gln^{A4}, Asp^{A21}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺)，

〔Arg^{A0}, Ser^{A21}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺)，

〔Arg^{A0}, Arg^{B27}〕- 脱〔Thr^{B30}〕人胰岛素。

本发明的胰岛素化合物可采用化学合成方法，从在其他胰岛素分子A 链的N 端上引入另一个精氨酸残基进行制备，但困难很大。一个更吸引人的方法就是单链前体的酶催化转化. 例如天然胰岛素原或前胰岛素原或生物合成制备的通式III的前体


S S
Arg-Gly-Ile-Val-E-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-E-Asn-Tyr-Cys-N-OH
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
S
S
S
(AA)n
B 链
Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-E-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-E-Arg
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
B 链（续）
Gly-Phe-Phe-Tyr-T-Pro-Lys
23 24 25 26 27 28 29

式中E, N 和T 的含意如式II所述,

(AA)n 表示具有n 氨基酸残基并且C 端残基为Lys 的肽链，但当n=0 时则表示肽键;

Z 表示氢或C 端残基为Lys 的任意长度的肽链。

用于酶转化的酶应是能在赖氨酸残基羧端上裂解肽链的类似胰蛋白酶的肽链内切酶。胰蛋白酶本身经常可以使用，但是对赖氨酸具有专一性的肽链内切酶则特别有利，例如由溶菌酶原(Lysobacter enzymogenes) (Boehringer Mannheim)得到的蛋白内切酶Lys-C 或由裂解无色杆菌(Achromobacter lyticus) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 得到的赖氨酸肽链内切酶。

反应可以按类似于欧洲专利公报EP-163529 所述条件，通过用苏氨酸酰胺的转肽作用完成，由此直接产生B30 酰胺；但是也能采用两步反应完成，开始用酶解离，生成脱(Thr^{B30})化合物，再经Morihara等(同上) 所述偶合反应，转化为B30-酰胺。

本发明胰岛素化合物的前体可通过生物合成方法，在表达编码前体的DNA 顺序的酵母宿主产生。

为了分泌到生长培养基中，可将编码胰岛素前体的DNA 顺序融合到另一个编码酵母中的信号肽功能的DNA 顺序中。通过插入到酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)MFα 1-前导顺序即可分泌(Kurjan & Herskowitz, Cell, 30, 933-943, 1982)。在较佳的构建中，采用编码包括二基部位LysArg的整个MFα 1-前导顺序的DNA 顺序，但不包括用作酵母蛋白酶DPAP(二肽氨基肽酶) 底物的肽顺序GluAlaGluAla。这样就能获得具有校正N 端的胰岛素前体的有效分泌。

编码修饰胰岛素前体的DNA 顺序是通过在表达盒上离体诱变进行构建的，该表达盒包含在表达质粒pYGABA的BamHI 限制性片段中(如图1所示) 。质粒在酵母中含有选择标记物和复制信号功能和具有1103bp的

长度。按Bitter和Egan所述，BamHI 片段含有包括-389至-1位的启动子顺序的GAPDH(甘油醛-3- 磷酸脱氢酶) 下游区(Gene, 32, 1984, 263-274)，并将其加到下游区BamHI 连接子的5′端，将该启动子顺序直接融合到如Kurjan和Herskowitz所述的编码MFα 1-前导顺序的85N-端氨基酸的顺序。MFα 1-前导顺序直接与胰岛素前体单链脱〔Thr^{B30}〕L 胰岛素(SCT) 的编码顺序融合，它是人工合成的构建基因，具有下列顺序：

```
TTCGTTAACCAACACTTGTGTGGTTCTCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTGGT-
AAGCAATTGGTTGTGAACACACCAAGAGTGAACCAACTTCGAAACATGAACCAAACACCA-
PheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGly-

GAAAGAGGTTTCTTCTACACTCCAAAGGGTATTGTTGAACAATGTTGTACTTCTATTTGT-
CTTTCTCCAAAGAAGATGTGAGGTTTCCCATAACAACTTGTTACAACATGAAGATAAACA-
GluArgGlyPhePheTyrThrProLysGluIleValGluGlnCysCysThrSerIleCys-

                                                    SalI
TCTTTGTACCAATTGGAAAACTACTGTAACTAATAGCGTCG
AGAAACATGGTTAACCTTTTGATGACATTGATTATCGCAGCAGCT
SerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn终点终点
```

如上所述，胰岛素前体基因的转译末端具有2 个终止密码子，其后紧接着SalI 限制位点。如欧洲专利公报No.0116201A1所述，终此区与SalI-BamHI 限制片段相同。顺序的构建完全采用常规技术。

所用诱变方法系Zoller和Smith 所述的“寡核苷酸控制诱变”法(DNA, Vol. 3, NO.6,479-488, 1984) 。该方法将在下面作扼要说明并在实施例1 中给予更详尽地介绍。将由表达质粒中分离得到的胰岛素前

