



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104693302 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201510007033. 3

(22) 申请日 2011. 06. 21

(30) 优先权数据

10167033. 9 2010. 06. 23 EP

10167046. 1 2010. 06. 23 EP

61/359150 2010. 06. 28 US

61/359500 2010. 06. 29 US

(62) 分案原申请数据

201180031021. 4 2011. 06. 21

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 P. 马德森 F. 胡巴莱克

T. B. 克杰尔德森 S. 卢德维格森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 石克虎

(51) Int. Cl.

C07K 14/62(2006. 01)

权利要求书2页 说明书59页

序列表2页 附图2页

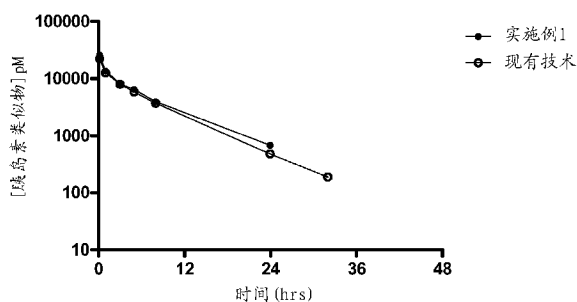
(54) 发明名称

包含额外的二硫键的胰岛素衍生物

(57) 摘要

本发明涉及包含额外的二硫键的胰岛素衍生物及其制备方法。

静脉内给药于大鼠的2nmol/kg胰岛素类似物



1. 胰岛素衍生物, 具有两个或更多个半胱氨酸取代和连接于胰岛素的侧链, 其中所述侧链是通式: $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$ 的酰基部分, 其中 n 为 0 或 1-3 范围内的整数; m 为 0 或 1-10 范围内的整数; p 为 0 或 1-10 范围内的整数; Acy 为包含约 8 个 - 约 24 个碳原子的脂肪酸或脂肪二酸; AA1 为中性线型或环状氨基酸残基; AA2 为酸性氨基酸残基; AA3 为中性的、含亚烷基二醇的氨基酸残基; 所述式中 AA1 、 AA2 和 AA3 出现的顺序可独立地相互交换, 其中保留了三个二硫键和与人胰岛素相关的期望的生物活性, 并且与人胰岛素相关的期望的生物活性选自结合胰岛素受体, 结合 IGF-1 (胰岛素生长因子 1) 受体, 体外效力和体内效力, 并且

其中所述半胱氨酸被取代至修饰的胰岛素的两个位置中, 其中所述位置选自:

A10C, B1C;
A10C, B2C;
A10C, B3C;
A10C, B4C;
A10C, B5C; 和
B1C, B4C。

2. 根据权利要求 1 的胰岛素衍生物, 其中半胱氨酸被取代至胰岛素类似物的两个位置中, 其中所述位置选自:

A10C, B1C;
A10C, B2C;
A10C, B3C;
A10C, B4C; 和
B1C, B4C。

3. 根据权利要求 1 的胰岛素衍生物, 其中半胱氨酸被取代至胰岛素类似物的两个位置中, 其中所述位置选自:

A10C, B1C;
A10C, B2C;
A10C, B3C; 和
A10C, B4C。

4. 根据权利要求 1 或 2 中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述半胱氨酸被取代至修饰的胰岛素的两个位置中, 其中所述位置选自:

A10C, B3C; 和
A10C, B4C。

5. 根据前述权利要求中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述半胱氨酸被取代至修饰的胰岛素的两个位置中, 其中所述位置为 A10C 和 B3C。

6. 根据前述权利要求中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述半胱氨酸被取代至修饰的胰岛素的两个位置中, 其中所述位置为 A10C 和 B4C。

7. 根据前述权利要求中任一项的胰岛素衍生物, 其中用半胱氨酸取代选自 A- 链的 A9、A10、A11 和 A12 的位置中的至少一个氨基酸残基, 用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B1、B2、B3、B4、B5 和 B6 的位置中的至少一个氨基酸残基, 以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

8. 前述权利要求中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B1、B2、B3和B4的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

9. 根据前述权利要求中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B3和B4的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

10. 根据前述权利要求中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代B-链的B3位的氨基酸,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

包含额外的二硫键的胰岛素衍生物

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 6 月 21 日的中国专利申请 201180031021.4“包含额外的二硫键的胰岛素衍生物”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含额外的二硫键的胰岛素衍生物及其制备方法。

背景技术

[0003] 糖尿病是代谢病,在这种病中,利用葡萄糖的能力部分或完全丧失。在糖尿病的治疗中,已经提出并使用了许多种胰岛素制剂,如常规胰岛素、低精蛋白锌胰岛素(指定为 NPH),胰岛素锌悬浮液(如 Semilente[®]、Lente[®]和 Ultralente[®])以及两相低精蛋白锌胰岛素。

[0004] 人胰岛素由两个多肽链组成,即 A 和 B 链,其分别包含 21 个和 30 个氨基酸残基。A 和 B 链通过两个二硫键相互连接。来自大多数其它物种的胰岛素是相似的,但在一些位置可能包含氨基酸取代。在过去十年内,已经开发了许多人胰岛素类似物。它们是设计用于特定的作用模式,即快速作用或延长作用。包括这种胰岛素类似物的商业上可获得的产品包括 Levemir[®]、NovoRapid[®]、Humalog[®]、Apidra[®]和 Lantus[®]。

[0005] 多种蛋白酶的作用使人胰岛素在胃肠道的内腔中迅速降解,限制了其吸收进入循环系统。当与天然胰岛素相比,亲水的并且对蛋白水解性降解稳定的胰岛素类似物在动物模型中表现出更高的生物利用度。

[0006] 将二硫键引入蛋白是改善蛋白稳定性一种天然方式:已经发现二硫键的丰度和嗜热生物体间最高的生长温度之间的相关性,暗示了高温环境中二硫键在蛋白稳定中的重要性 (Mallick P, 等, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 9679-9684. ; Ladenstein R, 等, 2006, FEBS J., 273, 4170-4185)。也有许多成功地将二硫键工程化进蛋白并伴随稳定性增加的例子。对于芽孢杆菌 RNase 获得了一种最高的稳定作用 (Clarke J., Fersht A., 1993, Biochem., 32, 4322-4329)。通过增加解折叠 (unfolding) 所需的活化能,或者通过约束蛋白的解折叠的构象从而降低它们的构象熵,带来了这种稳定作用 (Pace C. N., 1990, Trends Biol. Sci., 14-17)。然而,在这个新兴的研究领域,需要学习的多得多。至今,没有胰岛素中工程化的二硫键的报道。

[0007] 仍然需要稳定的新的胰岛素衍生物。

发明内容

[0008] 本发明涉及具有两个或更多个半胱氨酸取代和连接于胰岛素的侧链的胰岛素衍生物,其中保留人胰岛素的三个二硫键,选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0009] 在一个方面,获得了本发明的胰岛素衍生物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方

式使得 (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中, 以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成, 以及 (2) 胰岛素衍生物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性。

[0010] 在一个方面, 获得了本发明的胰岛素衍生物, 其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得 (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中, 以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成, (2) 胰岛素衍生物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性, 以及 (3) 胰岛素衍生物相对于人胰岛素和 / 或没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物增加了物理稳定性。

[0011] 在一个方面, 获得了本发明的胰岛素衍生物, 其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得 (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中, 以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成, (2) 胰岛素衍生物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性, 以及 (3) 胰岛素衍生物对蛋白水解性降解是稳定的。

[0012] 本文中描述用于稳定胰岛素衍生物的方法, 包括用半胱氨酸残基取代胰岛素的两个或更多个氨基酸并且将侧链连接于胰岛素, 其中

[0013] a. 保留人胰岛素的三个二硫键, 以及

[0014] b. 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中, 以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,

[0015] 从而产生胰岛素衍生物, 其包含不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键。

具体实施方式

[0016] 本发明中, 提供了新的胰岛素衍生物, 其中将二硫键工程化进胰岛素衍生物。

[0017] 在一个方面, 本发明的胰岛素衍生物具有两个或更多个半胱氨酸取代, 保留了人胰岛素的三个二硫键。

[0018] 在一个方面, 本发明的胰岛素衍生物具有侧链。在一个方面, 侧链连接于赖氨酸残基的 ϵ 氨基。在一个方面, 侧链连接于 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基。

[0019] 在一个方面, 本发明的胰岛素衍生物具有两个或更多个半胱氨酸取代, 保留的人胰岛素的三个二硫键以及连接于如 B- 链中的赖氨酸残基的 ϵ 氨基的侧链。

[0020] 在本发明的一个方面, 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中, 以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0021] 本发明人已经发现, 本发明的胰岛素衍生物具有改善的物理稳定性。因此已经发现, 例如, 类似物暴露于热 - 机械应激和 / 或与不稳定的界面和表面如疏水表面和界面的相互作用导致的本发明的胰岛素衍生物形成胰岛素类似物的无生物活性的和 / 或不溶性的聚集体的趋势降低。

[0022] 本发明的人胰岛素衍生物结合于胰岛素受体。本发明人已经惊讶地发现, 本发明的人胰岛素衍生物既具有改善的物理稳定性又保留与胰岛素受体的结合。

[0023] 在一个方面, 本发明的胰岛素衍生物, 即包含一个或多个额外的二硫键, 比没有有一个或多个额外的二硫键的相似胰岛素衍生物更持效。“更持效”在本文中意味着它们具有

更长的清除半衰期,或者换言之,持续延长的期间即更长的作用持续时间的胰岛素效应。因此,本发明人已经惊讶地发现,与没有个或多个额外的二硫键的相似胰岛素衍生物相比,包含一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物可以具有长清除半衰期,或者换言之,持续延长的期间即持效的作用持续时间的胰岛素效应。

[0024] 在一个方面,本发明的胰岛素衍生物针对蛋白水解性降解,即针对胃肠 (GI) 道中或身体其它部位的快速降解,是稳定的。在一个方面,相对于没有个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物,本发明的胰岛素衍生物针对蛋白水解性降解是稳定的。

[0025] 针对蛋白水解性降解稳定的胰岛素衍生物在本文被理解为胰岛素衍生物,相对于人胰岛素,其经受一种或多种蛋白酶的更慢的降解。在一个实施方案中,相对于人胰岛素,本发明的胰岛素衍生物经受一种或多种蛋白酶的更慢的降解。在本发明的进一步的实施方案中,本发明的胰岛素衍生物针对一种或多种酶的降解是稳定的,该酶选自:胃蛋白酶(如,例如,同种型胃蛋白酶 A,胃蛋白酶 B,胃蛋白酶 C 和 / 或胃蛋白酶 F),糜蛋白酶(如,例如,同种型糜蛋白酶 A,糜蛋白酶 B 和 / 或糜蛋白酶 C),胰蛋白酶,胰岛素-降解酶 (IDE),弹性蛋白酶(例如,同种型胰腺弹性蛋白酶 I 和 / 或 II),羧肽酶(例如,同种型羧基肽酶 A,羧肽酶 A2 和 / 或羧肽酶 B),氨肽酶,组织蛋白酶 D 及源自大鼠、猪或人的肠提取物中存在的其它酶。

[0026] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物针对一种或多种酶的降解是稳定的,该酶选自:糜蛋白酶,胰蛋白酶,胰岛素-降解酶 (IDE),弹性蛋白酶,羧肽酶,氨肽酶和组织蛋白酶 D。在进一步的实施方案中,本发明的胰岛素衍生物针对一种或多种酶的降解是稳定的,该酶选自:糜蛋白酶,羧肽酶和 IDE。在仍进一步的实施方案中,本发明的胰岛素衍生物针对一种或多种酶的降解是稳定的,该酶选自:糜蛋白酶和 IDE。在仍进一步的实施方案中,本发明的胰岛素衍生物针对一种或多种酶的降解是稳定的,该酶选自:糜蛋白酶和羧肽酶。

[0027] “蛋白酶 (protease)”或“蛋白酶 (protease enzyme)”是消化酶,其可以使蛋白和肽降解,并且可以在人体的各种组织中发现它,例如胃(胃蛋白酶),肠腔(糜蛋白酶,胰蛋白酶,弹性蛋白酶,羧肽酶,等)或胃肠道的粘膜表面(氨肽酶,羧肽酶,肠肽酶,二肽基肽酶,内肽酶,等等),肝(胰岛素降解酶,组织蛋白酶 D 等),和其它组织中。

[0028] 可以如实施例 102 中所述测定 $T_{1/2}$ 作为本发明的胰岛素衍生物对蛋白酶如糜蛋白酶、胃蛋白酶和 / 或羧基肽酶 A 或者对酶的混合物如组织提取液(来自肝,肾,十二指肠,空肠,回肠,结肠,胃,等)的蛋白水解稳定性的量度。在本发明的一个实施方案中,相对于人胰岛素, $T_{1/2}$ 增加。在进一步的实施方案中,相对于没有个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物, $T_{1/2}$ 增加。在仍进一步的实施方案中,相对于人胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少 2 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于没有个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物, $T_{1/2}$ 增加至少 2 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于人胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少 3 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于没有个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物, $T_{1/2}$ 增加至少 3 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于人胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少 4 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于没有个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物, $T_{1/2}$ 增加至少 4 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于人胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少 5 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于没有个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物, $T_{1/2}$ 增加至少 5 倍。在仍进一步的实施方

案中,相对于人胰岛素, T1/2 增加至少 10 倍。在仍进一步的实施方案中,相对于没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物, T1/2 增加至少 10 倍。

[0029] 在一个方面,本发明的胰岛素衍生物具有改善的化学稳定性。在一个方面,本发明的胰岛素衍生物具有改善的物理稳定性。在一个方面,本发明的胰岛素衍生物具有改善的化学和物理稳定性。

[0030] 在一个方面,相对于人胰岛素,本发明的胰岛素衍生物具有改善的化学和 / 或物理稳定性。在一个方面,相对于没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物,本发明的胰岛素衍生物具有改善的化学和 / 或物理稳定性。

[0031] 本文所用的术语“物理稳定性”是指,蛋白暴露于热 - 机械应激和 / 或与使之不稳定的界面和表面如疏水表面和界面的相互作用导致的胰岛素衍生物形成蛋白的无生物活性的和 / 或不溶性的聚集体的趋势。因此,物理不稳定性涉及相对于人胰岛素的构象变化,其包括更有序结构的损失,聚集,原纤化 (fibrillation), 沉淀和 / 或吸附至表面。已知肽如胰岛素倾向于例如原纤化导致的不稳定。通过在不同温度不同时间期间将填充合适的容器 (例如,盒或小瓶) 的溶液暴露于机械 / 物理应激 (例如搅动) 之后例如目视检查、比浊法和 / 或浊度测定法的常规方法,可以评价包含胰岛素衍生物的溶液的物理稳定性。在具有黑背景的尖锐聚焦光中进行溶液的目视检查。通过例如在从 0 到 3 的等级 (显示无浊度的溶液对应于目测评分 0, 显示目测浊度的溶液对应于目测评分 3) 排序浊度的程度的目测评分而表征溶液的浊度。当溶液在日光下显示目测浊度时,对于蛋白聚集,溶液被分类为物理不稳定的。或者,可以通过本领域技术人员公知的简单的浊度测定评价溶液的浊度。也可以通过使用胰岛素衍生物的构象状态的光谱试剂或探针评价胰岛素衍生物的物理稳定性。探针优选与蛋白的非天然构象优先结合的小分子。蛋白结构的小分子光谱探针的一个例子是硫磺素 T。硫磺素 T 是已经广泛用于淀粉样原纤维的检测的荧光染料。在原纤维和还可能其它蛋白构型存在的情况下,当结合于原纤维蛋白形式时,硫磺素 T 产生在约 450nm 的新的最大激发和在约 482nm 的增强的发射。未结合的硫磺素 T 在该波长基本上无荧光。如实施例 109 中所述测定本发明的胰岛素衍生物的物理稳定性。

[0032] 可以使用其它小分子作为蛋白结构从天然至非天然状态的变化变化的探针。例如,优先结合于蛋白的暴露的疏水补丁的“疏水性补丁”探针。疏水性补丁通常埋在天然状态的蛋白的三级结构内,但当蛋白开始解折叠或变性时变得暴露。这些小分子的光谱探针的例子是芳族的疏水性染料,如葱,吡啶,菲咯啉等。其它光谱探针是金属 - 氨基酸复合物,如疏水性氨基酸如苯丙氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,甲硫氨酸和缬氨酸或等的钴金属复合物。

[0033] 本文所用的胰岛素衍生物的术语“化学稳定性”是指导致化学降解产物的形成的蛋白结构中的化学共价变化,与天然蛋白结构相比,该化学降解产物具有潜在的更低的生物学效力和 / 或潜在的增加的免疫原性特性,其涉及避免共价键的降解如水解,外消旋,氧化或交联。根据天然蛋白的类型和性质和胰岛素衍生物暴露的环境,可以形成各种化学降解产物。化学降解的消除最可能不能完全避免,在本领域技术人员公知的蛋白制剂的储存和使用期间经常看到逐渐增加的化学降解产物。大多数蛋白倾向于脱酰胺化,在该过程中谷氨酰胺或天冬酰胺残基中的侧链酰胺基被水解形成游离的羧酸。天冬酰胺和天冬氨酸残基可以进一步形成 isoAsp 降解产物。其它降解途径涉及形成高分子量转化产物,其中两个或更多的蛋白分子通过转酰胺基作用和 / 或二硫化物相互作用而彼此共价结合,导致形成

共价结合的二聚体,寡聚体和多聚体降解产物 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T. J. & Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。(例如甲硫氨酸残基的)氧化和外消旋可以作为化学降解的另一种变体被提及。可以通过在暴露于不同的环境条件之后在各个时间点测定化学降解产物的量评价胰岛素衍生物的化学稳定性(例如升高的温度经常可以加速降解产物的形成)。通过根据分子大小和/或电荷分离降解产物,例如,使用色谱(例如, SEC-HPLC, RP-HPLC 或 IE-HPLC)和光谱方法(各种质谱方法),有时与化学/酶片段化的组合,测定个别降解产物。

[0034] 在一个实施方案中,当如实施例所述测试时,相对于没有一或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物的化学稳定性,本发明的胰岛素衍生物具有改善的化学稳定性。

[0035] 在一个实施方案中,当如本领域技术人员已知并且例如实施例 101 中所述检测疏水性时,相对于人胰岛素和/或没有一或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物的亲水性,本发明的胰岛素衍生物具有增加的亲水性。

[0036] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物具有很少或没有聚集的趋势。当在硫磺素测定中试验时,相对于没有一或多个额外的二硫键的人胰岛素和/或胰岛素衍生物的聚集趋势,聚集趋势优选显著改善。

[0037] 在一个方面,本发明的胰岛素衍生物具有改善的热力学稳定性,如例如,折叠稳定性,构象的稳定性和/或更高的熔解温度。

[0038] 当本文使用时,如果与没有一或多个额外的二硫键的人胰岛素和/或胰岛素衍生物相比,所述衍生物的变性需要更高的应激水平如更高的温度和/或更高浓度的变性剂,那么胰岛素衍生物被称为具有改善的“热力学稳定性”。

