

申請日期	84. 11. 14.
案 號	84112035
類 別	C02K1 ¹⁴ / ₆₂ , A61K38/28

Int. Cl⁶ (以上各欄由本局填註)

公告本

A4
C4

434259

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	醃化之胰島素類似物
	英 文	ACYLATED INSULIN ANALOGS
二、發明 創作人	姓 名	1.傑夫瑞·克賴頓·貝克 2.喬希·麥可·漢魁爾
	國 籍	1.美國 2.法國
	住、居所	1.美國印第安那州印第安那普利市東第44街114號 2.美國印第安那州馬丁威爾市班迪坡路70號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國禮來大藥廠
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國印第安那州印第安那普利市禮來公司中心
	代 表 人 名 姓	彼得·G·史君格

裝

訂

線

434259

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6

B6

本案已向：

美國(地區) 申請專利，申請日期：1994.11.17. 案號：08/342,931，☐有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

本發明係關於糖尿病的領域。更具體而言，本發明係關於具有延長反應性的經醯化胰島素類似物。

胰島素取代治療法的可用性避免了糖尿病中急性併發症的致死性及發病性。不過，慢性糖尿病併發症仍為最大的健康問題，主要由於不好的血糖控制所引起的持續性代謝不正常。由糖尿病控制及併發症試驗(DCCT)的結果顯示每減少1%的Hb A1c相對於高於35%的視網膜病變發病率的改善。

為了達到正常的血糖，治療方法必須儘可能與正常人內在胰島素分泌的步調相符。每天對於胰島素的需求起伏不定，且可分為二大階段：(a)吸收階段需要胰島素的釋放以處理由多飲引起的血糖突增，及(b)吸收後階段需要穩定量的胰島素以調節肝醣的釋放，使維持適當的飢餓血糖。

因此，有效的治療包括同時使用二種外來胰島素：一種快速反應的用多時胰島素及長效性基礎胰島素。

為了達到長效性，目前製備的胰島素，均以傾向生成不溶，結晶性的六體結構。這些長效製劑為超蘭特(Ultralente)，蘭特(Lente)，及半蘭特(semi-Lente)。不過，目前長效製劑的不溶性已知引起劑量不持續性及時間反應的不可預測性的問題。同時，目前使用中的一種長效胰島素製劑，牛超蘭特，其具有免疫性。由牛超蘭特的免疫性所產生的抗體改變了快速反應胰島素的藥劑動力反應。

雖然不溶性超蘭特製劑的時間性效應，可為方便地每天

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

使用一次的基礎胰島素，許多醫生事實上較喜愛使用間歇性時間反應胰島素，一種魚精蛋白胰島素製劑，通常被稱為胰島素-NPH。由於短時間效應的藥物較容易調整其適當的劑量，因此，以一天使用二次胰島素-NPH，做為基礎胰島素。結果，間歇性反應胰島素的市場分佈狀況為佔US 70%，日本的64%，歐洲的45%及全世界胰島素市場的55%。

不過，不溶性胰島素-NPH及不溶性超蘭特胰島素均為懸浮性製劑。因此，相較於可溶性製劑，其可預測性較低，且對血糖的控制較不當，有較高的高血糖，對生命具威脅性的時段。因此，仍需要一種可溶性，長效性基礎胰島素以達到成功的，完整的胰島素取代治療法。本發明提供的鹽化胰島素類似物，可經製劑後提供可溶性，基礎胰島素治療。

對豬，牛或人類胰島素的鹽化由Muranishi及Kiso，已於日本專利應用1-254,699中發表。下列化合物已經特別發表：B29-N^ε-十六鹽基胰島素(ε-胺基係經鹽化)，B1-N^α-十六鹽基胰島素(B鏈的N端α胺基經鹽化)，及B1,B29-N^α,N^ε-二-十六鹽基胰島素(ε-胺基及N端α-胺基均經鹽化)。Muranishi及Kiso發現經鹽化胰島素的生物性質與胰島素相似；但並未提供劑量，施用途徑，或其他生理中的條件，以利用已知法方來評估經鹽化胰島素的活性或反應的持續性。

同樣地，Hashimoto et al., 於 Pharmaceutical Research 6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

: 171-176 (1989) 中發表 B1-N α -十六醯基胰島素(N端 α -胺基經醯化), 及 B1,B29-N α ,N ϵ -二-十六醯基胰島素(ϵ -胺基及 N-端 α -胺基均經醯化)。Hashimoto et al., 於雄的大白鼠中, 以 25 U/mL 及更高的劑量研究 B1-N α -十六醯基胰島素及 B1,B29-N α ,N ϵ -二-十六醯基胰島素的低血糖效應。在這些劑量下, 圖 5 顯示了, 利用靜脈注射施用結果僅有非常低的活性。於圖 6 中, 若以肌肉下注射, 僅有 B1-N α -十六醯基胰島素有短暫的低血糖效應, 而 B1,B29-N α ,N ϵ -二-十六醯基胰島素則不具效應其揭示於圖 6 中。

除了 Muranishi 及 Kiso 及 Hashimoto et al., 提出的生理報告, Walder et al., 於 PCT 發表 WO 92/01476, 也提出了將蛋白質以化學性鏈結非極性基, 尤其是脂肪酸衍生物, 可於生理狀態下延長蛋白質或胜肽的半衰期。脂肪酸可提供蛋白質及白蛋白之間的鍵橋基。Walder et al., 又提出非極性基較佳地侷限於特別的位置或蛋白質上的位置, 同時以血紅素的半胱胺酸殘基的結合為例說明。上述參考文獻一般提出了胰島素的脂肪酸衍生物。不過, 並沒有任何的胰島素脂肪衍生物被特別提出或加以說明, 同時, 其並未提出任何數據指出胰島素的脂肪衍生物仍保有生物活性。

已知對胰島素類似物單體的自由胺基作選擇性醯化, 可提供有效的基礎胰島素活性。此處所描述的未經醯化胰島素類似物係設計用以提供可快速的開始反應及可快速清除。這些類似物已知為單體胰島素類似物。修飾此類似物以提供基礎的活性的能力是最不被預期的。

五、發明說明(4)

本發明提供一種單醯化胰島素類似物，其可延長其反應時效。此類似物可經製備為可溶性製劑，因此，可較目前的基礎胰島素治療更具優勢。本類似物同時具有極佳的劑量反應可預期性，極佳的反應時效可預期性，於時效反應圖譜中缺乏明顯的尖峰，且極適合用以製備包括胰島素類似物及經醯化胰島素類似物混合物製劑。

發明大綱

本發明提供如下式之單醯化胰島素類似物：

SEQ ID NO : 1

Xaa	異白胺酸	纈胺酸	麩胺酸	麩胺	半胱胺酸	半胱胺酸
1				5		
蘇胺酸	絲胺酸	異白胺酸	半胱胺酸	絲胺酸	白胺酸	蘇胺酸
		10				
麩胺	白胺酸	麩胺酸	天門冬醯胺	酥胺酸	半胱胺酸	天門冬醯胺
15					20	

