

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 2 月 8 日 (08.02.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/024186 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/62 (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/095377
- (22) 国际申请日: 2017 年 8 月 1 日 (01.08.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610625257.5 2016 年 8 月 2 日 (02.08.2016) CN
201610779132.8 2016 年 8 月 31 日 (31.08.2016) CN
- (71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国

江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

- (72) 发明人: 刘德玉 (LIU, Deyu); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。王宏伟 (WANG, Hongwei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。赵亮 (ZHAO, Liang); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。王菲菲 (WANG, Feifei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。曾翔 (ZENG, Xiang); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。王涛 (WANG, Tao); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。王亚里 (WANG,

(54) Title: ACYLATED DERIVATIVE OF HUMAN INSULIN OR ANALOGUE THEREOF

(54) 发明名称: 一种人胰岛素或其类似物的酰化衍生物

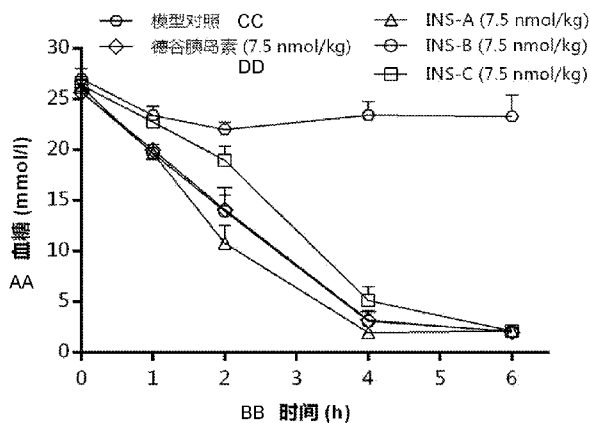


图 2

AA BLOOD SUGAR (MMOL/L)
BB TIME (H)
CC MODEL CONTROL
DD INSULIN DEGLUDEC

(57) Abstract: Provided is an acylated derivative of human insulin or an analogue thereof. Specifically disclosed is an acylated derivative of a human insulin analogue, or zinc complex thereof; said acylated derivative is longer-lasting than existing insulin analogues and acylated derivatives thereof, its blood sugar reduction is more steady, and it is more stable in storage.

(57) 摘要: 一种人胰岛素或其类似物的酰化衍生物。具体而言, 一种人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物, 该酰化衍生物相较于已有的胰岛素类似物及其酰化衍生物更加长效, 且降血糖更加平稳, 储存更加稳定。



WO 2018/024186 A1

Yali); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。戴雨璐(DAL Yulu); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层程伟, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种人胰岛素或其类似物的酰化衍生物

技术领域

5 本发明涉及一种人胰岛素类似物的酰化衍生物。

背景技术

10 糖尿病（Diabetes Mellitus, DM）是一种常见的代谢内分泌疾病，是由于体内胰岛素绝对或相对缺乏，或靶组织对胰岛素不敏感而引起的慢性高血糖为特征的伴随糖、脂肪和蛋白质代谢紊乱的临床慢性、全身性代谢综合症。它由遗传和环境因素相互作用而引起，涉及人体各个系统，包括心脑血管、肾、眼、神经等脏器并发症，严重危害人类健康，是一种终生疾病。

糖尿病已成为一种常见病、多发病，是继癌症、心脑血管病之后，第三大威胁人类生命的疾病，是全人类的挑战，其对人们生命健康的危害不分种族和国家。
15 据国际糖尿病联盟（IDF）的统计，上个世纪八十年代中期至九十年代中期十年间，糖尿病患者总量增长 4 倍，达到 1.2 亿。2007 年全球糖尿病患者人数为 2.46 亿，其中 46% 为 40-59 岁劳动力人口。预计到 2025 年全世界糖尿病患者将增加到 3.8 亿，占到世界成年人口的 7.1%。

