(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1483831 B
(45)授权公告日 2012.06.13

(21)申请号 03152330.7
(22)申请日 1998.08.17
(30)优先权数据
19735711.3 1997.08.18 DE
(62)分案原申请数据
98117909.6 1998.08.17
(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 F·J·鲁伯洛德 R·凯勒
(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.
C12P 21/02(2006.01)
(56)对比文件
WO 9620724 A1,1996.07.11, 全文.
EP 0668292 A2,1995.08.23, 全文.
EP 0600372 A1,1994.06.08, 全文.
WO 9103550 A,1991.03.21, 全文.
审查员 吴永庆

权利要求书 2 页 说明书 12 页

(54)发明名称

获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的方法

(57)摘要

一种从胰岛素或胰岛素衍生物的前体获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的方法，所述前体在半胱氨酸或盐酸半胱氨酸和离液助剂的存在下经历一个折叠过程，在该折叠过程之后，通过如下方式从所述前体获得胰岛素或胰岛素衍生物：采用胰蛋白酶或类胰蛋白酶并且任选另外采用羧肽酶B进行酶裂解，接着在吸附树脂上进行纯化。

CN 1483831 B

1. 一种从胰岛素或胰岛素衍生物的前体获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的方法，所述前体在半胱氨酸或盐酸半胱氨酸和离液助剂的存在下经历一个折叠过程，在该折叠过程之后，通过如下方式从所述前体获得胰岛素或胰岛素衍生物：采用胰蛋白酶或类胰蛋白酶并且任选另外采用羧肽酶 B 进行酶裂解，接着在吸附树脂上进行纯化；该方法包括依次实施以下步骤以完成所述折叠过程：

(a) 将胰岛素或胰岛素衍生物的前体的水悬浮液与一定量的半胱氨酸或盐酸半胱氨酸混合，该量使得每一个前体半胱氨酸残基 1-15 个半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的 SH 残基；

(b) 在 pH 值 8 ～ 11.5、温度 15 ～ 55℃下，将含半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的前体悬浮液加入到浓度为 4 ～ 9M 的离液助剂溶液中，使所得混合物在所述温度下保持 10 ～ 60 分钟；和

(c) 在 pH 值 8 ～ 11.5、温度 5 ～ 30℃下，将混合物加入到一定量的水中，使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度稀释到 1 ～ 5mM，离液助剂的浓度稀释到 0.2 ～ 1.0M，

其中所说的胰岛素或胰岛素衍生物的前体具有如式 II 的序列：

R^2-R^1-(B2-B29)-Y-X-Gly-(A2-A20)-R^3　　(II)

其中

R^2 为具有 2 ～ 15 个氨基酸残基的肽，该肽的羧基端存在精氨酸残基，

R^1 为一个苯丙氨酸残基，

(B2-B29) 是人胰岛素 B 链 B2 到 B29 位置上的氨基酸残基，

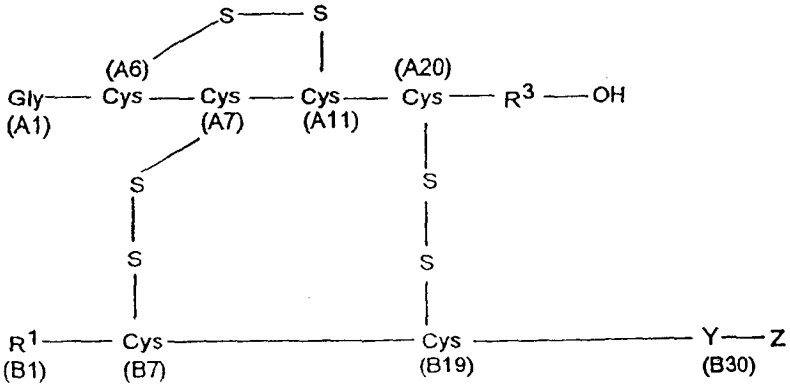
Y　为苏氨酸残基，

X　为具有人胰岛素 C 链氨基酸序列的肽，

(A2-A20) 是人胰岛素 A 链 A2 到 A20 位置上的氨基酸残基，而且

R^3 为氨基酸残基天冬酰胺或甘氨酸，

其中获得了式 I 的胰岛素或胰岛素衍生物



(I),

式 I 中的定义如下：

Y 为苏氨酸，

Z 为具有 2 个精氨酸残基的二肽或者 OH，

R^1 为苯丙氨酸残基，

R^3 为天冬酰胺或甘氨酸，

其中残基 A2-A20 对应于人胰岛素 A 链的氨基酸序列，而残基 B2-B29 对应于人胰岛素 B 链的氨基酸序列。

2. 如权利要求 1 所要求的方法，其中

在步骤 (a) 中，半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的量相当于使得每一个前体半胱氨酸残基 1-6 个半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的 SH 残基的量；