適當地與SEQ ID NO : 2作共價鍵結

Xaa	纈胺酸	天門冬醯胺	麩胺	組織胺酸	白胺酸	半胱胺酸
1				5		
甘胺酸	絲胺酸	組織胺酸	白胺酸	纈胺酸	麩胺酸	丙胺酸
		10				
白胺酸	酥胺酸	白胺酸	纈胺酸	半胱胺酸	甘胺酸	麩胺酸
15					20	
精胺酸	甘胺酸	苯胺基丙酸	苯胺基丙酸	酥胺酸	蘇胺酸	Xaa
			25			
Xaa	蘇胺酸					
	30					

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

張

訂

五、發明說明(5)

或其於藥劑上可接受的鹽類。

其中：

SEQ ID NO: 1(胰島素A鏈)中的第1個位置的Xaa為甘胺酸；或當SEQ ID NO: 2中第1個位置的Xaa為苯胺基丙酸，SEQ ID NO: 2中第28個位置的Xaa為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，或丙胺酸，且SEQ ID NO: 2中第29個位置的Xaa為離胺酸或吡咯胺酸，則SEQ ID NO: 2中第1個位置的Xaa為經鹽化甘胺酸；

SEQ ID NO: 2(胰島素B鏈)中第1個位置的Xaa為苯胺基丙酸；或當SEQ ID NO: 1的第1個位置Xaa為甘胺酸，SEQ ID NO: 2的第28個位置的Xaa為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，或丙胺酸，且SEQ ID NO: 2中第29個位置的Xaa為離胺酸或吡咯胺酸，則SEQ ID NO: 2第1個位置的Xaa為鹽化苯胺基丙酸；

SEQ ID NO: 2中第28個位置的Xaa為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，丙胺酸；或當SEQ ID NO: 1中的第1個位置的Xaa為甘胺酸，SEQ ID NO: 2中第1個位置的Xaa為苯胺基丙酸，且SEQ ID NO: 2中第29個位置的Xaa為吡咯胺酸，則SEQ ID NO: 2中第28個位置的Xaa為經鹽化離胺酸；且

SEQ ID NO: 2中第29個位置的Xaa為離胺酸，吡咯胺酸；或當SEQ ID NO: 2中第28個位置的Xaa為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，或丙胺酸，SEQ ID NO: 1的第1個位置的Xaa為甘胺酸，且SEQ ID NO: 2的第1個位

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

置的Xaa的苯胺基丙酸，則SEQ ID NO: 2中的第29個位置的Xaa為經鹽化離胺酸。

本發明更提供治療高血糖的方法，藉對需要的病患施用藥劑組合物，其中包括有效量的本發明之經鹽化胰島素類似物與一或多種藥劑上可接受的賦形劑。

同時包括於本發明為針劑藥劑配方，其中包括本發明之經鹽化胰島素類似物與一或多種藥劑上可接受的保存劑，等張液劑，或緩衝液。

本發明中所使用的胺基酸縮寫均為美國專利及商標局所接受的，如37 C. F. R. § 1.822 (B) (2)中發佈。

名詞"共價鍵結"代表於半胱胺酸殘基中生成雙硫鍵。經適當共價鍵結人類胰島素或胰島素類似物包括三個雙硫鍵。第1個雙硫鍵於A鏈的第6及第11個半胱胺酸殘基間生成。第2個雙硫鍵結合A鏈第7個位置的半胱胺酸殘基與B鏈第7個位置的半胱胺酸。第3個雙硫鍵結合A鏈第20個半胱胺酸及B鏈第19個位置的半胱胺酸。

名詞"經鹽化甘胺酸"，"經鹽化苯胺基丙酸"，及"經鹽化離胺酸"指以C₆-C₂₁脂肪酸鹽化的甘胺酸，苯胺基丙酸，或離胺酸。名詞"鹽化基"代表以化學鍵結至胰島素類似物的 α -胺基或 ϵ -胺基的脂肪酸。A1及B1位置上的自由胺基為 α -胺基。於第B28或B29位置的離胺酸自由基為 ϵ -胺基。

名詞"鹽化"代表使一個鹽基共價鍵結至蛋白質的自由胺基。名詞"選擇性鹽化"代表偏好性對 ϵ -胺基鹽化，而非

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

α -胺基。

名詞"脂肪酸"代表飽和或不飽和 C_6 - C_{21} 脂肪酸。較佳的脂肪酸為飽和性，且包括十四酸(C_{14})，十五酸(C_{15})，十六酸(C_{16})，十七酸(C_{17})及硬脂酸(C_{18})。最佳的脂肪酸為十六酸。本發明的化合物為單鹽化之胰島素類似物。胰島素類似物以 C_6 - C_{21} 脂肪酸於 α -胺基或 ϵ -胺基進行鹽化。較佳的，類似物於離胺酸的 ϵ -胺基經單鹽化。

名詞"經活化脂肪酸酯"代表脂肪酸以記載於Methods of Enzymology, 25, 494-499 (1972)及Lapidot et al., 於J. of Lipid Res. 8: 142-145 (1967)中的一般性方法進行活化。經活化的脂肪酸酯包括常使用的鹽化劑衍生物，如羥基苯并三疊氮(HOBT)，N-羥基丁二酸亞胺及其衍生物。較佳的經活化酯為十六酸N-琥珀鹽亞胺鹽酯。

名詞"可溶性"代表足量的酯存於液相中，以使胰島素類似物鹽化。較佳的，於液態中，每莫耳類似物存在1至2等莫耳當量經活化酯。

此處所用名詞"單體胰島素類似物"或"胰島素類似物"為不易形成雙體或自我結合的快速反應胰島素類似物。單體胰島素類似物為人類胰島素，其中於B28位置的吡咯胺酸為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，或丙胺酸所取代，且B29位置的離胺酸為離胺酸或吡咯胺酸。單體胰島素類似物已發表於Chance et al., 美國專利應用字號07/388,201, (EPO發表字號383 472)，及Brange et al., EPO發表字號214 826。已知可能對單體胰島素類似物作其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

他修飾，且可廣被接受。這些修飾包括於第B10位置以天門冬酸取代組胺酸；於B1位置，以天門冬酸取代苯胺基丙酸；於B30位置，以丙胺酸取代蘇胺酸；於B9位置，以天門冬酸取代絲胺酸；僅除去B1位置的胺基酸，或與B2位置一併去除；且由B30位置除去蘇胺酸。

名詞"鹼性條件"於此處指鹼性反應。為能選擇性地於胰島素類似物的 ϵ -胺基進行醯化，反應必須於所有自由胺基不與氫離子結合的條件下進行。於水性溶劑或副溶劑中，鹼性條件表示反應pH高於9.0。於有機溶劑中，反應於鹼存在下進行，且其鹼性相當於水中pKa高於或等於10.75。

SEQ ID NO: 1表示於序列表中的第1個序列，且表為如下序列之人類胰島素A鏈之類似物：

Xaa	異白胺酸	纈胺酸	麩胺酸	麩胺	半胱胺酸	半胱胺酸
1				5		
蘇胺酸	絲胺酸	異白胺酸	半胱胺酸	絲胺酸	白胺酸	酥胺酸
		10				
麩胺	白胺酸	麩胺酸	天門冬醯胺	酥胺酸	半胱胺酸	天門冬醯胺
15					20	