[0039] 可以通过如例如 Hudson 和 Andersen, Peptide Science, vol 76(4), pp. 298-308(2004) 中所述圆二色光谱和 NMR 评价构象的稳定性。熔解温度被理解为胰岛素结构可逆或不可逆地变化的温度。更高的熔解温度对应更稳定的结构。可以,例如,通过圆二色光谱和/或 NMR 将构象稳定性评价为温度的函数,或通过差示扫描量热法而测定熔解温度。也可以在逐渐增加浓度的变性剂如盐酸胍存在的情况下通过 CD 光谱和或 NMR 测定热力学稳定性。可以从这种实验测定以前所述 (Kaarsholm, N. C., 等, 1993, Biochemistry, 32, 10773-8) 的解折叠的自由能。蛋白变性后,远 UV 范围 (240-218-nm) 内的负 CD 逐渐减小,与伴随蛋白解折叠的有序的二级结构的损失一致 (Holladay 等, 1977, Biochim. Biophys. Acta, 494, 245-254; Melberg 和 Johnson, 1990, Biochim. Biophys. Acta, 494, 245-254)。在近 UV 范围 (330-250-nm) 内的胰岛素 CD 谱反映了具有来自二硫键的贡献的酪氨酸发色团的环境 (Morris 等, 1968, Biochim. Biophys. Acta., 160, 145-155; Wood 等, 1975, Biochim. Biophys. Acta, 160, 145-155; Strickland & Mercola, 1976, Biochemistry, 15, 3875-3884)。从这些研究以前计算的胰岛素的解折叠的自由能为 4.5 kcal/mol (Kaarsholm, N. C., 等, 1993, Biochemistry, 32, 10773-8)。

[0040] 在近 UV 范围 (330-250-nm) 内的胰岛素 CD 谱反映了具有来自二硫键的贡献的酪氨酸发色团的环境。由于酪氨酸残基是胰岛素二聚体表面的部分,在该区域(尤其是在 276nm)的摩尔椭圆率 (molar ellipticity) 的变化反映在胰岛素的结合状态上。测量胰岛素的结合状态的另一种方式是通过在本领域已知并且在实施例中描述的非解离条件下应用大小排阻色谱法。

[0041] 相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素衍生物具有基本上相同或增加的体内效力。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素衍生物具有基本上相同的体内效力。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素衍生物具有增加的体内效力。

[0042] 用于测定胰岛素体内效力的标准试验是本领域技术人员已知的,包括实施例中所所述的试验,如:本发明的胰岛素衍生物相对于人胰岛素的效力,静脉内稳态夹钳试验如大鼠药代动力学和在肠内注射后的大鼠 PK,血糖降低效应和静脉内大鼠 PK 试验。

[0043] 相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素衍生物具有基本上相同或增加的体外效力。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素衍生物具有基本上相同的体外效力。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素衍生物具有增加的体外效力。

[0044] 用于测定胰岛素体外效力的标准试验是本领域技术人员已知的,尤其包括下面的体外试验:

[0045] (1) 胰岛素放射受体试验,其中将胰岛素的相对效力定义为替代特异性结合于细胞膜,例如大鼠肝质膜部分上存在的胰岛素受体的 50% 的 ^{125}I -胰岛素所需的胰岛素和胰岛素衍生物的比例;

[0046] (2) 脂肪生成试验,例如用大鼠脂肪细胞进行,其中将相对的胰岛素效力定义为为实现 $[3\text{-}^3\text{H}]$ 葡萄糖向有机可提取的材料(即脂质)的最大转化的 50% 所需的胰岛素和胰岛素衍生物的比例;和

[0047] (3) 在分离的脂肪细胞中的葡萄糖氧化试验,其中将胰岛素衍生物的相对效力定义为实现葡萄糖 $\text{-1-}[^{14}\text{C}]$ 向 $[^{14}\text{CO}_2]$ 的最大转化的 50% 的胰岛素和胰岛素衍生物的比例。

[0048] 通过两个硫醇基的偶联得到二硫键,二硫键在本文理解为两个硫原子之间的连接,即具有整体连接 R-S-S-R 的结构。二硫键也可以被称为连接性二硫键、 SS- 键或二硫键(disulfide bridges)。通过将两个半胱氨酸氨基酸残基引入肽并且随后将两个硫醇基氧化为一个二硫键而产生二硫键。这种氧化可以化学地进行(如本领域技术人员已知的)或者可以,例如在酵母中,胰岛素表达期间发生。

[0049] 当将半胱氨酸残基引入没有个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物时,半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。例如,如果放置两个新的半胱氨酸残基,三维结构中新的半胱氨酸残基的邻近使得在两个新的半胱氨酸残基之间可以形成二硫键。

[0050] 通过如,例如实施例中所所述的准确的完整质量测量,可以容易地测定蛋白(如胰岛素)中二硫键的数量。通过本领域已知的标准技术,如肽作图,可以验证(确定)二硫键连接。在胰岛素肽中二硫键作图的一般策略包括以下步骤:1) 将非还原的胰岛素片段化为包含,如果可能,每个肽只有一个单一的二硫键,的二硫键键合的肽。选择的条件也使得避免二硫键的重排,2) 二硫键键合的肽彼此分离。3) 鉴定参与单个二硫键的半胱氨酸残基。

[0051] 通常,通过 Glu-C 蛋白酶消化人胰岛素,产生包含两个二硫键(A6-A11 和 A7-B7)的肽 I 和包含一个单一的二硫键(A20-B19)的肽 II。为了明确指定肽 I 中的二硫键,进一步片段化是必要的。以前采用酸水解(Ryle 等,1955 Biochem J. 60, 541-56),手工 Edman 降解(Kumazaki T, Ishii, S. 1990 J. Biochem(Tokyo) 17, 414-9),或用嗜热菌蛋白酶延长的消化(Ota M, Ariyoshi, Y., 1995, Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1956-7) 来水解蛋白中的 CysCys 键。指定肽 I 中的二硫键的另一种方式是用三羧乙基膦部分还原(A7-B7 二硫键的

还原),使用不同的烷基使还原的半胱氨酸残基的烷基化以及随后的完全还原以及半胱氨酸的烷基化(Yen, T.-Y., Yan, H., Macher, B., 2001J Mass Spectrom. 37,15-30)。包含额外的二硫键的胰岛素的二硫键作图的策略在原则上与对于每种类似物以容许新的二硫键的方式调整的人胰岛素的上述策略是相同的。通过 NMR 或 X-射线晶体学测定胰岛素结构是用于验证二硫化物键连接的一种另外的方法。解析胰岛素的 NMR 和 / 或 X-射线结构的条件以前已经描述并且是本领域已知的。

[0052] 在本发明的一个方面,提供了具有侧链和至少两个半胱氨酸取代的胰岛素衍生物,其中保留了人胰岛素的三个二硫键。

[0053] 术语“半胱氨酸取代”在本文中是指用半胱氨酸替代存在于人胰岛素中的氨基酸。例如,可以通过半胱氨酸残基各自替代人胰岛素的 A 链的 10 位的异亮氨酸(IleA10)和 B 链的 4 位的谷氨酰胺(GlnB4)。术语“其它氨基酸取代”在本文中是指用不是半胱氨酸的氨基酸替代存在于人胰岛素中的氨基酸。

[0054] 本文所用的术语“人胰岛素”是指人胰岛素激素,其二维和三维结构和性质是公知的。例如,通过许多不同的条件下由 NMR 和 X-射线晶体学确定人胰岛素的三维结构,许多这些结构保存在蛋白数据库(<http://www.rcsb.org>)。人胰岛素结构的非限制性例子是 T6 结构(<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MS0>)和 R6 结构(<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1EV3>)。人胰岛素有两条多肽链,名为 A-链和 B-链。A-链是 21 个氨基酸的肽, B-链是 30 个氨基酸的肽,两条链通过二硫键连接:在 A-链 7 位的半胱氨酸和 B-链 7 位的半胱氨酸之间的第一桥连和在 A-链 20 位的半胱氨酸和 B-链 19 位的半胱氨酸之间的第二桥连。第三桥连存在于 A-链的 6 和 11 位的半胱氨酸之间。因此,其中“其中保留人胰岛素的三个二硫键的胰岛素衍生物”在本文中理解为包含人胰岛素的三个二硫键的胰岛素衍生物,即在 A-链的 7 位的半胱氨酸和 B-链的 7 位的半胱氨酸之间的二硫键,在 A-链的 20 位的半胱氨酸和 B-链的 19 位的半胱氨酸之间的二硫键以及在 A-链的 6 位和 11 位的半胱氨酸之间的二硫键。

[0055] 在人体中,胰岛素激素被合成为结构为前肽-B-Arg Arg-C-LysArg-A(其中 C 是 31 个氨基酸的连接肽)的由 24 个氨基酸的前肽以及随后的包含 86 个氨基酸的胰岛素原组成的单链前体胰岛素原(前胰岛素原)。Arg-Arg 和 Lys-Arg 是用于从 A 和 B 链的连接肽的切割的切割位点。

[0056] 在本发明的一个方面,提供了具有两个或更多个半胱氨酸取代的胰岛素衍生物,其中保留了人胰岛素的三个二硫键,其中用半胱氨酸取代选自 A-链的 A9、A10 和 A12 的位置中的至少一个氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B-链的 B1, B2, B3, B4, B5 和 B6 的位置中的至少一个氨基酸残基,侧链连接于 B-链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基,以及任选地缺失 B30 位中的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代 A-链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B-链的 B1, B2, B3 和 B4 的位置中的至少一个氨基酸残基,侧链连接于 B-链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代选自 A-链的 A9、A10 和 A12 的位置中的至少一个氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B-链的 B1, B2, B3, B4, B5 和 B6 的位置中的至少一个氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代选自 A14, A21, B1, B3, B10, B16, B22, B25, B26, B27, B28, B29, B30, B31, B32 的位置中的至少一个氨基酸残基,侧链连接于 B-链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基,以及任选地缺失

B30 位的氨基酸。可以理解的是,当 B1 或 B3 是半胱氨酸时,相同的氨基酸可以不是不是半胱氨酸的氨基酸,而如果,例如 B1 是半胱氨酸,可以根据本发明的方面用不是半胱氨酸的氨基酸取代 B3,反之亦然。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B1, B2, B3 和 B4 的位置中的至少一个氨基酸残基,任选地用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基,侧链连接于 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B3 和 B4 的位置中的至少一个氨基酸残基,任选地用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基,侧链连接于 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代 B- 链的 B3 位的氨基酸残基,任选地用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基,侧链连接于 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代 B- 链的 B4 位的氨基酸残基,任选地用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基,侧链连接于 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

[0057] 在一个方面,获得本发明的胰岛素衍生物,其中缺失 B30 位。

[0058] 本发明获得的一个额外的二硫键可以连接相同链的两个半胱氨酸,即胰岛素的 A- 链的两个半胱氨酸或 B- 链的两个半胱氨酸,或者连接胰岛素的 A- 链的一个半胱氨酸和 B- 链的一个半胱氨酸。在一个方面,获得本发明的胰岛素衍生物,其中至少一个额外的二硫键连接 A- 链的两个半胱氨酸或连接 B- 链的两个半胱氨酸。在一个方面,获得本发明的胰岛素衍生物,其中至少一个额外的二硫键连接 A- 链的一个半胱氨酸和 B- 链的一个半胱氨酸。

[0059] 当在本文中使用时,术语“额外的二硫键”是指不存在于人胰岛素的一个或多个二硫键。

[0060] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素衍生物的两个位置,其中所述位置选自:

[0061] A10C, B1C ;

[0062] A10C, B2C ;

[0063] A10C, B3C ;

[0064] A10C, B4C ;

[0065] A10C, B5C ;和

[0066] B1C, B4C。

[0067] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置选自:

[0068] A10C, B1C ;

[0069] A10C, B2C ;

[0070] A10C, B3C ;

[0071] A10C, B4C ;和

[0072] B1C, B4C。

[0073] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素衍生物的两个位置,其中所述位置选自:

[0074] A10C, B1C;

[0075] A10C, B2C;

[0076] A10C, B3C;和

[0077] A10C, B4C。

[0078] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置选自:

[0079] A10C, B3C;和

[0080] A10C, B4C。

[0081] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置是 A10C 和 B3C。

[0082] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置是 A10C 和 B4C。

[0083] 在本发明的一个方面,除了半胱氨酸取代以外,本发明的胰岛素衍生物包含选自如下的一个或多个氨基酸:A8H, A14E, A14H, A18L, A21G, B1G, B3Q, B3E, B3T, B3V, B3K, B3L, B16H, B16E, B22E, B24G, B25A, B25H, B25N, B27E, B27D, B27P, B28D, B28E, B28K, desB1, desB24, desB25, desB27 和 desB30。在本发明的一个方面,除了半胱氨酸取代以外,本发明的胰岛素衍生物包含选自如下的一个或多个氨基酸:A8H, A14E, A21G, desB1, B1G, B3Q, B3E, B10E, B16H, B16E, B24G, B25H, B25A, B25N, B25G, desB27, B27E, B28E, B28D 和 desB30。

[0084] 在本发明的一个方面,除了半胱氨酸取代以外,本发明的胰岛素衍生物包含选自如下的一个或多个氨基酸:A21G, desB1, B1G, B3Q, B3S, B3T 和 B3E。

[0085] 在本发明的一个方面,除了半胱氨酸取代以外,本发明的胰岛素衍生物包含选自如下的一个或多个氨基酸:A8H, A14E, A14H, B16H, B10E, B16E, B25H, B25A, B25N, B27E, B27P, desB27 和 B28E。

[0086] 在本发明的一个方面,除了半胱氨酸取代以外,本发明的胰岛素衍生物包含选自如下的一个或多个氨基酸:B28E, B28D, desB27 和 A14E。

[0087] 在本发明的一个方面,除了半胱氨酸取代以外,本发明的胰岛素衍生物包含选自如下的一个或多个氨基酸:B3K, B29E, B27E, B27D, desB27, B28E, B28D, B28K 和 B29P。

[0088] 在本发明的一个方面,除了半胱氨酸取代以外,本发明的胰岛素衍生物包含连接 B-链的 C-末端和 A-链的 N-末端(以形成所谓的单链的胰岛素衍生物)的 C-肽。在本发明的一个实施方案中,母体胰岛素选自单链胰岛素类似物。在本发明的一个实施方案中,母体胰岛素选自 W02007096332, W02005054291 或 W02008043033(该专利都通过引用特异性地并入本文)中所列的单链胰岛素类似物。

[0089] 在本发明的一个方面,获得了胰岛素衍生物,所述胰岛素衍生物包含两个半胱氨酸取代,产生相对于人胰岛素的一个额外的二硫键。

[0090] 本发明“胰岛素(an insulin)”在本文被理解为人胰岛素, desB30 人胰岛素或胰岛素类似物。

[0091] 本文所用的术语“胰岛素肽”是指是人胰岛素, desB30 人胰岛素或具有胰岛素活性

的其类似物或衍生物的肽。

[0092] 本文所用的术语“胰岛素类似物”是指修饰的胰岛素,其中已经用其他氨基酸残基取代了胰岛素的一个或多个氨基酸残基和/或其中已经从胰岛素缺失了一个或多个氨基酸残基和/或已经将一个或多个氨基酸残基增加和/或插入到胰岛素。

[0093] 在一个方面,本发明的胰岛素衍生物是包含相对于人胰岛素的一个或多个额外的二硫键并且包含连接于分子的B-链中存在的赖氨酸残基的 ϵ 氨基的侧链的胰岛素类似物(如上所定义)。

[0094] 术语“胰岛素衍生物”意图是指已经被化学地衍生化的胰岛素(如上所定义)。这意味着侧链(如本文所定义)已经偶联于胰岛素。在最广泛的意义上,侧链可以是任何种类的,如PEG,但是,更优选地,侧链包含脂肪酸或脂肪二酸部分。

[0095] 本文所用的术语“母体胰岛素”意图是指具有一个或多个额外的二硫键的胰岛素,即在用侧链衍生化之前具有一个或多个额外的二硫键的人胰岛素,desB30人胰岛素或胰岛素类似物。

[0096] 本文所用的术语“没有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物”意图是指具有天然存在于人胰岛素中的三个二硫键的胰岛素衍生物,即在A-链的7位的半胱氨酸和B-链的7位的半胱氨酸之间的第一桥连,在A-链的20位的半胱氨酸和B-链的19位的半胱氨酸之间的第二桥连和在A-链的6位和11位的半胱氨酸之间的第三桥连以及连接于胰岛素但没有进一步的二硫键/桥连的侧链。

[0097] 本文使用的术语“侧链”,其意图是指(任选地通过一个或多个接头)偶联至本发明的母体胰岛素,如偶联至母体胰岛素的B-链中存在的赖氨酸的 ϵ 氨基的脂肪酸或二酸。侧链的脂肪酸或二酸部分赋予对血清白蛋白的亲合力,接头的作用或修饰(例如,增加)对白蛋白的亲合力,修饰胰岛素衍生物的溶解性,和/或调节(增加/减少)胰岛素衍生物对胰岛素受体的亲合力。

[0098] 在一个方面,本发明的胰岛素衍生物是包含至少两个半胱氨酸取代的胰岛素类似物,其中胰岛素类似物在胰岛素肽的一个或多个氨基酸中酰化。

[0099] 本文中,术语“酰化的胰岛素”包括通过接头将一个或多个酰基部分与胰岛素连接的人胰岛素或胰岛素类似物的修饰。

[0100] 例如,在WO 2009/115469 A1中发现了可以通过本发明的半胱氨酸取代而修饰的酰化的胰岛素类似物形式的胰岛素衍生物的非限制性的例子。

[0101] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物是修饰的胰岛素,其中已经用半胱氨酸残基取代两个氨基酸残基,已经引入侧链,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,B30位的氨基酸已经缺失。

[0102] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物包括侧链和相对于人胰岛素的2-9个突变,其中至少两个取代是针对半胱氨酸残基,或者本发明的胰岛素衍生物包括侧链和相对于人胰岛素的2-8个突变,其中至少两个取代是针对半胱氨酸残基,或者侧链和相对于人胰岛素的2-7个突变,其中至少两个取代是针对半胱氨酸残基,或者侧链和相对于人胰岛素的2-6个突变,其中至少两个取代是针对半胱氨酸残基,或者侧链和相对于人胰岛素的2-5个突变,其中至少两个取代是针对半胱氨酸残基,或者侧链和相对于人胰岛素的2-4个突变,其中至少两个取代是针对半胱氨酸残基,或者侧链和相对于人胰岛素的2-3个突

变,其中至少两个取代是针对半胱氨酸残基,或者侧链和相对于人胰岛素的 2 个半胱氨酸取代。

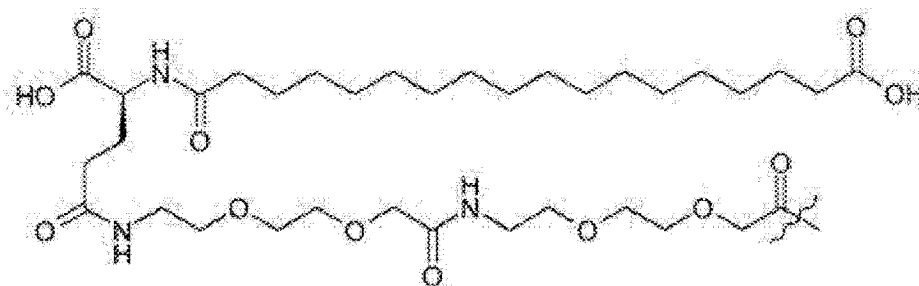
[0103] 通过说明取代天然的氨基酸残基的氨基酸残基的链(A或B),位置和一个或三个字母代码来表示胰岛素分子的修饰。