在步骤 (b) 中，在 pH 值 8 ～ 11、温度 30 ～ 45℃下，将含半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的前体悬浮液加入到浓度为 4 ～ 9M 的离液助剂溶液中，使所得混合物在所述温度下保持 20 ～ 40 分钟；而且

在步骤 (c) 中，在 pH 值 8 ～ 11、温度 15 ～ 20℃下，将混合物加入到一定量的水中，使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度稀释到大约 1 ～ 5mM，离液助剂的浓度稀释到 0.2 ～ 1.0M。

3. 如权利要求 1 或 2 所要求的方法，其中所说的离液助剂为胍或盐酸胍。

4. 如权利要求 1 或 2 所要求的方法，其中所说的离液助剂为尿素。

5. 如权利要求 1 ～ 4 中任一项所要求的方法，其中步骤 (b) 中的离液助剂浓度为 7.0 ～ 9M。

6. 如权利要求 1 ～ 5 中任一项所要求的方法，其中步骤 (b) 中的温度为 40℃。

7. 如权利要求 1 ～ 6 中任一项所要求的方法，其中步骤 (b) 中的 pH 值为 10 ～ 11。

8. 如权利要求 1 ～ 7 中任一项所要求的方法，其中步骤 (c) 中的 pH 值为 10 ～ 11。

9. 如权利要求 1 ～ 8 中任一项所要求的方法，其中步骤 (c) 中水的量使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度稀释到 2.5 ～ 3mM，离液助剂的浓度稀释到 0.5M。

10. 如权利要求 2 ～ 9 中任一项所要求的方法，其中步骤 (b) 中的离液助剂浓度为 8M，步骤 (b) 中的温度为 40℃，步骤 (b) 中的 pH 值为 10.6，步骤 (c) 中的 pH 值为 10.6，步骤 (c) 中水的量使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度稀释到 2.5 ～ 3mM，离液助剂的浓度稀释到 0.5M。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所要求的方法，其中式 II 中

R^2 为具有 10 个氨基酸残基的肽，该肽的羧基端存在精氨酸残基。

12. 如权利要求 11 所要求的方法，其中式 II 中

R^2 为具有如下氨基酸序列的肽：

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所要求的方法，其中式 I 中

Z 为 OH，

R^3 为天冬酰胺。

14. 如权利要求 1-12 中任一项所要求的方法，其中式 I 中

Z 为具有 2 个精氨酸残基的二肽，

R^3 为甘氨酸。

获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的方法

[0001] 本申请是申请日为 1998 年 8 月 17 日、申请号为 98117909.6、发明名称为“获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素前体的改进的方法”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种在半胱氨酸或盐酸半胱氨酸和一种离液助剂存在下，获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的前体的改进的方法。本发明还涉及一种由上述前体获得胰岛素或胰岛素衍生物的方法。

背景技术

[0003] 人胰岛素蛋白具有两条氨基酸链，总共具有 51 个氨基酸残基。两条氨基酸链中含有 6 个半胱氨酸残基，每两个半胱氨酸残基通过二硫键彼此连接。具有生物活性的人胰岛素，其 A 和 B 两条链间通过两个胱氨酸键进行连接，且 A 链中含有另一个胱氨酸键。从统计学角度看，人胰岛素分子中的二硫键形成方式具有 15 种可能性。然而，只有一种二硫键形成方式的人胰岛素具有生物活性。人胰岛素分子中下列半胱氨酸残基彼此连接：

[0004] A6-A11

[0005] A7-B7

[0006] A20-B19

[0007] 字母 A 和 B 分别代表胰岛素的两条氨基酸链，数字代表氨基酸残基的位置，分别从每条链的氨基端到羧基端数起。两个人胰岛素分子间也可以形成二硫键，因此很容易形成许多不同的二硫键。

[0008] 已知可从人胰岛素原制备人胰岛素的方法。人胰岛素原是有一条具有 86 个氨基酸残基的线性氨基酸链的蛋白，人胰岛素的 B 和 A 两条链是通过具有 35 个氨基酸残基的 C 肽彼此连接的。人胰岛素中二硫键是通过一个中间物 - 人胰岛素中的半胱氨酸残基形成的，该半胱氨酸带有硫保护基团，如 S- 磺酸根 (-S-SO3⁻) 基团 (EP0037255)。另外，已有方法可以制备具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素原 (Biochemistry,60, (1968), p622-629)，该方法是从猪胰腺中制备的胰岛素原开始，其中半胱氨酸残基是以 SH 残基形式存在的。“正确键合的胱氨酸键”这一术 语指的是具有生物活性的哺乳动物胰岛素中发现的二硫键。

[0009] DNA 重组技术能够使胰岛素或胰岛素衍生物的前体，尤其能够使人胰岛素原或者氨基酸序列和 / 或氨基酸链长度区别于人胰岛素的胰岛素原在微生物中制备。由基因修饰大肠杆菌细胞制备的胰岛素原不具有正确键合的胱氨酸键。下面是利用大肠杆菌 (EP 0 055 945) 制备人胰岛素的方法步骤：

