

一种新的 B 链 C 端去四肽胰岛素的研制方法

王一成 石嘉豪¹ 张元兴 费 俭^{1*}(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; ¹ 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 报道了将单体胰岛素前体(MIP)经胰蛋白酶和羧肽酶B两步连续酶切获得B链C端去四肽胰岛素(DTI)的方法。MIP由甲醇酵母表达,最高发酵表达量达到150 mg/L。发酵液中MIP通过疏水层析,分子筛初步纯化后直接进行酶切,在胰蛋白酶酶切3 h后加入抑制剂p-aminobenzamidine处理15 min,然后直接加入羧肽酶B酶切6 h,再通过反相柱纯化即可得到纯品DTI,从分子筛到最后DTI,总纯化得率达到77%。按中国药典小白鼠惊厥法测定得DTI的生物活力为22 IU/mg,是胰岛素的80%,在Superdex G-75分子筛上测定DTI的解离聚合曲线,证明其是单体。

关键词 单体胰岛素前体; B链C端去四肽胰岛素; 胰蛋白酶; 羧肽酶B

近年来,糖尿病的发病率急剧上升,成为继心脑血管疾病和肿瘤之后威胁人类健康的重大疾病。现在全球糖尿病患者约有1.5亿,我国占5000万,预计2025年将达到3亿,其中75%在印度、中国等发展中国家^[1]。糖尿病分为I型和II型,胰岛素目前依然是I型糖尿病主要的治疗药物,而II型糖尿病患者对胰岛素也有相当大的需求^[2,3]。

从上世纪20年代胰岛素被发现以来,一直是治疗I型糖尿病无可替代的特效药。胰岛素是以单体形式发挥其生理作用的,但是在中性溶液中,浓度高于100 nmol/L的胰岛素即以二聚体、六聚体的形式存在,所以常规胰岛素制剂在临床给药中不能模仿生理胰岛素分泌的时效性,很难有效地控制饭后的血糖升高,并会给患者带来低血糖的危险^[4]。

在中性溶液中,蛋白质浓度高于0.6 mmol/L时仍然保持单体性质的胰岛素类似物称为单体胰岛素^[5]。单体胰岛素在给药处无须经过高倍稀释即可被迅速吸收,缩短了给药后药物作用的时程,故而获得可用于临床的单体速效胰岛素是开发新一代治疗糖尿病药物的主要目标之一^[5]。Eli Lilly公司开发的单体胰岛素Lyspro于1996年分别在欧洲和美国用于临床^[6]。2000年Novo公司开发的单体[B28 Asp]-胰岛素也获美国FDA批准^[7]。

1976年,我国科学家发现去B链C端五肽胰岛素DPI在中性溶液中为单体,但是其生理活性只有胰岛素的50%^[8]; Cui等^[9]用基因工程联合酶促转肽的方法制备了B链C端去四肽胰岛素(DTI),并证明DTI保持80%的胰岛素活性且为单体。但是根据当时的

报道,整个制备过程的得率很低、过程复杂。Ding等^[10]用基因工程方法在甲醇酵母中表达单体胰岛素前体(MIP),并且通过胰蛋白酶酶切获得了B链27位Lys去三肽胰岛素B₂₇K-DTrI,证明B₂₇K-DTrI保持80%的胰岛素活性且为单体。此方法的优点是以得率比较高而且相对简单的酶切方法来替代得率较低过程复杂的酶促转肽,而且更换了表达载体之后表达量也有所提高,但是B₂₇K-DTrI比天然胰岛素片断DTI多一个氨基酸。为了得到与胰岛素差异性更小的单体胰岛素,我们将甲醇酵母表达的MIP用胰蛋白酶和羧肽酶B处理,将B₂₇K-DTrI含有的多余赖氨酸切除,从而得到天然胰岛素片断DTI,并证明其保持80%胰岛素活力以及具有单体性质。本文报道了上述DTI的制备方法。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株(*E. coli* DH5 α)本室保存,甲醇酵母菌株[*Pichia pastoris* GS115(his)]购自Invitrogen公司;质粒pPIC9K为用于*Pichia pastoris*的分泌型质粒,源自Invitrogen公司;限制性内切酶购自TaKaRa公司;培养基原料购自Oxoid公司;填料XAD-7购自Sigma公司;TPCK-胰蛋白酶购自Sigma公司;羧肽酶B(carboxypeptidase B)(PMSF)购自Worthington公司;填料Sephadex G-25, RPC resource 15, Superdex