体顺序插入到单链环状M13 噬菌体载体中。将化学合成的互补DNA 链与单链基因组对合。DNA 链含有所需顺序，其外层是与环状DNA 的胰岛素顺序完全相同的顺序。然后以生物化学上所用的克列诺夫聚合酶将引物加到全长的环状基因组上。这个双链就形成单链的噬菌体，当其在大肠杆菌中生长时，就有可能得到具有所需顺序的隔离双链DNA 。由该双链DNA 中可分离到限制片段，然后再将该片段插入到表达载体中。

下面参考附图将更详细地说明本发明。

图1 表示表达质粒pYGABA14276，

图2 表示酵母载体pAB24，

图3 表示皮下贮存的胰岛素的吸收。

以下的实施例将进一步说明本发明。

实施例 I：可用于表达前体B(1-29)-AKR-A(1-21) 的表达质粒的构建

表达质粒pYGABA（图1）的BamHI 限制性片段上表达合的分离：将表达质粒与核酸内切限制酶BamHI 一起温育。条件：20μg 质粒，50单位BamHI，100mM NaCl，50mM Tris-HCl，pH7.5，10mM $MgCl_2$ 和1mM DTT，配制成 100μl 。温度37℃，反应时间 2小时。在1%琼脂糖凝胶上将2个DNA 片段进行分离，得到所需要的片段。

M13 载体M13mp18 的连接：将分离得到的限制性片段连接噬菌体载体M13mp18，并在下列反应混合物中用核酸内切限制酶BamHI 切断：0.2μg 片段，0.02μg 载体，50mM Tris-HCl，pH7.4，10mM MgCl ，10mM DTT 和1mM ATP，配制成20μl 。将 5μl 该混合物移到大肠杆菌JM101中。片段在载体中的存在及其取向借助由转化株分离得到双连M13-DNA的限制酶图予以测定。

单链(ss)DNA(模板) 的分离：按Messing 所述方法(Gene，19，269-272，1982)，从上述转化株分离出ss-DNA。

诱变引物的5′磷酸化：具有顺序5′-CAACAA TACCTCTCTTAGCCTTTGGA GTG-3′的诱变引物，其5′端的磷酸化是在含有70mM Tris-HCl，pH7.0，10mM $MgCl_2$，5mM DTT，1mM ATP，100pmol 寡核苷酸和3.6 单位的T4多核苷酸激酶的30μl 反应混合物中进行的。在37℃下反应30分钟，然后在65℃下将混合物温育10分钟使酶失活。

模板与磷酸化的诱变引物的对合：模板和引物在10μl 含有0.5pmol 模板，5pmol 引物，20mM Tris-HCl，pH7.5，10mM $MgCl_2$，50mM NaCl 和1mM DTT 中，先在65℃下加温10分钟，然后冷却至 0℃进行对合。

扩大/ 连接反应：在所述制备的反应混合物中，加入10μl 下述混合物：0.3mM dATP，0.3mM dCTP，0.3mM dGTP，0.3mM TTP，1mM ATP，20mM Tris-HCl，pH7.5，10mM $MgCl_2$，10mM DTT，3 单位T4 DNA连接酶和2.5 单位克列诺夫聚合酶。反应在16℃下进行16小时。

JM101 的转化：用常规技术将上述反应混合物以不同的稀释度移入经$CaCl_2$ 处理过的大肠杆菌JM101 细胞中，并以 2×YT topagar涂在 2×YT琼脂平板上(2×YT=16 克胰蛋白酶胨/ 升，酵母膏10g/l，NaCl 5g/l。 2×YT topagar=2×YT和0.4%琼脂糖，并经高压灭菌。 2×YT琼脂板=2×YT和2%琼脂，并经高压灭菌) 。琼脂板在37℃下温育过夜。

正克隆的鉴定：采用空斑杂交的方法，即将硝化纤维素过滤器置于载有适当密度的噬菌体的平板上，使滤纸湿润。然后将滤纸放在下述溶液中浸润处理：在1.5M NaCl，0.5M NaOH中30秒钟；在1.5M NaCl，0.5M Tris-HCl，pH8.0 中1 分钟，在 2×SSC(0.3M NaCl，0.03M柠檬酸钠)中浸至以后使用。过滤器在3MM 滤纸上干燥，并在80℃真空炉中烘 2小时。

具有顺序5′-CAACAATACCTCTCTTAGCCTTTGGAGTG-3′ 的诱变引物，其5′端用放射性标记，所用30μl 放射性标记物中含有70mM Tris-HCl，

pH7.5，10mM $MgCl_2$，5mM DTT，10pmol寡核苷酸，20pmol γ^{32}P-ATP和3.5单位的T4多核苷酸激酶。混合物在37℃下温育30分钟，然后在100 ℃下保持 5分钟。