[0104] 在本文中,术语像“A1”、“A2”和“A3”等分别表明胰岛素 A 链中的位置 1、2 和 3(从 N 末端计算)的氨基酸。类似地,术语像 B1、B2、B3 等分别表明胰岛素 B 链中的位置 1、2 和 3(从 N 末端计算)的氨基酸。使用氨基酸的一个字母代码,术语像 A10C 表示在 A10 位的氨基酸是半胱氨酸。使用氨基酸的三个字母代码,相应的表达是 A10Cys。

[0105] “desB30”,“B(1-29)”或“desThrB30”是指缺乏 B30(苏氨酸, Thr)氨基酸的天然胰岛素 B 链或其类似物,“A(1-21)”是指天然的胰岛素 A 链。因此,例如, A10C, B1C, desB30 人胰岛素或者 A10Cys, B1Cys, desB30 人胰岛素(或者 CysA10, CysB1, desThrB30 人胰岛素)是人胰岛素的类似物,其中用半胱氨酸取代 A 链的 10 位的氨基酸被,用半胱氨酸取代 B 链的 1 位的氨基酸, B 链的 30 位的氨基酸(苏氨酸, Thr)缺失。

[0106] 本文中,根据以下原则进行肽或蛋白的命名:根据相对母体肽或蛋白如人胰岛素的突变和修饰(如酰化)给予名称。对于酰基部分的命名,根据 IUPAC 命名法进行命名,其它情况下根据肽命名法命名。例如,命名酰基部分:

[0107]



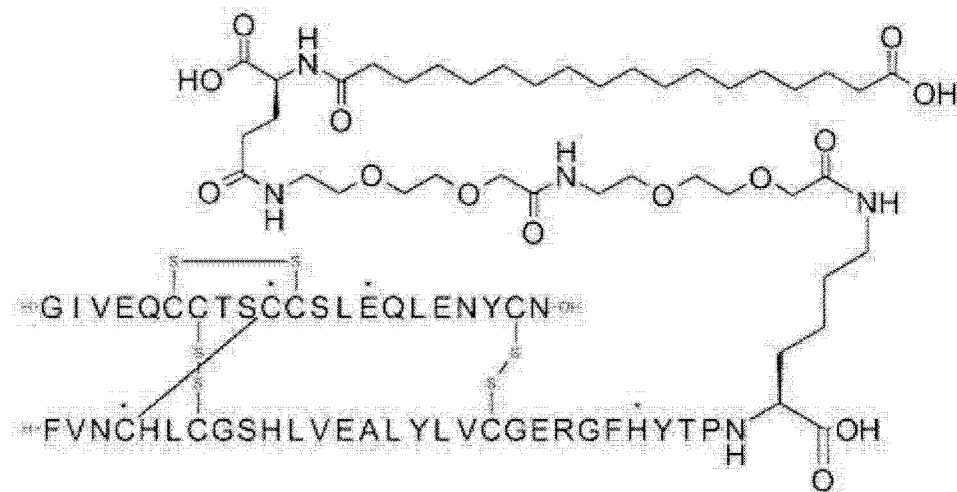
CHEM 1

[0108] 可以例如是“十八烷二酰-γ Glu-OEG-OEG”,“十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG”,“十八烷二酰-gGlu-2xOEG”,或“17-羧基十七酰基-γ Glu-OEG-OEG”,其中

[0109] OEG 是氨基酸残基 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}-$ 的缩写符号, γ Glu(或 gGlu) 是氨基酸 γ L-谷氨酸部分的缩写符号。

[0110] 例如,实施例 1 的胰岛素(具有下面给出的序列/结构)命名为“A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素”,以表明:人胰岛素中的 A10 位的氨基酸 I 已突变为 C;人胰岛素中 A14 位的 Y 已突变为 E;人胰岛素中 B4 位的氨基酸 Q 已突变为 C;人胰岛素中 B25 位的氨基酸 F 已突变为 H,人胰岛素中 B29 位的氨基酸 K 通过在 B29 的赖氨酸残基中的 ε 氮(表示为 N^ε)上被残基十八烷二酰-γ Glu-OEG-OEG 酰化而被修饰,以及人胰岛素中 B30 位的氨基酸 T 缺失。下式中的星号表示与人胰岛素相比,讨论的残基是不同的(即,突变的)。用硫原子显示人胰岛素中发现的二硫键,用直线显示本发明的额外的二硫键。

[0111]



CHEM 2, SEQ. ID. NO: 1

[0112] 此外,还根据 IUPAC 命名法 (OpenEye, IUPAC 类型) 命名本发明的胰岛素。根据该命名法,上述具有额外的二硫键的酰化的胰岛素被指定为如下名称:

[0113] N{ ϵ -B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0114] 本文中,术语“氨基酸残基”是其中已经从羧基上除去羟基和/或其中已经从氨基上除去氢原子的氨基酸。

[0115] 在本发明的一个方面,本发明的胰岛素衍生物,例如,在胰岛素氨基酸序列的 Lys 残基的 ϵ -氨基上包含酰基。在一个方面,胰岛素衍生物包含白蛋白结合残基,即当结合肽或蛋白时在体内条件下结合白蛋白的残基。

[0116] 在一个方面,白蛋白结合残基是亲脂性残基。在进一步的方面,通过接头将亲脂性残基结合于胰岛素氨基酸序列。

[0117] 在本发明的进一步的方面,白蛋白结合残基在生理 pH 带负电荷。在本发明的另一方面,白蛋白结合残基包含可以带负电荷的基团。一种优选的可以带负电荷的基团是羧基基团。

[0118] 在一个方面,白蛋白结合残基是 α , ω -脂肪二酸残基。

[0119] 在本发明的进一步的方面,亲脂性残基的 α , ω -脂肪二酸残基具有 6-40 个碳原子,8-26 个碳原子,8-22 个碳原子,或 14-22 个碳原子,或 16-22 个碳原子,或 16-20 个碳原子,或 16-18 个碳原子,或 16 个碳原子,或 18 个碳原子,或 20 个碳原子,或 22 个碳原子。

[0120] 在本发明的另一方面,白蛋白结合残基是直链或支链的烷烃 α , ω -二羧酸的酰基。在进一步的方面,白蛋白结合残基是直链或支链的烷烃 α , ω -二羧酸的酰基,其包括一个氨基酸部分如例如 γ -Glu 部分。在仍进一步的方面,白蛋白结合残基是直链或支链的烷烃 α , ω -二羧酸的酰基,其包括两个氨基酸部分如例如 γ -Glu 部分和 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (OEG) 部分。在仍进一步的方面,白蛋白结合残基是直链或支链的烷烃 α , ω -二羧酸的酰基,其包括更多个氨基酸部分如例如 γ -Glu 部分和连续的 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (OEG) 部分。

[0121] 在一个实施方案中,结合于母体胰岛素类似物的酰基部分具有以下通式:

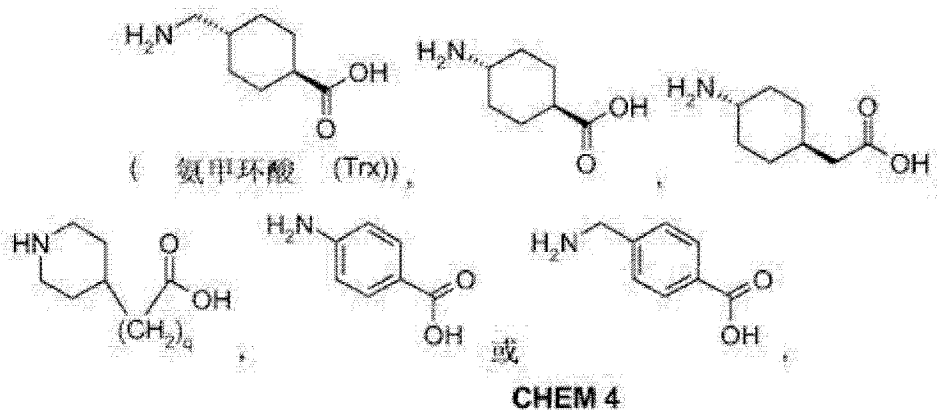
[0122] $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$

CHEM 3

[0123] 其中 n 为 0 或 1-3 的整数 ; m 为 0 或 1-10 的整数 ; p 为 0 或 1-10 的整数 ; Acy 为包含约 8 个 - 约 24 个碳原子的脂肪酸或脂肪二酸 ; AA1 为中性线型或环状氨基酸残基 ; AA2 为酸性氨基酸残基 ; AA3 为中性的、含亚烷基二醇的氨基酸残基 ; 所述式中 AA1 、 AA2 和 AA3 出现的顺序可独立地相互交换 ; AA2 可沿着所述式出现几次 (例如 $\text{Acy-AA2-AA3}_2\text{-AA2-}$) ; AA2 可沿着所述式独立地 (= 不同) 出现几次 (例如 $\text{Acy-AA2-AA3}_2\text{-AA2-}$) ; Acy 、 AA1 、 AA2 和 / 或 AA3 之间的连接为酰胺 (肽) 键, 其形式上可通过除去 Acy 、 AA1 、 AA2 和 AA3 各自的氢原子或羟基 (水) 来获得 ; 且与蛋白酶稳定化的胰岛素连接可以从式 (I) 酰基部分的 AA1 、 AA2 或 AA3 残基的 C- 末端或从式 (I) 的部分中存在的 AA2 残基的一个侧链开始进行。

[0124] 另一个实施方案中, 结合于母体胰岛素类似物的酰基部分具有通式 $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$ (I), 其中 AA1 选自 Gly、D- 或 L-Ala、 β -Ala、4- 氨基丁酸、5- 氨基戊酸、6- 氨基己酸、D- 或 L-Glu- α - 酰胺、D- 或 L-Glu- γ - 酰胺、D- 或 L-Asp- α - 酰胺、D- 或 L-Asp- β - 酰胺或下式之一的基团 :

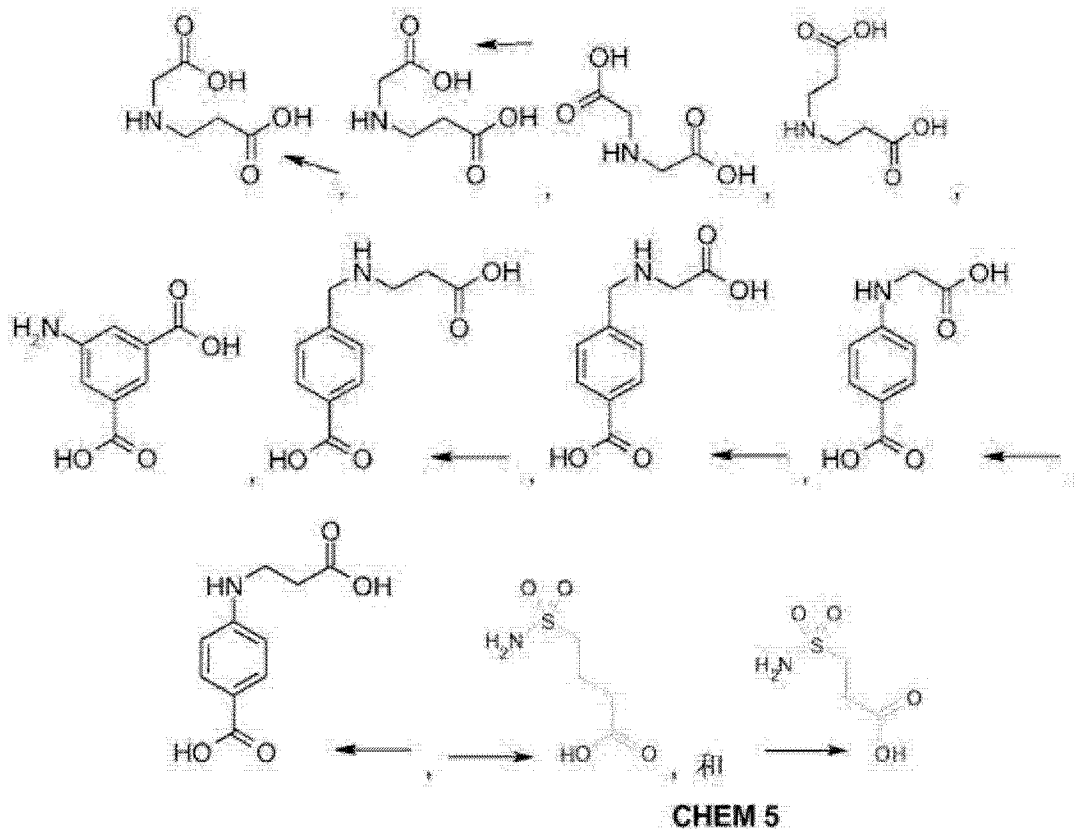
[0125]



[0126] 其已经除去氢原子和 / 或羟基并且其中 q 为 0、1、2、3 或 4, 在此实施方案中, AA1 可任选为 7- 氨基庚酸或 8- 氨基辛酸。

[0127] 另一个实施方案中, 结合于母体胰岛素类似物的酰基部分具有通式 $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$ (I), 其中 AA1 如上所定义, AA2 选自 L- 或 D-Glu、L- 或 D-Asp、L- 或 D-homoGlu 或下面中的任一个 :

[0128]



[0129] 其已经除去氢原子和 / 或羟基并且其中箭头表示与 AA1、AA2、AA3 的氨基或与蛋白酶稳定化的胰岛素的氨基的结合点。

[0130] 在一个方面, 命名为 AA1 的中性的环状氨基酸残基是一种氨基酸, 其包含饱和的 6 元碳环, 任选包含氮杂原子, 且优选地所述环为环己烷环或哌啶环。优选地, 这种中性的环状氨基酸的分子量为约 100- 约 200Da。

[0131] 命名为 AA2 的酸性氨基酸残基是分子量最多达约 200Da 的氨基酸, 其包含两个羧酸基团和一个伯或仲氨基。或者, 命名为 AA2 的酸性氨基酸残基是分子量最多达约 250Da 的氨基酸, 其包含一个羧酸基团和一个伯或仲磺胺基。

[0132] 命名为 AA3 的中性的、含亚烷基二醇的氨基酸残基是亚烷基二醇部分, 任选地低聚亚烷基二醇或聚亚烷基二醇部分, 其包含在一端的羧酸官能团和在另一端的氨基官能团。

[0133] 本文中, 术语亚烷基二醇部分包括单亚烷基二醇部分及低聚亚烷基二醇部分。单-和低聚亚烷基二醇包括基于单-和低聚乙二醇、基于单-和低聚丙二醇基和基于单-和低聚丁二醇的链, 即基于重复单元 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 的链。亚烷基二醇部分是单分散的 (具有明确的长度 / 分子量)。单亚烷基二醇部分包括 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 每个末端包含不同基团。

[0134] 如本文中所述, 式 (I) ($\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$) 的酰基部分中 AA1、AA2 和 AA3 出现的顺序可独立地相互交换。因此, 式 $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ 也涵盖部分如, 例如, 式 $\text{Acy-AA2}_m\text{-AA1}_n\text{-AA3}_p$, 式 $\text{Acy-AA2-AA3}_n\text{-AA2}$, 和式 $\text{Acy-AA3}_p\text{-AA2-AA1}_n$, 其中 ACY, AA1, AA2, AA3, n, m 和 p 如本文所定义。

[0135] 如本文中所述, 部分 Acy, AA1, AA2 和 / 或 AA3 之间的连接形式上通过从母体化合

物除去水而形成酰胺键（肽键）（-CONH-）来获得，所述母体化合物形式上由它们构成。这意味着为了获得式（I）（ $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ ，其中 Acy ， AA1 ， AA2 ， AA3 ， n ， m 和 p 如本文中所定义）的酰基部分的完整式，必须形式上采用术语 Acy ， AA1 ， AA2 和 AA3 给出的化合物并从它们除去氢和 / 或羟基，并且形式上必须在如此获得的游离末端连接如此获得的构成单元。

[0136] WO 2009/115469 A1, pp. 27-43 中列出了可存在于本发明的酰化的胰岛素类似物中的式 $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ 的酰基部分的非限制性的具体例子：

[0137] 式 $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ 的酰基部分的以上非限制性具体例子中的任一个可以连接到母体胰岛素类似物的以上非限制性具体例子中的任一个中存在的赖氨酸残基的 ϵ 氨基上，从而得到本发明的酰化的胰岛素类似物的其它具体例子。

[0138] 可以通过在赖氨酸残基中引入式 $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ 的期望基团而将母体胰岛素类似物转化为本发明的包含额外二硫键的酰化的胰岛素。可以通过任何方便方法和现有技术中公开的用于这种反应的许多方法而引入式 $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ 的期望基团。更多细节在本文实施例中公开。

[0139] 在本发明的一个方面，选择半胱氨酸取代的位点的方式使得人胰岛素衍生物保留与人胰岛素相关的期望的生物活性。期望的生物活性是本领域技术人员已知的，例如，包括如例如实施例中 106 和 107 所述的结合胰岛素受体，结合 IGF-1（胰岛素生长因子 1）受体，体外效力，体内效力。

[0140] 在一个方面，获得了本发明的胰岛素衍生物，其中与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 1%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 3%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 5%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 10%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 15%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 20%。

[0141] 在一个方面，获得了本发明的胰岛素衍生物，其中与胰岛素受体的受体结合增加。在一个方面，获得了本发明的胰岛素衍生物，其中与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 110%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 120%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 130%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 140%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 150%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的至少 160%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的 110-200%。在一个方面，与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个

个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的 120-180%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的 140-180%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是没有任何一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物与胰岛素受体的受体结合的 150-170%。

[0142] 多肽,例如,胰岛素的生产是本领域中公知的。例如,可以通过经典的肽合成,例如,用 t-Boc 或 Fmoc 化学或其它已有的技术(见,例如, Greene 和 Wuts, “Protective Groups in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons, 1999) 的固相肽合成生产用于生产本发明的胰岛素衍生物的胰岛素类似物。还可以通过一种方法生产胰岛素类似物,该方法包括在允许胰岛素类似物的表达的条件下在合适的营养培养基中培养包含编码该类似物的 DNA 序列并且能够表达该胰岛素类似物的宿主细胞。可以在人胰岛素和人胰岛素类似物的生产中使用数种重组方法。例如, W02008034881 中公开了可以在微生物(如,例如,大肠杆菌和酿酒酵母)中胰岛素的生产中使用的方法的三个非限制性的例子。

[0143] 通常,利用例如在 EP 1, 246, 845 或 W02008034881 (该专利都通过引用特异性地并入本文) 中公开的公知的技术,在合适宿主细胞中,通过表达编码讨论的胰岛素类似物或其前体的 DNA 序列来生产胰岛素类似物。

[0144] 如 EP 1, 246, 845 中公开的,可以表达具有 N- 末端延伸的胰岛素类似物。分泌到培养基并回收之后,胰岛素前体将进行各种体外程序以去除可能的 N- 末端的延伸序列和连接肽以得到胰岛素类似物。这种方法包括通过胰蛋白酶或在 L- 苏氨酸酯存在的情况下 *Achromobacter lyticus* 蛋白酶随后通过碱性或酸水解将胰岛素类似物的苏氨酸酯转化为胰岛素类似物(如美国专利说明书 No. 4, 343, 898 或 4, 916, 212 中所述) 的酶转化。

[0145] 美国专利号 No. 5, 395, 922 和欧洲专利 No. 765, 395 公开了适用于本发明中的 N- 末端延伸的类型的例子,该专利都通过引用特异性地并入本文。

[0146] 对于含有非天然的氨基酸残基的胰岛素类似物,应当修饰重组细胞使得将非天然的氨基酸引入该类似物,例如通过使用 tRNA 突变体。因此,简而言之,与已知的胰岛素类似物的制备类似地制备本发明的胰岛素类似物。