收稿日期: 2007-04-20 接受日期: 2007-06-07

上海市科学技术委员会基金项目资助(No.04DZ19204)

* 通讯作者。Tel/Fax: 021-65982429, E-mail: jfei124@126.com

75 HR 10/30 层析柱和 AKTA purifier 100 纯化仪购自 GE 公司; G418 购自 Calbiochem-Novabiochem 公司; 脱锌胰岛素、B 链去八肽胰岛素(DOI)、胰岛素前体(PIP)均由实验室自己制备。

1.2 方法

1.2.1 MIP 表达载体的构建与表达 按照文献^[10]报道的方法构建单体 MIP 表达载体, MIP 结构为 [insulin B-chain¹⁻²¹]-RGFFYK-AAK-[insulin A-chain¹⁻²¹]。含有 MIP 基因的分泌型表达质粒 pPIC9K/MIP 通过 *Bgl* II 酶切线性化后电转进入 *P. pastoris* GS115 菌株, 通过 G418 耐药筛选获得高拷贝插入的工程菌株, 用于发酵表达目的产物 MIP。发酵方法参照文献^[11]中介绍的方法, 发酵在 Bioengineering 公司的 16 L 发酵罐中进行, 甲醇诱导 72 h, 与文献^[10]不同之处在于诱导阶段未通纯氧, 只通空气, 菌密度 A_{600} 达到 500 左右终止发酵。

1.2.2 MIP 的初步纯化 发酵液经 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。将发酵上清液用 XAD-7 疏水层析分离^[12], 上清液上柱后, 先用 5% 醋酸和 10% 乙醇混合液洗去杂质, 再用 5% 醋酸和 45% 乙醇混合液洗脱目的产物。洗脱液旋转蒸发减压浓缩去除乙醇, 再用 Sephadex G-25 分子筛分离, 以 1 mol/L 醋酸为缓冲液, 收取洗脱峰, 冻干得含有 MIP 的粗品。

1.2.3 MIP 双酶切制备 DTI 胰蛋白酶酶切条件摸索: 将 MIP 粗品溶解在不同 pH 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 粗品浓度为 3 mg/ml, 以反应温度, 反应 pH, 酶和底物的比例以及时间行 4 因子 3 水平的正交实验, 正交表见表 1, 用 HPLC 测定不同条件下 B₂₇K-DTrI 的产率来决定最佳胰蛋白酶酶切条件。

在胰蛋白酶酶切完成之后, 加入胰蛋白酶抑制剂 p-aminobenzamidine、浓度为 0.05 mg/ml, 处理 15 min, 加入羧肽酶 B 进一步酶切。

羧肽酶 B 酶切条件摸索: 由于只有一个酶切位

表 1 胰蛋白酶酶切条件正交表

A	B	C	D
温度(°C)	pH	酶:底物(W/W)	时间(min)
30	6	1:600	30
30	7	1:800	60
30	8	1:1 000	120
15	6	1:800	120
15	7	1:1 000	30
15	8	1:600	60
4	6	1:1 000	60
4	7	1:600	120
4	8	1:800	30

点, 而且底物浓度和反应 pH 固定, 羧肽酶 B 的酶切得率仅与羧肽酶 B 的浓度和作用时间有关。加入不同浓度羧肽酶 B, 确定反应达到完全的时间, 根据需要确定羧肽酶 B 的用量。