使用人胰岛素是治疗糖尿病的一种主要方法，但是人胰岛素作用时间较短，
20 使得病人必须频繁注射，极为不便。因此，人们致力于获得一些能够更长时间作用于人体的胰岛素类似物及其衍生物。其中，使用酰化基团修饰人胰岛素或其类似物，是一种提高其半衰期的有效方法。WO2005012347 和 WO2013086927 分别公开了两类不同的人胰岛素类似物的酰化衍生物，此类衍生物是通过将脂肪酸形式的酰化基团共价连接到人胰岛素类似物的氨基酸上，经过此种修饰后，它们的
25 半衰期相对于现有的胰岛素类似物大大提高。然而，仍然需要提供半衰期更长的胰岛素类似物或其酰化衍生物，以提高治疗效果，并维持血糖平稳。并且现有的酰化胰岛素还存在不稳定的问题，也需要提供更为稳定的胰岛素类似物或其酰化衍生物。

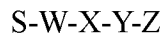
另一方面，生理性胰岛素需求包括基础和餐时（速效），前者提供全天血糖
30 控制，后者主要应对餐后血糖升高。根据其生理特点，理想的餐时胰岛素制剂能在进餐后迅速达峰发挥作用，并能在血糖降到正常水平时降至基础水平，以避免下餐前低血糖。理想的基础胰岛素则应有超长作用时间（在所有患者中持续 >24 h）、最小幅度胰岛素作用变异性（减少低血糖）和安全性，且能与速效胰岛素结合使用（便利性）。由于速效胰岛素降血糖作用十分迅速，这就要求当基础胰岛素与
35 其合用时应当提供一种较为平缓的降血糖作用，以免二者共同作用时产生低血糖的风险。因此，提供一种具有足够长的作用时间，且初始作用时平缓降血糖的基

础胰岛素具有十分迫切的需求。

发明内容

5 本发明的目的是提供一种新的人胰岛素类似物的酰化衍生物，其降低血糖的效果更佳持久，且具有更高的稳定性。

本发明提供的一种人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物，所述人胰岛素类似物的酰化衍生物具有如下通式如示的结构：



(I)

10 其中 S 为 B 链第 30 位苏氨酸缺失的人胰岛素；-W-X-Y-Z 为胰岛素类似物的酰化修饰基团；

其中 W 为具有 $-\text{OC}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 的二酰基结构，其中 n 为 2~10 之间整数，该结构以其酰基之一和母体胰岛素或其类似物的 A-链或 B-链 N-末端氨基酸残基的 α -氨基或 B-链上存在的赖氨酸残基的 ϵ -氨基形成酰胺键；

15 X 为含羧酸基团的二氨基化合物，该化合物以其氨基之一与 W 中的一个酰基连接形成酰胺键；

Y 为 $-\text{A}(\text{CH}_2)_m-$ ，其中 m 为 6-32 的整数，优选 10-16 的整数，特别优选 12-14 的整数，A 不存在或 $\text{CO}-$ ；

Z 为 $-\text{COOH}$ 。

20 优选地，W 与 B-链上存在的赖氨酸残基的 ϵ -氨基形成酰胺键。优选地，n 为 2~5 之间的整数，优选 2。

B 链第 30 位苏氨酸缺失的人胰岛素，是一种人胰岛素类似物，其 A、B 链的氨基酸序列如下所示：

A 链：GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

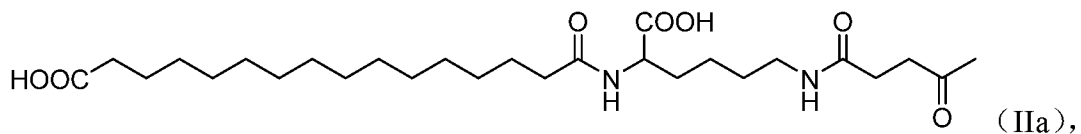
SEQ ID NO.1

25 B 链：FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK

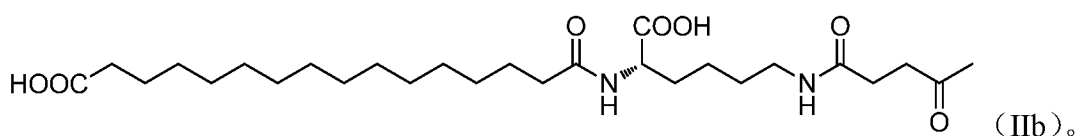
SEQ ID NO.2。

X 代表的含羧酸基团的二氨基化合物可以为 $-\text{HN}(\text{CH}_2)_p\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$ ，其中 p 为 2-10 的整数，优选 2-6 的整数，特别优选 2-4 的整数，最优选 4。