[0010] 微生物发酵 - 细胞破碎 - 融合蛋白的分离 - 卤化氰裂解融合蛋白 - 含有胰岛素原序列的裂解产物的分离 -S- 磺酸基对胰岛素原中胱氨酸残基的保护 -S- 磺酸基的色谱提纯 - 正确键合的胱氨酸键的形成 - 胰岛素原的脱盐 - 含有正确键合的胱氨酸键的胰岛素原的色谱提纯 - 胰岛素原溶液的浓缩 - 胰岛素原浓缩溶液的色谱提纯 - 酶裂解胰岛素原以获

得人胰岛素－所获得的人胰岛素的色谱提纯。

[0011] 该方法的不足之处为步骤较多且在每一提纯步骤中都有产物损失，结果胰岛素的产率很低。由于操作多步骤，造成大量产物的损失。从以卤化氰裂解融合蛋白到亚硫酸盐化（sulfitolysis）和胰岛素原的提纯，预计损失40％的胰岛素原（EP 0 055 945）。在以后获取终产物的纯化过程中，同样会有很大的损失。

[0012] 如果能大大简化操作步骤，通过DNA重组技术制备人胰岛素或其衍生物的产率将会得到提高。

[0013] EP 0 600 372 A1（或US 5,473,049）和EP 0 668 292 A2公开了一种制备胰岛素或胰岛素衍生物的改进方法，在该方法中，在有硫醇，如半胱氨酸，以及至少一种离液助剂，如尿素或盐酸胍的情况下，使胰岛素或胰岛素衍生物的前体发生反应，结果使胰岛素或胰岛素衍生物的前体中非正确键合的胱氨酸键转变为正确键合的胱氨酸键。在已知方法中，这些蛋白首先以很低浓度溶解在含有一种离液助剂或多种离液助剂的混合物的水溶液中，然后，再将蛋白混合物与硫醇水溶液进行混合。

发明内容

[0014] 惊奇的是，发现胰岛素或胰岛素衍生物的正确折叠的前体的产率可以通过以下方法提高并且还可以减少折叠反应所需要的时间，首先将硫醇，即半胱氨酸或盐酸半胱氨酸加到前体的水悬浮液中，而不是在第一 步中将前体借助离液助剂加入溶液中；然后加入离液助剂水溶液使前体发生溶解；最后用适量的水稀释混合物，使其中的半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度达到一个优选的浓度，从而使得前体发生正确的折叠反应。

[0015] 因此，本发明涉及一种在半胱氨酸或盐酸半胱氨酸和离液助剂存在下，获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的前体的改进的方法，该方法包括依次实施以下步骤：

[0016] (a) 将胰岛素或胰岛素衍生物的前体的水悬浮液与一定量的半胱氨酸或盐酸半胱氨酸混合，使得每一个前体半胱氨酸残基1～15个半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的SH残基；

[0017] (b) 在pH值约8～约11.5、温度约15～约55℃下，将含半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的前体悬浮液加入到浓度为4～9M的离液助剂溶液中，使所得混合物在所述温度下保持约10～60分钟；

[0018] (c) 在pH值约8～约11.5、温度约5～约30℃下，将混合物加入到一定量的水中，使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度稀释到大约1～5mM，离液助剂的浓度稀释到0.2～1.0M。

[0019] 优选地，所说的方法是这样一种方法，其中

[0020] 在步骤(a)中，半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的量相当于使得每一个前体半胱氨酸残基1～6个半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的SH残基的量；

[0021] 在步骤(b)中，在pH值8～11、温度30～45℃下，将含半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的前体悬浮液加入到浓度为4～9M的离液助剂溶液中，使所得混合物在所述温度下保持20～40分钟；

[0022] 在步骤(c)中，在pH值8～11、温度15～20℃下，将混合物加入到一定量的水中，使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度稀释到大约1～5mM，离液助剂的浓度稀

释到 0.2 ～ 1.0M。

[0023] 离液助剂为在水溶液中能够打开氢键的化合物，如硫酸铵、盐酸胍、碳酸亚乙酯、硫氰酸盐、二甲亚砜和尿素。

[0024] 根据本发明，优选采用的离液助剂为胍、盐酸胍，或特别优选尿素。

[0025] 根据本发明的方法，步骤 (b) 中，离液助剂的优选浓度为 7.0 ～ 9M；优选的温度为 40℃；优选的 pH 值为 10 ～ 11。

[0026] 根据本发明的方法，步骤 (c) 中，优选的 pH 值为 10 ～ 11；混合物进入其中的水的优选量为使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度稀释到 2.5 ～ 3mM，离液助剂的浓度为 0.5M 的量。

[0027] 更优选的是，根据本发明的方法是这样一种方法，其中步骤 (b) 中的离液助剂的浓度大约为 8M，温度大约为 40℃，pH 值大约为 10.6；步骤 (c) 中的 pH 值大约为 10.6，水的量是使得混合物中半胱氨酸或盐酸半胱氨酸的浓度大约稀释到 2.5 ～ 3mM，离液助剂的浓度稀释到 0.5M 的量。