酶切完全的粗品经过反相柱纯化 DTI, 反相柱分离条件见图 1。

1.2.4 DTI 体内生物活力测定 根据中国药典 2000 版附录 106 页中的小鼠惊厥法测定 DTI 生物活力: 通过对禁食 20 h 的 ICR 小鼠(小鼠重量为 20~22 g)皮下注射不同剂量的 DTI 和标准胰岛素, 每个剂量注射 5 只小鼠, 放入 30 °C 木箱中, 2 h 后根据小鼠惊厥数量来确定 DTI 的体内生物活力。

1.2.5 DTI 聚合性质测定^[9, 10, 13] 检测在中压系统(FPLC, AKTA Purifier)上进行, 层析柱采用 Superdex 75 (HR 10/30)(Pharmacia 公司), 流动相为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液, 流速为 0.5 ml/min, 上样量为 0.04 ml, 室温, 230 nm 检测。DTI 的上样浓度分别为 600 μmol/L、300 μmol/L、150 μmol/L 和 75 μmol/L, 观察其在分子筛柱中表现出的特性来判断其聚合性质。用对称因子 F_s 描述混合物的均一度, 用分配系数 K_D 描述混合物的平均分子量。 $F_s = W_{0.05h} / 2A$, 其中 $W_{0.05h}$ 为在 0.05 峰高处的峰宽, A 为 0.05 峰高处的前半峰宽; $K_D = (V_r - V_o) / (V_c - V_o)$, 其中 V_r 为流出体积, V_o 为外水体积, V_c 为总的柱床体积。

2 结果

2.1 MIP 的表达与初步纯化

在 4 mg/ml G418-YPD 板上挑取 MIP 表达菌株的单克隆作为种子菌, 在 16 L 发酵罐中发酵表达, 起始发酵体积为 5 L, 甘油培养 24 h, 甲醇诱导 72 h, 发酵液 A_{600} 为 500, MIP 表达产物用非变性聚丙烯酰胺电泳^[14]鉴定, 和标准品相比, 表达量可达到 150 ml/L 发酵液。

发酵液经过离心后用疏水层析 XAD-7 柱纯化, XAD-7 柱可以除去大量色素以及其他亲水性杂质, 起到富集蛋白质的作用^[15]。将过柱后的收集液经过旋转蒸发除去乙醇, 表达产物用 Sephadex G-25 分子筛柱进一步纯化, 去除小分子色素和其他小分子杂质。将洗脱液冷冻干燥, 此时干粉中蛋白质含量为 33% (紫外吸收法测定)。

2.2 粗品 MIP 的双酶切条件确定

根据正交实验结果(表 2), 可以得出胰蛋白酶最佳酶切条件为: 在底物浓度为 3 mg/ml 时, 反应温度

30 °C, 反应 pH 8, 酶和底物的比例为 1 : 600, 反应时间为 120 min。随着反应时间的增加产率有上升的趋势, 但是考虑到胰岛素 B 链 22 位精氨酸也是胰蛋白酶酶切位点, 最终确定酶切时间为 3 h。

羧肽酶 B 酶切条件结果见表 3。

双酶切反应结果由 HPLC(图 1)和电泳(图 2)鉴定, MIP 经过胰蛋白酶酶切成为 B₂₇K-DTrI, 再经过羧肽酶 B 酶切得到 DTI。酶切产物用 RPC 或者 RP-HPLC 一步纯化得到纯度为 90% 的 DTI(图 1 E), 从 Sephadex G-25 开始到最终获得 DTI, 酶切和纯化总得率为 77%。纯化所得 DTI 在电泳上为一条带(图 2), 经 ABI API2000 Q-trap 质谱仪鉴定分子量为 5 379.0 Da 与理论分子量 5 380.0 Da 相符(图 3)

