



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I747929 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：106125882

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07K14/62 (2006.01)

A61K38/28 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

(30)優先權：2016/08/02 中國大陸

201610625257.5

2016/08/31 中國大陸

201610779132.8

(71)申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司(中國大陸) JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：劉德玉 LIU, DEYU (CN)；王宏偉 WANG, HONGWEI (CN)；趙亮 ZHAO, LIANG (CN)；王菲菲 WANG, FEIFEI (CN)；曾翔 ZENG, XIANG (CN)；王濤 WANG, TAO (CN)；王亞里 WANG, YALI (CN)；戴雨璐 DAI, YULU (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

TW 201323439A

WO 2005012347A2

審查人員：王顥棣

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：3 共 31 頁

(54)名稱

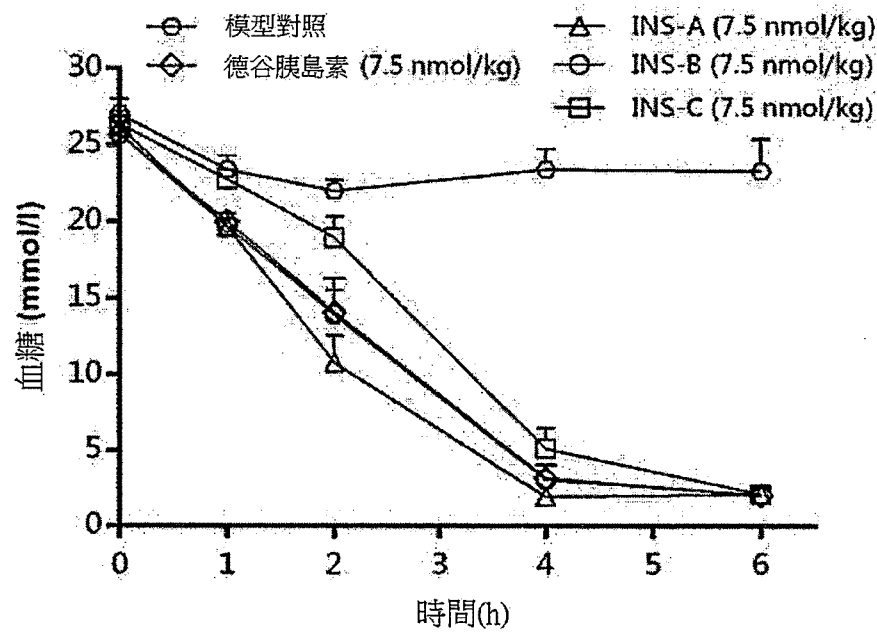
一種人胰島素或其類似物的醃化衍生物

(57)摘要

本發明提供了一種人胰島素或其類似物的醃化衍生物。具體而言，本發明提供了一種人胰島素類似物的醃化衍生物或其鋅複合物，該醃化衍生物相較於已有的胰島素類似物及其醃化衍生物更加長效，且降血糖更加平穩，儲存更加穩定。

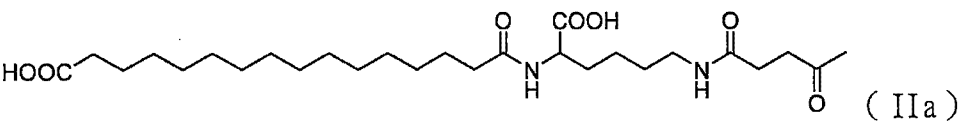
The present invention relates to an acylation derivative of human insulin or analog thereof. In particular, the present invention relates to an acylation derivative or Zinc complex of human insulin analog, compared with the existing insulin analogues and their acylation derivatives, the acylation derivative is more prolonged, reducing blood sugar more smoothly and the storage is more stable.

指定代表圖：



第2圖

特徵化學式：



I747929

發明摘要

※ 申請案號：106125882

※ 申請日：106/08/01

※ I P C 分類：
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

一種人胰島素或其類似物的醯化衍生物

AN ACYLATION DERIVATIVE OF HUMAN INSULIN OR
ANALOG THEREOF

【中文】

本發明提供了一種人胰島素或其類似物的醯化衍生物。具體而言，本發明提供了一種人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，該醯化衍生物相較於已有的胰島素類似物及其醯化衍生物更加長效，且降血糖更加平穩，儲存更加穩定。

【英文】

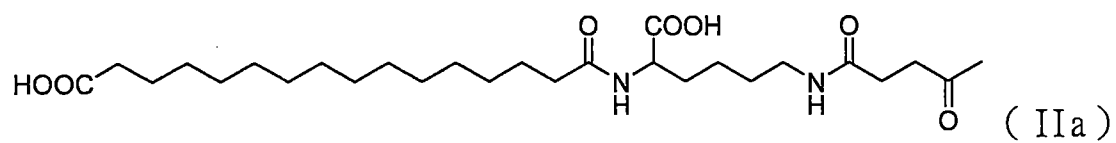
The present invention relates to an acylation derivative of human insulin or analog thereof. In particular, the present invention relates to an acylation derivative or Zinc complex of human insulin analog, compared with the existing insulin analogues and their acylation derivatives, the acylation derivative is more prolonged, reducing blood sugar more smoothly and the storage is more stable.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

一種人胰島素或其類似物的醯化衍生物

AN ACYLATION DERIVATIVE OF HUMAN INSULIN OR
ANALOG THEREOF

【技術領域】

本發明涉及一種人胰島素類似物的醯化衍生物。

【先前技術】

糖尿病 (Diabetes Mellitus, DM) 是一種常見的代謝內分泌疾病，是由於體內胰島素絕對或相對缺乏，或靶組織對胰島素不敏感而引起的慢性高血糖為特徵的伴隨糖、脂肪和蛋白質代謝紊亂的臨床慢性、全身性代謝症候群。它由遺傳和環境因素相互作用而引起，涉及人體各個系統，包括心腦血管、腎、眼、神經等臟器併發症，嚴重危害人類健康，是一種終生疾病。

糖尿病已成為一種常見病、多發病，是繼癌症、心腦血管病之後，第三大威脅人類生命的疾病，是全人類的挑戰，其對人們生命健康的危害不分種族和國家。據國際糖尿病聯盟 (IDF) 的統計，上個世紀八十年代中期至九十年代中期十年間，糖尿病患者總量增長 4 倍，達到 1.2 億。2007 年全球糖尿病患者人數為 2.46 億，其中 46% 為 40-59 歲勞動力人口。預計到 2025 年全世界糖尿病患者將增加到 3.8 億，占到世界成年人口的 7.1%。

使用人胰島素是治療糖尿病的一種主要方法，但是人胰島素作用時間較短，使得病人必須頻繁注射，極為不便。因此，人們致力於獲得一些能夠更長時間作用於人體的胰島素類似物及其衍生物。其中，使用醯化基團修飾人胰島素或其類似物，是一種提高其半衰期的有效方法。

WO2005012347 和 WO2013086927 分別公開了兩類不同的人胰島素類似物的醯化衍生物，此類衍生物是藉由將脂肪酸形式的醯化基團共價連接到人胰島素類似物的胺基酸上，經過此種修飾後，它們的半衰期相對於現有的胰島素類似物大大提高。然而，仍然需要提供半衰期更長的胰島素類似物或其醯化衍生物，以提高治療效果，並維持血糖平穩。並且現有的醯化胰島素還存在不穩定的問題，也需要提供更為穩定的胰島素類似物或其醯化衍生物。