[0147] 在仍进一步的实施方案中,本发明涉及生产胰岛素衍生物的方法,包括:

[0148] (i) 培养包含编码胰岛素前体的核酸序列的宿主细胞;

[0149] (ii) 从培养基中分离胰岛素前体;

[0150] (iii) 通过体外酶转化将胰岛素前体转化为胰岛素类似物;以及

[0151] (iv) 用侧链酰化胰岛素类似物。

[0152] 在仍进一步的实施方案中,本发明涉及生产胰岛素衍生物的方法,包括:

[0153] (i) 培养包含编码胰岛素前体的核酸序列的宿主细胞;

[0154] (ii) 从培养基中分离胰岛素前体;

[0155] (iii) 将胰岛素前体转化为胰岛素类似物;以及

[0156] (iv) 用侧链酰化胰岛素类似物。

[0157] 在本发明的一个实施方案中,宿主细胞是酵母宿主细胞,在进一步的实施方案中,酵母宿主细胞选自酵母属。在进一步的实施方案中,酵母宿主细胞选自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 种。

[0158] 如 WO 2010/029159, WO 00/55119, WO 04/029077 和 W02006/008238 (通过引用并

入) 中所述根据的本领域技术人员公知的方法修饰, 如酰化, 胰岛素类似物。

[0159] 在本发明的一个方面, 获得了用于稳定胰岛素衍生物的方法, 其包括用半胱氨酸残基取代胰岛素衍生物的两个或更多个氨基酸, 其中

[0160] a. 保留人胰岛素的三个二硫键, 以及

[0161] b. 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中, 以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,

[0162] 从而产生人胰岛素衍生物, 其包含不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键。

[0163] 根据本说明书, 如何获得本发明的胰岛素衍生物是显而易见的。因此, 当阅读本说明书时, 本领域技术人员知道如何以这种方式修饰胰岛素衍生物使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中, 以允许除了人胰岛素的三个二硫键之外不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0164] 药物组合物

[0165] 本发明的另一个目的是提供药物制剂, 其包含浓度为 0.1mg/ml–500mg/ml 的本发明的胰岛素衍生物, 其中所述制剂具有 2.0–10.0 的 pH。该制剂可以进一步包括一种或多种蛋白酶抑制剂, 缓冲系统, 一种或多种防腐剂, 一种或多种等渗剂, 一种或多种螯合剂, 稳定剂和表面活性剂。在本发明的一个实施方案中, 药物制剂是水性制剂, 即包含水的制剂。

[0166] 在另一个实施方案中, 药物制剂是没有任何事先溶解的准备使用的干燥的制剂 (例如冷冻干燥的或喷雾干燥的)。

[0167] 包含本发明的胰岛素衍生物的药物组合物可以施用于需要这种治疗的患者, 在数个部位, 例如, 在局部部位, 例如, 皮肤和粘膜部位, 在绕过吸收的部位, 例如, 动脉中, 静脉中, 心脏中, 的施用, 在涉及吸收的部位, 例如, 皮肤中, 皮肤下, 肌肉中或腹腔中的施用。

[0168] 本发明的药物组合物的施用可以通过多种施用途径施用于需要这种治疗的患者中, 例如, 舌, 舌下, 颊, 嘴中, 口腔, 胃和肠中, 鼻, 肺, 例如, 通过细支气管和肺泡或其组合, 表皮, 真皮, 经皮, 阴道, 直肠, 眼, 例如通过结膜, 输尿管和肠胃外。

[0169] 本发明的组合物可以以数种剂型施用, 例如, 溶液, 悬浮液, 乳液, 微乳液, 多重乳液, 泡沫剂, 膏剂, 糊剂, 硬膏剂, 软膏剂, 片剂, 包衣片剂, 冲洗剂, 胶囊剂, 例如, 硬明胶胶囊和软明胶胶囊, 栓剂, 直肠胶囊, 滴剂, 凝胶剂, 喷雾剂, 粉剂, 气雾剂, 吸入剂, 滴眼剂, 眼用软膏剂, 眼用冲洗剂, 阴道栓剂, 阴道环, 阴道软膏剂, 注射液, 原位转化溶液, 例如, 原位凝胶, 原位放置, 原位沉淀, 原位结晶, 输注溶液, 和植入物。

[0170] 对于肠胃外施用, 以类似于已知胰岛素制剂的方式来配制本发明的胰岛素衍生物。此外, 对于肠胃外施用, 可以用与施用已知胰岛素施用的类似方式来施用本发明的胰岛素衍生物, 并且医生熟悉该方法。

[0171] 可以通过注射器, 任选笔类注射器的方式进行肠胃外施用。或者, 可以通过输液泵的方式进行肠胃外施用。

[0172] 包含本发明的胰岛素衍生物的注射组合物可以使用制药工业的常规方法制备, 该方法涉及将适合的组分溶解和混合, 得到所需终产物。因此, 按照一种方法, 将本发明的胰岛素衍生物溶于适量的水中, 水的体积稍微少于所制备组合物的终体积。根据需要, 加入等渗剂、防腐剂和 / 或缓冲剂, 和如果需要的话, 使用酸例如盐酸或碱例如氢氧化钠水溶液

(根据需要)调节溶液的 pH 值。最后,用水调节溶液的体积,得到该组分的所需浓度。

[0173] 更准确地,通过将本发明的化合物,例如,以约 240–约 2400 纳摩尔 /ml 的浓度溶解于微酸性条件的水性介质中可以制备本发明的胰岛素衍生物制剂,例如溶液或悬浮液。例如,用氯化钠或甘油将水性介质制成等渗的。而且,水性介质可以包含缓冲剂,如乙酸盐或柠檬酸盐,防腐剂,如间甲酚或苯酚和锌离子,例如,其浓度为最高达约 $20 \mu\text{gZn}^{++}$ /单位胰岛素活性。溶液的 pH 值向中性调整,为了避免沉淀,该值与本发明的化合物的等电点不能太接近。最终的胰岛素制剂的 pH 值取决于使用本发明的何种化合物,锌离子的浓度以及本发明的化合物的浓度。例如,通过无菌过滤将胰岛素衍生物制剂制成无菌的。

[0174] 可以根据任何已知的方法制备旨在用于口服使用的制剂,这种制剂可以包含选自甜味剂,调味剂,着色剂和防腐剂的一种或多种试剂,以提供药学上优雅并且可口的制剂。片剂可以包含与适合用于片剂制备的无毒的药学上可接受的赋形剂混合的活性组分。这些赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂,如甘露醇,麦芽糊精,高岭土,碳酸钙,碳酸钠,乳糖,磷酸钙或磷酸钠;粒化剂和崩解剂,例如玉米淀粉;结合剂,例如,淀粉,明胶,聚合物或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁,硬脂酸或滑石粉。片剂可以不包衣,或者它们可以用已知的技术包衣以延缓药学上活性多肽的崩解或释放。

[0175] 根据药物化学中公知的方法,见 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 17 版.(A. Osol ed., 1985),可以制备本发明的口服施用的制剂。

[0176] 与已知的胰岛素制剂的使用类似地使用本发明的胰岛素衍生物制剂。

[0177] 通过咨询对糖尿病治疗熟悉的医生而决定本发明的化合物施用的量,确定何种频率施用本发明的化合物,和选择本发明的何种一种或多种化合物,以及任选地连同另一抗糖尿病化合物。

[0178] 在一个方面,口服施用本发明的胰岛素衍生物。在一个方面,肠胃外施用本发明的胰岛素衍生物。

[0179] 在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的胰岛素衍生物,其被用作药物。

[0180] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物被用于药物的制备中,该药物用于治疗或预防高血糖症,2 型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性和 1 型糖尿病。

[0181] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物被用作延迟或防止 2 型糖尿病的疾病进展的药物。

[0182] 在本发明的一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物被用于治疗或预防高血糖症,2 型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性,1 型糖尿病,或者用于延迟或防止 2 型糖尿病的疾病进展的药物。

[0183] 在本发明的进一步实施方案中,提供了用于治疗或预防高血糖症,2 型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性,1 型糖尿病,或者用于延迟或防止 2 型糖尿病的疾病进展的方法,该方法包括将对于这种治疗的有效量的本发明的胰岛素衍生物施用于需要这种治疗的患者。

[0184] 术语“糖尿病”包括 1 型糖尿病,2 型糖尿病和导致高血糖的其它状态。

[0185] 术语疾病的“治疗”包括疾病的治疗,预防或减轻。

[0186] 以下是进一步描述本发明的方面的列表:

[0187] 1. 胰岛素衍生物,具有两个或更多个半胱氨酸取代和连接于胰岛素的侧链,其中保留了人胰岛素的三个二硫键,并且

[0188] 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0189] 2. 根据方面 1 的胰岛素衍生物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得

[0190] (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,以及

[0191] (2) 人胰岛素衍生物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性。

[0192] 3. 根据方面 1 或 2 的胰岛素衍生物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得

[0193] (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,

[0194] (2) 人胰岛素衍生物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性,以及

[0195] (3) 相对于人胰岛素和 / 或母体胰岛素,人胰岛素衍生物具有增加的物理稳定性。

[0196] 4. 根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得

[0197] (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,

[0198] (2) 人胰岛素衍生物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性,以及

[0199] (3) 人胰岛素衍生物对蛋白水解性降解是稳定的。

[0200] 5. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代选自 A- 链的 A9、A10、A11 和 A12 的位置中的至少一个氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B1、B2、B3、B4、B5 和 B6 的位置中的至少一个氨基酸残基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

[0201] 6. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B1、B2、B3 和 B4 的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

[0202] 7. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B3 和 B4 的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

[0203] 8. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代 B- 链的 B3 位的氨基酸,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

[0204] 9. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代 B- 链的 B4 位的氨基酸,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

[0205] 10. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A21 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B25 和 B26 的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸。

[0206] 11. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B1、B2、B3 和 B4 的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸,

[0207] 其中,相对于没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物,胰岛素衍生物的清除半衰期延长。

[0208] 12. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B3 和 B4 的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸,

[0209] 其中,相对于没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物,胰岛素衍生物的清除半衰期延长。

[0210] 13. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代 B- 链的 B3 位的氨基酸,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸,

[0211] 其中,相对于没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物,胰岛素衍生物的清除半衰期延长。

[0212] 14. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A10 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代 B- 链的 B4 位的氨基酸,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸,

[0213] 其中,相对于没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物,胰岛素衍生物的清除半衰期延长。

[0214] 15. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中用半胱氨酸取代 A- 链的 A21 位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自 B- 链的 B25 和 B26 的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失 B30 位的氨基酸,

[0215] 其中,相对于没有有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物,胰岛素衍生物的清除半衰期延长。

[0216] 16. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中在 A- 链和 B- 链之间获得一个或多个额外的二硫键。

[0217] 17. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中在 A- 链和 B- 链之间获得一个或多个额外的二硫键。

[0218] 18. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中至少一个额外的二硫键连接 A- 链中的两个半胱氨酸,或者连接 B- 链中的两个半胱氨酸。

[0219] 19. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中与胰岛素受体的受体结合是有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物的受体结合的至少 1%。

[0220] 20. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中与胰岛素受体的受体结合是有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物的受体结合的至少 25%。

[0221] 21. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中与胰岛素受体的受体结合是有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物的受体结合的至少 50%。

[0222] 22. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中与胰岛素受体的受体结合是有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物的受体结合的至少 75%。

[0223] 23. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中与胰岛素受体的受体结合是有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物的受体结合的至少 90%。

[0224] 24. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,相对于母体胰岛

素,其具有改善的物理稳定性。

[0225] 25. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,与没有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物相比,其具有更持效的特性。

[0226] 26. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,与 没有一个或多个额外的二硫键的胰岛素衍生物相比,其具有延长的清除半衰期。

[0227] 27. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中缺失 B30 位的氨基酸。

[0228] 28. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中至少一个额外的二硫键连接 A- 链中的两个半胱氨酸,或者连接 B- 链中的半胱氨酸。

[0229] 29. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其具有两个半胱氨酸取代。

[0230] 30. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物,其中所述胰岛素选自:

[0231] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0232] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0233] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0234] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30 人胰岛素,

[0235] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0236] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0237] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0238] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0239] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30 人胰岛素,

[0240] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0241] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30 人胰岛素,

[0242] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30 人胰岛素,

[0243] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0244] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0245] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30 人胰岛素,

[0246] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30 人胰岛素,

[0247] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0248] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0249] A10C, B3C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0250] A10C, B3C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0251] A10C, B4C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0252] A10C, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0253] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0254] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0255] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0256] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素

[0257] 以及侧链连接于胰岛素的 N- 末端或胰岛素的赖氨酸残基的 ϵ 氨基。

[0258] 31. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述胰岛素选自:

[0259] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0260] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0261] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0262] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30 人胰岛素,

[0263] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0264] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0265] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0266] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0267] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30 人胰岛素,

[0268] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0269] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30 人胰岛素,

[0270] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30 人胰岛素,

[0271] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0272] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0273] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30 人胰岛素,

[0274] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30 人胰岛素,

[0275] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0276] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0277] A10C, B3C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0278] A10C, B3C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0279] A10C, B4C, B25H, desB27, desB30 人胰岛素,

[0280] A10C, B4C, B25H, desB30 人胰岛素,

[0281] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0282] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0283] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素,

[0284] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30 人胰岛素

[0285] 以及侧链连接于胰岛素的 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基。

[0286] 32. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述胰岛素选自:

[0287] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30 人胰岛素

[0288] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30 人胰岛素

[0289] A10C, A21G, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素

[0290] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30 人胰岛素

[0291] A10C, A21G, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素

[0292] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30 人胰岛素

[0293] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30 人胰岛素

- [0294] A10C, A21G, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0295] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0296] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30 人胰岛素
- [0297] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0298] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0299] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0300] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0301] A10C, A21G, B4C, desB30 人胰岛素
- [0302] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0303] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30 人胰岛素
- [0304] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0305] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30 人胰岛素
- [0306] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0307] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0308] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0309] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0310] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30 人胰岛素
- [0311] A10C, B1C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0312] A10C, B2C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0313] A10C, B2C, B3A, desB30 人胰岛素
- [0314] A10C, B2C, B3D, desB30 人胰岛素
- [0315] A10C, B2C, B3E, desB30 人胰岛素
- [0316] A10C, B2C, B3F, desB30 人胰岛素
- [0317] A10C, B4C, B28D 人胰岛素
- [0318] A10C, B4C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0319] 以及侧链连接于胰岛素的 N- 末端或胰岛素的赖氨酸残基的 ϵ 氨基。
- [0320] 33. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述胰岛素选自:
- [0321] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30 人胰岛素
- [0322] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30 人胰岛素
- [0323] A10C, A21G, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0324] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30 人胰岛素
- [0325] A10C, A21G, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0326] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0327] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30 人胰岛素
- [0328] A10C, A21G, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0329] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0330] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30 人胰岛素
- [0331] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30 人胰岛素

- [0332] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0333] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0334] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0335] A10C, A21G, B4C, desB30 人胰岛素
- [0336] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0337] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30 人胰岛素
- [0338] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0339] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30 人胰岛素
- [0340] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0341] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30 人胰岛素
- [0342] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0343] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30 人胰岛素
- [0344] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30 人胰岛素
- [0345] A10C, B1C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0346] A10C, B2C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0347] A10C, B2C, B3A, desB30 人胰岛素
- [0348] A10C, B2C, B3D, desB30 人胰岛素
- [0349] A10C, B2C, B3E, desB30 人胰岛素
- [0350] A10C, B2C, B3F, desB30 人胰岛素
- [0351] A10C, B4C, B28D 人胰岛素
- [0352] A10C, B4C, B28D, desB30 人胰岛素
- [0353] 以及侧链连接于胰岛素的 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基。
- [0354] 34. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述侧链连接于胰岛素的 N- 末端或胰岛素的赖氨酸残基的 ϵ 氨基。
- [0355] 35. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述侧链连接于胰岛素的 B- 链中赖氨酸残基的 ϵ 氨基。
- [0356] 36. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物, 其中所述侧链是通式: $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$ 的酰基部分。
- [0357] 37. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素衍生物, 其选自实施例中提到的胰岛素衍生物。
- [0358] 38. 用于稳定胰岛素的方法, 包括用半胱氨酸残基取代胰岛素的两个或更多个氨基酸并且将侧链连接于胰岛素, 其中
- [0359] a. 保留人胰岛素的三个二硫键, 以及
- [0360] b. 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素衍生物的三维结构中, 以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,
- [0361] 从而产生胰岛素衍生物, 其包含不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键。
- [0362] 39. 药物组合物, 包含生物活性量的方面 1-37 中任一项的胰岛素衍生物和药学上可接受的载体。

[0363] 40. 根据方面 39 的药物组合物,进一步包括药学上可接受的载体和 / 或赋形剂,以及任选的佐剂。

[0364] 41. 在受试者中治疗糖尿病的方法,包括将方面 1-37 中任一项的胰岛素衍生物或方面 39-40 中任一项的药物组合物施用于受试者。

[0365] 42. 哺乳动物中降低血糖水平的方法,通过将治疗活性剂量的方面 1-37 中任一项的胰岛素衍生物或方面 39-40 中任一项的药物组合物施用于需要这种治疗的患者。

[0366] 43. 方面 1-37 中任一项的胰岛素衍生物,其用作高血糖症,2 型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性和 1 型糖尿病的治疗或预防中的药物。

[0367] 44. 方面 1-37 中任一项的胰岛素衍生物,其用作延迟或防止 2 型糖尿病中疾病进展的药物。

[0368] 45. 制备方面 39-40 中任一项的药物组合物的方法,包括将方面 1-37 中任一项的胰岛素衍生物与药学上可接受的物质和 / 或赋形剂混合。

[0369] 46. 通过方面 45 的方法获得的药物组合物。

[0370] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,在此通过引用被完整地并入,其程度如同每份参考文献被单独且明确地指明通过引用并入并且在本文中完整地记载(法律允许的最大程度)。

[0371] 本文使用的所有的标题和副标题仅仅为了方便,不应当被解释为以任何方式限制本发明。

[0372] 本文提供的任何和所有实施例,或示例性语言(例如,如)的使用,除非另有要求,仅仅为了更好地阐明本发明,并不构成对本发明的范围的限制。说明书中任何语言都不应当被解释为指明任何非要求保护的对于本发明的实施所必需的元素。

[0373] 在本文中专利文件的引用并并入仅仅是为了方便,并不反映专利文件的有效性、可专利性和 / 或可执行性的任何观点。

[0374] 本发明包括本文所附加权利要求中所记载主题的所有变型和等同内容,其是为适用的法律所允许的。

附图说明

[0375] 图 1:实施例 1 的衍生物相比于没有额外的二硫键的类似衍生物在大鼠中的 i. v. PK 特征的比较。

[0376] 图 2:实施例 1 的衍生物相比于没有额外的二硫键的类似衍生物在狗中的 i. v. PK 特征的比较。

[0377] 图 3:本发明的胰岛素衍生物的差示扫描量热法(DSC)数据。

[0378] 图 4:母体胰岛素类似物的差示扫描量热法(DSC)数据。

[0379] 实施例

[0380] 以示例而非限制地提供下列实施例。

[0381] 本文中所用的缩写如下: β Ala 为 γ -丙氨酰,Aoc 为 8-氨基辛酸,tBu 为叔丁基,DCM 为二氯甲烷,DIC 为二异丙基碳二亚胺,DIPEA = DIEA,为 N,N'-二异丙基乙胺,DMF 为 N,N'-二甲基甲酰胺,DMSO 为二甲基亚砜,EtOAc 为乙酸乙酯,Fmoc 为 9-芴基甲氧羰基, γ Glu 为 γ -L-谷氨酰,HCl 为盐酸,HOBt 为 1-羟基苯并三唑,NMP 为 N-甲基吡咯烷酮,MeCN 为