2.3 DTI 体内生物活力测定

通过小鼠惊厥实验测定(表 4), DTI 制品的体内生物活力约为 22 U/mg, 相当于 80% 的人胰岛素活力。

表 2 胰蛋白酶酶切条件正交结果

列号 实验号	A	B	C	D	产率 (%)
	温度(°C)	pH	酶 : 底物 (W/W)	时间 (min)	
1	30 ¹	6 ¹	1 : 600 ¹	30 ¹	3.2
2	30	7 ²	1 : 800 ²	60 ²	44.9
3	30	8 ³	1 : 1 000 ³	120 ³	66.4
4	15 ²	6	1 : 800	120	15.3
5	15	7	1 : 1 000	30	17.6
6	15	8	1 : 600	60	60.6
7	4 ³	6	1 : 1 000	60	2.8
8	4	7	1 : 600	120	30.7
9	4	8	1 : 800	30	19.3
K1	38.1	7.1	31.5	13.4	
K2	31.8	31.1	26.5	36.1	
K3	17.6	48.8	28.9	37.5	
极差 R	20.5	41.7	5	24.1	

B³D³A³C¹

¹²³ 表示各分项条件编号, K 值越大, 表示该分项条件越有利于反应进行; R 值越大, 表示该项条件对反应影响越大。

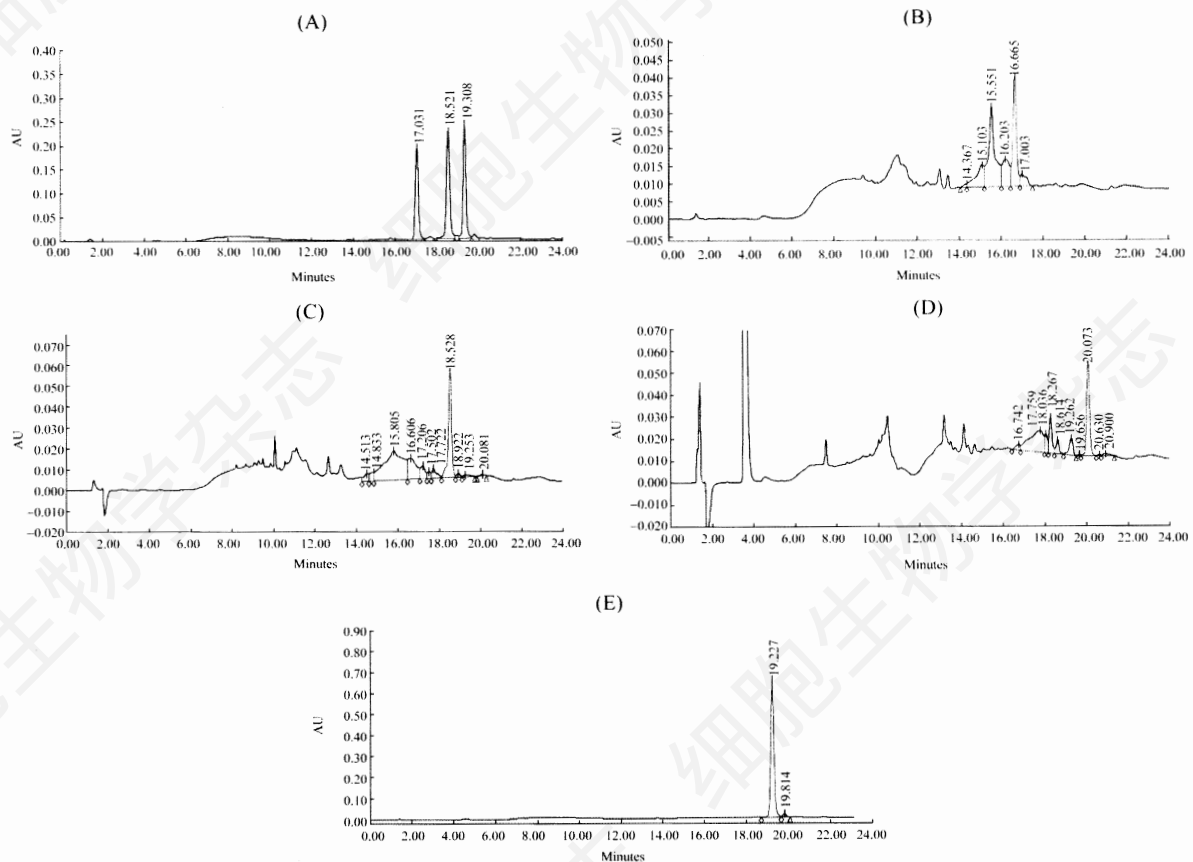


图 1 酶切 HPLC 鉴定

HPLC 特性: C8 柱(4.6 mm×250 mm); 溶液 A, 0.1% 三氟乙酸; 溶液 B, 90% 乙腈/0.1% 三氟乙酸; 梯度: 溶液 B 浓度 20 min 从 25%~45%; 流速 1 ml/min。(A) 标准品混合物含有 DOI、DTrI 和 DTI, 由于疏水性不同依次出峰; (B) 经过 XAD-7 和 Sephadex G-25 纯化的粗品 MIP; (C) 粗品 MIP 经过胰蛋白酶酶切 3 h 后转化成粗品 DTrI; (D) 粗品 DTrI 经过羧肽酶 B 酶切 6 h 后转化成粗品 DTI; (E) 经过反相柱纯化后样品纯度的鉴定图。