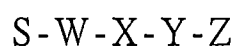
另一方面，生理性胰島素需求包括基礎和餐時（速效），前者提供全天血糖控制，後者主要應對餐後血糖升高。根據其生理特點，理想的餐時胰島素製劑能在進餐後迅速達峰發揮作用，並能在血糖降到正常水準時降至基礎水準，以避免下餐前低血糖。理想的基礎胰島素則應有超長作用時間（在所有患者中持續 > 24 h）、最小幅度胰島素作用變異性（減少低血糖）和安全性，且能與速效胰島素結合使用（便利性）。由於速效胰島素降血糖作用十分迅速，這就要求當基礎胰島素與其合用時應當提供一種較為平緩的降血糖作用，以免二者共同作用時產生低血糖的風險。因此，提供一種具有足夠長的作用時間，且初始作

用時平緩降血糖的基礎胰島素具有十分迫切的需求。

【發明內容】

本發明的目的是提供一種新的人胰島素類似物的醯化衍生物，其降低血糖的效果更佳持久，且具有更高的穩定性。

本發明提供的一種人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，所述人胰島素類似物的醯化衍生物具有如下通式所示的結構：



(I)

其中 S 為 B 鏈第 30 位蘇胺酸缺失的人胰島素；

-W-X-Y-Z 為胰島素類似物的醯化修飾基團；

其中 W 為具有 $-OC(CH_2)_nCO-$ 的二醯基結構，其中 n 為 2~10 之間整數，該結構以其醯基之一和母體胰島素或其類似物的 A-鏈或 B-鏈 N-末端胺基酸殘基的 α -胺基或 B-鏈上存在的賴胺酸殘基的 ϵ -胺基形成醯胺鍵；

X 為含羧酸基團的二胺基化合物，該化合物以其胺基之一與 W 中的一個醯基連接形成醯胺鍵；

Y 為 $-A(CH_2)_m-$ ，其中 m 為 6-32 的整數，較佳係 10-16 的整數，特別佳係 12-14 的整數，A 不存在或 $CO-$ ；

Z 為 $-COOH$ 。

較佳地，W 與 B-鏈上存在的賴胺酸殘基的 ϵ -胺基形成醯胺鍵。較佳地，n 為 2~5 之間的整數，較佳係 2。

B 鏈第 30 位蘇胺酸缺失的人胰島素，是一種人胰島素

類似物，其 A、B 鏈的胺基酸序列如下所示：

A 鏈：GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

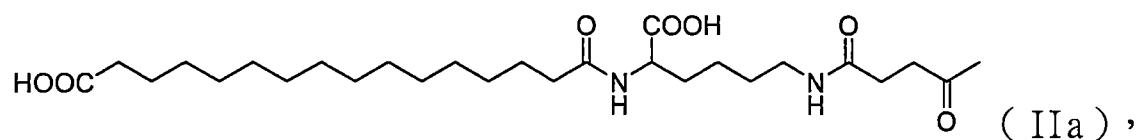
SEQ ID NO.1

B 鏈：FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK

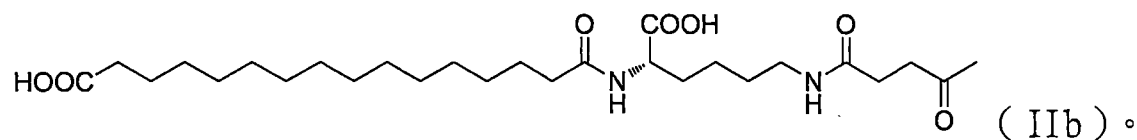
SEQ ID NO.2。

X 代表的含羧酸基團的二胺基化合物可以為
 $-\text{HN}(\text{CH}_2)_p\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$ ，其中 p 為 2-10 的整數，較佳係
 2-6 的整數，特別佳係 2-4 的整數，最佳係 4。

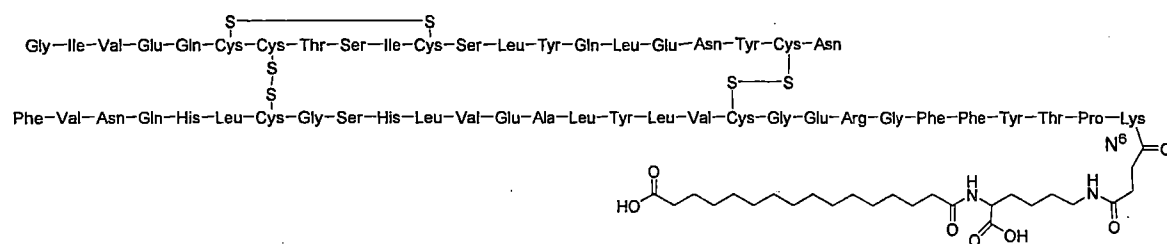
在本發明特別佳的實施方式中，-W-X-Y-Z 具有如下結構：



較佳係

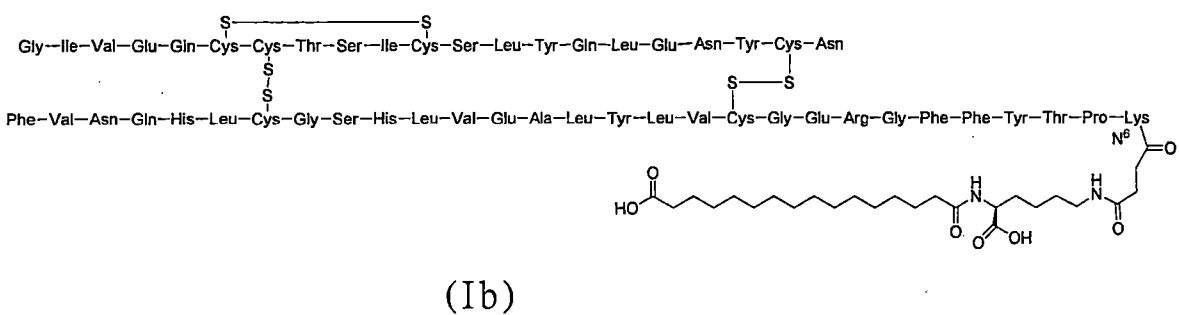


本發明中特別佳的人胰島素類似物的鹽化衍生物可依習慣命名為
 $\text{N}^\alpha - (\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}) - \text{N}^\epsilon - (\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO} - (\text{N}^\epsilon \text{B}^{29} - \text{Des}(\text{B}30)\text{人胰島素})) - \text{Lys} - \text{OH}$ ，其具有如下式(Ia)的具體結構，

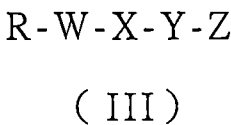


(Ia)