其中SEQ ID NO: 1(胰島素A鏈)中位置1的Xaa為甘胺酸；或當SEQ ID NO: 2中位置1的Xaa為苯胺基丙酸，SEQ ID NO: 2中第28位置的Xaa為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，或丙胺酸，且SEQ ID NO: 2中第29位置的Xaa為離胺酸或吡咯胺酸時SEQ ID NO: 1中位置1的Xaa為經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明(9)

鹽化甘胺酸。

SEQ ID NO: 2表示序列表中第2個序列，且表為如下序列之人類胰島素B鏈類似物：

Xaa	纈胺酸	天門冬醯胺	麩胺	組胺酸	白胺酸	半胱胺酸
1				5		
甘胺酸	絲胺酸	組胺酸	白胺酸	纈胺酸	麩胺酸	丙胺酸
		10				
白胺酸	酥胺酸	白胺酸	纈胺酸	半胱胺酸	甘胺酸	麩胺酸
15					20	
精胺酸	甘胺酸	苯胺基丙酸	苯胺基丙酸	酥胺酸	蘇胺酸	Xaa
			25			
Xaa	蘇胺酸					
	30					

SEQ ID NO: 2(胰島素B鏈)中第1個位置的Xaa為苯胺基丙酸；或當SEQ ID NO: 1的第1個位置Xaa為甘胺酸，SEQ ID NO: 2的第28個位置的Xaa為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，或丙胺酸，且SEQ ID NO: 2的第29個位置的Xaa為離胺酸或吡咯胺酸，則SEQ ID NO: 2第1個位置的Xaa為鹽化苯胺基丙酸；

SEQ ID NO: 2中第28個位置的Xaa為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，丙胺酸；或當SEQ ID NO: 1中的第1個位置的Xaa為甘胺酸，SEQ ID NO: 2中第1個位置的Xaa為苯胺基丙酸，且SEQ ID NO: 2中第29個位置的Xaa為吡咯胺酸，則SEQ ID NO: 2中第28個位置的Xaa為經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(10)

醯化離胺酸；且

SEQ ID NO: 2 中第 29 個位置的 Xaa 為離胺酸，吡咯胺酸；或當 SEQ ID NO: 2 中第 28 個位置的 Xaa 為天門冬酸，離胺酸，白胺酸，纈胺酸，或丙胺酸，SEQ ID NO: 1 的第 1 個位置的 Xaa 為甘胺酸，且 SEQ ID NO: 2 的第 1 個位置的 Xaa 為苯胺基丙酸，則 SEQ ID NO: 2 中的第 29 個位置的 Xaa 為經醯化離胺酸。

如上述，本發明提供如下式單醯化胰島素類似物：SEQ ID NO: 1 適當地與 SEQ ID NO: 2 共價結合，或其於藥劑上可接受的鹽類。SEQ ID NO: 1 (胰島素 A 鏈) 中第 1 位置之較佳的胺基酸殘基為甘胺酸。SEQ ID NO: 2 (胰島素 B 鏈) 第 1 位置之較佳的胺基酸為苯胺基丙酸。SEQ ID NO: 2 中第 28 個位置的較佳胺基酸為天門冬酸；或當 SEQ ID NO: 2 中第 29 個位置的胺基酸殘基為吡咯胺酸，則為經醯化離胺酸。SEQ ID NO: 2 中第 29 個位置的較佳胺基酸為離胺酸；或當 SEQ ID NO: 2 中第 28 個位置的胺基酸為經醯化離胺酸，則為吡咯胺酸。於已知的標準生化名詞中，較佳的類似物為單醯化之離胺酸^{B28}吡咯胺酸^{B29}-人類胰島素。最佳的經醯化胰島素類似物為以 C₈ 至 C₁₈ 脂肪酸單醯化者，較佳為以 C₁₄ 至 C₁₆ 脂肪酸。較佳的脂肪酸包括辛醯基(C8)，壬醯基(C9)，癸醯基(C10)，十一醯基(C11)，十二醯基(C12)，十三醯基(C13)，十四醯基(C14)，十五醯基(C15)，十六醯基(C16)。因此，本發明中較佳的化合物包括 B29-N^ε-天門冬酸^{B28}-十六醯基人類胰島素(B²⁸為天

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明(11)

門冬酸；B²⁹為經鹽化離胺酸)，B28-N^ε-十六鹽基-離胺酸B²⁸吡咯胺酸B²⁹-人類胰島素(B²⁸為經鹽化離胺酸；B²⁹為吡咯胺酸)，B28-N^ε-辛鹽基-離胺酸B²⁸吡咯胺酸B²⁹-人類胰島素，B28-N^ε-癸鹽基-Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素，B28-N^ε-十四鹽基-Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素，及B28-N^ε-十一鹽基-Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素。

已知如何對蛋白質中的自由胺基進行鹽化，包括胰島素。鹽化的一般方法發佈於Methods of Enzymology，25：494-499 (1972)，且包括使用經活化酯，鹵化鹽或酸酐。利用脂肪酸經活化酯，特別是N-羥基丁二鹽亞胺酯，為以脂肪酸對自由胺基酸進行鹽化的最佳方法。Lapidot et al., J. of Lipid Res. 8：142-145 (1967)中，Lapidot et al., 描述N-羥基丁二鹽亞胺酯的製備及其用於製備N-十二鹽基-甘胺酸，N-十二鹽基-L-絲胺酸，及N-十二鹽基-L-麩胺酸。

為能選擇性地鹽化ε-胺基，於耦合過程中，可用多種保護基遮蔽α-胺基，已知如何選擇合適的保護基，且包括p-甲氧基苯甲氧基羰基(pmZ)。較佳地，於不使用胺基保護基的情況下，以一個步驟合成的方式將ε-胺基鹽化。鹽化反應於極性溶劑中，鹼性條件下，以經活化的脂肪酸酯，將蛋白質的ε-胺基鹽化。反應的鹼性需足以將所有胰島素類似物的自由胺基去氫化。於弱鹼條件下，並非所有的自由胺基均去氫化，因此可能有部分的N-端或α胺基被鹽化。於水性溶劑或副溶劑中，鹼性條件代表反應於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (12)

pH高於9.0的情況下進行。由於pH高於12.0時，將產生蛋白質裂解情況，因此反應混合物的pH值較佳於10.0至11.5，最佳於10.5。於有機及水性溶劑混合物中反應pH值的測定為混合前水性溶劑的pH。

於非水性溶劑中，對 ϵ -胺基的選擇性鹽化為存在的鹼。其鹼性之pKa需相當或高於在10.75的水中值，以足夠使 ϵ -胺基去氫化。即，此鹼需至少與三乙胺一樣強。較佳的，此鹼為四甲基胍，二異丙基乙胺，或四丁基氫氧化銨。使用弱鹼，將使 α -胺基被鹽化。

溶劑的選擇並非最重要的，而主部仰賴胰島素類似物及脂肪酸酯的溶解度。溶劑可完全為有機性。一般可接受的有機溶劑包括DMSO，DMF及其相似者。水性溶劑及水性與有機性溶劑的混合液亦可使用。對極性溶劑的選擇僅限於試劑的溶解性。較佳的溶劑為DMSO；DMF；氫甲烷及水；丙酮及水；乙醇及水；異丙醇及水；異丙醇，乙醇，及水；及乙醇，丙醇及水。較佳地，此溶劑為氫甲烷及水；最佳為50%氫甲烷。已知的方法亦可接受其他的極性溶劑。