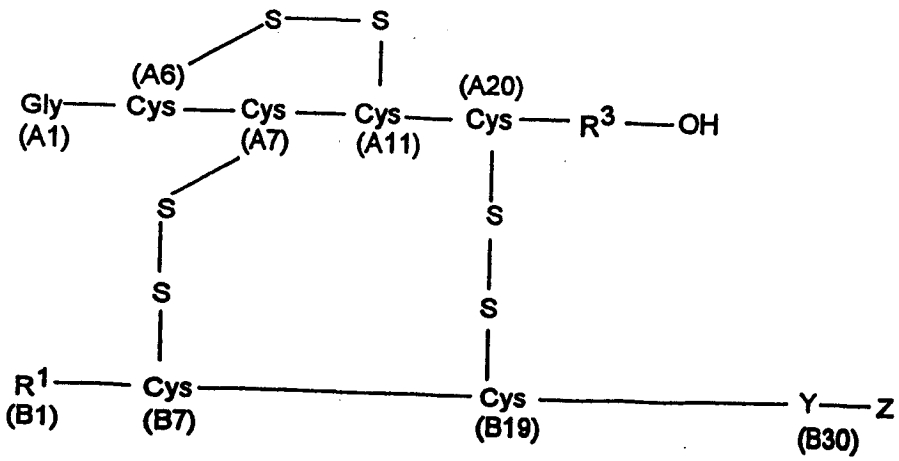
[0028] 根据本发明的方法所制备的胰岛素或胰岛素衍生物的前体，特别是胰岛素原，其胱氨酸键是正确键合的。

[0029] 胰岛素衍生物是天然胰岛素即人胰岛素（见 SEQ ID NO.:1 = 人胰岛素的 A 链；见 SEQ ID NO.:2 = 人胰岛素的 B 链，序列表）或动物胰岛素的衍生物，其与天然胰岛素不同之处在于天然胰岛素中的至少一个天然氨基酸残基被替换和 / 或添加了至少一个氨基酸残基和 / 或相应的、而不是相同的天然胰岛素的有机残基。

[0030] 根据本发明的方法制得的含有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的前体，可以通过 EP 0 600 372 A1（或 US5,473,049）或 EP 0 668 292 A2 中所描述的方法来制备含有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物，其中所描述的方法是采用胰蛋白酶或类胰蛋白酶进行酶裂解，另外，合适的话还可采用羧肽酶 B，以及在吸附树脂上纯化的后续步骤。

[0031] 可以从前体制备的胰岛素或胰岛素衍生物可以更好地采用式 I 来描述：

[0032]



(I),

[0033] 其中：

[0034] Y 为可基因编码的氨基酸残基；

[0035] Z 为 a) 选自组氨酸、精氨酸和赖氨酸的一种氨基酸残基，

[0036] b) 具有 2 或 3 个氨基酸残基的肽，该肽的羧基端含有精氨酸或赖氨酸残基，

[0037] c) 具有 2-35 个可基因编码的氨基酸的肽，含有 1 ～ 5 个组氨酸残基，或，

[0038] d)OH，

[0039] R^1 为苯丙氨酸残基 (Phe) 或一共价键，

[0040] R^3 为可基因编码的氨基酸残基，

[0041] 为了简化对应于动物的胰岛素或胰岛素衍生物的式 I，没有具体给出人胰岛素 A 链氨基酸序列上的基团 A2-A20，同样也没有具体给出人胰岛素 B 链氨基酸序列上的基团 B2-B29。

[0042] 肽和蛋白的氨基酸序列是从氨基酸链的 N- 端开始排列的 . 式 I 中括号中的内容如 A6、A20、B1、B7 或 B19 对应于胰岛素 A 链或 B 链中氨基酸残基的位置。

[0043] “可基因编码的氨基酸残基”一词是指甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、蛋氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸和硒代半胱氨酸。

[0044] 动物胰岛素的“A2-A20 残基”和“B2-B29 残基”可以理解为，如牛、猪或鸡胰岛素的氨基酸序列。胰岛素衍生物的“A2-A20 残基”和“B2-B29 残基”指的是通过用其它可基因编码的氨基酸替换氨基酸形成的、人胰岛素的相应氨基酸序列。

[0045] 如人胰岛素的 A 链具有以下序列 (SEQ ID NO. :1)：

[0046] Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr GlnLeu

[0047] Glu Asn Tyr Cys Asn.