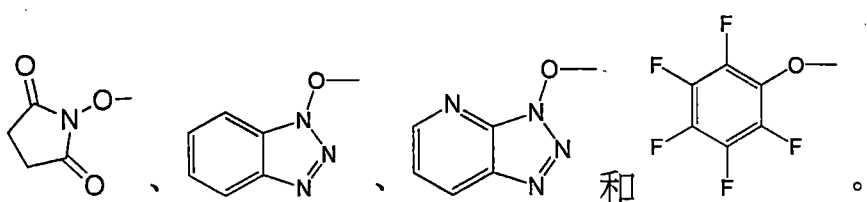
更佳地，賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-氧代丁醯基))des(B30)人胰島素，其具有式(Ib)所示的結構。



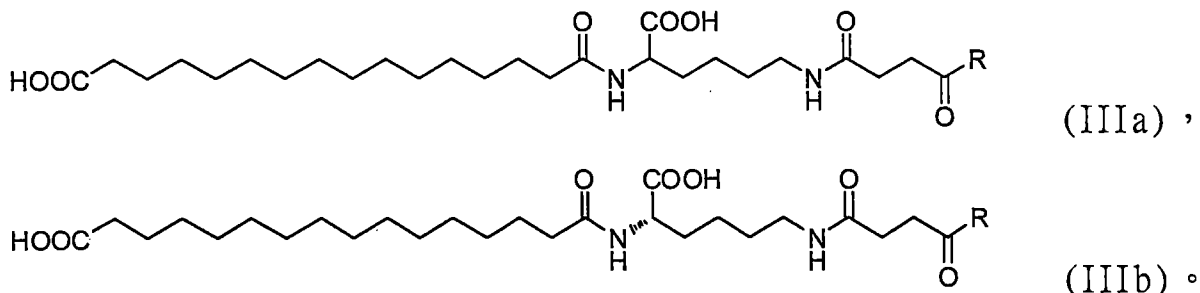
本發明還提供了一種製備前述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物的製備方法，其包括使式(III)化合物與B鏈第30位蘇胺酸缺失的人胰島素的步驟，



其中 R 為離去基團，較佳係活化酯基團，更佳係選自

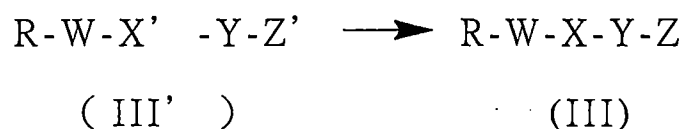


較佳的式(III)化合物具體結構可為(IIIa)或(IIIb)所示，



所述的製備方法較佳還包括式(III')化合物去除羧

基保護基得到式 (III) 化合物的步驟，



其中，X'、Z' 分別代表 X、Z 中所有的羧基被保護基保護的形式，所述的保護基較佳係 C₁-C₆ 的烷基，較佳係 C₁-C₄ 的烷基，特別佳係甲基或第三丁基；R 如通式 (III) 中定義。

在本發明特別佳的實施方案中，人胰島素類似物的醯化衍生物的鋅複合物是一種人胰島素類似物的醯化衍生物的 6 聚體，其中每個 6 聚體中包含多於 4 個鋅原子，即 6 分子醯化胰島素包含多於 4 個鋅原子；更佳係 5 至 8 個鋅原子，特別佳係 5 個鋅原子。

本發明還提供了一種藥物組成物，含前述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，還含有藥學上可接受的載體。

本發明還提供了前述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物或其藥物組成物在製備治療糖尿病的藥物中的用途。

本發明還提供一種藥物組成物，除含有上述人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物外，還含有速效胰島素。

本發明還涉及上述人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物、或含有它們的藥物組成物在製備治療糖尿病的藥物中的用途。

本發明還涉及前述的人胰島素類似物的醯化衍生物

或其鋅複合物、或含有它們的藥物組成物與速效胰島素聯合在製備治療糖尿病的藥物中的用途。

另外，本發明提供了一種治療糖尿病的方法，所述方法包括對需要治療的患者給予前述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物、或含有它們的藥物組成物。

本發明提供的另一種治療糖尿病的方法，所述方法包括對需要治療的患者給予前述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物、或含有它們的藥物組成物和速效胰島素。本發明還涉及前述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物、或含有它們的藥物組成物作為治療糖尿病的藥物。

本發明還涉及前述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物、或含有它們的藥物組成物聯合速效胰島素作為治療糖尿病的藥物。

本發明中的糖尿病包括 I 型糖尿病和 II 型糖尿病。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示 STZ 大鼠給藥後血糖值變化曲線

($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs 模型對照組; $^*P<0.05$ vs 德穀胰島素)

第 2 圖顯示 0~6 小時內 STZ 大鼠給藥後血糖值變化曲線

第 3 圖顯示給藥後 0~2、0~4 和 0~6 小時內血糖 AUC 的比較 ($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs INS-C)