在本发明特别优选的实施方式中，-W-X-Y-Z 具有如下结构：

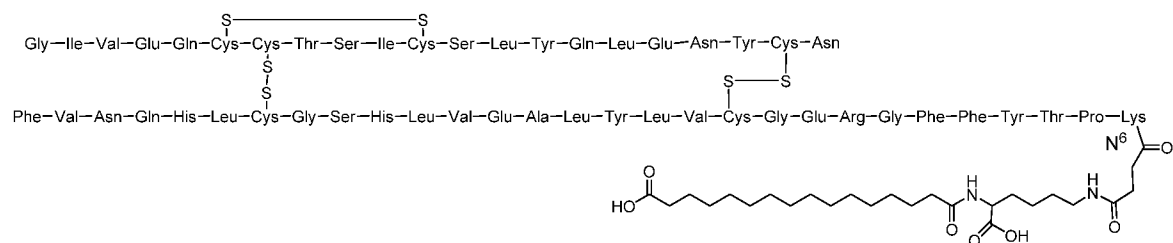


30 优选



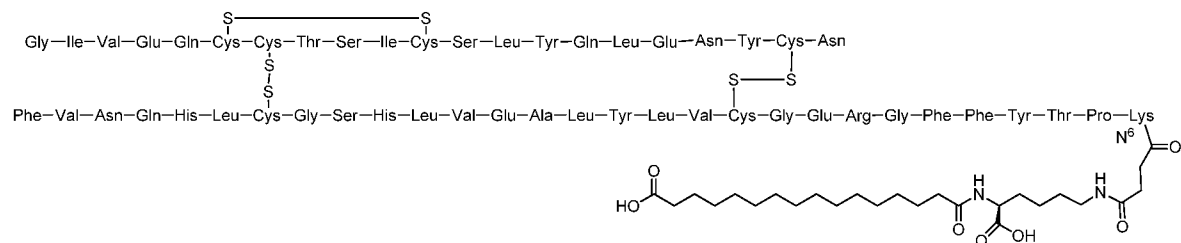
本发明中特别优选的人胰岛素类似物的酰化衍生物可依习惯命名为 $\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\text{N}^\epsilon-(\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-(\text{N}^{\text{B29}}-\text{Des}(\text{B30})\text{人胰岛素}))- \text{Lys}-\text{OH}$ ，其具

有如下式(Ia)的具体结构,



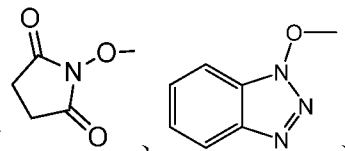
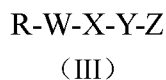
(Ia)

更优选，赖氨酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^ε-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素，其具有式(Ib)所示的结构。

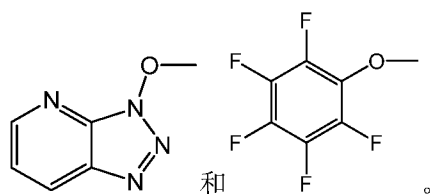


(Ib)

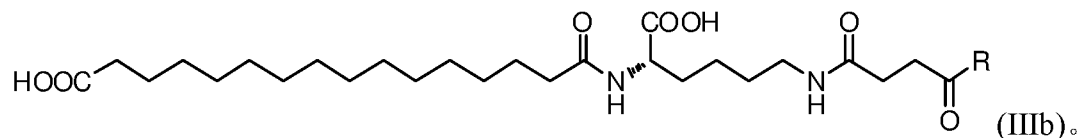
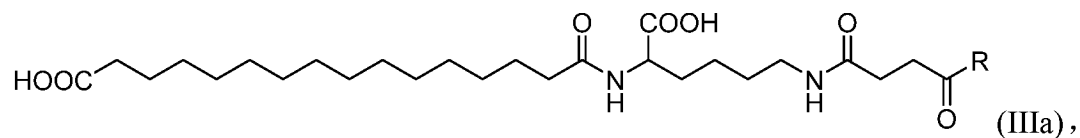
10 本发明还提供了一种制备前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物的制备方法，其包括使式(III)化合物与B链第30位苏氨酸缺失的人胰岛素的步骤，