干燥滤纸在65℃下，于 6×SSC，0.2%牛血清白蛋白，0.2%聚蔗糖，0.2%聚乙烯吡咯烷酮，0.2%十二烷基硫酸钠(SDS) 和50μg/ml鲑鱼精子DNA 预杂交 2小时。然后将含有标记试样的反应混合物加到15ml新鲜的预杂交混合物，滤纸在40℃和缓和摇动下浸泡过夜。杂交后，滤纸在2×SSC+0.1% SDS中洗涤 3次，每次15分钟，然后进行放射自显影。又在62℃相同溶液中洗涤后，再次进行放射自显影，证明含DNA 顺序的空斑已经互补。

正克隆的再筛选：由于所鉴定的克隆是异源双链的结果，所以再次将空斑涂在平板上，重复杂交和鉴定。

双链M13 噬菌体DNA 的纯化：将经过重复筛选的克隆用于感染大肠杆菌JM101 。含有大约10^8 空斑和 5个JM101 菌落的培养物在37℃下于5ml 2 ×YT培养基中培养 5小时，然后按Birnboim和Doly所述方法(Nucleic Acids Res., 2, 1513, 1979) 由碎片中纯化得到双链环状DNA 。

含修饰胰岛素前体的限制性片段的分离：在37℃下将大约 5μg 上述分离到的DNA 制剂用10单位核酸内切限制酶BamHI 于60μl 100mM NaCl，50mM Tris-HCl，pH7.5，10mM $MgCl_2$和1mM DTT 中消化 2小时。在琼脂糖凝胶上分离DNA 产物，从凝胶中纯化得到片段。

酵母载体pAB24 的连接（图2)：将分离到的限制性片段在含有片段 0.2μg，载体0.02μg 50mM Tris-HCl，pH7.4，10mM $MgCl_2$，10mM DTT，1mM ATP （总体积为20μl)的反应混合物中，连接到经核酸内切限制酶BamHI 消化过的酵母载体pAB24 上。将 5μl 该反应混合物用于转化大肠杆菌MC1061，鉴定其中修饰过的表达质粒。该质粒命名为pYGAB-AKR-

A, 除了所加密码子外, 与pYGABA相同。

酵母的转化: 按Ito 等所述方法(J. Bact. Vol. 153, No. 1, 163-168, 1983), 将表达质粒转移到酿酒酵母JC482 Δpep ΔLeu 2 cir°(α, his4, pep4, ura3, leu2, cir°) 中。再将转化细胞置于SC-ura培养基(0.7% 酵母氮碱, 2.0%葡萄糖, 0.5%酪蛋白氨基酸, 2.0%琼脂) 上, 选择含质粒的细胞。

实施例 II: 可用于产生前体B(1-29)-Gly-Ser-Lys-Arg-A(1-21) 的表达质粒的构建

使用方法基本上与实施例1 相同, 不同之处在于诱变引物的顺序为5′CAACAATACCTCTCTTAGAACCCTTTGGAGTG-3′, 杂交温度42℃, 杂交后的洗涤温度64℃。修饰过的质粒的顺序除了加有密码子外, 与pYGABA的顺序相同。

实施例 III: 可用于产生前体〔Gln^{B13}〕-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21)的表达质粒的构建

采用的方法基本上与实施例1 相同, 不同之处在于所用模板是克隆M13 中pYGAB-AKR-A 的BamHI 合得到的, 诱变引物的顺序为5′-GTACAAAGCTTGAACCAAGTG-3′, 杂交温度31℃, 杂交后的洗涤温度53℃。修饰质粒的顺序除了交替和所加的密码子外, 与pYGABA的顺序相同。

实施例 IV: 可用于产生前体〔Gln^{A4}, ASP^{A21}〕-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21) 的表达质粒的构建

采用的方法基本上与实施例1 相同, 不同之处在于所用模板是克隆M13 中pYGAB-AKR-A 的BamHI 合得到的, 而且用两步法诱变。第一步中的引物是5′-ACAACATTGTTGAACAATACC-3′, 杂交温度27℃, 杂交后的洗涤温度49℃; 第二步中的引物是5′-CGCTATTAGTCAGTACTTT-3′ , 杂交温度29℃, 杂交后的洗涤温度51℃。修饰质粒的顺序除了交替和所加密码子外, 与pYGABA的顺序相同。

实施例Ⅴ：可用于产生前体〔Ser^{A21}〕-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21)的表达质粒的构建

采用的方法基本上与实施例1 相同，不同之处在于所用模板是克隆M13 中pYGAB-AKR-A 的BamHI 合得到的，诱变引物的顺序为5′-GACGCTATTAAGTACAGTAGT-3′，杂交温度29℃，杂交后的洗涤温度51℃。修饰质粒的顺序除了交替和所加密码子外，与pYGABA的顺序相同。