表3 羧肽酶B用量与酶切完全时间的关系表

羧肽酶B : 底物(W/W)	酶切完全时间(h)
1 : 200	3
1 : 500	6
1 : 1 000	18

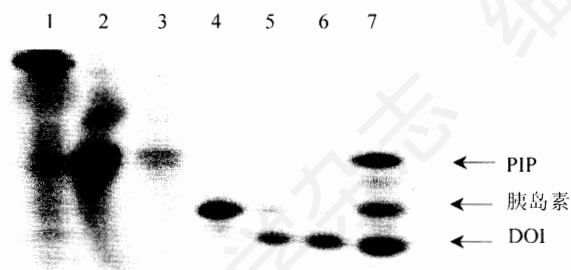


图2 pH 8.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定图

1: 发酵液上清液 20 μ l 上样; 2: 发酵液上清液经过 XAD-7 纯化; 3: 经过 Sephadex G25 纯化的 MIP 粗品; 4: MIP 经过 TPCK- 胰蛋白酶酶切 3 h 转化成 B₂₇K-DtrI; 5: B₂₇K-DtrI 经过羧肽酶 B 酶切 6 h 转化成 DTI; 6: DTI 经过 HPLC 纯化; 7: marker.

表4 小鼠惊厥实验测定 DTI 体内生物活力

注射量(μ g)	惊厥小鼠所占比例	
	人胰岛素	DTI
0.50	0/5	
0.63		0/5
1.00	2/5	
1.25		1/5
2.00	4/5	
2.50		4/5

2.4 DTI 聚合性质的测定结果

由于不同分子量的物质在分子筛层析柱上出峰时间是不同的,一般分子量大的物质出峰时间较分子量小的物质早。如果一种物质随着浓度增加容易聚合,那么不同浓度的同一种物质在分子筛上出峰时间以及峰形都将发生变化。通过比较不同浓度的胰岛素和 DTI 在分子筛柱 Superdex 75 (HR 10/30) 上的出峰情况和峰形(图 4), 来判断两者的聚合性质, 并且计算不同浓度的对称因子 F_s 和分配系数 K_D (图 5)。