乙腈, OEG 为 [2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙基羰基, Su 为琥珀酰亚胺-1-基 = 2,5-二氧-吡咯烷-1-基, OSu 为琥珀酰亚胺-1-基氧基 = 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基, RPC 为反相色谱法, RT 为室温, TFA 为三氟乙酸, THF 为四氢呋喃, TNBS 为 2,4,6-三硝基苯磺酸, TRIS 为三(羟甲基)氨基甲烷, TSTU 为 O-(N-琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯。

[0382] 以下实施例和通用程序涉及说明书和合成方案中鉴定的中间化合物和最终产物。采用以下实施例对本发明化合物的制备进行详细描述,但描述的化学反应根据它们对本发明化合物制备的一般适用性来公开。有时,所述反应可能不能适用于如所述的本发明范围内的每种化合物。本领域技术人员容易识别会发生这种情况的化合物。在这些情况下,所述反应可成功地通过本领域技术人员已知的常规改进进行,也就是说,通过干扰基团的合适保护,通过改变为其它常规试剂,或通过反应条件的常规改进。或者,本文中公开的或常规的其它反应将适用于制备本发明的相应化合物。在所有制备方法中,所有原料都是已知的或能容易地采用已知原料制备的。所有温度都以摄氏度给出,除非另外明确指出,当提到产率时,所有份和百分比都以重量计,当提到溶剂和洗脱液时,所有份都以体积计。

[0383] 可以通过采用本领域中常用的以下方法中的一种或多种来纯化本发明的化合物。如果需要,可将这些方法针对梯度、pH、盐、浓度、流速、柱子等等进行改进。根据因素如杂质特征、考虑的胰岛素溶解性等等,本领域技术人员容易认识和进行这些改进。

[0384] 酸性 HPLC 或脱盐后,通过冷冻干燥纯的部分来分离化合物。

[0385] 中性 HPLC 或阴离子交换色谱后,使所述化合物脱盐、例如通过大小排阻色谱法,在等电 pH 下沉淀或通过酸性 HPLC 脱盐。

[0386] 典型的纯化方法:

[0387] HPLC 系统为由以下组成的 Gilson 系统:215 型液体处理系统,322-H2 型泵和 155 型 UV 检测仪。典型地在 210nm 和 280nm 下进行检测。

[0388] Äkta Purifier FPLC 系统 (Amersham Biosciences) 由如下组成:P-900 型泵,UV-900 型 UV 检测仪, pH/C-900 型 pH 和电导率检测仪, Frac-950 型馏分收集器。通常在 214nm、254nm 和 276nm 下进行 UV 检测。

[0389] 酸性 HPLC:

[0390] 柱:Macherey-Nagel SP 250/21Nucleusil 300-7C4

[0391] 流速:8ml/min

[0392] 缓冲液 A:乙腈中的 0.1% TFA

[0393] 缓冲液 B:水中的 0.1% TFA

[0394] 梯度:0.0-5.0min:10% A

[0395] 5.00-30.0min:10% A 至 90% A

[0396] 30.0-35.0min:90% A

[0397] 35.0-40.0min:100% A

[0398] 中性 HPLC:

[0399] 柱:Phenomenex, Jupiter, C4 5 μ m 250x 10.00mm, 300 Å

[0400] 流速:6ml/min

- [0401] 缓冲液 A :5mM TRIS, 7.5mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH = 7.3, 20% CH_3CN
- [0402] 缓冲液 B :60% CH_3CN , 40% 水
- [0403] 梯度 :0-5min :10% B
- [0404] 5-35min :10-60% B
- [0405] 35-39min :60% B
- [0406] 39-40min :70% B
- [0407] 40-43.5min :70% B
- [0408] 阴离子交换色谱法 :
- [0409] 柱 :ResourceQ, 1ml
- [0410] 流速 :6ml/min
- [0411] 缓冲液 A :0.09% NH_4HCO_3 , 0.25% NH_4OAc , 42.5% 乙醇 pH 8.4
- [0412] 缓冲液 B :0.09% NH_4HCO_3 , 2.5% NH_4OAc , 42.5% 乙醇 pH 8.4
- [0413] 梯度 :在 30 个柱体积期间 100% A-100% B
- [0414] 脱盐 :
- [0415] 柱 :HiPrep 26/10
- [0416] 流速 :10ml/min, 6 个柱体积
- [0417] Buffer :10mM NH_4HCO_3 。
- [0418] 固相合成通式 (II) 的酰化剂的通用程序 :
- [0419] (II) : $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-Act}$,
- [0420] 其中 Acy, AA1, AA2, AA3, n, m 和 p 如上所定义且 Act 为活性酯的离去基团, 如 N-羟基琥珀酰亚胺 (OSu) 或 1-羟基苯并三唑, 和
- [0421] 其中酰基部分的 Acy 和 AA2 部分内的羧酸作为叔丁酯受到保护。
- [0422] 可以采用固相肽合成领域中技术人员熟知的方法在固体载体上合成本发明通式 (II) 的化合物。该方法包括将 Fmoc 保护的氨基酸与聚苯乙烯 2-氯三苯甲基氯树脂相连接。可以例如在叔胺如三乙胺或 N, N-二异丙基乙胺存在的情况下采用游离的 N-保护的氨基酸来完成该连接 (参见下面参考文献)。该氨基酸的 C-末端 (其与树脂相连) 在与本发明母体胰岛素偶联的合成序列的末端。Fmoc 氨基酸与所述树脂相连后, 采用, 例如仲胺如哌啶或二乙胺使 Fmoc 基团脱保护, 随后偶联另一种 (或相同的) Fmoc 保护的氨基酸并脱保护。通过单叔丁基保护的脂肪 (α , ω) 二酸如十六烷二酸、十七烷二酸、十八烷二酸或二十烷二酸单叔丁基酯的偶联而终止该合成序列。采用稀释的酸如 0.5-5% TFA/DCM (二氯甲烷中的三氟乙酸)、乙酸 (例如 DCM 中 10%, 或 HOAc/ 三氟乙醇 /DCM 1 : 1 : 8) 或 DCM 中的六氟异丙醇来完成将所述化合物从所述树脂裂解 (参见例如 “Organic Synthesis on Solid Phase (固相有机合成)”, F. Z. Dörwald, Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-29950-5, “Peptides: Chemistry and Biology (肽: 化学和生物学)”, N. Sewald & H.-D. Jakubke, Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3 或 “The Combinatorial Chemistry Catalog (组合化学目录)” 1999, Novabiochem AG, 及本文引用的文献)。这确保了化合物中作为羧酸保护基团存在的叔丁基酯没有被脱保护。最后, C-末端羧基 (从所述树脂释放的) 被活化, 例如作为 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (OSu) 并直接或纯化后用作与本发明母体胰岛素连接中的偶联剂。

[0423] 或者,可以通过下面描述的液相合成来制备以上通式 (II) 的酰化剂。

[0424] 单叔丁基保护的脂肪二酸如十六烷二酸、十七烷二酸、十八烷二酸或二十烷二酸单叔丁基酯被激活,例如作为下面描述的 OSu- 酯或本领域技术人员已知的任何其它活化酯,如 HOBt- 或 HOAt- 酯。在合适碱如 DIPEA 或三乙胺存在的情况下,在合适溶剂如 THF、DMF、NMP (或溶剂混合物) 中,将这种活性酯与氨基酸 AA₁、单叔丁基保护的 AA₂ 或 AA₃ 中的一种偶联。通过萃取方法或通过色谱法分离中间体。将产生的中间体再次活化 (如上所述) 并如上所述使之与氨基酸 AA₁、单叔丁基保护的 AA₂ 或 AA₃ 中的一种偶联。重复该方法直到获得期望的受保护中间体 Acy-AA_{1_n}-AA_{2_m}-AA_{3_p}-OH。这依次被活化以提供通式 (II) Acy-AA_{1_n}-AA_{2_m}-AA_{3_p}-Act 的酰化剂。

[0425] 通过以上方法中任一种制备的酰化剂可以在作为 OSu 酯活化后脱 (叔丁基) 保护。可以通过 TFA 处理 OSu- 活化的叔丁基保护的酰化剂做到这一点。任何蛋白酶稳定化的胰岛素酰化后,获得产生的本发明的未保护的酰化的、蛋白酶稳定化的胰岛素。

[0426] 如果通过以上方法中任一种制备的试剂在作为 OSu 酯活化后不脱 (叔丁基) 保护,任何蛋白酶稳定化的胰岛素的酰化提供相应的本发明的叔丁基保护的酰化的、蛋白酶稳定化的胰岛素。为了获得本发明的未保护的酰化的、蛋白酶稳定化的胰岛素,所述保护的胰岛素将被脱保护。可以通过 TFA 处理以获得本发明的未保护的酰化的、蛋白酶稳定化的胰岛素而做到这一点。

[0427] 在碱性 pH (例如在 pH 10, 10.5, 11, 11.5 或 12) 下进行人胰岛素或胰岛素类似物的赖氨酸残基 (在 ε 位) 的酰化。

[0428] 在第一个实施例中说明了通用方法 (A)。

[0429] 实施例 1, 通用方法 (A) :

[0430] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0431] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0432] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)

[0433] 将 A10C, B4C, A14E, B25H, desB30 人胰岛素 (2g) 溶解于 100mMNa₂CO₃ 水溶液 (50mL) 中, 并加入 NMP (3mL)。用 1N NaOH 将 pH 调节至 11.2。加入溶解于 NMP (6mL) 中的十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG-OSu (0.8g, 1.4equiv.), 同时用 1N NaOH 将 pH 保持在约 11.5 分钟后, 加入水 (40mL), 通过加入 1N HCl 而将 pH 降低至 5.5。通过离心分离沉淀。残余物溶解于乙腈 (30mL) 和包含 1% TFA 的水 (30mL) 中, 通过 4 次运行 HPLC 而纯化 :

[0434] 柱 : Phenomenex, Gemini, 5 μ, C18, 110 Å, 250x30cm

[0435] 流速 : 20ml/min'

[0436] 洗脱剂 : A : 水中的 0.1% TFA B : 乙腈中的 0.1% TFA

[0437] 梯度 :

[0438] 0-7.5min : 10% B,

[0439] 7.5-87.5min : 10% B 至 60% B,

[0440] 87.5-92.5min : 60% B

[0441] 92.5-97.5min : 60% B 至 100% B

- [0442] 97.5-100min:100% B
- [0443] 100-103min:10% B。
- [0444] 合并纯馏分并冻干。将干物质溶解于水(200mL)中并加入0.1NNaOH至pH=8.1,冻干以产生1g标题胰岛素衍生物。
- [0445] MALDI-MS:m/z:6340;calcd:6341.
- [0446] LC-MS(电喷雾):m/z=1586.04(M+4)/4(6340)。
- [0447] 实施例2,通用方法(A):
- [0448] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu), desB30人胰岛素
- [0449] IUPAC(OpenEye, IUPAC类型)名称:
- [0450] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0451] LCMS(电喷雾):m/z=1517.0(M+4)/4(6064)。
- [0452] 实施例3,通用方法(A):
- [0453] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰), desB30人胰岛素
- [0454] IUPAC(OpenEye, IUPAC类型)名称:
- [0455] N{ε-B29}-17-羧基十七酰基-[CysA10, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0456] MS(电喷雾)m/4:m/z=1485.0(5935.9)。Calcd.:1484.8。
- [0457] 实施例4,通用方法(A):
- [0458] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu), desB30人胰岛素
- [0459] IUPAC(OpenEye, IUPAC类型)名称:
- [0460] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0461] MS(电喷雾)m/4:m/z=1525.8(6099.1)。Calcd.:1525.8。
- [0462] 实施例5,通用方法(A):
- [0463] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-2xOEG), desB30人胰岛素
- [0464] IUPAC(OpenEye, IUPAC类型)名称:
- [0465] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-PheB1, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽, (B2-B29)-肽
- [0466] MS(电喷雾)m/4:m/z=1549.4(6193.6)。Calcd.:1549.3。
- [0467] 类似地制备了下列衍生物:
- [0468] 实施例6,通用方法(A):
- [0469] A10C, A14H, B4C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-2xOEG), desB30人胰岛素
- [0470] IUPAC(OpenEye, IUPAC类型)名称:
- [0471] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, HisA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0472] 类似地制备如下类似物：

[0473] 实施例 7, 通用方法 (A)：

[0474] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0475] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称：

[0476] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0477] MS(电喷雾)m/4:m/z = 1597.6(6386.4)。Calcd.:1597.5。

[0478] 实施例 8, 通用方法 (A)：

[0479] A10C, A14E, B1C, B25H, B29K(N^ε 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0480] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称：

[0481] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0482] MS(电喷雾)m/4:m/z = 1588.9(6351.6)。Calcd.:1588.8。

[0483] 实施例 9, 通用方法 (A)：

[0484] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0485] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称：

[0486] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0487] MS(电喷雾)m/4:m/z = 1514.1(6351.6)。Calcd.:1513.8。

[0488] 实施例 10, 通用方法 (A)：

[0489] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε 十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0490] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称：

[0491] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0492] MS(电喷雾)m/4:m/z = 1589.6(6355.4)。Calcd.:1589.9。

[0493] 实施例 11, 通用方法 (A)：

[0494] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε 十八烷二酰 -gGlu-gGlu), desB30 人胰岛素

[0495] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称：

[0496] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)-丁酰基]氨基]丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0497] MS(电喷雾)m/4:m/z = 1549.2(6194.2)。Calcd.:1549.6。

[0498] 实施例 12, 通用方法 (A)：

[0499] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, B29K(N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0500] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称：

[0501] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)

- [0502] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1488(5948)$ 。Calcd.:1488。
- [0503] 实施例 13,通用方法(A):
- [0504] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰), desB30 人胰岛素
- [0505] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0506] N{ε-B29}-17-羧基十七酰基-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0507] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1481.9(5921.9)$ 。Calcd.:1481.5。
- [0508] 实施例 14,通用方法(A):
- [0509] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-gGlu), desB30 人胰岛素
- [0510] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0511] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)-丁酰基]氨基]丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0512] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1546.1(6180.2)$ 。Calcd.:1545。
- [0513] 实施例 15,通用方法(A):
- [0514] A10C, A14E, B2C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素
- [0515] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0516] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0517] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1593.6(6370.4)$ 。Calcd.:1593.6。
- [0518] 实施例 16,通用方法(A):
- [0519] A10C, A14E, B1C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素
- [0520] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0521] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0522] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1581.5(6322.1)$ 。Calcd.:1581.5。
- [0523] 实施例 17,通用方法(A):
- [0524] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K(N^ε二十烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素
- [0525] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0526] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)
- [0527] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1590.5(6357.8)$ 。Calcd.:1590.5。
- [0528] 实施例 18,通用方法(A):
- [0529] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^εMyristyl), desB30 人胰岛素
- [0530] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0531] N{ε-B29}-十四酰基-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素

(人)

[0532] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1460.0(5835.8)$ 。Calcd.:1460.0。

[0533] 实施例 19,通用方法(A):

[0534] A10C, B4C, B29K(N^ε 豆蔻基), desB30 人胰岛素

[0535] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:

[0536] N{ε-B29}-十四酰基-[CysA10, CysB4], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0537] MS(电喷雾) $m/3:m/z = 1961.4(5881.2)$ 。Calcd.:1961.4。

[0538] 实施例 20,通用方法(A):

[0539] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, B29K(N(ε) 十八烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0540] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:

[0541] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)

[0542] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1492.2(5964.0)$ 。Calcd.:1492.0。

[0543] 实施例 21,通用方法(A):

[0544] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, B29K(N(ε) 十八烷二酰-gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0545] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:

[0546] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)

[0547] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1564.7(6254.3)$ 。Calcd.:1564.6。

[0548] 实施例 22,通用方法(A):

[0549] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε 二十烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0550] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:

[0551] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0552] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1524.4(6093.1)$ 。Calcd.:1524.3。

[0553] 实施例 23,通用方法(A):

[0554] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰-gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0555] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:

[0556] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)

[0557] MS(电喷雾) $m/4:m/z = 1593.2(6369.4)$ 。Calcd.:1593.4。

[0558] 实施例 24,通用方法(A):

[0559] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, B29K(N(ε) 二十烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0560] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:

[0561] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)

- [0562] MS(电喷雾)m/4:m/z = 1499.1(5992.0)。Calcd.:1499.0。
- [0563] 实施例 25,通用方法(A):
- [0564] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, B29K(N(ε)二十烷二酰-gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素
- [0565] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0566] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)
- [0567] MS(电喷雾)m/4:m/z = 1571.8(6282.3)。Calcd.:1571.6。
- [0568] 类似地,可以制备下列胰岛素衍生物:
- [0569] 实施例 26,通用方法(A):
- [0570] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素
- [0571] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0572] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。
- [0573] 实施例 27,通用方法(A):
- [0574] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素
- [0575] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0576] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。
- [0577] 实施例 28,通用方法(A):
- [0578] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰), desB30 人胰岛素
- [0579] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0580] N{ε-B29}-15-羧基十五酰基-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。
- [0581] 实施例 29,通用方法(A):
- [0582] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-gGlu), desB30 人胰岛素
- [0583] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0584] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-[[4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。
- [0585] 实施例 30,通用方法(A):
- [0586] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素 IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型)名称:
- [0587] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。
- [0588] 实施例 31,通用方法(A):
- [0589] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-gGlu), desB30 人胰岛

素

[0590] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0591] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。

[0592] 实施例 32, 通用方法 (A):

[0593] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素 IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0594] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。

[0595] 实施例 33, 通用方法 (A):

[0596] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0597] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0598] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。

[0599] 实施例 34, 通用方法 (A):

[0600] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0601] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0602] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0603] 实施例 35, 通用方法 (A):

[0604] A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0605] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0606] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0607] 实施例 36, 通用方法 (A):

[0608] A10C, A14E, B2C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0609] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0610] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0611] 实施例 37, 通用方法 (A):

[0612] A10C, A14E, B2C, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0613] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0614] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0615] 实施例 38, 通用方法 (A):

[0616] A10C, A14E, B2C, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

- [0617] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :
- [0618] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。
- [0619] 实施例 39, 通用方法 (A) :
- [0620] A10C, A14E, B1C, B25H, B29K(N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0621] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :
- [0622] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。
- [0623] 实施例 40, 通用方法 (A) :
- [0624] A10C, A14E, B1C, B25H, B29K(N^ε 十六烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素
- [0625] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :
- [0626] N{ ε -B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。
- [0627] 实施例 41, 通用方法 (A) :
- [0628] A10C, A14E, B1C, B25H, B29K(N^ε 十六烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0629] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :
- [0630] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。
- [0631] 实施例 42, 通用方法 (A) :
- [0632] A10C, B1C, B29K(N^ε 十六烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素
- [0633] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :
- [0634] N{ ε -B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, CysB1], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。
- [0635] 实施例 43, 通用方法 (A) :
- [0636] A10C, B1C, B29K(N^ε 十六烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0637] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :
- [0638] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, CysB1], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。
- [0639] 实施例 44, 通用方法 (A) :
- [0640] A10C, B1C, B29K(N^ε 十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素
- [0641] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :
- [0642] N{ ε -B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, CysB1], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。
- [0643] 实施例 45, 通用方法 (A) :
- [0644] A10C, B1C, B29K(N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0645] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0646] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, CysB1], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0647] 实施例 46, 通用方法 (A) :