实施例Ⅵ：可用于产生前体〔Arg^{B27}〕-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A-(1-21)的表达质粒的构建

采用的方法基本与实施例1 相同，不同之处在于所用模板是克隆M13 中pYGAB-AKR-A 的BamHI 合得到的，诱变引物的顺序为5′-CAACAATACCTCTCTTAGCCTTTGGTCTGTAGAAGA-3′，杂交温度43℃，杂交后的洗涤温度65℃。修饰质粒的顺序除了交替和所加密码了外，与pYGABA的顺序相同。

实施例Ⅶ：前体的表达和由培养基中进行分离

将如实施例Ⅰ-Ⅵ所述转化的酶母，在30℃下，在含基本培养基(无尿嘧啶)的陪替氏平板上繁殖48小时。从该陪替氏平板中取出单个菌落接种到含有基本培养基(无尿嘧啶)+酪蛋白氨基酸5g/l+琥珀酸10g/l+葡萄糖30g/l 的100ml 摇瓶中，pH5.0 。将摇瓶在30℃下和培养箱中摇动培养72小时。

离心后，将1 升沉淀过的上清液经过滤灭菌，加入5M HCl和水将pH调至4-4.5，导电率为<10mS 。先用50mM乙酸和用NaOH将pH调至4.0 的50%(体积) 乙醇平衡1.6×6cm 的S-Sepharose® FF 层析柱，然后以120毫升/小时的流速流经该层析柱，用60ml 缓冲液洗涤该柱，0-0.35M线性梯度的360ml NaCl缓冲溶液洗脱前体，流速为10毫升/小时。洗脱液分成4ml 等份，进行紫外光吸收率测定。含有前体的馏份经RP-HPLC分析鉴定和沉淀，用1M乙酸在Sephadex® G25 柱上脱盐后，经冷冻干燥

分离得到前体。

实施例Ⅷ: 由前体B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21) 制备〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素

在 4℃下，将按实施例 I 和Ⅶ的方法制备的B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21) 250mg 溶解于25ml 50mM tris-(羟基甲基) 氨基甲烷和用盐酸将pH调至10的20%(体积) 乙醇中。含有0.8mg 固相胰蛋白酶/ml 的Sepharose® 用相同的缓冲液在玻璃漏斗上洗涤和排液。将缓冲液加到40g 排液的凝胶上，将体积调至75ml。将含有前体的溶液加到悬浮液中，混合物在 4℃下，缓和搅拌 1小时后过滤。

HPLC分析证明61% 转化为〔Arg^{A0}〕- 脱- 〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

用50ml 缓冲液(不含乙醇) 洗涤凝胶并排液，将沉淀的过滤液的pH调至6 后，使其中的蛋白质沉淀。通过离心和冷冻干燥分离沉淀物。

将 4℃下，将沉淀物溶解于pH调至8.1 的20ml 7M 尿素中，并将溶液装在 1.6×20cm的Q-Sepharose® FF 层析柱上，层析柱事先在4 ℃下用20mM tris-(羟基甲基) 氨基甲烷和用HCl 将pH调至8.1 的7M尿素进行平衡。以 0mM至50mM线性梯度的NaCl 缓冲液 (缓冲液与上相同) 和按40 毫升/ 小时的流速，洗脱层析柱24小时。洗脱液用紫外光吸收进行检测，收集 2个主峰的第一次洗脱液。沉淀物用1M乙酸在Sephadex® G25 柱上脱盐后，冷冻干燥，得到75mg 〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

产物的鉴定经氨基酸分析，等离子体吸收质谱以及分开的乙烯吡啶基化的A 链和B 链的Edman 顺序降解方法得到证实。

实施例 IX: 由前体B(1-29)-Gly-Ser-Lys-Arg-A(1-21) 制备〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素

将按实施例 II和Ⅶ的方法制备的B(1-29)-Gly-Ser-Lys-Arg-A(1-21

) 400mg 溶解于50ml 的50mM tris-(羟基甲基)-氨基甲烷和用HCl 将pH调至10的20%(体积) 乙醇中。含有0.8g固相胰蛋白酶/ml 的Sepharose® 用相同缓冲液在玻璃漏斗上洗涤并排液，将缓冲液加到排去液体的80g凝胶中，体积调至150ml 。将含前体的溶液加到悬浮液上，混合物在20℃下缓和搅拌30分钟后过滤。