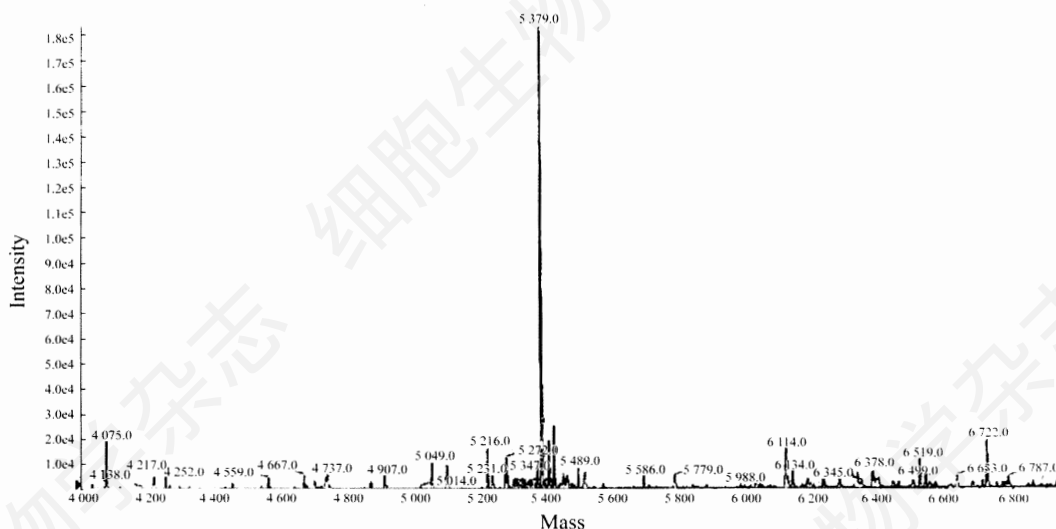


图3 DTI 质谱鉴定图

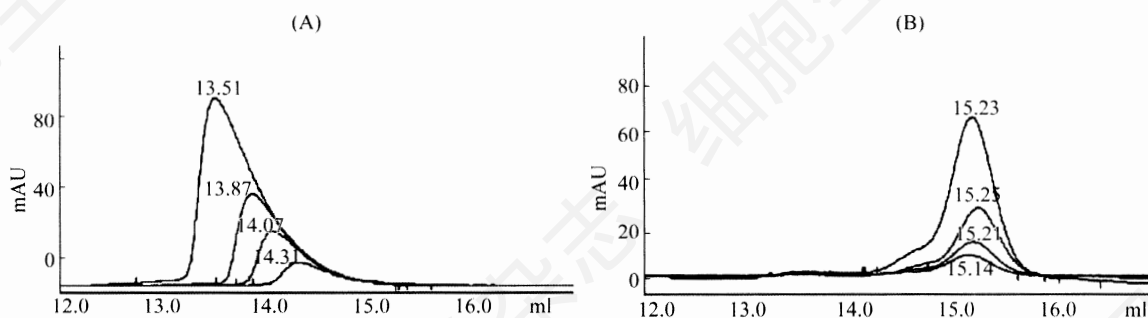
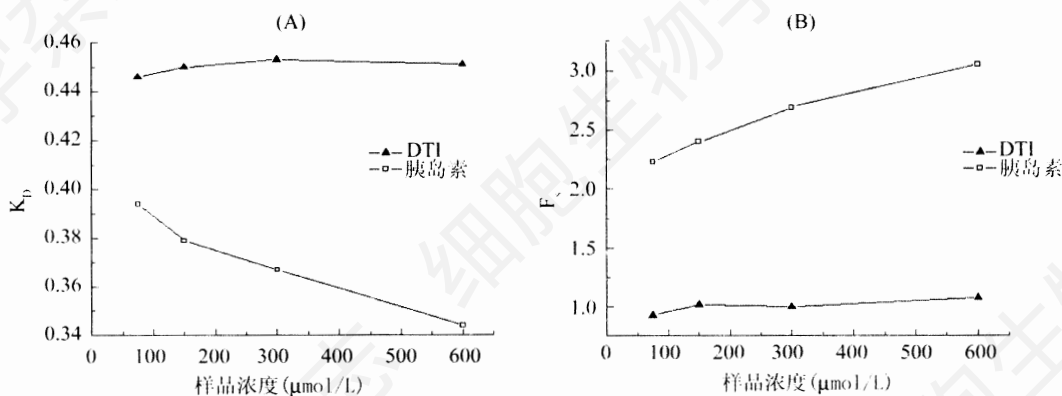