一般而言，經活化的脂肪酸酯最好過量。較佳地，反應中酯含1至4莫耳當量，最佳為1至2個莫耳當量。已知反應中將產生適量的經活化酯及雙-或三-經鹽化產物。

反應溫度並非最重要的。反應於20至40°C中進行，且通常於15分至24小時內完成。

鹽化後，以標準方法純化產物，如逆相或疏水性色譜分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (13)

析法。然後，以標準方法如冷凍乾燥或結晶取回產物。

本發明的單體胰島素類似物，可利用任一種已知的胜肽合成技術製備，包括傳統方法(溶液)，固相方法，半合成法，及最近的重組DNA方法。例如，Chance et al., 美國專利字號 07/388,201，EPO發表字號 383 472，及 Brange et al., EPO 214 826發表了製備多種胰島素類似物，且於此外被列入參考文獻。本發明之胰島素類似物之A及B鏈可由類前胰島素前驅物分子以重組DNA技術製備。參見 Frank et al., Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proc. Seventh Am. Pept. Symp., Eds. D. Rich及 E. Gross (1981)，於此處被列為參考文獻。

下列範例僅供為對本發明作進一步說明。本發明範圍不以下例為限。

範例 1

於氬甲烷及水中，以十六酸N-琥珀醯亞胺醯酯醯化

Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素

將Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素結晶(2.22 g)溶於pH 2.5，含有50 mM硼酸的100 mL的溶液中。以10% HCl重新調整溶液的pH至2.5，且攪拌溶液至肉眼判斷結晶已完全溶解。加入270 mg的固體經活化酯至已加熱至約50°C之27 mL的氬甲烷中製備經活化酯溶液(十六酸N-琥珀醯亞胺醯酯)，且劇烈攪拌至以肉眼判斷為完全溶解。藉加入10% NaOH調整溶液的pH值至約10.22，且使溶液於4°C中攪拌15分。將氬甲烷(73 mL)加入pH已經調整的溶液中，再加

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

張

訂

五、發明說明(14)

入前述製備之經活化酯溶液。使反應於4°C中進行85分，再加入1N醋酸(600 mL)停止反應，得pH為2.85。以反應終止中所得的B28-N^E-十六醯基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素的量除以原有Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素的量計算反應產率為72.5%。

範例2

C8 (B28) Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素

將Lys(B28)，Pro(B29)人類胰島素(KPB)結晶(2.0^g)溶於pH 2.5，200 mL含有50 mM的硼酸液中。利用10% HCl再調整pH至2.5，持續攪拌至肉眼判定為完全溶解。將175 mg的固體活化酯加入25.62 mL的氯甲烷中，劇烈攪拌至所有顆粒完全溶解來製備活化酯溶液(1-辛醯-N-羥基琥珀醯亞胺酯)。加入10% NaOH調整KPB溶液的pH值至約10.4，且使溶液於室溫中攪拌約5分。加入氯甲烷(176 mL)至pH已經調整之KPB溶液，再加入前述製備之活化酯溶液。使反應於室溫下進行90分，再藉加入10% HCl，5.5mL (2.75% v/v)及3倍體積的冷dH₂O (1200 mL)，而得最終pH為2.70。以終止反應後之Lys B29 (C8) KPB的量除以原有BHI的量，計算得產率為75.5%。將溶液分為2個800 mL分裝液，用以作疏水性色譜分析法(SP20SS)純化。管柱色譜分析後，再進行超過濾及冷凍乾燥。

如前述，給予需要的病患足量的單醯化胰島素類似物可有效地治療高血糖。此處名詞"足量"表示所需用以治療性或預防性降低或維持血糖量的本發明之一或多種經醯化類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 (15)

似物。典型的量為每天10單位或高於10單位(或假設每mg含約29單位，則約0.3至約2 mg)。不過，必須了解的是，實際上所施用的鹽化類似物的量必須醫生根據相對的條件來決定，包括治療的條件(i. e. 高血糖的起因)，施用的類似物，施用的注射途徑，病患的年齡，重量及反應，以及患者症狀的嚴重性。因此，上述劑量範圍並不限制本發明。

本發明之鹽化胰島素類似物施用於所需患者(i. e. 高血糖患者)時，及藉含有有效量之至少一種單鹽化胰島素類似物與一或多種藥劑上可接受的賦形劑或載體共組的藥劑組合物來使用。因此，此藥劑組合物一般被製劑為含有約每mL 100單位或含有相似濃度之效量鹽化胰島素類似物。此組合物一般為針劑，且可用傳統已知的針劑產品用的賦形劑或載體，利用任一種技術來製備。參見如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1985)，其於此外被列入參考文獻。例，針劑用劑型可將至少一種單鹽化胰島素類似物溶於或懸浮於非毒性，適用於注射的液體載體中，如，水性溶液，再使懸浮液或溶液滅菌。另外，將已知量的化合物置於小瓶中；使小瓶及其內含物滅菌後密封。可提供另一小瓶或載體，用於使用前混合。適用於針劑用途的藥劑組合物利用稀釋劑，賦形劑及載體，如水及水可混合有機溶劑，如甘油，芝麻油，花生油，水性丙三醇，N,N-二甲鹽胺及其相似者。此種藥劑組合物範例包括，單鹽化胰

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(16)

島素類似物無菌，等張食鹽水溶液，其可經藥劑上可接受的緩衝液緩衝，且不含熱源。另外，針劑製劑中可含有保存劑，如間-不焦油酚或其他試劑來調整最終產物的pH，如氫氧化鈉或氫氯酸。

本發明的鹽化胰島素類似物可經製劑為混合物。混合物製劑中包括未鹽化胰島素或胰島素類似物，及已鹽化胰島素類似物。胰島素或胰島素類似物對鹽化類似物的重量比比比例為由1:99至99:1。較佳的，比例由75:25至25:75；更佳的，由40:60至60:40；最佳為50:50。混合物製劑的製備為將所需組成分的體積於標準針劑稀釋劑中混合。標準稀釋劑包括等張劑，鋅，生理上可接受的緩衝液及保存劑。生理上可接受的緩衝液較佳為磷酸緩衝液，如磷酸二氫鈉。其他生理上可接受的緩衝液包括TRIS或醋酸鈉。已知緩衝液的選擇法及濃度。藥劑上可接受的保存劑包括酚，m-木焦油酚，間苯二酚及對甲基苯。本發明之混合物製劑的優點為相當快速反應胰島素或胰島素類似物及單鹽化胰島素類似物均溶於製劑中。因此，其可提供相當可預期的反應時間圖譜。

下列製劑範例僅用於說明，而不用於限制本發明範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (17)

製劑 1

一種針劑配方可製備如下：

	數量
酚	30 mM
甘油	16 mg/mL
醯化Lys ^{B28} Pro ^{B29} -人類胰島素	100 U
鋅	0.7 %
醋酸鈉	3.8 mg/mL