HPLC分析证明,50%转化为〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

凝胶用100ml 缓冲液(不含乙醇) 洗涤并排液，将pH调至6 沉淀出沉淀滤液中的蛋白质，经离心和冷冻干燥分离沉淀物。

在 4℃下通过pH调至8.1,将沉淀物溶解在20ml 7M 尿素中，再将该溶液装在 1.6×20cm的Q-Sepharose® FF 层析柱上，层析柱事先在4 ℃下用20mM tris-(羟基甲基) 氨基甲烷和经HCl 将pH调至8.1 的7M尿素平衡。用0mM 至50mM线性梯度的NaCl 缓冲液(用相同的缓冲液) 以40毫升/ 小时流速洗脱层析柱24小时。洗脱液经紫外光吸收检测，收集两个主峰的第一洗脱液。沉淀物在Sephadex® G25 柱上用1M乙酸脱盐后冷冻干燥。得到145mg 的〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

产物的鉴定经用氨基酸分析，HPLC分析和Edman 顺序降解等方法得到证实。

实施例X: 由猪胰岛素原制备〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素

40mg猪胰岛素原溶解于 800μl 0.1M HCl 中，加入8ml 50mM tris-(羟基甲基) 氨基甲烷。制备1 单位由溶菌酶原(Lysobacter enzymogenes) (Boehringer Mannheim)得到的蛋白内切酶Lys-C 于用HCl 将pH调至8.5 的 200μl 0.1M tris-(羟基甲基) 氨基甲烷的溶液中。将2个溶液混合并在12℃下放置16小时。

通过加1.8ml 96% 乙醇后将pH调至6.2 终止反应，生成的悬浮液在4℃下放置过夜。将离心分离到的沉淀物再在 4℃下溶解于pH调至8.1

的2ml 7M尿素中。将该溶液装在 1.6×20cm Q-Sepharose® FF层析柱上，该层析柱事先用20mM tris-(羟基甲基)氨基甲烷和用HCl 将pH调至8.1 的7M尿素。用0mM 至50mM线性梯度的NaCl缓冲溶液(相同的缓冲液)以40ml/小时的流速洗脱层析柱24小时。洗脱液经紫外光吸收检测，收集主峰洗脱液，沉淀物用1M乙酸在Sephadex® G25 层析柱上脱盐，冷冻干燥后得到15mg的〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

产物的鉴定经氨基酸分析，HPLC分析和Edman 顺序降解等方法得到证实。

实施例XI: 〔Arg^{A0}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 的制备

将按实施例Ⅷ至X之一的方法制备的〔Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素200mg 溶解于400mg 苏氨酰胺，2.0ml 乙醇和0.8ml 水的混合物中，用乙酸将pH调至6.3 ，加入含有3.2mg 固相胰蛋白酶的4ml (沉降)体积的Sepharose® 。在20℃下缓和搅拌 2小时后，滤去凝胶，加入10体积2-丙醇沉淀出蛋白质。将风干的沉淀物在 4℃下溶解于pH调至8.1 的20ml 7M 尿素中，然后将该溶液装在 1.6×20cm的Q-Sepharose® FF层析柱上，该层析柱事先在 4℃下用20mM tris-(羟基甲基)氨基甲烷和经HCl 将pH调至8.1 的7M尿素中平衡。用0mM 至50mM线性梯度NaCl缓冲溶液(相同的缓冲液)和40ml/小时流速洗脱层析柱24小时。洗脱液经紫外光检测，收集主峰洗脱液。沉淀物用1M乙酸在Sephadex® G25柱上脱盐，冷冻干燥后得到80mg的〔Arg^{A0}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 。

产物的鉴定经氨基酸分析，等离子体吸收质谱和Edman 顺序降解等方法得到证实。

实施例XII: 〔Gln^{B13}, Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素的制备

将按实施例Ⅲ和Ⅶ方法制备的〔Gln^{B13}〕-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21)250mg 与固相胰蛋白酶反应，反应产物基本按实施例Ⅷ的方法纯化，得到60mg的〔Gln^{B13}, Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

产物的鉴定经氨基酸分析，等离子体吸收质谱和Edman 顺序降解等方法得到证实。

实施例ⅩⅢ：〔Gln^{A4}，Asp^{A21}，Arg^{A0}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 的制备

将按实施例Ⅳ和Ⅶ的方法制备的〔Gln^{A4}，Asp^{A21}〕-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21)500mg与固相胰蛋白酶反应，生成的产物基本按实施例Ⅷ的方法纯化，得到175mg 的〔Gln^{A4}，Asp^{A21}，Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

将上述产物按实施例Ⅺ方法，与苏氨酰胺偶合，转化为B30-酰胺。得到50mg的纯〔Gln^{A4}，Asp^{A21}，Arg^{A0}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 。

产物的鉴定经氨基酸分析，等离子体吸收质谱和Edman 顺序降解等方法得到证实。

实施例ⅩⅣ：〔Ser^{A21}，Arg^{A0}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 的制备

将按实施例Ⅴ和Ⅷ的方法制备的〔Ser^{A21}〕-B(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21)400mg 与固相胰蛋白酶反应，生成的产物基本按实施例Ⅷ的方法纯化，得到125mg 的〔Ser^{A21}，Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