[0648] A10C, B2C, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0649] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0650] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, CysB2], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0651] 实施例 47, 通用方法 (A) :

[0652] A10C, B2C, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0653] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0654] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, CysB2], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0655] 实施例 48, 通用方法 (A) :

[0656] A10C, B2C, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0657] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0658] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, CysB2], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0659] 实施例 49, 通用方法 (A) :

[0660] A10C, B2C, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0661] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0662] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, CysB2], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0663] 实施例 50, 通用方法 (A) :

[0664] A10C, B3C, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0665] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0666] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, CysB3], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0667] 实施例 51, 通用方法 (A) :

[0668] A10C, B3C, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0669] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0670] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, CysB3], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0671] 实施例 52, 通用方法 (A) :

[0672] A10C, B3C, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0673] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0674] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)

丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, CysB3], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0675] 实施例 53, 通用方法 (A) :

[0676] A10C, B3C, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0677] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0678] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基 十七酰基 氨基) 丁酰基]-[CysA10, CysB3], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0679] 实施例 54, 通用方法 (A) :

[0680] A10C, B4C, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0681] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0682] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基 十七酰基 氨基) 丁酰基]-[CysA10, CysB4], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0683] 实施例 55, 通用方法 (A) :

[0684] A10C, B4C, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0685] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0686] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基 十七酰基 氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, CysB4], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0687] 实施例 56, 通用方法 (A) :

[0688] A10C, B4C, B29K (N^ε 十六烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0689] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0690] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基 十五酰基 氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, CysB4], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0691] 实施例 57, 通用方法 (A) :

[0692] A10C, B4C, B29K (N^ε 十六烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0693] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0694] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基 十五酰基 氨基) 丁酰基]-[CysA10, CysB4], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0695] 实施例 58, 通用方法 (A) :

[0696] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, B29K (N^ε 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0697] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0698] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基 十九酰基 氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0699] 实施例 59, 通用方法 (A) :

[0700] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, B29K (N^ε 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0701] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0702] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0703] 实施例 60, 通用方法 (A) :

[0704] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0705] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0706] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0707] 实施例 61, 通用方法 (A) :

[0708] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, B29K(N^ε十八烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0709] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0710] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0711] 实施例 62, 通用方法 (A) :

[0712] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0713] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0714] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0715] 实施例 63, 通用方法 (A) :

[0716] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0717] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0718] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0719] 实施例 64, 通用方法 (A) :

[0720] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0721] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0722] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0723] 实施例 65, 通用方法 (A) :

[0724] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, B29K(N^ε十六烷二酰-gGlu), desB30 人胰岛素

[0725] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0726] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB16, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0727] 实施例 66, 通用方法 (A) :

[0728] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0729] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0730] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] -[CysA10, GluA14, CysB2, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0731] 实施例 67, 通用方法 (A):

[0732] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0733] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0734] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] -[CysA10, GluA14, CysB2, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0735] 实施例 68, 通用方法 (A):

[0736] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, B29K (N^ε 二十烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0737] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0738] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] -[CysA10, GluA14, CysB2, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0739] 实施例 69, 通用方法 (A):

[0740] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, B29K (N^ε 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0741] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0742] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] -[CysA10, GluA14, CysB2, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0743] 实施例 70, 通用方法 (A):

[0744] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K (N^ε 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0745] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0746] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] -[CysA10, GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0747] 实施例 71, 通用方法 (A):

[0748] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0749] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0750] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] -[CysA10, GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0751] 实施例 72, 通用方法 (A):

[0752] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0753] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] -[CysA10,

GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0754] 实施例 73, 通用方法 (A) :

[0755] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十六烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0756] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0757] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基] -[CysA10, GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0758] 实施例 74, 通用方法 (A) :

[0759] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十六烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0760] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0761] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] -[CysA10, GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0762] 实施例 75, 通用方法 (A) :

[0763] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十六烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0764] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0765] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] -[CysA10, GluA14, CysB4, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0766] 实施例 76, 通用方法 (A) :

[0767] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十六烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0768] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0769] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(15- 羧基十五酰基氨基) 丁酰基] -[CysA10, GluA14, CysB4, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0770] 实施例 77, 通用方法 (A) :

[0771] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0772] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0773] N{ ε -B29} -[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] -[CysA10, GluA14, CysB4, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0774] 实施例 78, 通用方法 (A) :

[0775] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, B29K (N^ε 十八烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰岛素

[0776] IUPAC (OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0777] N{ ε -B29} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(17- 羧基十七酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] -[CysA10, GluA14, CysB4, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0778] 实施例 79, 通用方法 (A) :

[0779] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, B29K (N^ε 二十烷二酰 -gGlu-OEG-OEG), desB30 人胰

胰岛素

[0780] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0781] N{ ε -B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0782] 实施例 80, 通用方法(A):

[0783] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, B29K(N^ε 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0784] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0785] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0786] 实施例 81, 通用方法(A):

[0787] A10C, A14E, B1C, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0788] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0789] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB1, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0790] 实施例 82, 通用方法(A):

[0791] A10C, A14E, B2C, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0792] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0793] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0794] 实施例 83, 通用方法(A):

[0795] A10C, A14E, B2C, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0796] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0797] N{ ε -B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB2, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素(人)。

[0798] 实施例 84, 通用方法(A):

[0799] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0800] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0801] N{ ε -B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB27, ThrB30- 胰岛素(人)。

[0802] 实施例 85, 通用方法(A):

[0803] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0804] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0805] N{ ε -B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB27, ThrB30- 胰岛素(人)。

[0806] 实施例 86, 通用方法(A):

- [0807] A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N(ε)) 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0808] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:
- [0809] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, HisB25], des-ThrB30-胰岛素(人)。
- [0810] 实施例 87, 通用方法(A):
- [0811] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, B29K(N(ε)) 十六烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0812] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:
- [0813] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。
- [0814] 实施例 88, 通用方法(A):
- [0815] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, B29K(N(ε)) 十六烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素
- [0816] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:
- [0817] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB25], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。
- [0818] 实施例 89, 通用方法(A):
- [0819] A10C, A14E, B3C, desB27, B29K(N(ε)) 十六烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0820] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:
- [0821] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。
- [0822] 实施例 90, 通用方法(A):
- [0823] A10C, A14E, B3C, desB27, B29K(N(ε)) 十六烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素
- [0824] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:
- [0825] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。
- [0826] 实施例 91, 通用方法(A):
- [0827] A10C, A14E, B3C, desB27, B29K(N(ε)) 十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素
- [0828] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:
- [0829] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)。
- [0830] 实施例 92, 通用方法(A):
- [0831] A10C, A14E, B3C, desB27, B29K(N(ε)) 十八烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素
- [0832] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:
- [0833] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(17-羧基十七酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]-[CysA10,

GluA14, CysB3], des-ThrB27, ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0834] 实施例 93, 通用方法 (A) :

[0835] A10C, A14E, B3C, desB27, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素

[0836] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0837] N{ε-B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3], des-ThrB27, ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0838] 实施例 94, 通用方法 (A) :

[0839] A10C, A14E, B3C, desB27, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0840] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0841] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3], des-ThrB27, ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0842] 实施例 95, 通用方法 (A) :

[0843] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -2xgGlu), desB30 人胰岛素

[0844] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0845] N{ε-B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-[[4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基)- 丁酰基] 氨基] 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0846] 实施例 96, 通用方法 (A) :

[0847] A10C, A14E, B3C, B16E, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0848] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0849] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, GluB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0850] 实施例 97, 通用方法 (A) :

[0851] A10C, A14E, B4C, B16E, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素

[0852] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0853] N{ε-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基]-[CysA10, GluA14, CysB4, GluB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0854] 实施例 98, 通用方法 (A) :

[0855] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -2xgGlu), desB30 人胰岛素

[0856] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称 :

[0857] N{ε-B29}-[(4S)-4- 羧基 -4-[[4S)-4- 羧基 -4-(19- 羧基十九酰基氨基)- 丁酰基] 氨基] 丁酰基]-[CysA10, GluA14, CysB3, HisB16, HisB25], des-ThrB30- 胰岛素 (人)。

[0858] 实施例 99, 通用方法 (A) :

[0859] A10C, A14E, B4C, B16E, B25H, B29K(N(ε) 二十烷二酰 -2xgGlu), desB30 人胰岛素

[0860] IUPAC(OpenEye, IUPAC 类型) 名称:

[0861] N{ε-B29}-[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(19-羧基十九酰基氨基)-丁酰基]氨基]丁酰基]-[CysA10,GluA14,CysB4,GluB16,HisB25],des-ThrB30-胰岛素(人)。

[0862] 实施例 100,胰岛素受体结合:

[0863] 胰岛素受体结合试验(对溶解的胰岛素受体)

[0864] 用闪烁近似测定法(SPA)测定本发明的胰岛素衍生物对于人胰岛素受体的亲和力(根据 Glendorf 等.(2008), Biochemistry, 47, 4743-4751)。使用通过麦胚凝集素纯化从幼仓鼠肾(BHK)细胞(该细胞用包含人 IR-A 和 IR-B 插入物的 pZem 载体稳定转染)半纯化的溶解的人 IR(holoreceptor)在 Eppendorf epMotion 5075 机器人上在 96-孔板(聚苯乙烯 Optiplate-96, PerkinElmer)中进行竞争性结合实验。通过进行包含胰岛素衍生物的酵母上清液和人胰岛素标准品的稀释系列(8 次稀释,每份 5 倍,第一次稀释 43 倍)而开始测定。将由重悬在结合缓冲液中的 SPA 珠子(SPA PVT Antibody-Binding Beads, Anti-Mouse Reagent Cat. No. RPNQ0017, GE Healthcare),抗-IR 单克隆小鼠抗体(83-7),溶解的人 IR(hIR-A 或 hIR-B)和 [¹²⁵I]A14Tyr- 标记的胰岛素组成的试剂混合物加入适当样品的系列稀释物。 [¹²⁵I]A14Tyr- 标记的胰岛素的最终浓度为 7.5pM,缓冲液由 100mM HEPES(pH 7.8), 100mM NaCl, 10mM MgSO₄ 和 0.025% (V/V) Tween 20 组成。将板在室温轻轻振荡地孵育 24 小时, 2000rpm 离心 2 分钟, 3 分钟/孔在 TopCount NXT 中计数。根据四参数逻辑模型(Vølund, A., (1978), Biometrics, 34, 357-365.) 分析来自 SPA 的数据, 胰岛素衍生物的亲和力相对于人胰岛素的亲和力表示。

[0865] 也在测定缓冲液中 1.5% HAS 运行这种测定以模拟生理学条件。

[0866] 单克隆 mIR 抗体的制备

[0867] 通过单克隆技术生产特异性抗体(F12 或 83-7):通过皮下注射 50 μg FCA 中纯化的 mIR 并随后两次注射 20 μg FIA 中的 mIR 而免疫 RBF 小鼠。用 25 μg mIR 静脉内增强高应答的小鼠, 3 天后收获脾脏。用骨髓瘤 Fox 细胞系融合脾细胞(Köhler, G&Milstein C. (1976), European J. Immunology, 6:511-19; Taggart RT 等 (1983), Science 219: 1228-30)。在 mIR 特异性 ELISA 中筛选上清液的抗体产生。克隆阳性孔并在 Western 印迹中检测。

[0868] 胰岛素受体结合试验(对膜相关的胰岛素受体)

[0869] [¹²⁵I]-人胰岛素与膜相关的重组胰岛素受体同种型 A(hIR-A) 的结合

[0870] 膜相关的胰岛素受体的提取:从 10 层细胞工厂收获表达人胰岛素受体同种型 A 的 BHK 细胞(tk-ts13)并在 25ml 冰冷的缓冲液(25mM HEPES pH 7.4, 2.5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 250mg/l 杆菌肽, 0.1mM Pefablock(Roche))中匀浆。将匀浆物小心地铺在 41%蔗糖垫(sucrose cushions)上,在超速离心机的 Beckman SW28 转子中在 4°C 以 95,000x g 离心 75 分钟。从蔗糖垫的顶部收集质膜,用缓冲液 1:4 稀释,在 Beckman SW28 转子中以 40,000xg 离心 45 分钟。沉淀悬浮于缓冲液(25mM HEPES pH 7.4, 2.5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 250mg/l 杆菌肽, 0.1mM Pefablock)中,并储存在 -80°C。

[0871] 在 96 孔 OptiPlates(Perkin Elmer)中一式两份进行放射配体与膜相关的胰岛素受体的结合。膜蛋白与总体积 200ml 的测定缓冲液(50mMHEPES, 150mM NaCl, 5mM

MgSO₄, 0.01% Triton X-100, 0.1% HSA(无脂肪酸), Complete™无 EDTA 的蛋白酶抑制剂) 中 50pM [¹²⁵I-Tyr^{A14}]-人胰岛素, 浓度逐渐增加的人胰岛素或胰岛素衍生物(通常在 0.01-300nM 之间) 以及 1mg WGA- 包被的 PVT 微球 (GE Healthcare) 在 25℃ 孵育 150 分钟。通过在 2000RPM 将板离心 2 分钟而终止测定, 通过在延迟 60 分钟之后在 Packard TopCount NXT 中计数而定量结合的放射性。

[0872] 在 GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA) 中, 使用四参数 S 形回归拟合结合数据。结果表示为 % 的相对于人胰岛素的 IC₅₀。

[0873] 胰岛素受体亲和力:

[0874]

实施例 编号	相对的IR-A亲和力 SPA 测定 (@ 0% HSA) (%)	相对的IR-A亲和力 SPA 测定 (@ 1.5% HSA) (%)
1	3.38	0.39
2	0.64	0.23
10	1.90	0.15
3	1.13	0.01
11	0.44	0.06
12	3.68	0.39
13	5.14	0.52
14	1.90	0.25
4	2.79	0.18
9	3.98	0.89
15	2.57	0.04
16	0.60	0.03
17	0.17	0.01
18		0.27
19	29.29	0.48
5	2.54	0.08
20	1.00	0.06
21	1.05	0.06
7	0.50	0.05
8	0.40	0.03
22	0.42	0.01
23	2.18	
24	0.45	0.03
25	0.66	0.08

[0875] 本发明的胰岛素衍生物中额外的二硫桥连的影响是 - 令人惊讶的 - 仅仅较小的。脂肪酸侧链的影响产生最大的影响, 仅次于母体胰岛素中没有半胱氨酸突变的影响。这在下表中说明, 是一般发现。为了获得长期 且持效的体内特征, 本发明的脂肪酸衍生化的胰岛素的低胰岛素受体亲和力是期望的。

[0876]

实施例 编号	侧链	母体胰岛素突变(相对于HI)	相对的 IR-A 亲和力 SPA 测定 (@ 0% HSA) (%)	相对的 IR-A 亲和力 SPA 测定 (@ 1.5% HSA)
		desB30	100.0	
		A14E, B25H, desB30	25.0	
		A10C, B4C, desB30	162.4	
		A10C, B3C, desB30	51.3	
		A10C, B2C, desB30	164.9	
		A10C, B1C, desB30	56.9	
		A10C, A14E, B4C, B25H,	37.8	
		A10C, A14E, B3C, B25H,	11.4	
		A10C, A14E, B2C, B25H,	37.1	
		A10C, A14E, B1C, B25H,	13.2	
	C18-gGlu-	desB30	10.4	0.70
	C18-gGlu-	A14E, B25H, desB30	2.3	0.11
1	C18-gGlu-	A10C, A14E, B4C, B25H,	3.4	0.39
10	C18-gGlu-	A10C, A14E, B3C, B25H,	1.9	0.15
15	C18-gGlu-	A10C, A14E, B2C, B25H,	2.6	0.04
16	C18-gGlu-	A10C, A14E, B1C, B25H,	0.6	0.03

[0877] 实施方案 101, 本发明的胰岛素衍生物的疏水性:

[0878] 通过在等强度条件下运行的反相 HPLC 研究胰岛素衍生物的疏水性。在相同条件下比较所述胰岛素衍生物与人胰岛素 (本文中称为 HI) 或具有已知亲水性的另一种衍生物的洗脱时间。如 $k'_{rel_{衍生物}} = ((t_{衍生物} - t_0) / (t_{参照} - t_0)) * k'_{rel_{参照}}$ 计算疏水性 k'_{rel} 。使用 HI 作为参照: $k'_{rel_{参照}} = k'_{rel_{HI}} = 1$ 。通过注射 $5 \mu l$ $0.1 mM$ $NaNO_3$ 测定 HPLC 系统的空白时间 (void time) t_0 。运行条件:

[0879] 柱: Lichrosorb RP-C18, $5 \mu m$, $4 \times 250 mm$

[0880] 缓冲液 A: $0.1 M$ 磷酸钠 pH 7.3, 10 体积% CH_3CN

[0881] 缓冲液 B: 50 体积% CH_3CN

[0882] 注射体积: $5 \mu l$

[0883] 运行时间: 最多 60 分钟。

[0884] 运行起始梯度后, 选择运行衍生物和参照 (例如 HI) 的等强度水平, 在以上方程中在等强度条件下所述衍生物和参照物的洗脱时间来计算 $k'_{rel_{衍生物}}$ 。

[0885] 实施例 102: 采用十二指肠腔酶使胰岛素衍生物降解:

[0886] 采用来自 SPD 大鼠的十二指肠腔酶 (通过过滤十二指肠腔内容物制备) 使胰岛素

衍生物降解。

[0887] 该测定由机器人在 96 孔板 (2ml) 中进行, 其中 16 孔用于胰岛素衍生物和标准品。37℃ 下在 100mM Hepes, pH = 7.4 中胰岛素衍生物 ~ 15 μ M 与十二指肠酶孵育, 在 1, 15, 30, 60, 120 和 240min 后取样并通过加入 TFA 使反应淬灭。通过 RP-HPLC 确定各时间点的完整胰岛素衍生物。通过数据的指数拟合确定降解半衰期并归一到在各试验中参照胰岛素, A14E, B25H, desB30 人胰岛素或人胰岛素的确定的半衰期。为了降解而加入的酶的量使得参照胰岛素的降解半衰期为 60min 至 180min。按照胰岛素衍生物在大鼠十二指肠中的降解半衰期除以相同试验中参照胰岛素的降解半衰期给出结果 (相对的降解速率)。

[0888]

实施例编号	十二指肠降解
	相对于 A14E, B25H, desB30 人胰岛素的稳定性
1	1.9
2	3.2
10	2.1

[0889]

实施例编号	十二指肠降解 相对于A14E, B25H, desB30 人胰岛素的稳定性
3	1.2
11	2.3
12	13.4
13	0.9
14	3.6
4	1.5
9	3.1
15	4.3
16	1.5
17	1.4
18	0.4
19	0.1
5	2.9
6	
20	
21	
7	1.7
8	0.6
22	2.8
23	1.2
24	
25	6.1

[0890] 实施例 103, 大鼠药代动力学, 静脉大鼠 PK :

[0891] 以各种剂量将胰岛素衍生物静脉内 (i. v.) 给药于麻醉的大鼠并在给药后以 4 小时或更长的特定间隔使用免疫测定或质谱测定所用化合物的血浆浓度。随后用 WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA) 计算药代动力学参数。