上述組成分溶液以注射方式用於治療。

爲了證明本發明化合物的有效性，將B28-N^ε-十六醯基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素於有意識的狗模型上試驗。以重8-15 kg，經整夜未進食，有意識的成年(1-2)歲公獵犬及母獵犬來進行實驗。至少於實驗前10天，以異氟烷使動物麻醉，並於其左或右腹股溝區切開。將導管插入股動脈及近尾端的股靜脈，且以4-0絲縫線縫緊。以套管針將導管自由端穿透皮下至背部。以甘油/肝磷脂溶液(3:1, v/v; 肝磷脂的最終濃度爲250 KIU/ml)充填導管，將其末端打結，且置於皮下袋中，使皮膚能完全密合。於手術前(20mg/kg, IV及20mg/kg, I.M.)及手術後(250 mg, p. o. 每天一次，可維持7天)打入Keflex，以避免感染。手術後打入Torbugesic (1.5 mg/kg, I.M.)以控制疼痛。

於實驗開始前日先抽血以測定動物的健康狀態。僅使用血球量高於38%，而白血球量低於16,000/mm³的動物。實

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (18)

驗前日下午，利用局部麻醉(2% lidocaine)，由皮下小袋開一小口，取出導管末端，且以頸鍊拴住獵犬。

實驗當日早晨，將動脈導管抽乾後(實驗中僅使用動脈導管)，以生理食鹽水沖洗，再加入延長管(以不銹鋼套索保護)。將獵犬放入代謝籠中，將導管延長管及鎖鍊接於迴旋系統，使狗能於籠中自由移動。於15分的休息期後，(45分，控制)抽血以測定其中的血糖濃度。15分後(0分)抽取第2個樣本。由頸背皮下注射測試物質(經磷酸鹽緩衝生理食鹽水，或10.5 mmol/kg之B28-N^ε-十六醯基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素；此劑量為等莫耳當量之1.75 U/kg人類胰島素)。

於接下來的2(控制組)至6小時(B28-N^ε-十六醯基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素)中，至少每30分取一次動脈血樣本(2-3.5 ml)。將血樣收集於含有二鈉EDTA之真空血收集管中，且立即置於冰上。將樣本離心後，收集所得的血漿至聚丙烯試管中，且儲存於冰上或於研究時置於冰箱中。

實驗終止時，將動物麻醉(異氟烷)；以新鮮食鹽水清洗導管，且以甘油/肝磷脂混合物充填；如前述，將導管末端打結且置於皮下；注射抗生素(300 mg Keflex, I. M.)。利用貝克曼葡萄糖分析儀，於實驗當日，以葡萄糖氧化法酶法測定血糖濃度。其數值以平均值±平均值的標準偏差來表示。

於注射經磷酸鹽緩衝生理食鹽水前2小時的觀察期中，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (19)

血糖濃度沒有太大的變化(表1)。於相同時間後，經皮下注射B28-N^ε-十六醯基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素，使血糖濃度下降15% (17 mg/dl)。於接下來4小時中，經B28-N^ε-十六醯基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素治療的動物血糖逐漸下降至低於注射後6小時的基準線41 mg/dl (35%降低)。

由已知文獻中查得，即使於禁食一週後，狗的血糖濃度並不會有所改變。本實驗所觀察的血糖降低係因注射B28-N^ε-十六醯基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素，因此證明了此化合物的類胰島素活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(20)

表1. 經皮下注射磷酸鹽生理食鹽水緩衝液(控制組)或B28-N^ε-十六鹽基Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素後血糖濃度。

時間(分)	控制組(n=5) (mg/dL)	B28-N ^ε -十六鹽基Lys ^{B28} Pro ^{B29} - 人類胰島素(n=1) (mg/dL)
-15	114±3	116
0	112±3	116
30	117±4	114
60	114±3	107
90	115±3	102
120	117±5	99
150		101
180		100
210		100
240		98
270		87
300		82
330		79
360		75

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(21)

序列表

(1)一般性資訊：

(i)申請者：Baker et al.

(ii)發明名稱：經醃化之胰島素類似物

(iii)序列數目：2

(iv)回覆地址：

(A)地址：禮來(Eli Lilly)及公司專利部門/SPC

(B)街：禮來集團中心(Lilly Corporate Center)

(C)市：印第安那亞波尼士(Indianapolis)

(D)州：IN

(E)國：USA

(F)郵遞區號：46285

(v)電腦可讀格式：

(A)媒介型態：磁片，3.50吋，1.4 Mb儲存量

(B)電腦：麥金塔(Macintosh)

(C)作業系統：麥金塔(Macintosh)

(D)軟體：微軟Word

(vi)目前申請資料：

(A)申請字號：

(B)歸檔日期：

(C)分類：

(vii)先前申請資料：

(A)申請字號：

(B)歸檔日期：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (22)

(viii) 代理人 / 機構 資訊

(A) 名字 : Steven P. Caltrider

(B) 註冊字號 : 36467

(C) 文獻 / 文案字號 : X9720

(ix) 電訊資料 :

(A) 電話 : (317)276-0757

(B) 傳真 : (317)277-1917

(C) 電傳 :

(2) SEQ ID NO : 1 資訊

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 21 個胺基酸

(B) 型態 : 胺基酸

(C) 脫譜學 : 直線

(ii) 分子型態 : 多胜肽

(ix) 特性 :

(A) 名稱 / 要點 : 不固定位置

(B) 位置 : 1

(C) 鑑識方法 :

(D) 其他資訊 :

" 在 SEQ ID NO : 1 的第 1 個位置之 Xaa 為 Gly ; 或當 SEQ ID NO : 2 中第 1 個位置的 Xaa 為 Phe , 於 SEQ ID NO : 2 的第 28 個位置之 Xaa 為 Asp , Lys , Leu , Val , 或 Ala , 且於 SEQ ID NO : 2 中第 29 個位置之 Xaa 為 Lys 或 Pro , 則於 SEQ ID NO : 1 的第 1 個位置

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (23)

之 Xaa 為經鹽化 Gly"。

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：1：

Xaa	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys
1				5		
Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr
		10				
Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn
15					20	

(3) SEQ ID NO：2 的資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：30 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(C) 脫譜學：直線

(ii) 分子型態：多胜肽

(ix) 特性：

(A) 名稱/要點：不固定位置

(B) 位置：1

(C) 鑑識方法：

(D) 其他資訊：

"SEQ ID NO：2 中第 1 個位置的 Xaa 為 Phe；或當 SEQ ID NO：1 的第 1 個位置的 Xaa 為 Gly，SEQ ID NO：2 中第 28 個位置之 Xaa 為 Asp，Lys，Leu，Val，或 Ala，且 SEQ ID NO：2 中第 29 個位置之 Xaa 為 Lys 或 Pro，則 SEQ ID NO：2 中第 1 個位

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(24)

置的Xaa為經鹽化Phe"。

(ix)特性：

(A)名稱/要點：不固定位置

(B)位置：28

(C)鑑識方法：

(D)其他資訊：

"SEQ ID NO：2中第28個位置的Xaa為Asp，Lys，Leu，Val，Ala；或當SEQ ID NO：1中第1個位置的Xaa為Gly，SEQ ID NO：2中第1個位置之Xaa為Phe，且SEQ ID NO：2中第29個位置之Xaa為Pro，則SEQ ID NO：2中第28個位置之Xaa為經鹽化Lys"。