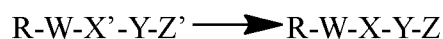
其中 R 为离去基团, 优选活化酯基团, 更优选选自



15 优选的式(III)化合物具体结构可为(IIIa)或(IIIb)所示,



所述的制备方法优选还包括式(III')化合物脱除羧基保护基得到式(III)化合物的步骤,



(III')

(III)

其中, X'、Z'分别代表 X、Z 中所有的羧基被保护基保护的形式, 所述的保护基优选 C₁-C₆ 的烷基, 优选 C₁-C₄ 的烷基, 特别优选甲基或特丁基; R 如通式(III)中定义。

5 在本发明特别优选的实施方案中, 人胰岛素类似物的酰化衍生物的锌复合物是一种人胰岛素类似物的酰化衍生物的 6 聚体, 其中每个 6 聚体中包含多于 4 个锌原子, 即 6 分子酰化胰岛素包含多于 4 个锌原子; 更优选 5 至 8 个锌原子, 特别优选 5 个锌原子。

10 本发明还提供了一种药物组合物, 含前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物, 还含有药学上可接受的载体。

本发明还提供了前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物或其药物组合物在制备治疗糖尿病的药物中的用途。

本发明还提供一种药物组合物, 除含有上述人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物外, 还含有速效胰岛素。

15 本发明还涉及上述人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、或含有它们的药物组合物在制备治疗糖尿病的药物中的用途。

本发明还涉及前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、或含有它们的药物组合物与速效胰岛素联合在制备治疗糖尿病的药物中的用途。

20 另外, 本发明提供了一种治疗糖尿病的方法, 所述方法包括对需要治疗的患者给予前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、或含有它们的药物组合物。

25 本发明提供的另一种治疗糖尿病的方法, 所述方法包括对需要治疗的患者给予前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、或含有它们的药物组合物和速效胰岛素。本发明还涉及前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、或含有它们的药物组合物作为治疗糖尿病的药物。

本发明还涉及前述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、或含有它们的药物组合物联合速效胰岛素作为治疗糖尿病的药物。

本发明中的糖尿病包括 I 型糖尿病和 II 型糖尿病。

30 附图说明

图 1 显示 STZ 大鼠给药后血糖值变化曲线(*P<0.05, **P<0.01 vs 模型对照组; #P<0.05 vs 德谷胰岛素)

图 2 显示 0~6 小时内 STZ 大鼠给药后血糖值变化曲线

35 图 3 显示给药后 0~2、0~4 和 0~6 小时内血糖 AUC 的比较(*P<0.05, **P<0.01 vs INS-C)