将上述产物按实施例Ⅺ的方法，与苏氨酰胺偶合，转化成B30-酰胺，得到40mg的纯〔Ser^{A21}，Arg^{A0}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 。

产物的鉴定经氨基酸分析，等离子体吸收质谱和Edman 顺序降解等方法得到证实。

实施例ⅩⅤ：〔Arg^{B27}，Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素的制备

将按实施例Ⅵ和Ⅶ的方法制备的〔Arg^{B27}〕-B-(1-29)-Ala-Lys-Arg-A(1-21)250mg与固相胰蛋白酶反应，生成的产物基本按实施例Ⅷ的方法纯化，得到50mg的〔Arg^{B27}，Arg^{A0}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素。

产物的鉴定经氨基酸分析和Edman 顺序降解等方法得到证实。

实施例ⅩⅥ：含溶解的〔Arg^{AC}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 的长效注射剂的配制

将60μmol 的〔Arg^{AC}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 溶解于4ml 0.1M HCl 中，加入20ml 1.5% m-甲酚。该溶液与70ml 1% NaCl 和3.25ml 0.1M $ZnCl_2$ 混合，pH调至4.0，用水将最终体积调至100ml ，过滤灭菌。

实施例ⅩⅦ：含〔Arg^{AC}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 结晶悬浮液的长效注射剂的配制

将60μmol 的〔Arg^{AC}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 溶解于含0.5% m-苯酚的70ml 1% NaCl 溶液中，用1M NaOH 将pH调至9.7 ，加入 325μl 0.1M乙酸锌。再将pH调至9.7 后用水将体积调至80ml，溶液经过滤灭菌。

含有0.3% m- 苯酚的20ml 65mM NaH_2PO_4，用NaOH调pH至6.0，过滤灭菌。

在无菌条件下，将两种溶液混合，生成的悬浮液在20℃下非常缓和地搅拌 1小时，最后用HCl 将pH调至7.3 。

实施例ⅩⅧ：大鼠皮下注射后经外部γ 计数测定长效作用

采用体重约250g和90天令以上的Wistar雌鼠作为试验材料。试验前使大鼠适应环境约一周并且随意进食。试验前4 天，用20mM碘化钾水溶液作为大鼠的饮用水。

所用的试验制剂如下：

1.含有〔Arg^{AC}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 并按实施例ⅩⅦ制备的悬浮剂。

2.含有〔Arg^{AC}〕- 人胰岛素-(B30-酰胺) 并按实施例ⅩⅥ制备的溶液制剂。

3.含有半合成的人胰岛素(Velosulin®，100单位/ml)的速效溶液制剂。

另外，上述三种制剂还各含有50微居里/毫升的〔单-^{125}I〕胰岛素或〔单-^{125}I〕-胰岛素化合物示踪物，按常规放射性碘方法制备。

在大鼠腿的背部皮下注射50μl 含有3.5nmol 胰岛素化合物和2.5微居里〔^{125}I〕标记示踪物，试验期间，将大鼠固定在夹鼠器中。

注射部位是吸收皮下贮存的胰岛素的测量范围(C. Binder: Absorption of Injected Insulin. Munksgaard, Copenhagen 1969)。测量注射部位示踪物的消失是用2个固定的MIP-10辐射强度测量仪和装有3mm NaI 窗式闪烁晶体管的检测器E749和60°视角10mm视野的照准仪(Raytronic)。辐射强度测量仪与微型记录器121N (Raytronic)联结。检测器固定在注射部位皮肤上部2cm。在注射制剂后的0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4.5, 6, 8, 12和14小时，测量5分钟的放射性强度。扣除本底计数后，将计数值转换成起始计数值的百分比。

图3 中，残余的放射性的平均值表示为各制剂的时间函数。取50%残余放射性(T50%)的时间为长效测量值，由曲线得到：

	T50%
制剂 I	>12小时
制剂 II	≈ 8小时
制剂 III	≈0.5小时

上述结果说明：与速效人胰岛素制剂相比，含有〔Arg^{A0}〕-人胰岛素-(B30-酰胺) 的两个制剂具有长效作用。

实施例XIX：含有〔Arg^{A0}, Arg^{B27}〕-脱〔Thr^{B30}〕-人胰岛素溶液的长效注射剂的配制

将12μmol 〔Arg^{A0}, Arg^{B27}〕-脱〔Thr^{B30}〕-人胰岛素溶解于含有0.5% m-苯酚经1M HCl 将pH调至3.5 的35ml 1% NaCl 溶液，加入650μl 0.1M乙酸锌，再将pH调至3.5，用水将体积调至50ml，溶液经过滤灭菌。