(ix)特徵：

(A)名稱/要點：不固定位置

(B)位置：29

(C)鑑識方法：

(D)其他資訊：

"SEQ ID NO：2中第29個位置的Xaa為Lys，Pro；或當SEQ ID NO：2中第28個位置之Xaa為Asp，Lys，Leu，Val，或Ala，SEQ ID NO：1中第1個位置之Xaa為Gly，且SEQ ID NO：2中第29個位置之Xaa為Pro，則SEQ ID NO：2中第29個位置的Xaa為經鹽化Lys"。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (25)

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO : 2 :

Xaa	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys
1				5		
Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala
		10				
Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu
15					20	
Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Xaa
			25			
Xaa	Thr					
	30					

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

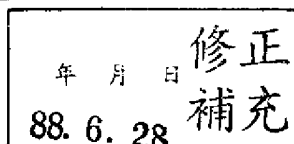
訂

四、中文發明摘要(發明之名稱： 醯化之胰島素類似物)

本發明係關於糖尿病的領域。更特定言之，本發明係關於單體胰島素類似物，其中A鏈為天然生成的人類胰島素A鏈的序列，而B鏈則於第B28位置，或第B29位置，或二者經過修飾。此類似物於A鏈或B鏈或於離胺酸的N-端進行單醯化。此經醯化胰島素類似物具有延長的作用期間。

英文發明摘要(發明之名稱： ACYLATED INSULIN ANALOGS)

The present invention relates to the field of diabetes. More particularly, the invention relates to a monomeric insulin analog wherein the A chain is the naturally occurring sequence of the human insulin A chain and the B chain is modified at either position B28 and B29 or both. The analog is mono-acylated at the N-terminal of the A chain or B chain or at the lysine. The acylated insulin analogs have an extended duration of action.



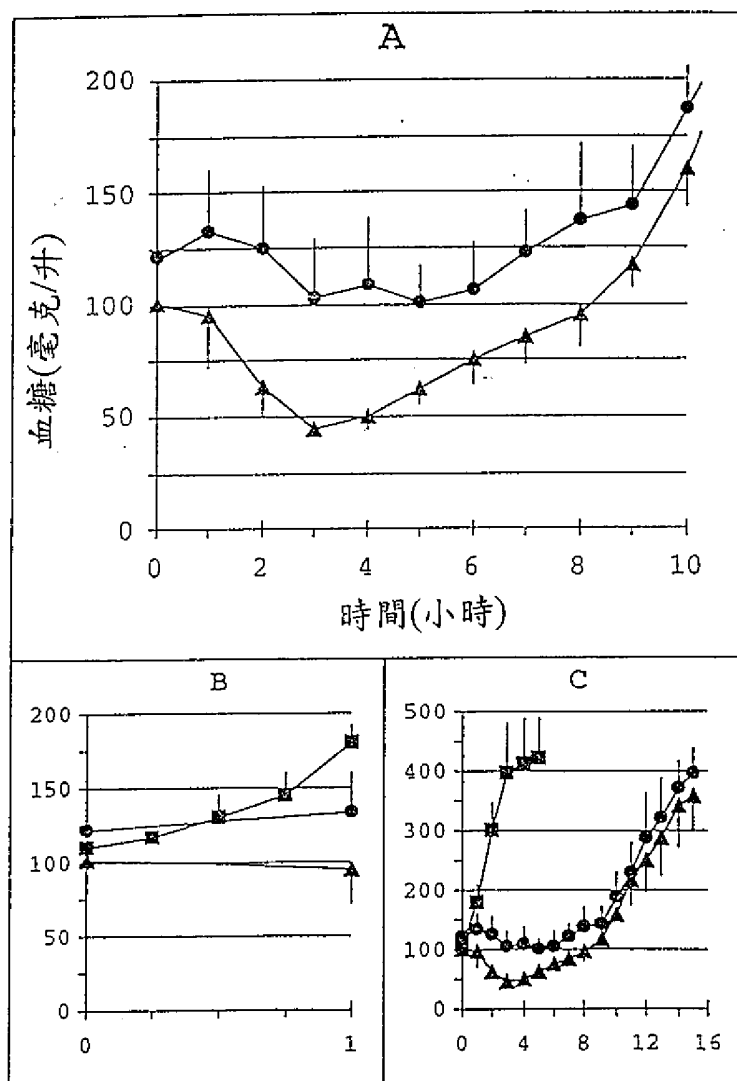
第 84112035 號專利申請案
中文補充說明書(88年6月)

第一試驗中 N^{ϵ} -十六醯基-KPI(Lys^{B28}, Pro^{B29}-人類胰島素類似物)與患糖尿病、經切除胰臟之狗之 N^{ϵ} -十六醯基-hI(人類胰島素)做比較, 該狗經投與試驗化合物後之血糖水平已正常。首先將試驗化合物溶於 0.01N 鹽酸中, 濃度約為 1 毫克/毫升, 經添加氯化鋅而提供莫耳胰島素 0.35 莫耳鋅原子。溶液 pH 經 5N 氫氧化鈉調整成約 7.8, 然後將溶液冷凍乾燥。投與前, 乙醯化胰島素樣品經溶於供 Humulin®R 使用之消毒稀釋劑, 最終濃度為 600 當量莫耳/毫升, U-100 Humulin®溶液之莫耳當量。患糖尿病之狗供用於十六醯基-胰島素之研究。連續, 經皮注射豬胰島素以於試驗間控制患糖尿病, 經切除胰臟之狗之葡萄糖水平。約在投與試驗化合物 11 小時前, 終止連續注射。約在投與試驗化合物 5 小時前, 開始連續靜脈注射豬胰島素, 使血糖水平正常。使用此程序, 至少在投與試驗化合物前 1 小時, 所有患糖尿病之狗之血糖水平變成正常水平。在投與試驗化合物前, 終止靜脈注射豬胰島素。試驗化合物於頸部背側進行皮下投與(SC), 劑量為 1.4 當量莫耳/公斤(莫耳當量為 0.23 U 之 hI/公斤)。每隻動物經研究二次, 一次以 N^{ϵ} -十六醯基-hI 進行, 另一次以 N^{ϵ} -十六醯基-KPI 進行。研究間最小相隔一週。靜脈注射載媒做為負對照組。結果如圖 1 所示。

圖 1.A 組. 在皮下注射(1.4 當量莫耳/公斤) N^{ϵ} -十六醯基-hI(三隻狗, ▲)或 N^{ϵ} -十六醯基-KPI(相同三隻狗, 在不同時間, ●)之前以胰島素治療使經切除胰臟之患糖尿病之狗之血糖水平。各點為平均值。