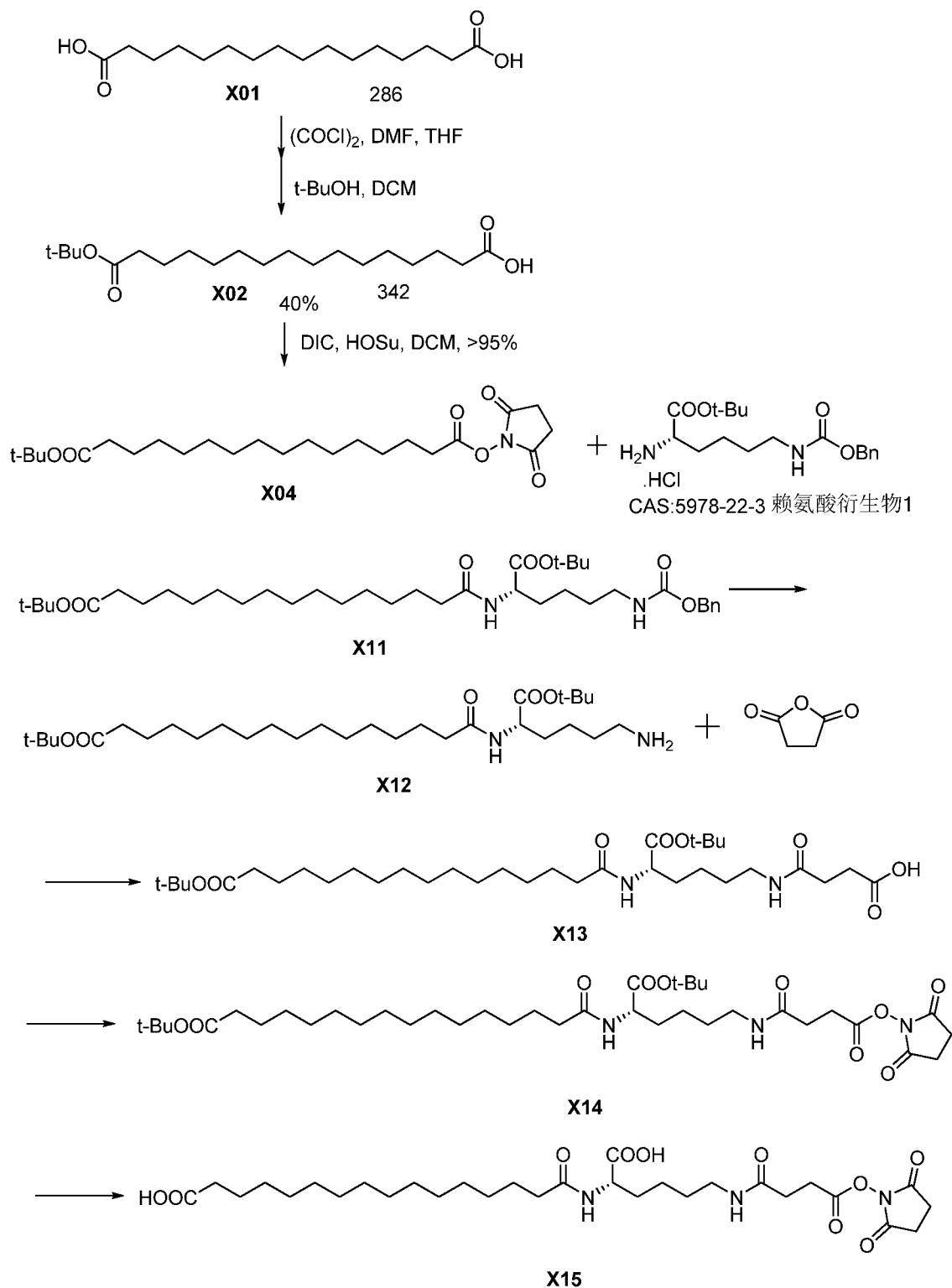
具体实施方式

以下结合实施例进一步描述解释本发明。

实施例 1:

赖氨酸 B29 (N^{ϵ} -(N^{α} -十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸- N^{ϵ} -氧代丁酰基))des(B30)人胰

5 胰岛素的制备

1、 N^{α} -(十六烷脂肪二酸)- N^{ϵ} -(3-酰基丙酸-OSu)赖氨酸的制备

取 X01 (150g, 524.5mmol), 室温下加入干燥的 THF (2.5L), 随后加入催化量的 DMF (1.0mL), 将草酰氯 (49mL) 加入到 100mL 的恒压滴液漏斗中, 将草酰氯缓慢滴加到反应瓶中, 期间有气体生成, 需不断放气, 约滴加两小时。滴加完毕后, 室温搅拌 1.5h, 随后减压旋干 THF, 向反应瓶中加入 DCM (800mL) 和叔丁醇 (500mL), 室温下搅拌过夜。旋干叔丁醇和二氯甲烷, 加入二氯甲烷 (1L), 过滤, 除去不溶固体。滤液旋干过柱。收集所需成分, 旋干, 石油醚重结晶, 得 54g 产品 X02, 同时回收二叔丁酯产物 X03。

将X02 (28.5g, 83.3mmol) 溶于DCM (200mL) 中, 室温下加入N-羟基丁二酰亚胺 (5.54g, 48.1mmol) 和二异丙基碳二酰亚胺 (7.6mL), 室温搅拌1天, TLC 显示基本反应完全。过滤, 除去不溶固体, 减压旋干溶剂, 柱层析纯化, 得28.5g X04。

将 X04 (22g, 50.1mmol) 溶于干燥的 THF (250mL) 中, 室温搅拌, 赖氨酸衍生物 (20.5g, 55mmol) 和三乙胺 (21mL) 分别加入到反应体系中, 室温搅拌 24h。硅藻土过滤, THF 洗涤三次, 旋干溶剂, 柱层析纯化, 得 31g 产物 X11。