[0892] 使用称重为约 200 克的未禁食雄性 Wistar 大鼠 (Taconic)。

[0893] 测量体重并随后用 Hypnorm/ 多美康 (Dormicum) (每种化合物分别在无菌水中以 1 : 1 稀释, 然后混合; 在实验的当日新鲜制备) 麻醉大鼠。使用 2ml/kg Hypnorm/Doricum

混合物 sc 开始麻醉,然后以 30min 间隔给予两次 1ml/kg sc 维持剂量以及以 45min 间隔给予两次 1ml/kg sc 维持剂量。如果需要,为了保持大鼠始终轻度麻醉,提供 1-2ml/kg sc 的进一步剂量。在大鼠容纳室进行称重和初始麻醉以避免将动物从一个房间移到另一房间使它们紧张。

[0894] PK 特征如图 1 中所示。

[0895] 实施例 104,狗药代动力学,静脉狗 PK :

[0896] 雄性小猎犬(约 12kg)接受单一静脉内剂量的胰岛素类似物(2nmol/kg)。在给药后 -0.17,0,0.083,0.25,0.5,0.75,1,1.25,1.5,2,2.5,3,3.5,4,5,8,10,12,16,24,32,48,72,96,120,144 和 168 小时的时间点采集血液并收获血浆。通过夹心免疫测定法或 LCMS 分析血浆样品。使用 WinNonlin Professional 5.2(Pharsight Inc.,Mountain View,CA,USA)通过非房室药代动力学分析来分析血浆浓度-时间曲线。

[0897] 实施例 105,大鼠药代动力学,肠内注射后的大鼠 PK :

[0898] 将胰岛素衍生物肠内(到空肠)给药于麻醉的大鼠。给药后以 4 小时或更长的特定间隔测定所用化合物的血浆浓度及血糖变化。随后用 WinNonLin Professional (Pharsight Inc.,Mountain View,CA,USA) 计算药代动力学参数。

[0899] 使用 Hypnorm-Dormicum s.c.(0.079mg/ml 枸橼酸芬太尼,2.5mg/ml 氟阿尼酮,和 1.25mg/ml 咪达唑仑)将雄性 Sprague-Dawley 大鼠(Taconic)(称重 250-350g,禁食~18h)麻醉,2ml/kg 作为初次剂量(测试物质给药前 -60min 的时间点),20min 之后给予 1ml/kg,随后每 40min 给予 1ml/kg。

[0900] 根据下列组成(以重量%)配制在肠内注射模型中待测试的胰岛素:

[0901]

45%丙二醇	(Merck)
33% Capmul MCM C10	(Abitec)
11% 泊洛沙姆 407	(BASF)
11% 超聚乙二醇 3350	(Fluka)。

[0902] 从 Capmul MCM C10,泊洛沙姆 407 和 PEG 3350 均等地减去但不从 丙二醇减去加入的胰岛素的量,以保持丙二醇的量独立于药物负载,恒定为 45%。

[0903] 将麻醉的大鼠置于稳定在 37℃恒温垫上。用胰岛素制剂或载体充满安装 1ml 注射器的 20cm 聚乙烯导管。在腹壁进行一个 4-5cm 中线切口。通过穿过肠壁将导管从盲肠轻轻插入空肠中间~50cm 处。如果存在肠内内容物,将施用部位移动 ±10cm。将导管尖头置于肠段的腔内约 2cm 处并不在不使用结扎的情况下将其固定。将肠小心地再次放入腹腔内并在各层中用自动夹封闭腹壁和皮肤。在时间 0 时,通过导管将 0.4ml/kg 测试化合物或媒介给药于大鼠。

[0904] 为了确定全血血糖浓度,通过将尾尖的毛细血管进行穿刺,将血液样品收集在肝素化的 10 μl 毛细管中。在 500 μl 分析缓冲液中稀释之后,通过葡萄糖氧化酶方法,采用 Biosen 自动分析仪(EKF Diagnostic GmbH,Germany)测定血糖浓度。对于每种化合物,得到平均血糖浓度进程(平均值 ±SEM)。

[0905] 收集样品以确定血浆胰岛素浓度。将 100 μl 血液样品吸入包含 EDTA 的冷管内。

将样品保持在冰上直到离心 (7000rpm, 4℃, 5min), 将血浆移液到 Micronic 管中并在 20℃ 冷冻直到分析。在认为对个别衍生物合适或有效的免疫测定中测定胰岛素衍生物的血浆浓度。

[0906] 在 $t = -10$ (仅对血糖), $t = -1$ (临给药前) 和给药后以 4 小时或更长的特定间隔收集血液样品。

[0907] 实施例 106, 相对于人胰岛素的本发明的酰化的胰岛素衍生物的效力, 静脉内稳态夹钳。

[0908] 将称重为 238-383g 的 Sprague Dawley 雄性大鼠在实验的当天用于夹钳实验。在可控的环境条件下, 使大鼠自由接触饲料, 并且禁食过夜 (从 3pm), 之后进行夹钳实验。

[0909] 实验方案:

[0910] 在进行外科手术之前, 使大鼠在动物装置中适应至少 1 周。在夹钳实验之前约 1 周, 在氟烷麻醉下, 将 Tygon 导管插入到颈静脉 (用于输注) 和颈动脉 (用于采血) 中, 并且在颈部背后外置并固定。外科手术后将 Streptocilin vet. (Boehringer Ingelheim; 0.15ml/大鼠, i.m.) 给予大鼠, 在恢复期间将大鼠置于动物护理单元 (25℃) 中。为了获得镇痛, 在麻醉期间施用 Anorphan (0.06mg/大鼠, s.c.), 从麻醉中完全恢复 (2-3 小时) 之后, 施用 Rimadyl (1.5mg/kg, s.c.), 再次每日施用一次, 持续 2 天。

[0911] 在实验当天的 7am, 将禁食过夜 (从前一天的 3pm 开始) 的大鼠称重, 并与取样注射器和输注系统 (Harvard 22Basic 泵, Harvard, 和 Perfectum Hypodermic 玻璃注射器, Aldrich) 连接, 然后放入独立的夹钳笼中, 其中使它们休息约 45min, 而后开始实验。在整个实验期间, 大鼠能够自由地在其常见的寝具上移动, 并且可以自由地接触饮用水。30min 基本时间 (在此期间, 以 10min 间隔测量血浆葡萄糖水平) 之后, 将待测的胰岛素衍生物和人胰岛素 (每只大鼠一个剂量水平, 每剂量水平 $n = 6-7$) 以恒速输注 (i.v.) 300min。为了达到血浆的快速稳态水平, 任选地施用待测胰岛素衍生物的初次大剂量输注。基于从 i.v. 大剂量药代动力学所获得的清除数据, 药代动力学领域的技术人员可以计算初次大剂量输注的剂量。为了保持血糖正常 (euglycemia), 以 10min 间隔全程测量血浆葡萄糖水平, 并且相应地调节 20% 葡萄糖水溶液的输注。合并来自每只大鼠的重悬的红细胞样品, 并且通过颈动脉导管返还约 1/2ml 体积。

[0912] 在每个实验的当天, 在夹钳实验之前和结束时, 获取待测试的各胰岛素衍生物溶液和人胰岛素溶液的样品, 并通过 HPLC 确认肽的浓度。在该研究之前的相应时间点和结束时, 测量大鼠胰岛素和 C-肽以及待测试的胰岛素衍生物和人胰岛素的血浆浓度。在实验结束时, 使用过度剂量的戊巴比妥将大鼠处死。

[0913] 实施例 107, 相对于对照胰岛素衍生物的本发明的酰化的胰岛素衍生物的效力, 皮下施用于大鼠

[0914] 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 ($n = 6$ /组) 接受单一皮下剂量的媒介或胰岛素类似物 (对于具有中间作用持续时间或长期作用持续时间的类似物分别为 50 或 200nmol/动物)。对于具有中间作用持续时间或长期作用持续时间的类似物分别在给药后 0, 1, 2, 4, 8, 24 和 48 或 0, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 小时的时间点采集 (舌下) 血液并收获血浆。测定血浆的葡萄糖。将葡萄糖降低作用计算为作为时间的函数的 $-\Delta$ 血糖的曲线下的面积并与对照胰岛素衍生物比较。

[0915] 实施例 108 熔解温度测定

[0916] 差示扫描量热法 (DSC)。

[0917] 使用 VP-DSC 差示扫描微量热仪 (MicroCal, LLC, Northampton, MA) 进行数据收集。在参照室中以 1°C /min 的扫描速率从 15°C 至 120°C 和 0.21MPa 的超压用 2mM 磷酸盐缓冲液进行所有的蛋白扫描 (~200mM 胰岛素衍生物)。在临使用前,将所有样品和参照脱气。在浓度归一化之前,从每次样品扫描中减去缓冲液 - 缓冲液参照。

[0918] DSC 结果如图 3 和 4 中所示。

[0919] 实施例 109 原纤化趋势的测定

[0920] 硫磺素 T (ThT) 原纤化测定的通用方法：

[0921] 原理

[0922] 肽的低物理稳定性可以导致淀粉样原纤维的形成,这被观察为样品中非常有序的、线状大分子结构,最终导致凝胶的形成。这在传统上通过目视检查样品而测定。然而,这种测定是非常主观的,取决于观察者。因此,小分子指示探针的应用要优选得多。硫磺素 T (ThT) 是这种探针,当结合原纤维时具有独特的荧光信号 (Naiki 等 . Anal. Biochem. 177, 244-249, 1989 ; Le-Vine, Methods Enzymol. 309, 274-284, 1999)。原纤维形成的时程可以通过以下列表示的 S 形曲线来描述 (Nielsen 等 . Biochemistry 40, 6036-6046, 2001)：

[0923]
$$F = f_i + m_f t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}}$$
 方程 (1)

[0924] 在这里, F 是在时间 t 的 ThT 荧光。常数 t_0 是达到最大荧光的 50% 所需要的时间。描述原纤维形成的两个重要参数是通过 $t_0 - 2\tau$ 计算的滞后时间 (lag-time) 和表观速率常数 $k_{app} = 1/\tau$ 。

[0925] 提示肽的部分折叠中间体的形成是原纤化的一般开始机制。那些中间体中的一些成核 (nucleate) 而形成模板,在该模板上进一步的中间体可以装配,原纤化进行。滞后时间对应间隔,在该间隔中,建立核的临界量 (critical mass),表观速率常数是原纤维本身形成的速率。

[0926] 样品制备

[0927] 每次测定之前新鲜制备样品。每种衍生物溶解在 7mM 磷酸钠, pH = 7.4 中。将硫磺素 T 加入来自水中的储存溶液的样品中至 1 μ M 的终浓度。将 200 μ l 样品等份置于 96 孔微量滴定板 (Packard OptiplatTM-96, 白色聚苯乙烯) 中。通常将每份样品的 4 份重复 (对应于一个测试条件) 置于一列孔中。用 Scotch Pad (Qiagen) 密封该板。

[0928] 孵育和荧光测定

[0929] 在 Fluoroskan Ascent FL 或 Varioskan 荧光板检测仪 (thermo Labsystems) 中进行在给定温度的孵育,振荡和 ThT 荧光发射的测定。将温度调节至 37°C。在所有提出的数据中,将轨道振荡调整至 960rpm,幅度为 1mm。使用通过 444nm 过滤器的激发和通过 485nm 过滤器的发射测定进行荧光测定。

[0930] 通过在测定温度将板孵育 10 分钟而开始每次运行。每 20 分钟测定板,通常持续 45 小时。每次测定之间,如上所述振荡并加热该板。

[0931] 数据处理

[0932] 以 Microsoft Excel 格式保存测定数据点用于进一步处理,使用 GraphPad Prism 进行曲线绘制及拟合。在原纤维不存在的情况下来自 ThT 的背景发射是可以忽略的。数据点典型地是四份样品的平均值。只有在相同的实验(即在相同的板上的样品)中获得的数据表示在相同的图中,确保一次测定中个别样品之间的原纤化的相对亮度,而不是不同的测定之间的比较。

[0933] 可以将数据组拟合至方程(1)。然而,因为在测定时间期间通常没有获得完整的 S 形曲线,将原纤化的程度表示为在各个时间点计算为四份样品的平均值并以标准偏差显示的 ThT 荧光。

[0934]

	0 h	2 h	20 h	45 h
人胰岛素	28±1	1567±46	1780±40	1732±48
A10C, A14E, B4C, B25H, B29K(N ^ε -十八烷二酰 -gGlu- OEG-OEG), desB30 人胰岛素 (实施例1)	33±1	24±1	24±1	24±2
A10C, A14E, B3C, B25H, B29K(N ^ε -十八烷二酰 -gGlu), desB30 人胰岛素 (实施例2)	36±1	29±0	28±0	31±0

[0935]

实施例 编号	ThT 0h	ThT 2h	ThT 20h	ThT 45h
1	33.3 ± 1.4	23.6 ± 1.1	23.8 ± 0.7	23.5 ± 1.6
2	35.8 ± 0.7	28.7 ± 0.4	28.4 ± 0.2	31.3 ± 0.2
3	34.4 ± 0.9	24.3 ± 0.8	23 ± 1.3	21.9 ± 0.8
11	23.2±0.7	14.3±0.6	14.2±1.9	14.5±2
12	28.4±0.1	20.1±1.5	19.8±3.5	19.9±3.8
13	55.9±1.2	31±0.1	29.9±0.5	28.1±0.6
14	22.2±0.5	15.5±0.3	16.2±0.2	16.6±0.2
4	31±0.5	24.9±0.3	25.9±0.3	24.9±0.1
9	25.8±0.9	17.1±0.2	17±0.3	16.8±0.3
15	27.7±0.3	20.7±0.3	20±0.5	19.3±0.4
16	25±0.4	17.2±0.4	18.2±0.3	18.6±0.3
17	27.5 ± 0.6	17.7 ± 0.7	17.5 ± 1.3	16.9 ± 1.3
18	63.7±0.8	38.6±3	34.7±5.4	31.9±5.3
19	63.3±1.8	41.5±1.4	35.9±1.9	30.7±1.8
5	27.5±0.3	16.3±0.9	14.8±2.4	14.3±2.7
21	25.9 ± 0.1	14.7 ± 0.4	16.1 ± 0.7	15.8 ± 0.7

[0936] 显而易见的是,在 ThT 测定中测试原纤化倾向的本发明的胰岛素都没有显示作为时间的函数的增加的荧光(的不存在)所见的任何原纤化的迹象。这是非常不寻常的,这低估了本发明的类似物的实用性。

[0937] 实施例 110,大鼠脂肪细胞中的脂肪生成

[0938] 作为本发明的胰岛素体外效力的量度,可以使用脂肪生成。

[0939] 从附睾的脂肪垫(epididymale fat pads)分离原代大鼠脂肪细胞,在包含,例如,1%无脂肪 HAS 以及或标准品(人胰岛素,HI)或本发明的胰岛素的缓冲液中与 3H-葡萄糖孵育。以剂量依赖的方式将标记的葡萄糖转化为可提取的脂质,产生全剂量响应曲线。结果表示为本发明的胰岛素与标准品(HI)相比的具有 95%置信区间的相对效力(%)。

[0940] 本发明的胰岛素的脂肪生成数据:

[0941]

实施例编号	在0.1% HAS存在的情况下脂肪生成， 与人胰岛素相比的相对效力 (%)
1 没有二硫键 (现有技术)	0.31
18	3.24
19	1.69
1	0.45
2	0.24
3	0.04
11	0.08
12	0.40
13	0.57
14	0.19
4	0.14
9	0.98
15	0.13
16	0.08
5	0.24
17	0.02
7	0.04
8	0.05
24	0.03
25	0.04

[0942] 对于大多数本发明的类似物，在获得的脂肪生成数据（在 0.1% HSA 存在的情况下）和在 1.5% HSA 存在的情况下获得的胰岛素受体数据之间有非常好的一致性，因此验证了受体结合被翻译为受体激活。

[0943] 实施方案 111，本发明的胰岛素类似物的化学稳定性：

[0944] 在 2mM 磷酸盐，pH = 7.5 中在 37°C 孵育胰岛素类似物最长达 8 周之后评价胰岛素类似物的化学稳定性。在 0, 2, 4 和任选的 8 周后通过 SEC-HPLC 分析测定高分子量产物 (HMWP) 的形成。SEC 方法的结果表示为在 37°C 和 5°C 时 HMWP 形成之间的差异，开始样品作为在 215nm 处的总吸光度的百分比。在 0, 2, 4 和任选的 8 周后通过 RP-HPLC 分析测定化学降解产物。RP 方法的结果表示为在 37°C 和 5°C 时观察到的化学降解之间的差异，开始样品作为在 215nm 处的总吸光度的百分比。

[0945] SEC-HPLC 方法：

[0946] 溶剂：500mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 5mM H₃PO₄, 50% (v/v) 2- 异丙醇

[0947] 流速：0.5ml/min

[0948] 运行时间：30min

[0949] UV 检测：215nm

[0950] 柱：来自 Waters 的胰岛素 HMWP 柱 7.8x300mm

[0951] 温度：50℃

[0952] RP-HPLC 方法：

[0953] 溶剂 A：0.09M 磷酸盐缓冲液 pH 3.6 (磷酸氢二铵)，10% MeCN(v/v)

[0954] 溶剂 B：80% MeCN(v/v%)

[0955] 流速：0.3ml/min

[0956] 运行时间：33min

[0957] UV 检测：215nm

[0958] 柱：Waters Acquity BEH130C18 柱 1.7 μm, 150x2.1mm

[0959] 温度：50℃

[0960] 梯度：

[0961]

时间, min	流速, ml/min	% A	% B
0	0.3	95	5
2	0.3	95	5
25	0.3	45	55
27	0.3	20	80
28	0.3	20	80
29	0.3	95	5
33	0.3	95	5

实施例编号	化学降解 (%) (4周 37℃ ~ 0周 5℃)	HMWP形成 (%) (4周 37℃ ~ 0周 5℃)
1 没有 A10-B4 二硫键 (现有技术)	11.7	1.0
18	4.2	5.1
19	11.7	34.6
1	6.8	0.9
2	2.5	0.0
3	3.4	0.7
11	3.2	-0.2
12	7.3	-0.1
13	9.8	0.5
14	9.7	0.0
4	8.7	-0.4
9	5.7	0.7
15	10.4	1.2
16	58.0	42.7
5	12.5	0.4
17	13.3	0.2
7	0.6	0.4
8	66.4	54.5
24	2.0	0.4
25	1.9	0.8

[0963] 可以得出结论,具有至 B3 的二硫键的类似物通常比具有至 B4 的二硫键的类似物更稳定,具有至 B2 或 B1 的二硫键的类似物稳定性更差。

[0964] 实施例 112, X- 射线结构测定:

[0965] 下面给出了结晶条件的例子,然而,对于不同类似物的确切条件是不同的,可以通过筛选不同的条件发现最佳条件。通过坐滴气相扩散法 (the sitting drop vapor diffusion method) 从,例如,包含 0.8M K/Na 酒石酸盐,0.1M Tris pH 8.5,0.5% PEG MME 5000 的储存溶液获得晶体。使用配备 MarCCD 检测器的旋转阳极 (Rigaku, MicroMax-007HF) 收集数据并通过 XDS (J Appl Crystallogr 26 :795-800) 处理。使用具有作为搜索模型的内部结构 (in house structure) 的 Molrep (J Appl Crystallogr 30 :1022-1025.) 解析结构。使用程序 Refmac (Acta Crystallogr D 53 :240-255.) 和 Coot (Acta Crystallogr D 60 :2126-2132.) 进行数据精炼和模型建立。