條狀為標準誤差。B 組顯示第一小時之數據。經投與不含胰島素之載媒之狗做為負對照組(■)。C 組顯示所有數據。

001

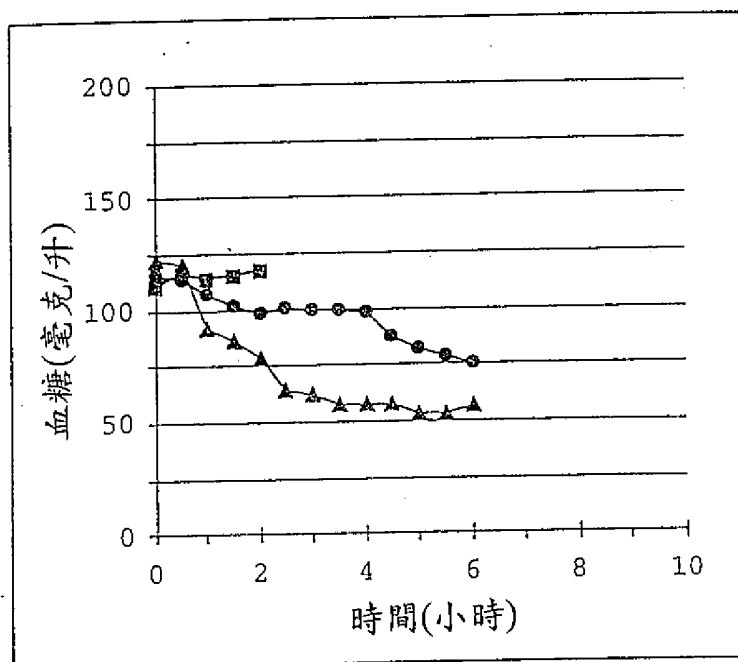


002

經投與 N^6 -十六醯基-KPI 之動物之平均血糖於約 100 及 150 毫克/升之間維持 8 小時。另一方面，經投與 N^6 -十六醯基-hI 之動物已平均血糖水平在注射後 1 至 5 小時之間低於 100 毫克/升，於 3 及 4 小時接近 50 毫克/升。以等莫耳基準，這些數據暗示 N^6 -十六醯基-hI 之生物活性大於 N^6 -十六醯基-KPI，其引起低血糖之風險大於 N^6 -十六醯基-KPI。

第二試驗中，比較正常禁食狗之 N^6 -十六醯基-KPI 及 N^6 -十六醯基-hI。動物及化合物之製備如上所述，唯一不同的是動物未經切除胰臟，在注射胰島素試驗前其血糖水平未正常化。頸部背側經皮下投與十六醯基-胰島素，劑量為 10.5 當量莫耳/公斤(莫耳當量為 1.75U 之 hI/公斤)。每一種治療對象為單一動物。結果如表 2 所述。

圖 2. 正常禁食狗在經皮下注射(10.5 當量莫耳/公斤) N^6 -十六醯基-hI(一隻狗³⁰³▲)或 N^6 -十六醯基-KPI(一隻狗³⁰⁴●)之血糖水平。經投與不含胰島素之載媒之狗做為負對照組(5 隻狗■)。對照值為平均值。

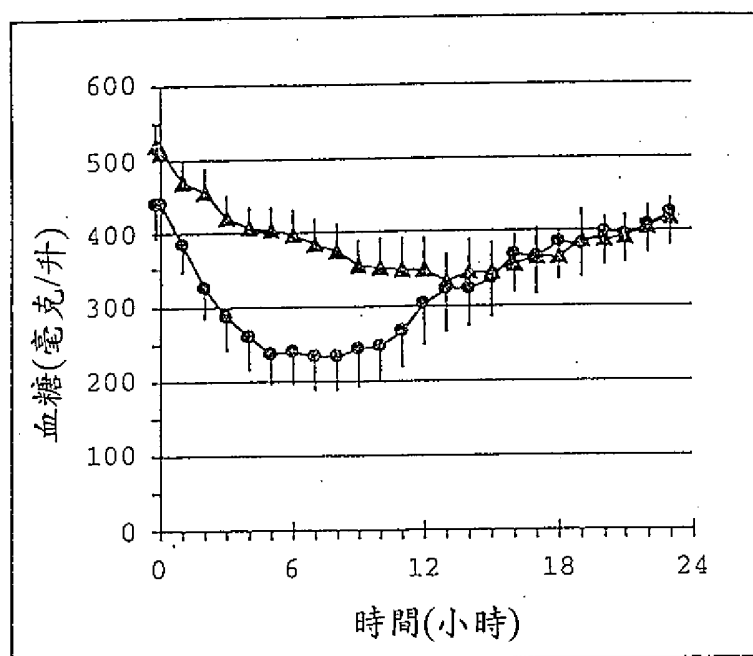


N^{ϵ} -十六醯基-KPI 降低血糖之起始及持續期間之效果並未與 N^{ϵ} -十六醯基-hI 降低血糖之起始及持續期間之效果有顯著差異(圖 2)。使用 N^{ϵ} -十六醯基-KPI 比 N^{ϵ} -十六醯基-hI 觀察到顯著較不嚴重之低血糖。

另一試驗中，在投與試驗化合物之前，比較血糖水平未正常化之經抽取胰島素之患糖尿病、切除胰臟之狗之 $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-KPI 與 $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-hI。維持每天對 5 隻狗投與二次胰島素(NPH 及一般豬胰島素)，係將胰臟萃取物添加至食物以取代胰酵素。NPH 胰島素係於進行研究前一天抽取。一般胰島素投與方式如常，係於研究開始之前至少 17 小時投與最後一劑。研究當天透過植入股 $\leftrightarrow$ 動脈導管抽取動脈血液樣品，以測定注射前之血糖濃度，然後皮下投與試驗物質藥丸(2.52 當量莫耳/公斤；注射入頸部背側)。間歇取血液樣品，使用臨床化學分析器以偶合己糖激酶程序測定血糖。對 5 隻動物進行研究二次，一

次用 $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-hI，一次用 $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-KPI。研究之間至少相隔一週。結果列於圖 6。

圖 6. 皮下注射(2.52 當量莫耳/公斤，莫耳當量為 0.42 單位/公斤) $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-hI(5 隻狗▲)或 $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-KPI(相同 5 隻狗，時間不同●)之前至少 17 小時已抽取胰島素之經切除胰臟之患糖尿病狗之血糖水平。各點為平均值。條狀為標誤差。



006

N^{ϵ} -乙醯化-KPI 具備與 N^{ϵ} -乙醯化-hI 相同或略長之控制葡萄糖之持續期間或降低葡萄糖能力，其造成低血糖之潛力比 N^{ϵ} -乙醯化-hI 低。另一方面， $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-KPI 之時間-作用分佈比 $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-hI 短，但是在控制葡萄糖水平方面比 $N^{B1\alpha}$ -十六醯基-hI 更有效 8-10 小時。

六、申請專利範圍修正
89年10月10日
補充

公告本

1. 一種單醯化胰島素類似物，其中 A 鏈 (SEQ ID NO: 1) 適當地與 B 鏈 (SEQ ID NO: 2) 交聯，或其藥學上可接受之鹽，其中

SEQ ID NO: 1 為

Xaa	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys
1				5		
Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr
		10				
Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn
15					20	

及；

SEQ ID NO: 2 為

Xaa	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys
1				5		
Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala
		10				
Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu
15					20	
Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Xaa
			25			
Xaa	Thr					
	30					