[0048] 人胰岛素的 B 链具有以下序列 (SEQ ID NO. :2)：

[0049] Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala LeuTyr

[0050] Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr•

[0051] 在这种情况下，式 I 中的 R^3 为天冬酰胺 (Asn)，R^1 为苯丙氨酸 (Phe)，Y 为苏氨酸 (Thr)，Z 为 OH。

[0052] 本发明方法特别适用于制备式 II 的胰岛素或胰岛素衍生物的前体，其中胱氨酸键折叠正确 (式 II 中未显示)，

[0053] R^2-R^1-(B2-B29)-Y-X-Gly-(A2-A20)-R^3 (II)

[0054] 其中：

[0055] R^2 为 a) 一个氢原子，

[0056] b) 选自赖氨酸 (Lys) 和精氨酸 (Arg) 的一个氨基酸残基，或者

[0057] c) 具有 2 ～ 45 个氨基酸残基的肽，该肽的羧基端含有赖氨酸 (Lys) 或精氨酸 (Arg)

[0058] R^1 为苯丙氨酸残基 (Phe) 或共价键，

[0059] (B2-B29) 为人胰岛素、动物胰岛素或胰岛素衍生物的 B 链上 B2 到 B29 位置上的氨基酸残基，所述衍生物在一个或多个这些位置上任选改变，

[0060] Y 为一个可基因编码的氨基酸残基，

[0061] X 为 a) 选自赖氨酸 (Lys) 和精氨酸 (Arg) 的一个氨基酸残基，

[0062] b) 具有 2 ～ 35 个氨基酸残基的肽，该肽的 N- 端和羧基端含有赖氨酸 (Lys) 或精氨酸 (Arg) 残基，或者

[0063] c) 具有 2 ～ 35 个可基因编码的氨基酸的肽，其中含有 1 ～ 5 个组氨酸残基，

[0064] (A2-A20) 为人胰岛素、动物胰岛素或胰岛素衍生物的 B 链上 A2 到 A20 位置上的氨基酸残基，所述衍生物在一个或多个这些位置上任选改变，

[0065] R^3 为一个可基因编码的氨基酸残基。

[0066] 1. 优选的是，在式 II 中：

[0067] R^2 为 a) 一个氢原子或

[0068] b) 具有 2 ～ 25 个氨基酸残基的肽，该肽的羧基端含有精氨酸 (Arg) 残基，

[0069] R^1 为一个苯丙氨酸残基 (Phe)，

[0070] (B2-B29) 是人胰岛素 B 链 B2 到 B29 位置上的氨基酸残基，

[0071] Y 为选自丙氨酸 (Ala)、苏氨酸 (Thr) 和丝氨酸 (Ser) 的一个氨基酸残基，

[0072] X 为氨基酸残基精氨酸 (Arg) 或具有人胰岛素 C 链氨基酸序列的肽，

[0073] (A2-A20) 是人胰岛素 B 链 A2 到 A20 位置上的氨基酸残基，

[0074] R^3 为选自天冬酰胺 (Asn)、丝氨酸 (Ser) 和甘氨酸 (Gly) 的一个氨基酸残基，

[0075] 人胰岛素 C 链具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO. :3)：

[0076] Arg Arg Glu Ala Glu AsP Leu Gln ValG ly Gln Val Glu Leu GlyGly

[0077] Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly SerLeu

[0078] Gln Lys Arg.

[0079] 2. 优选的是，在式 II 中：

[0080] R^2 为 a) 一个氢原子或

[0081] b) 具有 2 ～ 15 个氨基酸残基的肽，该肽的羧基端含有精氨酸残基 (Arg)，

[0082] R^1 为一个苯丙氨酸残基 (Phe)，

[0083] (B2-B29) 是人胰岛素 B 链 B2 到 B29 位置上的氨基酸残基，

[0084] Y 为苏氨酸残基 (Thr)，

[0085] X 为氨基酸残基精氨酸 (Arg) 或具有 2 ～ 35 个氨基酸残基的肽，该肽的首端和末端有两个碱性氨基酸残基，尤其是精氨酸 (Arg) 和 / 或赖氨酸 (Lys)，

[0086] (A2-A20) 是人胰岛素 B 链 A2 到 A20 位置上的氨基酸残基，

[0087] R^3 为氨基酸残基天冬酰胺 (Asn) 或甘氨酸 (Gly)。

[0088] 式 I 的胰岛素或胰岛素衍生物的残基 Z 是指式 II 前体的 X 的部分氨基酸序列，残基 Z 是通过蛋白酶，如胰蛋白酶、类胰蛋白酶或羧肽酶 B 的活性作用而产生的。基团 R^3 是胰岛素 A 链位置 A21 上的氨基酸残基。基团 Y 是胰岛素 B 链位置 B30 上的氨基酸残基。

[0089] 胰蛋白酶、类胰蛋白酶是在精氨酸或赖氨酸残基的位置上切割氨基酸链的蛋白酶。

[0090] 羧肽酶 B 是除去氨基酸链羧基端上的碱性氨基酸残基如 Arg 或 Lys 的外切蛋白酶 (Kemmler 等，生物化学杂志 246，p6786-6791).