实施例ＸＸ：兔子皮下注射后测定长效作用

按照British Pharmacopoeia (1980)所述方法，测定含有按实施例ＸＩＸ方法制备的〔Arg^{A0}, Arg^{B27}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素0.24mM的溶液制剂在兔体内的长效量。将65μl 制剂皮下注射到6 个兔子中，在注射时和注射后的1，2，4 和6 小时，采集血样测定血糖水平。血糖值用注射前血糖值的百分率表示。

测定结果得到如下平均值：

注射后的时间：	0小时	1小时	2小时	4小时	6小时
开始时的% 血糖值：	100%	68.2%	65.0%	80.1%	79.4%

按J. Markussen 等所述方法(Protein Engineering, Vol.1, No. 3, pp. 205-213, 1987)测定长效指数，计算得到的值为42，与表1 (文献同上) 结果相比，含有〔Arg^{A0}, Arg^{B27}〕- 脱〔Thr^{B30}〕- 人胰岛素的溶液制剂具有与普遍在使用的长效锌胰岛素悬浮液制剂Actrapid Human同样的长效作用。

图　1

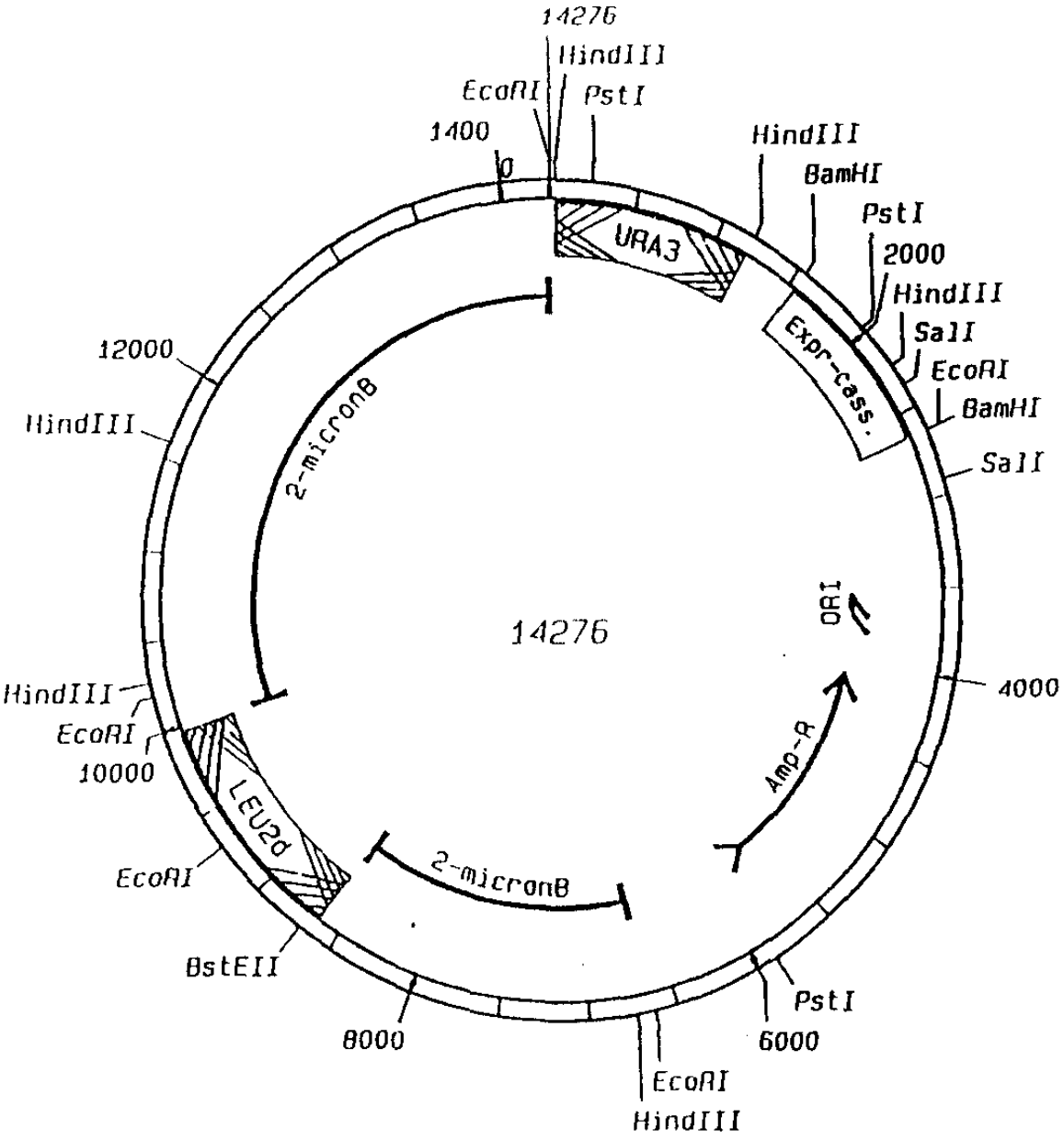

14276
HindIII
EcoRI
PstI
1400
0
HindIII
BamHI
PstI
2000
HindIII
SalI
EcoRI
BamHI
SalI
4000
6000
PstI
EcoRI
HindIII
8000
BstEII
EcoRI
10000
HindIII
12000
HindIII
URA3
Expr-cass.
2-micronB
14276
ORI
Amp-R
2-micronB
LEU2d