将X11 (30.6g, 46.3mmol) 溶于无水乙醇 (200mL) 中, 室温搅拌, 加入6.0g 10% Pd/C, 随后通入氢气, 室温剧烈搅拌反应过夜。硅藻土抽滤, 无水乙醇洗涤三次, 滤液旋干, 得24.5g X12粗品, 直接用于下一步反应。

将X12 (24g, 45.6mmol) 溶于干燥THF (200mL) 中, 加入三乙胺 (12.7mL), 随后降温至0°C。将丁二酸酐 (5.2g, 52mmol) 分批加入到反应体系中, 0°C下继续搅拌30min, 随后转移至室温搅拌过夜。减压旋干THF, 剩余物溶于二氯甲烷 (500mL) 中, 用5%柠檬酸水溶液 (500mL*2) 洗涤2次, 饱和食盐水洗涤1次, 无水硫酸钠干燥。减压旋干溶剂, 得29.0g X13粗品, 直接用于下一步反应。

将X13 (28.5g, 45.5mmol) 溶于DCM (200mL) 中, 室温下加入N-羟基丁二酰亚胺 (5.54g, 48.2mmol) 和二异丙基碳二酰亚胺 (7.6mL), 室温搅拌1天, TLC 显示基本反应完全。过滤, 除去不溶固体, 减压旋干溶剂, 柱层析纯化, 得28.5g 产品X14。

将X14 (3.0g, 4.1mmol) 溶于三氟乙酸 (15mL) 中, 室温搅拌45min, 随后低温减压旋干三氟乙酸, 加入无水乙醚, 有固体析出, 过滤, 滤饼用无水乙醚洗涤三次, 固体干燥后, 得1.8g产品X15。

2、赖氨酸B29 (N^{ϵ} -(N^{α} -十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸- N^{ϵ} -氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素的制备

取B链第30位苏氨酸缺失的人胰岛素53mg (8mg/mL, 50mM Tris HCl pH8.5 缓冲液), 用1.5M Na_2CO_3 调节pH至约10.75, 后用缓冲液 (50mM Tris HCl pH8.5 缓冲液) 定容至4mg/mL。将 N^{ϵ} -(十六烷脂肪二酸)- N^{ϵ} -(3-酰基丙酸-OSu)赖氨酸 (18mg) 悬浮于7mL乙腈后, 每隔15min将1.75mL本溶液加入到上述B链第30位苏氨酸缺失的人胰岛素溶液中开始反应, 分4次加完, 同时搅拌。加完后开始计时, 反应1h后, 用乙酸将溶液pH调节至约7.5, 终止反应, 获得粗品溶液。采用RP-HPLC对反应过

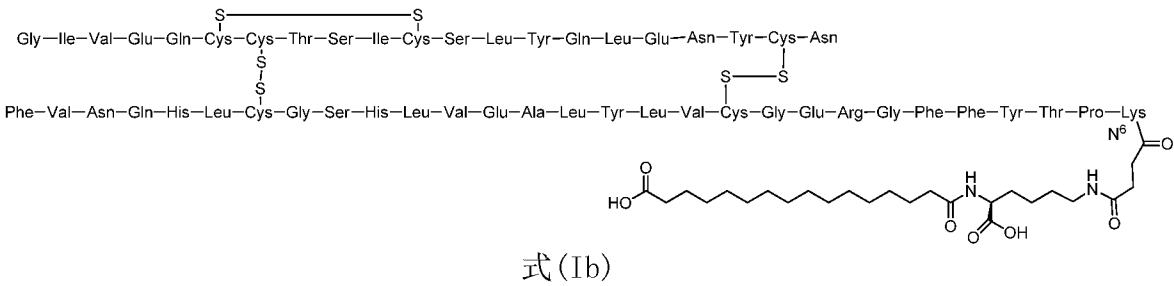
程进行中控。

3、赖氨酸B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^ε-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素的纯化

将上述前体粗品溶液加入水稀释使有机相含量约15% (v:v)，用0.45μm滤膜过滤后采用RP-HPLC对其进行纯化得纯化液。

4、赖氨酸B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^ε-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素的超滤及冻干

将上述纯化溶液用超滤膜包系统将样品置换至注射用水中，进行冻干获得冻干产物26mg。所得分子结构式如下。



5、赖氨酸B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^ε-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素结构确证

赖氨酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^ε-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素实测质谱分子量为 6203.37Da，与理论分子量 6203.21Da 一致。