[0091] 从 1 中提到的前体，例如，可以制备式 I 所示的含有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物，其中 Y，R^1，R^2，R^3，A2-A20 和 B2-B29 的含义如 1 中提到的，并且 Z 是精氨酸残基 (Arg)、肽的残基 Arg-Arg 或 -OH。

[0092] 从 2 中提到的前体，例如，可以制备式 I 所示的含有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物，其中 Y，R^1，R^2，R^3，A2-A20 和 B2-B29 的含义如 2 中提到的，并且 Z 是精氨酸残基 (Arg)、肽的残基 Arg-Arg 或 Lys-Lys 或 -OH。

[0093] 借助于大量的基因构建体，可以在微生物中形成式 II 中的前体 (EP0 489 780，EP 0 347 781，EP 0 453 969)。通过发酵，基因构建体在诸如大肠杆菌或链霉菌中获得表达。所产生的蛋白贮存于微生物体内 (EP 0 489 780) 或者分泌到发酵液中。

[0094] 本发明的方法可以直接采用细胞破碎后的式 II 的胰岛素或胰岛素衍生物的前体，该前体仍然含有大量的来自发酵液和微生物的杂蛋白。然而，也可以采用预纯化了的式 II 前体，例如经过沉淀的或色谱纯化的前体。

具体实施方式

[0095] 实施例 1（对照例，现有技术）

[0096] 遗传修饰的大肠杆菌细胞经发酵 (EP 0 489 780)，制备出具有下列氨基酸序列的融合蛋白。

[0097] 胰岛素原序列 1(SEQ ID NO. :4)：

[0098] Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln HisLeu

[0099] Cys Gly Ser His Leu ValG lu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly GluArg

[0100] Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp LeuGln

[0101] Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser LeuGln

[0102] Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val GluGln

[0103] Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr CysAsn

[0104] 胰岛素原序列 1 对应于式 II，式中

[0105] X 为人胰岛素的 C- 肽 (SEQ ID NO. :3)

[0106] Y 为苏氨酸 (B30)，

[0107] R^1 为苯丙氨酸 (B1)，

[0108] R^2 为具有 10 个氨基酸残基的肽，

[0109] R^3 为天冬酰胺 (A21) 和

[0110] A2-A20 是人胰岛素 A 链的氨基酸序列（氨基酸残基 2 ～ 20)，B2-B29 是人胰岛素 B 链的氨基酸序列（氨基酸残基 2 ～ 29)。

[0111] 具有胰岛素原的序列 1 的表达的融合蛋白聚集在大肠杆菌的细胞内，并形成包涵体。发酵后，离心分离细胞，采用普通的高压匀浆法破碎细胞，释放出来的融合蛋白包涵体通过离心进行分离。

[0112] 将分离到的 20kg 具有胰岛素原序列 1 的融合蛋白包涵体（基于冻干后的干物质；通过 HPLC 测定含胰岛素的融合蛋白的含量，结果为 50％）溶解于 550L、pH 值为 10.6 的 8M 尿素溶液中。合适的话，离心掉引起混浊的少量物质后，将清液加入 9000L，pH 值为 10.6 和温度为 4℃ 的半胱氨酸水溶液 (5kg 盐酸半胱氨酸水合物)。

[0113] 经过大约 24 小时的折叠反应，通过分析用 HPLC，测定出这批反应中具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素原序列 1 的含量为 3.0kg，相当于 30％的转化率。

[0114] 用 1N 的 HCl 将 9500L 溶液的 pH 值调节到 5.0 并进行分离。然后，用 1N 的 NaOH 将 pH 值调节到 9。往溶液中加入 3g 的胰蛋白酶。根据 HPLC 测定的结果，具有 2 个羧基端精氨酸残基的胰岛素含量为 1.25kg.

[0115] 经羧肽酶 B 裂解后，再进行色谱纯化，便可得到人胰岛素。

[0116] 人胰岛素对应于式 I，式中

[0117] Y 为苏氨酸 (B30)，

[0118] Z 为 OH，

[0119] R^1 为苯丙氨酸 (B1)，

[0120] R^3 为天冬酰胺 (A21) 和

[0121] A2-A20 是人胰岛素 A 链的氨基酸序列（氨基酸残基 2 ～ 20)，B2-B29 是人胰岛素 B 链的氨基酸序列（氨基酸残基 2 ～ 29)。

[0122] 人胰岛素 2 由 SEQ ID NO. :1 和 2 组成，其中序列 1 和 2 是通过正确键合的胱氨酸键彼此连接的。

[0123] 如 EP 0 668 292 中所描述的，溶液通过吸附树脂进行浓缩和纯化。含有胰岛素 2 的洗脱物用水稀释并调节 pH 值后，可以直接采用色谱柱进一步进行纯化。