其中

當 SEQ ID NO:2 第 1 位置之 Xaa 為苯胺基丙酸，SEQ ID NO:2 第 28 位置之 Xaa 為天門冬酸、離胺酸、白胺酸、纈胺酸、或丙胺酸，且 SEQ ID NO:2 第 29 位置之 Xaa 為吡咯胺酸時，SEQ ID NO:1 第 1 位置之 Xaa 為甘胺酸或經醯化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

甘胺酸；

當 SEQ ID NO:1 第 1 位置之 Xaa 為甘胺酸，SEQ ID NO:2 第 28 位置之 Xaa 為天門冬酸、離胺酸、白胺酸、纈胺酸或丙胺酸，且 SEQ ID NO:2 第 29 位置之 Xaa 為吡咯胺酸時，SEQ ID NO:2 第 1 位置之 Xaa 為苯胺基丙酸或經醯化之苯胺基丙酸；

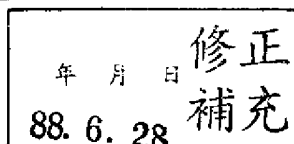
當 SEQ ID NO:1 第 1 位置之 Xaa 為甘胺酸，SEQ ID NO:2 第 1 位置之 Xaa 為苯胺基丙酸，且 SEQ ID NO:2 第 29 位置之 Xaa 為吡咯胺酸時，SEQ ID NO:2 第 28 位置之 Xaa 為天門冬酸、離胺酸、白胺酸、纈胺酸或丙胺酸或經醯化離胺酸；及

SEQ ID NO:2 第 29 位置之 Xaa 為吡咯胺酸。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之單醯化胰島素類似物，其中 SEQ ID NO:1 第 1 位置之 Xaa 為甘胺酸。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之單醯化胰島素類似物，其中 SEQ ID NO:2 第 1 位置之 Xaa 為苯胺基丙酸。
4. 根據申請專利範圍第 3 項之單醯化胰島素類似物，其中 SEQ ID NO:2 第 28 位置之 Xaa 為離胺酸。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之單醯化胰島素類似物，其中醯化基為 C₁₃-C₁₇ 脂肪酸。
6. 根據申請專利範圍第 2 項之單醯化胰島素類似物，其中醯化基為 C₁₃-C₁₇ 脂肪酸。
7. 根據申請專利範圍第 3 項之單醯化胰島素類似物，其中醯化基為 C₁₃-C₁₇ 脂肪酸。

六、申請專利範圍

8. 根據申請專利範圍第4項之單醯化胰島素類似物，其中經醯化甘胺酸係為經C₁₃-C₁₇脂肪酸醯化之甘胺酸。
9. 根據申請專利範圍第1項之胰島素類似物，其中於SEQ ID NO: 2之位置28處之Xaa為經醯化之離胺酸，而於SEQ ID NO: 2之位置29處之Xaa為Pro。
10. 根據申請專利範圍第9項之醯化胰島素類似物，其中醯化基為C₆-C₁₇脂肪酸。
11. 根據申請專利範圍第9項之胰島素類似物，其中醯化基為C₁₃-C₁₇脂肪酸。
12. 一種B28-N^ε-十六醯基-Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素。
13. 一種B28-N^ε-十四醯基-Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素。
14. 一種用於治療糖尿病之非經腸醫藥組合物，其包含根據申請專利範圍第1至13項中任一項之胰島素類似物，以及一或多種藥學上可接受之保存劑等張劑或緩衝劑。
15. 一種用於治療糖尿病之非經腸醫藥組合物，其中包含胰島素或胰島素類似物及根據申請專利範圍第1至13項中任一項之經醯化胰島素類似物之混合物，其中該二種成分之重量比為約1-99:99-1。
16. 根據申請專利範圍第15項之非經腸醫藥組合物，其中該混合物為Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素及B28-N^ε-醯化Lys^{B28}Pro^{B29}-人類胰島素。
17. 根據申請專利範圍第1至13項中任一項之單醯化胰島素類似物，其係供使用於治療糖尿病。



第 84112035 號專利申請案
中文補充說明書(88年6月)

第一試驗中 N^{ϵ} -十六醯基-KPI(Lys^{B28}, Pro^{B29}-人類胰島素類似物)與患糖尿病、經切除胰臟之狗之 N^{ϵ} -十六醯基-hI(人類胰島素)做比較, 該狗經投與試驗化合物後之血糖水平已正常。首先將試驗化合物溶於 0.01N 鹽酸中, 濃度約為 1 毫克/毫升, 經添加氯化鋅而提供莫耳胰島素 0.35 莫耳鋅原子。溶液 pH 經 5N 氫氧化鈉調整成約 7.8, 然後將溶液冷凍乾燥。投與前, 乙醯化胰島素樣品經溶於供 Humulin®R 使用之消毒稀釋劑, 最終濃度為 600 當量莫耳/毫升, U-100 Humulin®溶液之莫耳當量。患糖尿病之狗供用於十六醯基-胰島素之研究。連續, 經皮注射豬胰島素以於試驗間控制患糖尿病, 經切除胰臟之狗之葡萄糖水平。約在投與試驗化合物 11 小時前, 終止連續注射。約在投與試驗化合物 5 小時前, 開始連續靜脈注射豬胰島素, 使血糖水平正常。使用此程序, 至少在投與試驗化合物前 1 小時, 所有患糖尿病之狗之血糖水平變成正常水平。在投與試驗化合物前, 終止靜脈注射豬胰島素。試驗化合物於頸部背側進行皮下投與(SC), 劑量為 1.4 當量莫耳/公斤(莫耳當量為 0.23 U 之 hI/公斤)。每隻動物經研究二次, 一次以 N^{ϵ} -十六醯基-hI 進行, 另一次以 N^{ϵ} -十六醯基-KPI 進行。研究間最小相隔一週。靜脈注射載媒做為負對照組。結果如圖 1 所示。

圖 1.A 組. 在皮下注射(1.4 當量莫耳/公斤) N^{ϵ} -十六醯基-hI(三隻狗, ▲)或 N^{ϵ} -十六醯基-KPI(相同三隻狗, 在不同時間, ●)之前以胰島素治療使經切除胰臟之患糖尿病之狗之血糖水平。各點為平均值。

六、申請專利範圍修正
89年10月10日
補充

公告本

1. 一種單醯化胰島素類似物，其中 A 鏈 (SEQ ID NO: 1) 適當地與 B 鏈 (SEQ ID NO: 2) 交聯，或其藥學上可接受之鹽，其中

SEQ ID NO: 1 為

Xaa	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys
1				5		
Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr
		10				
Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn
15					20	

及；

SEQ ID NO: 2 為

Xaa	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys
1				5		
Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala
		10				
Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu
15					20	
Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Xaa
			25			
Xaa	Thr					
	30					

其中

當 SEQ ID NO:2 第 1 位置之 Xaa 為苯胺基丙酸，SEQ ID NO:2 第 28 位置之 Xaa 為天門冬酸、離胺酸、白胺酸、纈胺酸、或丙胺酸，且 SEQ ID NO:2 第 29 位置之 Xaa 為吡咯胺酸時，SEQ ID NO:1 第 1 位置之 Xaa 為甘胺酸或經醯化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