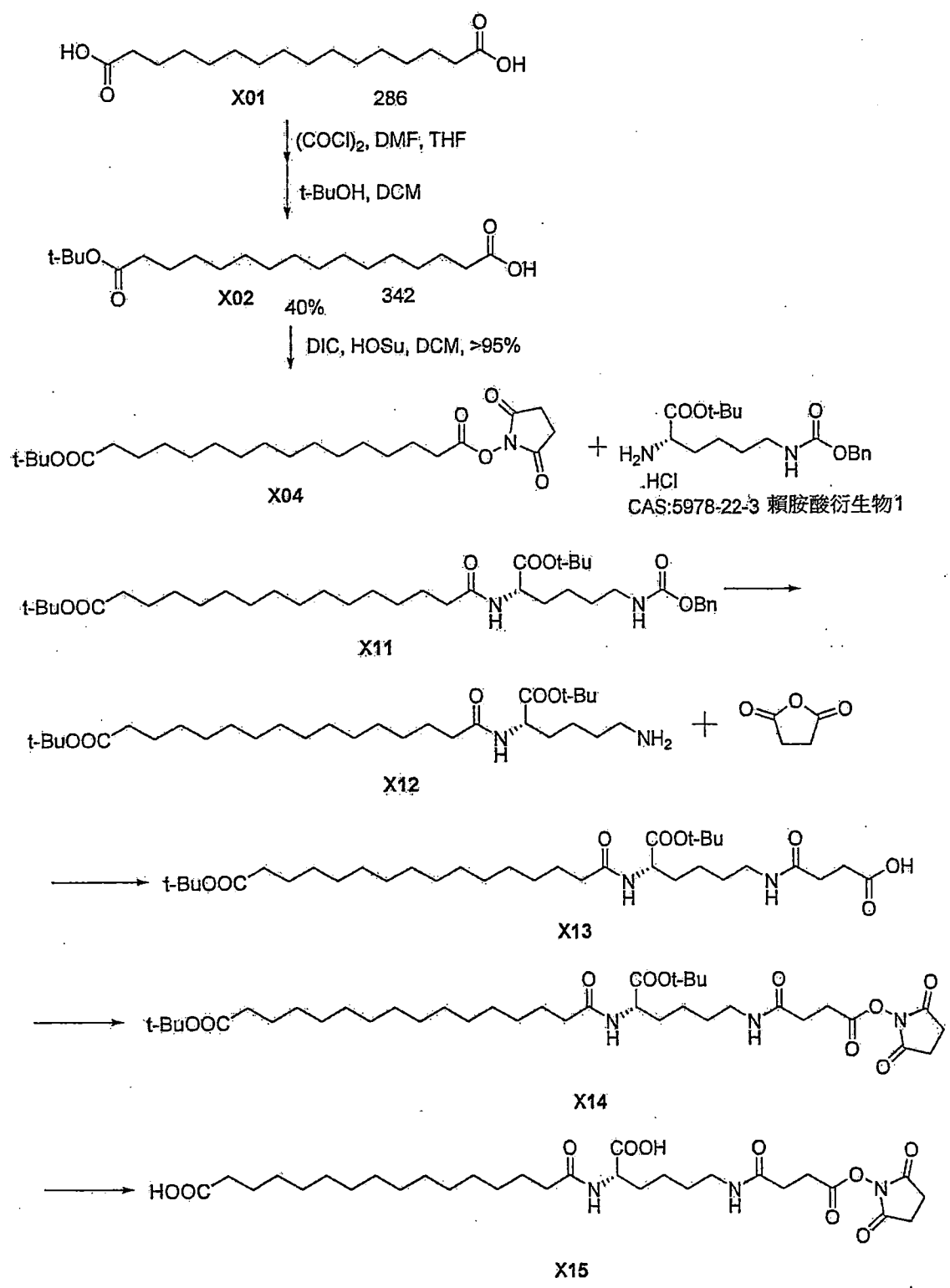
【實施方式】

以下結合實施例進一步描述解釋本發明。

實施例 1：

賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-
氧代丁鹽基))des(B30)人胰島素的製備

1、N^α-(十六烷脂肪二酸)-N^ε-(3-鹽基丙酸-OSu)賴胺酸
的製備



取 X01 (150g, 524.5mmol), 室溫下加入乾燥的 THF (2.5L), 隨後加入催化量的 DMF (1.0mL), 將草醯氯 (49mL) 加入到 100mL 的恆壓滴液漏斗中, 將草醯氯緩慢滴加到反應瓶中, 期間有氣體生成, 需不斷放氣, 約滴加兩小時。滴加完畢後, 室溫攪拌 1.5h, 隨後減壓旋乾 THF, 向反應瓶中加入 DCM (800mL) 和第三丁醇 (500mL), 室溫下攪拌過夜。旋乾第三丁醇和二氯甲烷, 加入二氯甲烷 (1L), 過濾, 除去不溶固體。濾液旋乾過管柱。收集所需成分, 旋乾, 石油醚重結晶, 得 54g 產品 X02, 同時回收二第三丁酯產物 X03。

將 X02 (28.5g, 83.3mmol) 溶於 DCM (200mL) 中, 室溫下加入 N-羥基丁二醯亞胺 (5.54g, 48.1mmol) 和二異丙基碳二醯亞胺 (7.6mL), 室溫攪拌 1 天, TLC 顯示基本反應完全。過濾, 除去不溶固體, 減壓旋乾溶劑, 管柱層析純化, 得 28.5g X04。

將 X04 (22g, 50.1mmol) 溶於乾燥的 THF (250mL) 中, 室溫攪拌, 賴胺酸衍生物 (20.5g, 55mmol) 和三乙胺 (21mL) 分別加入到反應體系中, 室溫攪拌 24h。矽藻土過濾, THF 洗滌三次, 旋乾溶劑, 管柱層析純化, 得 31g 產物 X11。

將 X11 (30.6g, 46.3mmol) 溶於無水乙醇 (200mL) 中, 室溫攪拌, 加入 6.0g 10% Pd/C, 隨後通入氫氣, 室溫劇烈攪拌反應過夜。矽藻土抽濾, 無水乙醇洗滌三次, 濾液旋乾, 得 24.5g X12 粗製品, 直接用於下一步反應。

將 X12 (24g, 45.6mmol) 溶於乾燥 THF (200mL) 中，加入三乙胺 (12.7mL)，隨後降溫至 0°C。將丁二酸酐 (5.2g, 52mmol) 分批加入到反應體系中，0°C 下繼續攪拌 30min，隨後轉移至室溫攪拌過夜。減壓旋乾 THF，剩餘物溶於二氯甲烷 (500mL) 中，用 5% 檸檬酸水溶液 (500mL*2) 洗滌 2 次，飽和食鹽水洗滌 1 次，無水硫酸鈉乾燥。減壓旋乾溶劑，得 29.0g X13 粗製品，直接用於下一步反應。

將 X13 (28.5g, 45.5mmol) 溶於 DCM (200mL) 中，室溫下加入 N-羥基丁二醯亞胺 (5.54g, 48.2mmol) 和二異丙基碳二醯亞胺 (7.6mL)，室溫攪拌 1 天，TLC 顯示基本反應完全。過濾，除去不溶固體，減壓旋乾溶劑，管柱層析純化，得 28.5g 產品 X14。

將 X14 (3.0g, 4.1mmol) 溶於三氟乙酸 (15mL) 中，室溫攪拌 45min，隨後低溫減壓旋乾三氟乙酸，加入無水乙醚，有固體析出，過濾，濾餅用無水乙醚洗滌三次，固體乾燥後，得 1.8g 產品 X15。

2、賴胺酸 B29 (N^{ϵ} -(N^{α} -十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸- N^{ϵ} -氧代丁醯基))des(B30)人胰島素的製備

取 B 鏈第 30 位蘇胺酸缺失的人胰島素 53mg (8mg/mL, 50mM Tris HCl pH8.5 緩衝液)，用 1.5M Na_2CO_3 調節 pH 至約 10.75，後用緩衝液 (50mM Tris HCl pH8.5 緩衝液) 定容至 4mg/mL。將 N^{α} -(十六烷脂肪二酸)- N^{ϵ} -(3-醯基丙酸-OSu)賴胺酸 (18mg) 懸浮於 7mL 乙腈後，每隔 15min 將 1.75mL 本溶液加入到上述 B 鏈第 30 位蘇胺酸缺失的人胰

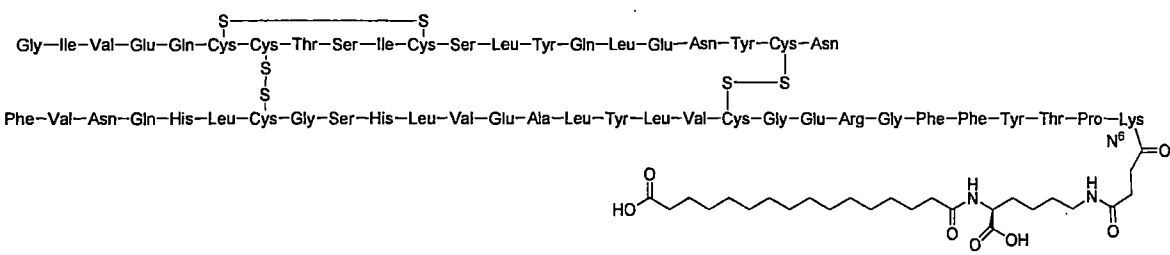
島素溶液中開始反應，分 4 次加完，同時攪拌。加完後開始計時，反應 1h 後，用乙酸將溶液 pH 調節至約 7.5，終止反應，獲得粗製品溶液。採用 RP-HPLC 對反應過程進行中控。