图 2

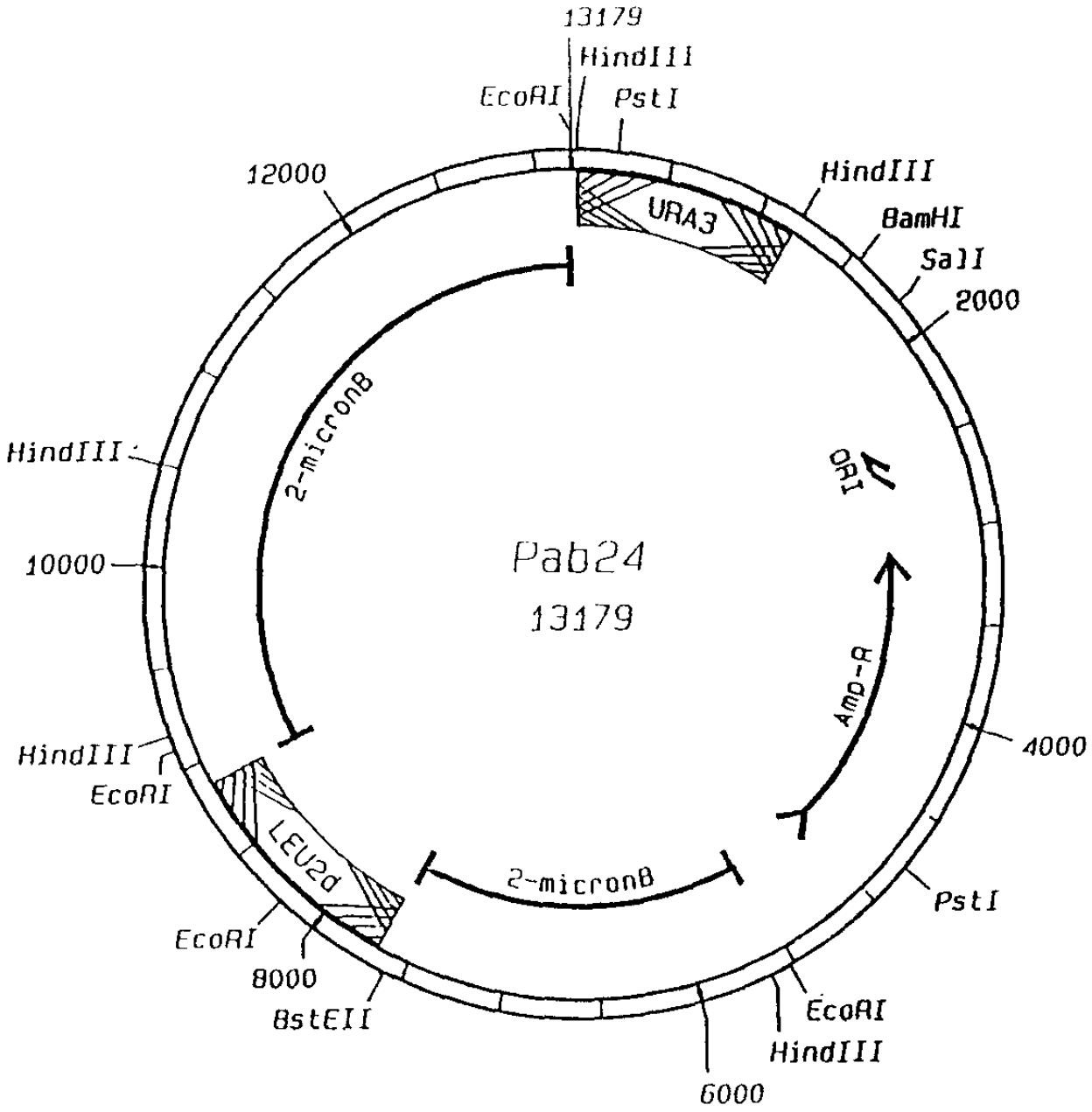

13179
HindIII
EcoRI
PstI
12000
HindIII
BamHI
SalI
2000
URA3
2-micronB
ORI
Pab24
13179
AMP-R
HindIII
10000
4000
HindIII
EcoRI
LEU2d
2-micronB
PstI
EcoRI
8000
BstEII
EcoRI
HindIII
6000

图 3