图4 分子筛 Superdex 75 (HR 10/30) 鉴定图

不同浓度的胰岛素(A)和 DTI(B)溶解在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中,用分子筛 Superdex 75 (HR 10/30) 鉴定其聚合性质, 曲线从上到下依次样品浓度为 600 μ mol/L、300 μ mol/L、150 μ mol/L 和 75 μ mol/L。

图5 胰岛素和DTI的 K_D (A)及 F_s (B)曲线

根据公式 $K_D = (V_r - V_o) / (V_c - V_o)$ 求出不同浓度所对应的 K_D , 其中 V_r 为流出体积即出峰体积, V_o 为外水体积, V_c 为总的柱床体积, 这两者与柱子本身属性有关, 分别为8 ml和24 ml。 K_D 与分子量有关, 若 K_D 相同则分子量相同。

根据公式 $F_s = W \cdot 0.05h / 2A$ 求出不同浓度所对应的 F_s , 其中 $W \cdot 0.05h$ 为在0.05峰高处的峰宽, A 为0.05峰高处的前半峰宽。 F_s 与混合物均一度有关, 该值越接近于1说明该物质纯度越高。

胰岛素和DTI的 K_D 及 F_s 曲线如图5所示, 从图中可以看出DTI的 K_D 基本不变, F_s 接近于1, 说明DTI随着浓度的改变, 分子量基本不变, 是单体, 而胰岛素的 K_D 随着上样浓度的增加而减小, F_s 为2.5左右, 说明分子量有着明显的变化, 即有多聚体的产生。

3 讨论

我们通过基因工程的方法在*Pichia pastoris*表达系统中表达了单体胰岛素DTI的前体MIP, 表达产物经过简单的两步纯化得到粗品, 然后直接进行两步连续酶切得到目的产物, 之后再经过一步提纯得到纯度90%以上的纯品, 样品从分子筛层析开始到最后产品获得, 总纯化得率达到77%, 相比较以前用啤酒酵母表达人胰岛素前体然后进行酶促转肽来得到DTI, 本次实验使用的方法简单、得率高, 且易于产业化放大。

本实验的关键在于两步连续酶切, 这里的两步连续酶切是指先用胰蛋白酶限制性酶切, 将MIP转化成 $B_{27}K-DTrI$, 然后运用抑制剂p-aminobenzamidine处理15 min, 将胰蛋白酶活性抑制之后直接加入羧肽酶B酶切。为什么要分步酶切而不是将两种酶同时加入一起酶切, 原因在于MIP B链22位的精氨酸也是胰

蛋白酶酶切位点, 如果酶切时间太长则MIP直接转化成没有活性的B链C端去八肽胰岛素(DOI), 同时胰蛋白酶还有可能将羧肽酶B降解, 所以要在MIP转化成 $B_{27}K-DTrI$ 之后及时抑制胰蛋白酶活性, 然后再加入羧肽酶B进行酶切, 从而得到DTI。

酶切过程中, 底物(MIP)的浓度非常关键, 由于酶切底物是粗品, 里面含有许多未知杂质会对酶切过程产生一定的影响, 我们曾将酶切底物浓度提高到25 mg/ml, 其余条件相同, 胰蛋白酶酶切1 h后取样, 经HPLC鉴定, 结果发现酶切反应完全被抑制(结果未显示), 推测是粗品中含有的某些杂质在高浓度下会起胰蛋白酶活性的丧失。将底物浓度设定为3 mg/ml是考虑到用在大规模工业生产时可以用超滤的方法替换分子筛Sephadex G-25这一步骤, 达到扩大处理量、缩短纯化周期的目的。但是超滤产物往往浓度不是很高, 为了避免中间增加浓缩的步骤, 所以将底物浓度设定为超滤可以达到的浓度来进行酶切。