3、賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-氧代丁醯基))des(B30)人胰島素的純化

將上述前體粗製品溶液加入水稀釋使有機相含量約 15% (v:v)，用 0.45 μm 濾膜過濾後採用 RP-HPLC 對其進行純化得純化液。

4、賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-氧代丁醯基))des(B30)人胰島素的超濾及凍乾

將上述純化溶液用超濾膜包系統將樣品置換至注射用水中，進行凍乾獲得凍乾產物 26mg。所得分子結構式如下。



式 (Ib)

5、賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-氧代丁醯基))des(B30)人胰島素結構確證

賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-氧代丁醯基))des(B30)人胰島素實測質譜分子量為 6203.37Da，與理論分子量 6203.21Da 一致。

用 V8 蛋白酶對 INS 進行酶解，並對酶解產物進行 LC-MS 分析，結果顯示共產生 4 個肽段，肽段分子量分別為 416.23Da（A1-A4）、2968.29Da（A5-A17,B1-B13）、1376.57Da（A18-A21,B14-B21）和 1510.84Da（B22-B29），與理論肽段分子量相符，其中肽段 B22-B29 為脂肪酸鏈修飾的肽段。證明修飾位點和預期一致。

實施例 2：觀察受試藥物在 STZ 誘導的 I 型糖尿病模型上的降血糖作用

1、供試品

名稱	受試藥物 (INS-1)	受試藥物 (INS-2)	德穀胰島素
供應商	江蘇恆瑞	江蘇恆瑞	諾和諾德
物理狀態	無色液體	無色液體	無色液體
儲存條件	4℃	4℃	4℃

其中，INS-1 和 INS-2 分別代表將賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-氧代丁醯基))des(B30)人胰島素製備成每個胰島素衍生物六聚體包含 5 個 Zn 和 8 個 Zn 的兩種不同複合物，其配製方法為本領域常規方法，德穀胰島素中每六聚體包含 5 個 Zn。

2、供試品配製

供試品避光保存在 4℃ 條件下，取適量受試樣品母液 600 nmol/mL，用溶媒稀釋 400 倍至 1.5nmol/mL，劑量為 7.5 nmol/kg。使用時藥物恢復至室溫。

3、實驗動物

種屬	SD 大鼠
級別	SPF 動物
訂購周齡	6 周
實驗開始時周齡	8-9 周
體重範圍	300-400 克
性別	雄性
供應商	斯萊克實驗動物有限公司
供應商地址	中國，上海
動物識別方法	尾部記號筆標記
動物訂購數量	50 隻
動物使用數量	40 隻

4、實驗方法

SPF 級大鼠實驗室環境飼養 7 天，均以標準飼料、標準籠餵養，溫度 20-25℃，濕度 40-60%。造模前一天，大鼠禁食 16 小時，腹腔快速注射 STZ (65 mg/kg)，1 小時後，恢復給食。造模後每日給予充足飲水（提供正常的 2-3 倍的飲水量）、食物，每日換墊料 1-2 次，保持乾燥。在第五天測量空腹血糖（禁食 6 小時），挑出血糖值 >16.7 mmol/L 的大鼠。根據血糖水準，將其分為 4 組。

動物分組及給藥資訊如下：

組別	動物類型	動物數	給藥劑量 (nmol/kg)	給藥體積 (mL/kg)	給藥 方式	給藥 頻率
溶媒對照	STZ 大鼠	10	/	5	SC	一次
德穀胰島素	STZ 大鼠	10	7.5	5	SC	一次
INS-1	STZ 大鼠	10	7.5	5	SC	一次
INS-2	STZ 大鼠	10	7.5	5	SC	一次

給藥前不禁食，單次皮下注射各藥物，對照組用溶媒注射相同體積，給藥後全程禁食。給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24 小時測定大鼠血糖值。24 小時點測完血糖值後，採血製備血清。

所有的資料被錄入到 Excel 文檔中，並以 Mean ± SEM 的方式表示。資料統計分析使用 Graphpad Prism 6.0 軟體，單因素或雙因素方差分析比較方法，以 P<0.05 作為顯著性差異的判斷標準。

5、結果：

SD 大鼠注射 STZ 後第五天，禁食 6 小時，進行血糖測試，造模成功率達 80%。

由第 1 圖可見，STZ 溶媒組基礎血糖值給藥前為 27.3 mmol/L，給藥後其血糖值逐步降低，24 小時後達到 15.1 mmol/L，血糖變化值為 12.1 mmol/L。陽性藥德穀胰島素組給藥前後血糖值變化為 16.8 mmol/L。陽性藥物德穀胰島素組給藥後 6、8、10、12 和 24 小時時間點，其血糖水準與

溶媒陰性對照組比較都具有顯著性差異，表明該動物模型及實驗方法的有效性。

與溶媒陰性對照組比較，受試藥物 INS-1 和 INS-2 在給藥後 24 小時內均能顯著降低動物的血糖水準，在 6、8、10、12 和 24 小時時間點都具有顯著性差異，並且血糖水準持續下降，表明其具有良好的長效降糖作用。

試藥物 INS-1 和 INS-2 對於 STZ 大鼠，其血糖值隨給藥後時間的變化曲線基本一致，表明兩者的降糖效果類似。在 24 小時時間點，INS-1 和 INS-2 的降糖效果優於德穀胰島素組，表明 INS-1 和 INS-2 具有更好的長效作用。

實施例 3：觀察各種長效胰島素在 STZ 誘導的 I 型糖尿病模型上的降血糖作用

1、供試品

名稱	INS-A	INS-B	INS-C	德穀胰島素
供應商	江蘇恆瑞	江蘇恆瑞	江蘇恆瑞	諾和諾德
物理狀態	無色液體	無色液體	無色液體	無色液體
儲存條件	4℃	4℃	4℃	4℃

其中 INS-A 代表 WO2013086927 中的 HS061、INS-B 代表 WO2013086927 中的 HS067、INS-C 代表賴胺酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸-N^ε-氧代丁醯基))des(B30)人胰島素，所有供試品均使用相同的處方，且使用鋅複合物形式，每個胰島素六聚體包含 5 個 Zn。

2、供試品配製

供試品避光保存在 4℃ 條件下，取適量受試樣品母液 600 nmol/mL，用溶媒稀釋 80 倍至 7.5 nmol/mL，劑量為 7.5 nmol/kg。使用時藥物恢復至室溫。

3、實驗動物

種屬	SD 大鼠
級別	SPF 動物
訂購周齡	6 周
實驗開始時周齡	8-9 周
體重範圍	300-400 克
性別	雄性
供應商	北京維通利華實驗動物技術有限公司
供應商地址	中國，北京
動物識別方法	尾部記號筆標記
動物訂購數量	60 隻
動物使用數量	40 隻

4、實驗方法

SPF 級大鼠實驗室環境飼養 7 天，均以標準飼料、標準籠餵養，溫度 20-25℃，濕度 40-60%。造模前一天，大鼠禁食 16 小時，腹腔快速注射 STZ (65 mg/kg)，1 小時後，恢復給食。造模後每日給予充足飲水（提供正常的 2-3 倍的飲水量）、食物，每日換墊料 1-2 次，保持乾燥。在第五天測量空腹血糖（禁食 6 小時），挑出血糖值 >16.7 mmol/L 的大鼠。根據血糖水準隨機分為 5 組。