[0124] HPLC 分析

[0125] 于 95℃下，将 0.5g 的蛋白在 40ml 下述溶液中溶解 2 分钟，该溶液含 6M 的盐酸胍、50mM 的 tris(pH 值为 8.5)、5mM 的乙二胺四乙酸 (EDTA)、1％的 2- 巯基乙醇、10mM 的二硫苏糖醇，然后，在 14000g 下离心 20 分钟。取 0.02ml 的上清液加到高压液相色谱柱上。

[0126] 柱子：®**Nucleogel** RP300-5/46(Macherey&Nagel，Aachen，德国）

[0127] 梯度 :缓冲液 A :0.1％三氟乙酸 (TFA)

[0128] 缓冲液 B :0.09％ TFA/ 乙腈

[0129] 温度 :55℃

[0130] 运行总时间 :40 分钟

[0131] 梯度以对应于运行时间的缓冲液 B 的浓度来表示：

[0132] 10 分钟 25％，12 分钟 60％，13 分钟 90％，15 分钟 100％

[0133] 流速 :1ml/ 分钟

[0134] 检测波长 :215nm

[0135] 胰岛素的保留时间 :约 19 分钟

[0136] 实施例 2（本发明的方法）

[0137] 通过对遗传修饰的大肠杆菌细胞进行发酵培养 (EP 0 489 780)，制备出具有实施例 1 中所示的氨基酸序列的融合蛋白（胰岛素原序列 1.SEQ ID NO. :4)。

[0138] 具有胰岛素原序列 1 的表达的融合蛋白聚集在大肠杆菌细胞内，形成包涵体。发酵培养结束后，离心分离细胞，常规高压匀浆破碎细胞，最后通过离心分离到释放出的融合蛋白的包涵体。

[0139] 将 5kg 的盐酸半胱氨酸水合物加到含有 40kg 融合蛋白的融合蛋白水悬浮液中（通过冻干样品测定的）。

[0140] 将含有胰岛素原序列 1 的悬浮液（经 HPLC 测定含胰岛素的融合蛋白的浓度为 50％）于 40℃溶解到 550L、pH 值为 10.2、浓度为 8M 的尿素溶液中。在 pH 值为 10.6 和温度为 15℃的条件下，将所述清液加入 9000L 的水。

[0141] 经大约 5 小时完成折叠反应后，通过分析用 HPLC 测出反应液中具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素原序列 1 的含量为 10.0kg，相当于 50％的转化率。

[0142] 用 1N HCl 将 9500L 溶液的 pH 值调节到 5.0 并进行分离，再添加 1NNaOH 将溶液的

pH 值调节到 9. 往溶液中加入 10g 的胰蛋白酶。结果得到 4kg 具有 2 个羧基端精氨酸残基的胰岛素。用羧肽酶 B 进行裂解后，得到人胰岛素 (SEQ ID NO. :1 和 2，有正确键合的胱氨酸键).

[0143] 采用吸附树脂对溶液进行浓缩和纯化 .

[0144] 用水稀释并进行 pH 值调节后，可直接采用色谱柱进一步纯化含人胰岛素的洗脱物。

[0145] 实施例 3(对照实施例，现有技术)

[0146] 通过对遗传修饰的大肠杆菌细胞进行发酵培养 (EP0 489 780)，

[0147] 制备出具有下列氨基酸序列的融合蛋白

[0148] 胰岛素原序列 2(SEQ ID NO. :5) :

[0149] Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg PheVal Asn Gln HisLeu

[0150] Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly GluArg

[0151] Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp LeuGln

[0152] Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser LeuGln

[0153] Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val GluGln

[0154] Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr CysGly

[0155] 胰岛素原序列 2 对应于式 II，式中

[0156] X 为人胰岛素的 C- 肽 (SEQ ID NO. :3)

[0157] Y 为苏氨酸 (B30)，

[0158] R^1 为苯丙氨酸 (B1)，

[0159] R^2 为具有 10 个氨基酸残基的肽，

[0160] R^3 为甘氨酸 (A21) 和

[0161] A2-A20 是人胰岛素 A 链的氨基酸序列 (氨基酸残基 2 ～ 20)，B2-B29

[0162] 是人胰岛素 B 链的氨基酸序列 (氨基酸残基 2 ～ 29).

[0163] 具有胰岛素原序列 2 的表达融合蛋白聚集在大肠杆菌的细胞内，并形成包涵体。发酵后，离心分离细胞，采用普通的高压匀浆法破碎细胞，释放出来的融合蛋白包涵体通过离心进行分离。

[0164] 将分离到的 20kg 具有胰岛素原序列 2 的融合蛋白包涵体 (基于冻干后的干物质 ；通过 HPLC 测定含胰岛素的融合蛋白的含量，结果为 50％) 于 20℃条件下，溶解于 550L、pH 值为 10.6 的 8M 尿素溶中。将清液加入 9000L，pH 值为 10.6 和温度为 4℃的半胱氨酸水溶液 (5kg 盐酸 半胱氨酸水合物)。

[0165] 经过大约 24 小时的折叠反应后，通过分析用 HPLC 测出反应液中具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素原序列 2 的含量为 3.0kg，相当于 30％的转化率。