对于羧肽酶B的酶切条件, 当酶和目的底物的比例为1:200时, 反应3 h完全, 当比例为1:500时, 反应需6 h, 而当比例为1:1000时, 反应过夜才能完全, 在产业化过程中, 可根据经济原则, 决定加入的酶量。

本研究建立了一种制备单体速效胰岛素的方法, 由于其具有技术路线简单、产物回收率高和制备成本低廉的优点, 具有明显的产业化前景。DTI是天然胰岛素的一个大片断, 不含突变氨基酸残基, 较之目前市场上已有的速效胰岛素其安全性和病人依从性将更好。此外, 含有该单体结构的胰岛素的药物组合物还可以用于注射以外的给药途径, 如在SD大鼠实验中, 舌黏膜下给药, 生物利用度为31.6%, 高于胰岛素20%^[16], 具有良好的药用价值和开发前景。

本工作是在中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所的张友尚院士和崔大数教授的共同指导下完成, 作者在此表示衷心的感谢。

参考文献(References)

- [1] Zimmet P *et al.* *Nature*, 2001, **414**: 782
- [2] Masteller EL *et al.* *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**: 652
- [3] Lee HC *et al.* *Nature*, 2000, **408**: 483
- [4] Brange J *et al.* *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, **35**: 307
- [5] Brange J *et al.* *Nature*, 1988, **333**: 679
- [6] Bakaysa DL *et al.* *Protein Sci*, 1996, **5**: 2521
- [7] Whittingham JL *et al.* *Biochemistry*, 1998, **37**: 11516
- [8] Insulin research group. *Sci Sin*, 1976, **19**: 475
- [9] Cui DF *et al.* *J Pept Res*, 2001, **57**: 188
- [10] Ding JG *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, **37**: 234
- [11] Higgins DR *et al.* *Pichia Protocols*. Totowa NJ: Humana Press, 1998, 107
- [12] Wang Y *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 2001, **73**: 74
- [13] Brems DN *et al.* *Protein Eng*, 1992, **5**: 527
- [14] Gabriel O. In: Jakoby WB ed. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, 1971, **22**: 565
- [15] Brady CP *et al.* *Protein Expr Purif*, 2001, **23**: 468
- [16] 彭红等. *中国生化药物杂志*, 2003, **24**: 116

A New Method for Preparation of Monomeric Destetrapeptide Human Insulin

Yi-Cheng Wang, Jia-Hao Shi¹, Yuan-Xing Zhang, Jian Fei^{1*}

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

¹School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract Monomeric destetrapeptide human insulin (DTI, human insulin with B27–30 removed) was obtained from a monomeric insulin precursor (MIP) expressed in *Pichia pastoris* through two step subsequent hydrolysis with trypsin and carboxypeptidase B. The crude MIP which purified by hydrophobic and size-exclusion chromatography was converted to be DTI by hydrolysis with trypsin for 3 h and with carboxypeptidase B for 6 h. Before hydrolysis with carboxypeptidase B, the activity of trypsin was inhibited by adding inhibitor p-aminobenzamidine for 15 min. The crude DTI was then purified by reverse processing chromatography. The yield of MIP was 150 mg per liter of culture, and the overall yield of purified DTI from crude MIP was 77%. The *in vivo* biological activity of DTI as determined by the mouse convulsion assay was 22 IU/mg. Compared with native insulin, DTI molecules do not aggregate in solution but exist in the monomeric form.

Key words monomeric insulin precursor; monomeric destetrapeptide human insulin; trypsin; carboxypeptidase B

Received: April 20, 2007 Accepted: June 7, 2007

This work was supported by the Foundation of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No.04DZ19204)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-65982429, E-mail: jfei124@126.com