動物分組及給藥資訊如下：

組別	動物 類型	動物 數	給藥劑量 (nmol /kg)	給藥 體積 (mL/kg)	給藥 方式	給藥 頻率
溶媒對照	STZ 大鼠	8	/	1	SC	一次
德穀胰島素	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次
INS-A	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次
INS-B	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次
INS-C	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次

給藥前不禁食，單次皮下注射各藥物，對照組用溶媒注射相同體積，給藥後全程禁食。給藥後 1、2、4、6、8、10、12、24 小時測定大鼠血糖值。

所有的資料被錄入到 Excel 文檔中，並以 Mean $\pm$ SEM 的方式表示。資料統計分析使用 SPSS 軟體，單因素或雙因素方差分析比較方法，以 $P < 0.05$ 作為顯著性差異的判斷標準。

5、結果

STZ 溶媒組基礎血糖值給藥前為 27.01 mmol/L，給藥後其血糖值逐步降低，24 小時後達到 11.64 mmol/L，血糖變化值為 15.37 mmol/L。陽性藥德穀胰島素組給藥前後血糖值變化為 19.78 mmol/L。陽性藥物德穀胰島素組給藥後 1、2、4、6、8、10 和 12 小時時間點，其血糖水準與溶媒陰性對照組比較都具有顯著性差異，表明該動物模型及實

驗方法的有效性。

與溶媒陰性對照組比較，受試藥物 INS-A、INS-B 和 INS-C 在給藥後 24 小時內均能顯著降低動物的血糖水準，從血糖值來看，受試藥物的血糖值（分別為 7.03 ± 1.15 、 3.57 ± 0.44 及 4.20 ± 0.72 mmol/L）低於溶媒陰性對照組（ 11.64 ± 3.94 mmol/L）。這表明三者均具有較良好的長效降糖作用。重點比較了各組在 0~6 小時內降低血糖的差異性，具體數值如表 1 和表 2 所示：

表 1 單次給藥對 STZ 誘導的 I 型糖尿病大鼠血糖的影響（Mean $\pm$ SEM, n=8）

組別	血糖值 (mmol/L)				
	給藥前	給藥後	給藥後	給藥後	給藥後
		1h	2h	4h	6h
溶媒	27.01 ± 1.02	23.41 ± 0.89	22.01 ± 0.71	23.43 ± 1.32	23.30 ± 2.09
德穀	25.69 ± 0.72	$20.01 \pm 0.75^{**\$}$	$14.13 \pm 2.16^{**}$	$3.20 \pm 0.81^{**}$	$2.05 \pm 0.16^{**}$
INS-A	26.19 ± 0.71	$19.68 \pm 0.55^{***\$}$	$10.80 \pm 1.77^{***\$}$	$1.96 \pm 0.33^{**\$}$	$2.14 \pm 0.23^{**}$
INS-B	25.73 ± 0.73	$19.69 \pm 0.86^{***\$}$	$13.94 \pm 1.59^{**\$}$	$3.10 \pm 1.02^{**}$	$2.09 \pm 0.22^{**}$
INS-C	26.38 ± 0.87	22.75 ± 0.51	18.96 ± 1.37	$5.14 \pm 1.36^{**}$	$2.15 \pm 0.15^{**}$

注：* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 空白溶媒組； $^{\$}P < 0.05$, $^{**\$}P < 0.01$ vs INS-C。

表 2 單次給藥後 0~2、0~4 及 0~6 小時內的血糖 AUC 值 (Mean $\pm$ SEM, n=8)

組別	血糖 AUC 值 (mmol/L $\cdot$ h)		
	0~2 小時	0~4 小時	0~6 小時
德穀胰 島素	39.92 $\pm$ 1.35 ^{\$\$}	57.24 $\pm$ 3.54 ^{\$}	62.49 $\pm$ 3.84 ^{\$}
INS-A	38.17 $\pm$ 1.09 ^{\$\$}	50.93 $\pm$ 2.96 ^{\$\$}	55.03 $\pm$ 3.34 ^{\$\$}
INS-B	39.52 $\pm$ 1.40 ^{\$\$}	56.56 $\pm$ 3.49 ^{\$}	61.74 $\pm$ 4.40 ^{\$}
INS-C	45.42 $\pm$ 1.25	69.52 $\pm$ 3.74	76.81 $\pm$ 5.09

注：^{\$} $P < 0.05$, ^{\$\$} $P < 0.01$ vs INS-C。

INS-C 和德穀胰島素對於 STZ 大鼠，給藥後 INS-C 組血糖值下降幅度小於德穀胰島素，且在給藥 1 小時後顯著高於德穀胰島素組（見第 2 圖和表 1）。具體數值如表 1 所示。另由第 3 圖和表 2 可見，INS-C 在給藥後 0~2、0~4 和 0~6 小時內血糖-時間曲線下面積（AUC）均顯著高於德穀胰島素。這表明，若與速效胰島素聯合給藥或組成複方製劑給藥，INS-C+速效胰島素在給藥後 0~6 小時內（速效胰島素發揮降血糖作用的時間段）發生低血糖的風險明顯低於德穀胰島素+速效胰島素。

INS-C 和 INS-A 對於 STZ 大鼠，給藥後 INS-C 組血糖值下降幅度小於 INS-A，且在給藥 1、2 和 4 小時後顯著高於 INS-A 組；而在給藥 10 和 12 小時後則顯著低於 INS-A 組，給藥 24 小時後血糖值也有低於 INS-A 組的趨勢。表明

INS-C 降血糖速度慢於 INS-A，且長效作用也優於 INS-A，更符合長效胰島素的作用特點。此外，由第 3 圖可見，INS-C 在給藥後 0~2、0~4 和 0~6 小時內血糖 AUC 均顯著高於 INS-A。這表明，若與速效胰島素聯合給藥或組成複方製劑給藥，INS-C+速效胰島素在給藥後 0~6 小時內發生低血糖的風險明顯低於 INS-A+速效胰島素。

INS-C 和 INS-B 對於 STZ 大鼠，給藥後 INS-C 組血糖值下降幅度小於 INS-B，且在給藥 1 和 2 小時後顯著高於 INS-B 組，表明 INS-C 降血糖速度慢於 INS-B。此外，由第 3 圖可見，INS-C 在給藥後 0~2、0~4 和 0~6 小時內血糖 AUC 均顯著高於 INS-B。這表明，若與速效胰島素聯合給藥或組成複方製劑給藥，INS-C+速效胰島素在給藥後 0~6 小時內發生低血糖的風險明顯低於 INS-B+速效胰島素。

綜合 24 小時和 0~6 小時內降血糖的效果，INS-C 有降糖作用持久且初期降糖平緩的特點，是最為理想的長效胰島素，特別適合於與速效胰島素聯合或組成複方，從而減少注射次數，提高患者的依從性。

實施例 4：犬 PK 試驗（INS-B 和 INS-C 與實施例 3 中具有相同的含義）

6 隻雄性比格犬（每組 3 隻）單次皮下注射 INS-B 或 INS-C（3 nmol/kg）後，不同時間點採血並分離血清，檢測血清中 INS-B 或 INS-C 的濃度。結果顯示，INS-B 在 $4.7 \pm$