用 V8 蛋白酶对 INS 进行酶解，并对酶解产物进行 LC-MS 分析，结果显示共产生 4 个肽段，肽段分子量分别为 416.23Da(A1-A4)、2968.29Da(A5-A17,B1-B13)、1376.57Da (A18-A21,B14-B21) 和 1510.84Da (B22-B29)，与理论肽段分子量相符，其中肽段 B22-B29 为脂肪酸链修饰的肽段。证明修饰位点和预期一致。

20 实施例 2：考察受试药物在 STZ 诱导的 I 型糖尿病模型上的降血糖作用

1、供试品

名称	受试药物(INS-1)	受试药物(INS-2)	德谷胰岛素
供应商	江苏恒瑞	江苏恒瑞	诺和诺德
物理状态	无色液体	无色液体	无色液体
储存条件	4℃	4℃	4℃

其中，INS-1 和 INS-2 分别代表将赖氨酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^ε-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素制备成每个胰岛素衍生物六聚体包含 5 个 Zn 和 8 个 Zn 的两种不同复合物，其配制方法为本领域常规方法，德谷胰岛素中每六聚体包含 5 个 Zn。

2、供试品配制

供试品避光保存在 4℃条件下，取适量受试样品母液 600 nmol/mL，用溶媒稀释 400 倍至 1.5nmol/mL，剂量为 7.5 nmol/kg。使用时药物恢复至室温。

3、实验动物

种属	SD 大鼠
级别	SPF 动物
订购周龄	6 周
实验开始时周龄	8-9 周
体重范围	300-400 克
性别	雄性
供应商	斯莱克实验动物有限公司
供应商地址	中国，上海
动物识别方法	尾部记号笔标记
动物订购数量	50 只
动物使用数量	40 只

5 4、实验方法

SPF 级大鼠实验室环境饲养 7 天，均以标准饲料、标准笼喂养，温度 20-25℃，湿度 40-60%。造模前一天，大鼠禁食 16 小时，腹腔快速注射 STZ (65 mg/kg)，1 小时后，恢复给食。造模后每日给予充足饮水（提供正常的 2-3 倍的饮水量）、食物，每日换垫料 1-2 次，保持干燥。在第五天测量空腹血糖（禁食 6 小时），挑出血糖值>16.7 mmol/L 的大鼠。根据血糖水平，将其分为 4 组。

10 动物分组及给药信息如下：

组别	动物类型	动物数	给药剂量 (nmol/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药方式	给药频率
溶媒对照	STZ 大鼠	10	/	5	SC	一次
德谷胰岛素	STZ 大鼠	10	7.5	5	SC	一次
INS-1	STZ 大鼠	10	7.5	5	SC	一次
INS-2	STZ 大鼠	10	7.5	5	SC	一次

给药前不禁食，单次皮下注射各药物，对照组用溶媒注射相同体积，给药后全程禁食。给药后 1、2、4、6、8、10、12、24 小时测定大鼠血糖值。24 小时点测完血糖值后，采血制备血清。

15 所有的数据被录入到 Excel 文档中，并以 Mean ± SEM 的方式表示。数据分析使用 Graphpad Prism 6.0 软件，单因素或双因素方差分析比较方法，以 P<0.05

作为显著性差异的判断标准。

5、结果：

SD 大鼠注射 STZ 后第五天，禁食 6 小时，进行血糖测试，造模成功率达 80%。

由图 1 可见，STZ 溶媒组基础血糖值给药前为 27.3 mmol/L，给药后其血糖值逐步降低，24 小时后达到 15.1 mmol/L，血糖变化值为 12.1 mmol/L。阳性药德谷胰岛素组给药前后血糖值变化为 16.8 mmol/L。阳性药物德谷胰岛素组给药后 6、8、10、12 和 24 小时时间点，其血糖水平与溶媒阴性对照组比较都具有显著性差异，表明该动物模型及实验方法的有效性。

与溶媒阴性对照组比较，受试药物 INS-1 和 INS-2 在给药后 24 小时内均能显著降低动物的血糖水平，在 6、8、10、12 和 24 小时时间点都具有显著性差异，并且血糖水平持续下降，表明其具有良好的长效降糖作用。