[0966] 实施例 113, 盐酸胍变性

[0967] 为了测定解折叠的自由能, 可以根据圆二色性 (CD) 色谱法进行选择的包含二硫键的胰岛素衍生物的盐酸胍变性。蛋白变性后, 远 UV 范围 (240–218-nm) 内的负 CD 逐渐减小, 与伴随蛋白解折叠的有序的二级结构的损失一致。人胰岛素的远 UV CD 谱对蛋白解折叠和自结合 (self-association) 都敏感 (Holladay 等, 1977 Biochim. Biophys. Acta 494, 245–254.; Melberg & Johnson, 1990, Biochim. Biophys. Acta 494, 245–254.)。为了在 pH 8 分开这些现象, 在不同的蛋白浓度, 例如, 3、37 和 250 μ M 进行 GuHCl 滴定。在这些浓度, 胰岛素类似物主要作为单体, 二聚体以及二聚体和更高的聚集体的混合物存在。在近 UV 范围 (330–250-nm) 内的胰岛素 CD 谱反映了具有来自二硫键的贡献的酪氨酸发色团的环境 (Morris 等, 1968, Biochim. Biophys. Acta., 160, 145–155; Wood 等, 1975, Biochim. Biophys. Acta, 160, 145–155; Strickland & Mercola, 1976, Biochemistry, 15, 3875–3884)。产生作为变性剂浓度的函数在近 UV 和远 UV 区的摩尔椭圆率 (molar ellipticity) 的变化图。以前从用两种状态模型拟合的这种胰岛素变性曲线计算了解折叠的自由能 (Kaarsholm, N. C., 等 1993 Biochemistry, 32, 10773–8)。

[0968] 通过 UV 吸收和 / 或 RP-HPLC 和 / 或 SEC-HPLC 测定蛋白浓度。通过用 10mM Tris/C104- 缓冲液, pH8.0 组合不同比例的蛋白和 GuHCl 储存溶液而制备变性样品。蛋白储存溶液通常为 10mM Tris/C104-, pH 8.0 中的 1.5mM。GuHCl 储存溶液为 10mM Tris/C104-, pH 8.0 中的 8.25M (通过折光率确定)。在 25°C 记录所有的 CD 谱。从 250 至 218nm 扫描远 UV CD 变性样品。典型的室通路长度和蛋白浓度分别为 0.2cm 和 37 μ M。使用 1-cm 通路长度和典型地 75 μ M 蛋白从 330 至 250nm 扫描近 UV CD 变性样品。在减去适当的溶剂空白之前通过傅立叶变换算法平滑处理所有的谱。在远 UV 范围内, A_e 基于肽键的摩尔浓度, 而在近 UV 内, 将 $\Delta \epsilon$ 归一化至胰岛素单体的摩尔浓度。

[0969] 通过假定折叠 / 解折叠转换是两种状态的而分析 GuHCl 变性曲线, 在这种情况下, 可以使用 $K = (\Delta \epsilon_N - \Delta \epsilon) / (\Delta \epsilon - \Delta \epsilon_U)$ 在每个变性剂浓度获得平衡常数, 其中 $\Delta \epsilon$ 是 CD 的观察值, $\Delta \epsilon_N$ 和 $\Delta \epsilon_U$ 分别代表在给定的 GuHCl 浓度对于天然的和解折叠形式的 CD 值 (Pace, C. N. (1975) CRC Crit. Rev. Biochem. 3, 1–43.)。通过将转换之前和之后的基线线性外推至转换区域而获得转换区域中在 GuHCl 浓度的 $\Delta \epsilon_N$ 和 $\Delta \epsilon_U$ 值, 即, $\Delta \epsilon_N = \Delta \epsilon_N^\circ + m_N [\text{GuHCl}]$ 以及 $\Delta \epsilon_U = \Delta \epsilon_U^\circ + m_U [\text{GuHCl}]$, 其中 $\Delta \epsilon_N^\circ$ 和 $\Delta \epsilon_U^\circ$ 分别是截距, m_N 和 m_U 分别是转换之前和之后的基线的斜率。通过 $\Delta G = -RT \ln K$ 给出转换区中在给定的变性剂浓度的解折叠的自由能。我们假设 ΔG 对变性剂浓度的线性依赖: $\Delta G = \Delta G_{H_2O} - m [\text{GuHCl}]$, 其中 ΔG_{H_2O} 是在变性剂不存在的情况下 ΔG 的值, m 是 ΔG 对变性剂浓度的依赖的量度。因此, 可以将转换区中从 K 衍生的 ΔG 值回推至 0M 变性剂以得到 ΔG_{H_2O} 。对于完全的解折叠曲线的 $\Delta \epsilon$ 和 $[\text{GuHCl}]$ 之间的关系如方程 1 中所示 (Santoro, M. M., & Bolen, D. W. (1988) Biochemistry 27, 8063–8068.):

$$[\text{0970}] \quad \Delta \epsilon = \{(\Delta \epsilon_N^\circ + m_N [\text{GuHCl}]) + (\Delta \epsilon_U^\circ + m_U [\text{GuHCl}]) \exp[-(\Delta G_{H_2O} - m [\text{GuHCl}]) / (RT)]\} / \{1 + \exp[-(\Delta G_{H_2O} - m [\text{GuHCl}]) / (RT)]\}$$

[0971] 以 $\Delta \epsilon$ 作为响应, $[\text{GuHCl}]$ 作为独立变量, 使用, 例如, PC SAS (SAS Inc., Cary, NC) 的 NLIN 程序将这个方程进行非线性最小二乘方分析 (nonlinear least-squares analysis)。然后六参数描述了变性曲线: $\Delta \epsilon_N^\circ$, $\Delta \epsilon_U^\circ$, m_N , m_U , m 和 ΔG_{H_2O} 。此外,

通过 $\Delta G_{H2O}/m$ 给出变性曲线中点的 GuHCl 浓度 C_{mid} 。然后从 $\Delta \Delta G_{H2O} = \Delta G_{H2O}(\text{突变型}) - \Delta G_{H2O}(\text{野生型})$ 计算人胰岛素和突变型胰岛素之间解折叠的自由能的差异。

[0972] 实施例 114, 精确的完整质量测定:

[0973] LC-MS 仪器由 Acquity UPLC 系统 (Waters, Milford, MA) 和 Synapt G2 质谱仪 (Waters, Milford, MA) 组成。将胰岛素类似物应用到 C18 反相 HPLC 柱, 并使用 0.05% 三氟乙酸中乙腈的线性梯度进行分析。将来自 HPLC 的流直接应用于以正 MS 的唯一模式 (in the positive MS only mode) 操作的 Synapt G2 的电喷雾界面, 毛细管电位为 2500V, 源温度为 110°C, 去溶剂化温度为 250°C, 圆锥气流速 (N_2) 为 50L/h。每秒两次获得 $m/z = 100$ 至 $m/z = 3000$ 的 MS 谱。分析之前通过 NaI 的标准混合物校准仪器, 在 LC-MS 分析期间应用亮氨酸脑啡肽的锁喷雾 (lock spray)。使用 MaxEnt3 算法通过 BioPharmaLynx 1.2 (Waters, Milford, MA) 重构完整的胰岛素质量。可以使用 Orbitrap XL 质谱仪 (Thermo Fisher) 代替 Synapt G2。以正 MS 模式操作 Orbitrap 仪器, 源电压为 4kV, 源电流为 100 μ A, 鞘气流为 40, 辅助气流为 10, 扫除气流为 5, 毛细管电压为 20V。在调整仪器的最佳性能期间调整所有 MS 参数, 这些参数可能与上面给出的那些有轻微偏离。通过这种方法获得的质量准确度优于 10ppm。

[0974] 柱: Acquity BEH C18 1x150mm, 1.7 μ m (Waters)

[0975] 流速: 0.1ml/min

[0976] 缓冲液 A: 0.02% (v/v) 或 0.05% (v/v) TFA

[0977] 缓冲液 B: 乙腈中 0.02% (v/v) 或 0.04% (v/v) TFA

[0978] 梯度: 5% B 持续 2min; 在 12min 内 5% B 至 50% B, 在 1min 内 50% B 至 90% B

[0979] UV 检测: 215nm。

[0001]

序列表

<110> NOVO NORDISK A/S
<120> 包含额外的二硫键的胰岛素衍生物
<130> 8198.504-W0
<150> EP 10167046.1
<151> 2010-06-23
<150> EP 10167033.9
<151> 2010-06-23
<150> US 61/359,150
<151> 2010-06-28
<160> 2
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 修饰的胰岛素A链

<220>
<221> 二硫键
<222> (6)..(6)

<220>
<221> 二硫键
<222> (7)..(7)

<220>
<221> 二硫键
<222> (10)..(10)

<220>
<221> 二硫键
<222> (11)..(11)

<220>
<221> 二硫键
<222> (20)..(20)
<400> 1
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Cys Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 修饰的胰岛素B链

<220>
<221> 二硫键
<222> (4)..(4)

<220>
<221> 二硫键

[0002]

<222> (7)..(7)

<220>

<221> 二硫键

<222> (19)..(19)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Xaa是Lys-(N(ε)-十八烷二酰-gGlu-OEG-OEG)

<400> 2

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

Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	His	Tyr	Thr	Pro	Xaa
			20					25				

静脉内给药于大鼠的2nmol/kg胰岛素类似物

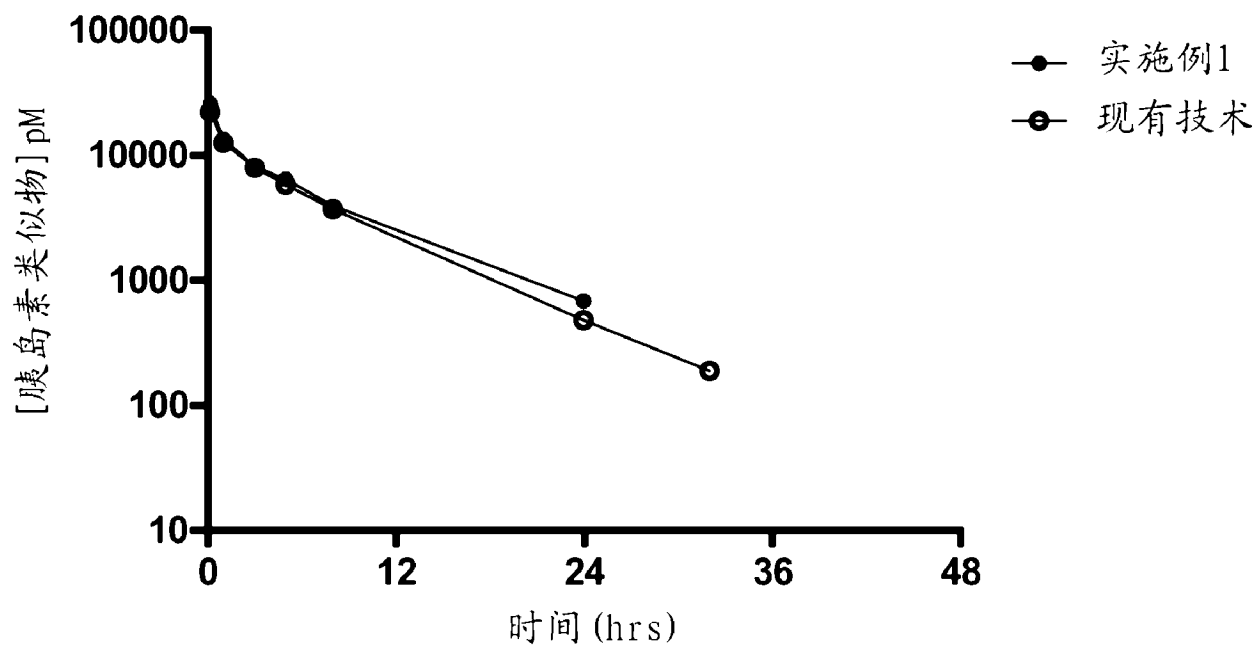


图 1

静脉内给药于狗的2nmol/kg胰岛素类似物

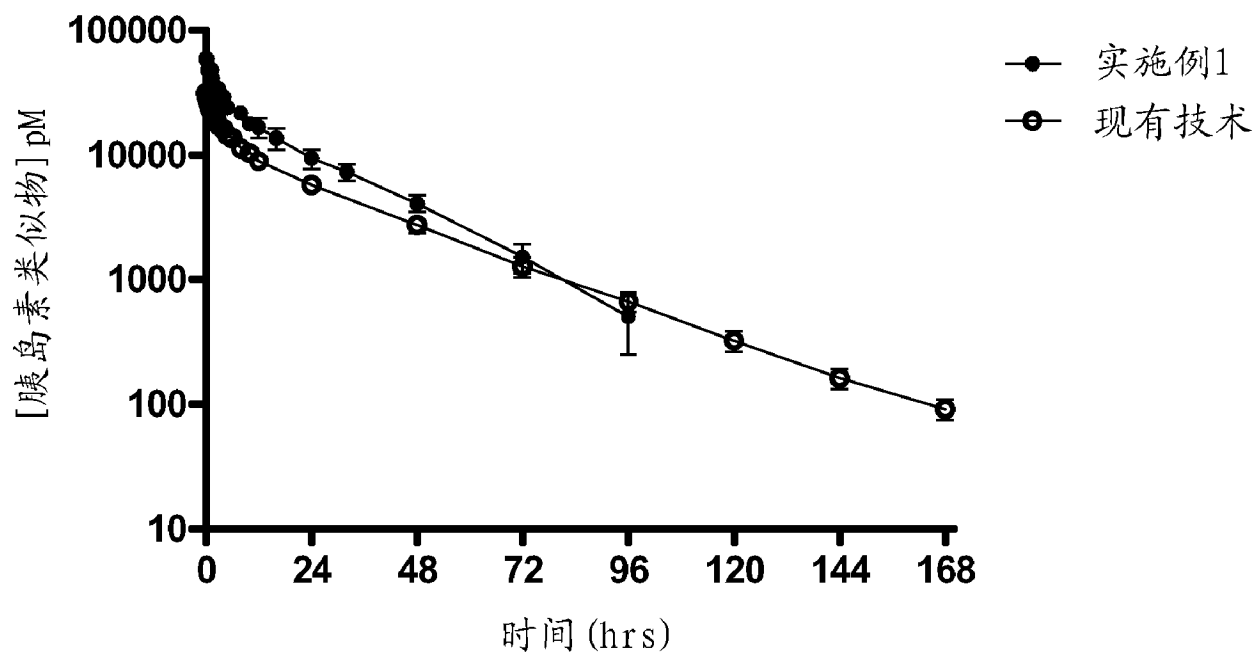


图 2

本发明的胰岛素衍生物相比于没有额外的二硫键的现有技术的衍生物的DSC扫描

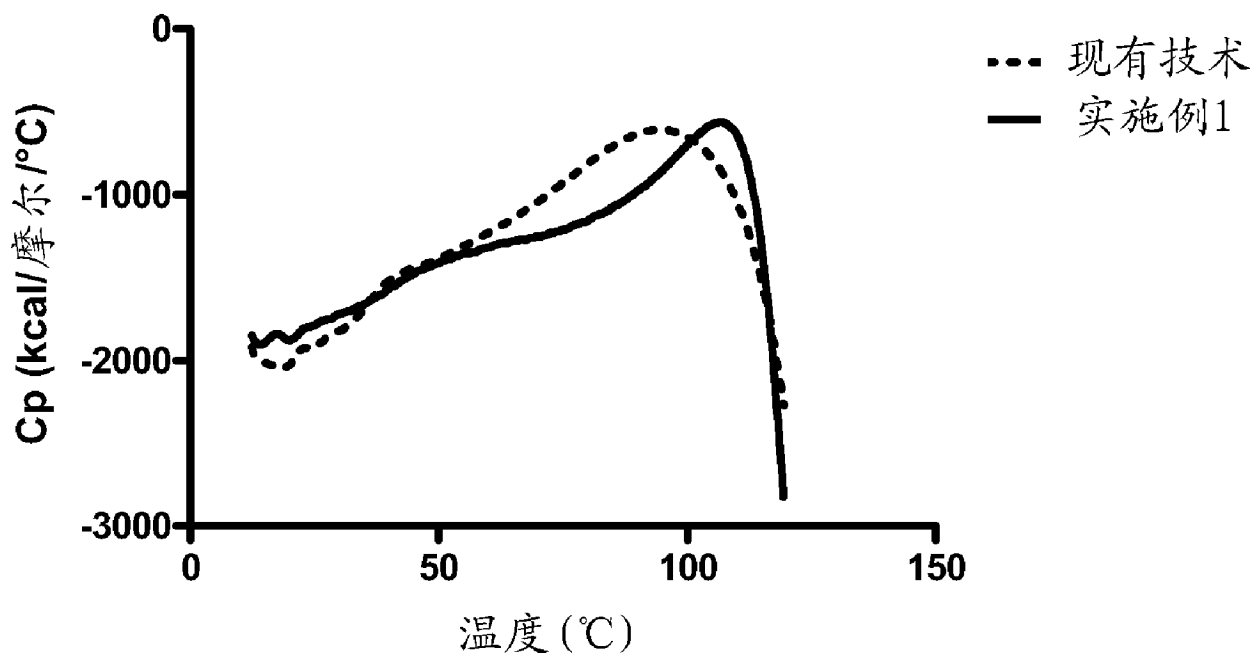


图 3

本发明的母体胰岛素类似物和人胰岛素的DSC扫描 (0.2mM, 无锌)

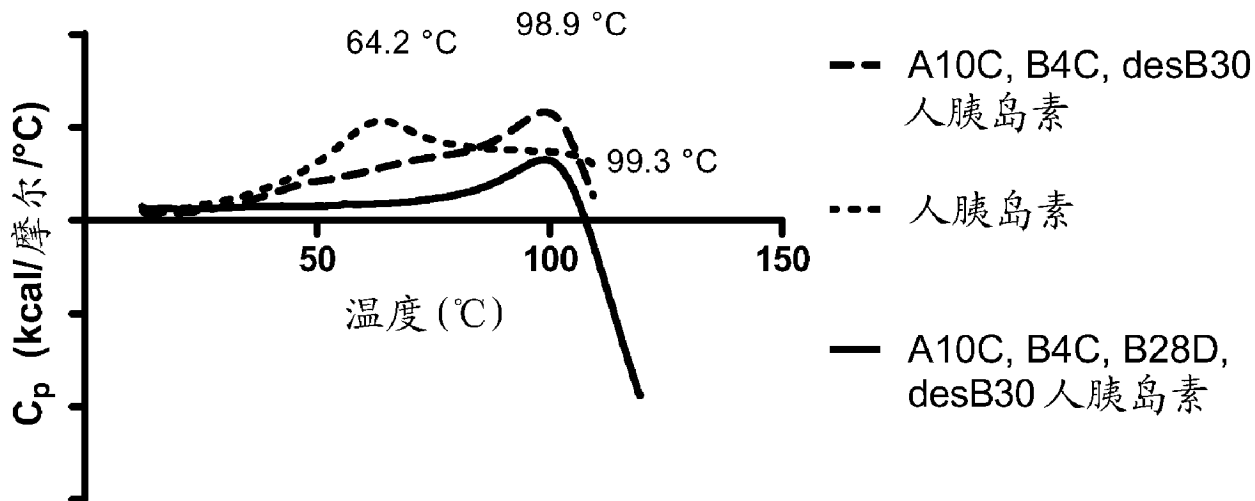


图 4