1.2 小時 (3 隻動物分別為 4、4 和 6 小時) 內達峰，而 INS-C 則為 8 小時 (三隻動物均為 8 小時) 達峰。INS-B 和 INS-C 的半衰期分別為 6.0 ± 1.2 和 7.8 ± 1.1 小時。這提示 INS-C 作用更為平緩且作用時間更長。

實施例 5：穩定性比較

INS-A、INS-B、INS-C (各種代號與實施例 3 含義相同)、德穀胰島素均按照德穀胰島素上市處方製備成製劑，然後觀察它們的穩定性，使用 HPLC 測定起始和各時間點主峰純度以及雜質含量，具體結果如表 3 所示。從表 3 可以看出，INS-C 的穩定性明顯優於 INS-A 和 INS-B；略優於德穀胰島素。

表 3 穩定性資料比較

供試品	條件/時間	主峰純度%	歸一化總雜%
INS-C	0 天	99.40	0.60
INS-A		99.22	0.78
INS-B		98.48	1.52
德穀胰島素		99.02	0.98
INS-C	40°C 7 天	98.86	1.14
INS-A		95.86	4.14
INS-B		94.86	5.14
德穀胰島素		98.11	1.89
INS-C	55°C 7 天	93.15	6.85
INS-A		52.00	48.00
INS-B		53.56	46.44
德穀胰島素		91.67	8.33
INS-C	40°C 14 天	98.38	1.62
德穀胰島素		97.75	2.25
INS-C	55°C 14 天	87.94	12.06
德穀胰島素		86.71	13.29

注：由於 7 天時 INS-A 和 INS-B 雜質增長已經過快，所以後續未再測 14 天數據。

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 江蘇恆瑞醫藥股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.)

<120> 一種人胰島素或其類似物的醯化衍生物

<130> 770053CPCT

<150> CN201610625257.5

<151> 2016-08-02

<150> CN201610779132.8

<151> 2016-08-31

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人類

<223> 人胰島素類似物 A 鏈

<400> 1

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

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人胰島素類似物 B 鏈

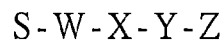
<400> 2

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
20 25

申請專利範圍

1. 一種人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，該人胰島素類似物的醯化衍生物具有如下通式所示的結構：



(I)

其中 S 為 B 鏈第 30 位蘇胺酸缺失的人胰島素；
W-X-Y-Z 為胰島素類似物的醯化修飾基團；

其中 W 為具有 $-OC(CH_2)_nCO-$ 的二醯基結構，其中 n 為 2 至 5 之間整數，該結構以其醯基之一和母體胰島素類似物 B-鏈上存在的賴胺酸殘基的 ϵ -胺基形成醯胺鍵；

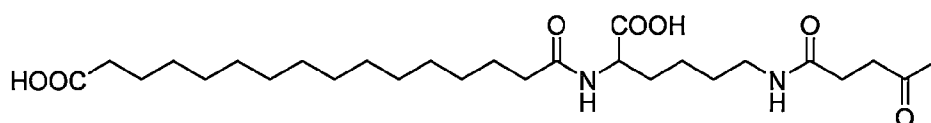
X 為結構如 $-HN(CH_2)_pCH(COOH)NH-$ 的化合物，p 為 2 至 10 的整數，該化合物以其胺基之一與 W 中的一個醯基連接形成醯胺鍵；

Y 為 $-A(CH_2)_m-$ ，其中 m 為 10 至 16 的整數，A 為 $CO-$ ；

Z 為 $-COOH$ 。

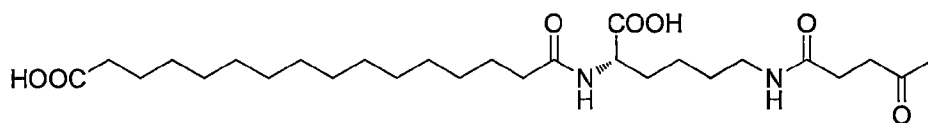
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，其中 m 係 12 至 14 的整數。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，其中 n 為 2。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，其中 p 為 2 至 6 的整數。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，其中 p 為 2 至 4 的整數。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，其中 p 為 4。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，其中 $-W-X-Y-Z$ 具有如下結構，



(IIa)。

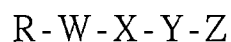
8. 如申請專利範圍第 11 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物，其中 $-W-X-Y-Z$ 具有如下結構，



(IIb)。

9. 一種 N^{α} -($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}$)- N^{ϵ} -($\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ -($N^{\epsilon \text{ B}29}$ -Des(B30)人胰島素))-Lys-OH 或其鋅複合物。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述的 N^{α} -($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}$)- N^{ϵ} -($\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ -($N^{\epsilon \text{ B}29}$ -Des(B30)人胰島素))-Lys-OH 或其鋅複合物，其係賴胺酸 B29 (N^{ϵ} -(N^{α} -十六烷脂肪二酸-L-賴胺酸- N^{ϵ} -氧代丁醯基))des(B30)人胰島素或其鋅複合物。
11. 一種申請專利範圍第 1 至 8 項中任意一項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物的製備方法，其包括使式 (III) 化合物與 B 鏈第 30 位蘇胺酸缺失

的人胰島素反應的步驟，

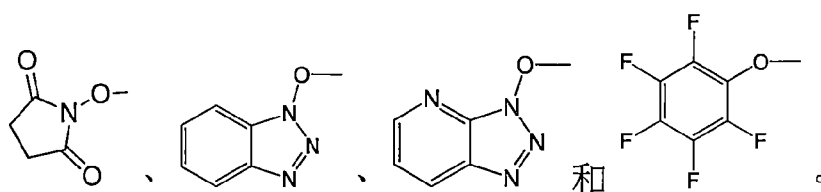


(III)

其中 R 為離去基團。

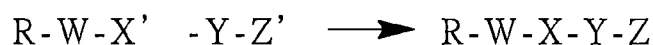
12. 如申請專利範圍第 11 項所述的方法，其中 R 為活化酯基團。

13. 如申請專利範圍第 11 項所述的方法，其中 R 係選自



14. 如申請專利範圍第 11 項所述的方法，還包括式

(III') 化合物去除羧基保護基得到式 (III) 化合物的步驟，



(III')

(III)