[0166] 用 1N 的 HCl 将 9500L 溶液的 pH 值调节到 5.0 并进行分离。然后，添加 1N 的 NaOH 将 pH 值调节到 9。往溶液中加入 3g 的胰蛋白酶。根据 HPLC 测定，具有 2 个羧基端精氨酸残基的胰岛素衍生物含量为 0.98kg。该胰岛素衍生物对应于式 I，其中，

[0167] Y 为苏氨酸 (B30)，

[0168] Z 为精氨酸 - 精氨酸，

[0169] R^1 为苯丙氨酸 (B1)，

[0170] R^3 为甘氨酸 (A21) 和

[0171] A2-A20 是人胰岛素 A 链的氨基酸序列 (氨基酸残基 2 ～ 20),B2-B29 是人胰岛素 B 链的氨基酸序列 (氨基酸残基 2 ～ 29),由 SEQ ID NO. :6 和 7 组成,该两个序列通过正确的胱氨酸键彼此连接。

[0172] 溶液通过吸附树脂进行浓缩和纯化。

[0173] 含有胰岛素衍生物的洗脱物用水稀释并调节 pH 值后,可以直接采用

[0174] 色谱柱进一步进行纯化。

[0175] 实施例 4(本发明的方法)

[0176] 通过对遗传修饰的大肠杆菌细胞进行发酵培养 (EP0 489 780),按照实施例 3 制备含有胰岛素原序列 2 的融合蛋白 (SEQ ID NO. :5)。

[0177] 具有胰岛素原序列 2 的表达的融合蛋白聚集在大肠杆菌细胞内,并形成包涵体。发酵培养结束后,离心分离细胞,常规高压匀浆破碎细胞。通过离心分离到释放的融合蛋白包涵体。

[0178] 将 5kg 的盐酸半胱氨酸水合物加到含有 40kg 融合蛋白的融合蛋白水悬浮液中 (通过冻干样品测定的)。

[0179] 将含有胰岛素原序列 2 的悬浮液 (经高压液相色谱分析,含胰岛素的融合蛋白的浓度为 50％) 于 40℃溶解到 550L、pH 值为 10.2、浓度为 8M 的尿素溶液中 . 在 pH 值为 10.6 和温度为 15℃的条件下,将所述清液加 入 9000L 的水。

[0180] 经大约 5 小时完成折叠反应后,通过分析用 HPLC 测定出具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素原序列 1 的含量为 10.0kg,相当于 50％的转化率。

[0181] 用 1N HCl 将 9500L 溶液的 pH 值调节到 5.0 并进行分离,再添加 1NNaOH 溶液将 pH 值调节到 9。往溶液中加入 10g 的胰蛋白酶,结果得到 2.8kg 的胰岛素衍生物 (HPLC 测定),胰岛素衍生物由 SEQ ID NO. :6 和 7 的序列组成,该两个序列通过正确键合的胱氨酸键彼此连接。

[0182] 采用吸附树脂对溶液进行浓缩并进行纯化。

[0183] 用水稀释并进行 pH 值调节后,可直接采用色谱柱进一步纯化含人胰岛素衍生物的洗脱物。

[0184] 序列表

[0185] <110> 阿文蒂斯药物德国有限公司

[0186] <120> 获得具有正确键合的胱氨酸键的胰岛素或胰岛素衍生物的方法

[0187] <130> IIC031422

[0188] <160> 7

[0189] <170> PatentIn version3.1

[0190] <210> 1

[0191] <211> 21

[0192] <212> PRT

[0193] <213> 大肠杆菌

[0194] <400> 1

[0195]

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

[0196] <210> 2

[0197] <211> 30

[0198] <212> PRT

[0199] <213> 大肠杆菌

[0200] <400> 2

[0201]

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

[0202] <210> 3

[0203] <211> 35

[0204] <212> PRT

[0205] <213> 大肠杆菌

[0206] <400> 3

[0207]

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly
1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu
20 25 30

Gln Lys Arg
35

[0208] <210> 4

[0209] <211> 96

[0210] <212> PRT

[0211] <213> 大肠杆菌

[0212] <400> 4

[0213]

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu
1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln
35 40 45

Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
50 55 60

Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln
65 70 75 80

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85 90 95

[0214] <210> 5

[0215] <211> 96

[0216] <212> PRT

[0217] <213> 大肠杆菌

[0218] <400> 5

[0219]

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu
1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg
20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln
35 40 45

Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
50 55 60

Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln
65 70 75 80

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly
85 90 95

[0220] <210> 6

[0221] <211> 32

[0222] <212> PRT

[0223] <213> 大肠杆菌

[0224] <400> 6

[0225]

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

[0226] <210> 7

[0227] <211> 21

[0228] <212> PRT

[0229] <213> 大肠杆菌

[0230] <400> 7

[0231]

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

[0232]

Glu Asn Tyr Cys Gly
20