其中，X'、Z' 分別代表 X、Z 中所有的羧基被保護基保護的形式；R 如申請專利範圍第 11 項中定義。

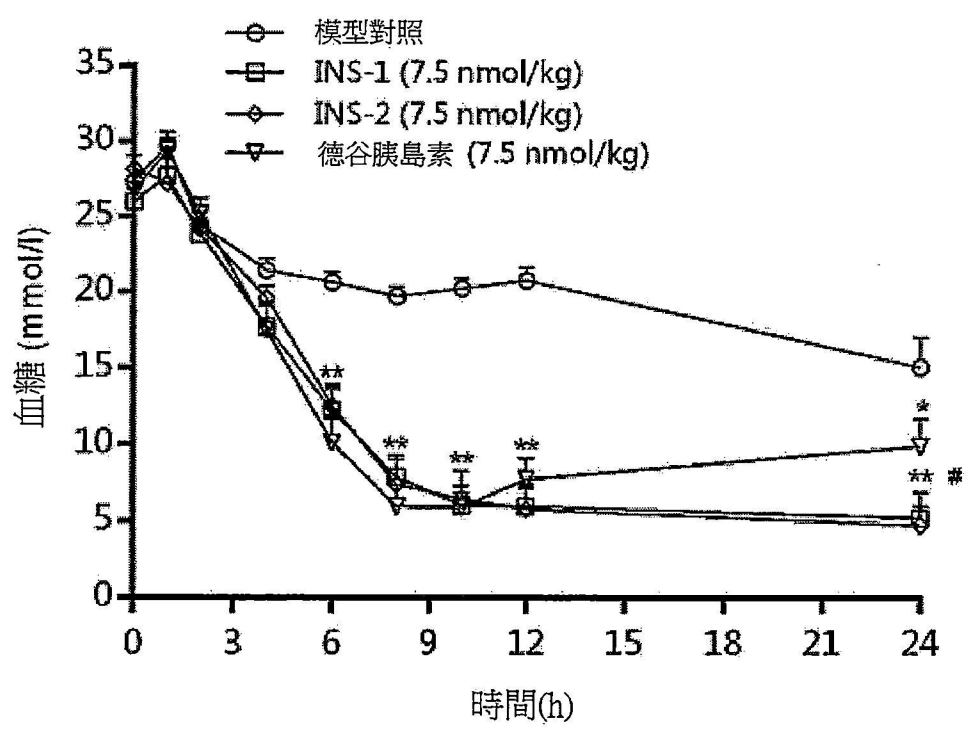
15. 如申請專利範圍第 14 項所述的方法，其中，該保護基係 C₁-C₆ 的烷基。

16. 如申請專利範圍第 14 項所述的方法，其中，該保護基係 C₁-C₄ 的烷基。

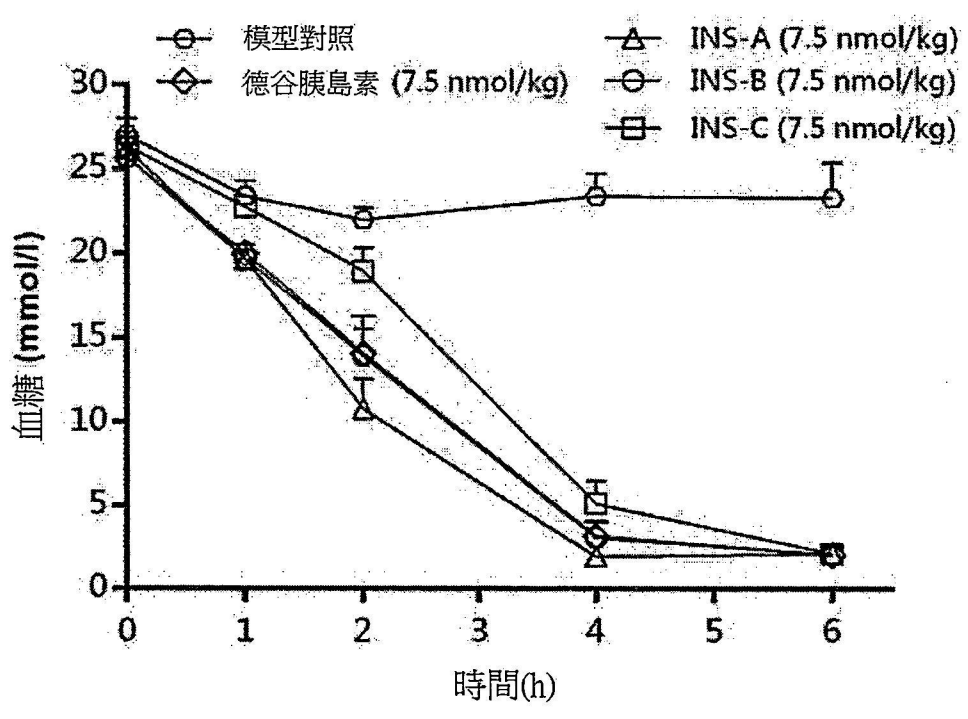
17. 如申請專利範圍第 14 項所述的方法，其中，該保護基係甲基或第三丁基。

18. 如申請專利範圍第 1 至 10 項中任意一項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物的鋅複合物，其中每 6 分子醯化胰島素包含多於 4 個鋅原子。
19. 一種藥物組成物，含有如申請專利範圍第 1 至 8 項中任意一項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物或如申請專利範圍第 18 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物的鋅複合物，還含有藥學上可接受的載體。
20. 如申請專利範圍第 19 項所述的藥物組成物，還含有速效胰島素。
21. 一種如申請專利範圍第 1 至 10 項中任意一項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物、如申請專利範圍第 18 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物的鋅複合物、或如申請專利範圍第 19 或 20 項所述的藥物組成物在製備治療糖尿病的藥物中的用途。
22. 一種如申請專利範圍第 1 至 10 項中任意一項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物或其鋅複合物、如申請專利範圍第 18 項所述的人胰島素類似物的醯化衍生物的鋅複合物、或如申請專利範圍第 19 項所述的藥物組成物與速效胰島素聯合在製備治療糖尿病的藥物中的用途。

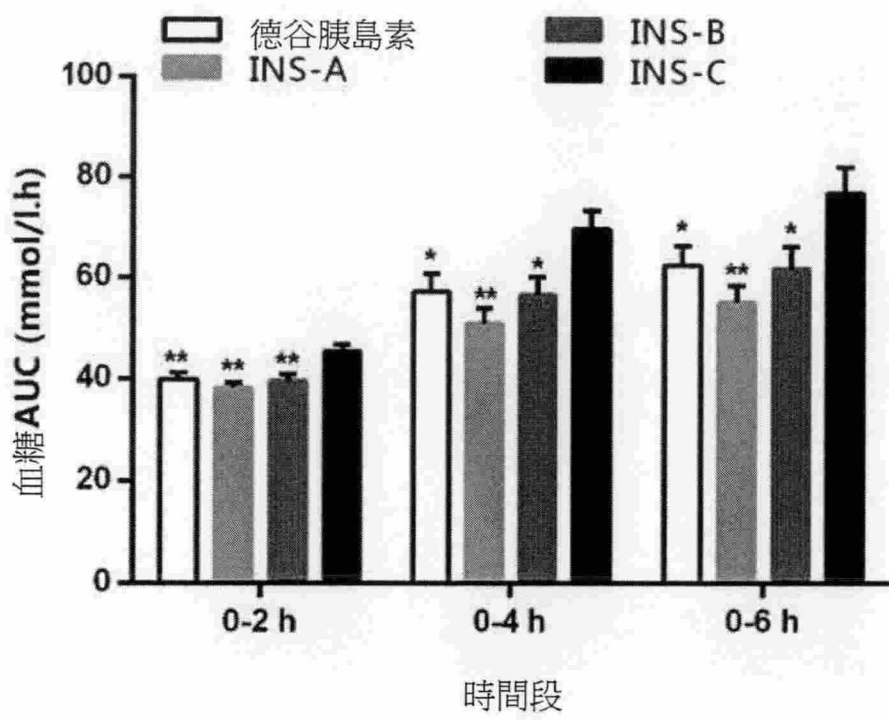
圖式



第1圖



第2圖



第3圖