试药物 INS-1 和 INS-2 对于 STZ 大鼠，其血糖值随给药后时间的变化曲线基本一致，表明两者的降糖效果类似。在 24 小时时间点，INS-1 和 INS-2 的降糖效果优于德谷胰岛素组，表明 INS-1 和 INS-2 具有更好的长效作用。

实施例 3：考察各种长效胰岛素在 STZ 诱导的 I 型糖尿病模型上的降血糖作用
1、供试品

名称	INS-A	INS-B	INS-C	德谷胰岛素
供应商	江苏恒瑞	江苏恒瑞	江苏恒瑞	诺和诺德
物理状态	无色液体	无色液体	无色液体	无色液体
储存条件	4℃	4℃	4℃	4℃

其中 INS-A 代表 WO2013086927 中的 HS061、INS-B 代表 WO2013086927 中的 HS067、INS-C 代表赖氨酸 B29 (N^ε-(N^α-十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸-N^ε-氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素，所有供试品均使用相同的处方，且使用锌复合物形式，每个胰岛素六聚体包含 5 个 Zn。

2、供试品配制

供试品避光保存在 4℃ 条件下，取适量受试样品母液 600 nmol/mL，用溶媒稀释 80 倍至 7.5 nmol/mL，剂量为 7.5 nmol/kg。使用时药物恢复至室温。

25 3、实验动物

种属	SD 大鼠
级别	SPF 动物
订购周龄	6 周
实验开始时周龄	8-9 周
体重范围	300-400 克

性别	雄性
供应商	北京维通利华实验动物技术有限公司
供应商地址	中国，北京
动物识别方法	尾部记号笔标记
动物订购数量	60 只
动物使用数量	40 只

4、实验方法

SPF 级大鼠实验室环境饲养 7 天，均以标准饲料、标准笼喂养，温度 20-25℃，湿度 40-60%。造模前一天，大鼠禁食 16 小时，腹腔快速注射 STZ (65 mg/kg)，1 小时后，恢复给食。造模后每日给予充足饮水（提供正常的 2-3 倍的饮水量）、食物，每日换垫料 1-2 次，保持干燥。在第五天测量空腹血糖（禁食 6 小时），挑出血糖值>16.7 mmol/L 的大鼠。根据血糖水平随机分为 5 组。

动物分组及给药信息如下：

组别	动物类型	动物数	给药剂量 (nmol /kg)	给药体积 (mL/kg)	给药方式	给药频率
溶媒对照	STZ 大鼠	8	/	1	SC	一次
德谷胰岛素	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次
INS-A	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次
INS-B	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次
INS-C	STZ 大鼠	8	7.5	1	SC	一次

给药前不禁食，单次皮下注射各药物，对照组用溶媒注射相同体积，给药后全程禁食。给药后 1、2、4、6、8、10、12、24 小时测定大鼠血糖值。

所有的数据被录入到 Excel 文档中，并以 Mean ± SEM 的方式表示。数据分析使用 SPSS 软件，单因素或双因素方差分析比较方法，以 $P<0.05$ 作为显著性差异的判断标准。

5、结果

STZ 溶媒组基础血糖值给药前为 27.01 mmol/L，给药后其血糖值逐步降低，24 小时后达到 11.64 mmol/L，血糖变化值为 15.37 mmol/L。阳性药德谷胰岛素组给药前后血糖值变化为 19.78 mmol/L。阳性药物德谷胰岛素组给药后 1、2、4、6、8、10 和 12 小时时间点，其血糖水平与溶媒阴性对照组比较都具有显著性差异，表明该动物模型及实验方法的有效性。

与溶媒阴性对照组比较，受试药物 INS-A、INS-B 和 INS-C 在给药后 24 小时内均能显著降低动物的血糖水平，从血糖值来看，受试药物的血糖值（分别为

7.03±1.15、3.57±0.44 及 4.20±0.72 mmol/L) 低于溶媒阴性对照组 (11.64±3.94 mmol/L)。这表明三者均具有较良好的长效降糖作用。重点比较了各组在 0~6 小时内降低血糖的差异性, 具体数值如表 1 和表 2 所示:

表 1 单次给药对 STZ 诱导的 I 型糖尿病大鼠血糖的影响 (Mean ± SEM, n=8)

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

5 注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 空白溶媒组; \$ $P<0.05$, \$\$ $P<0.01$ vs INS-C。

表 2 单次给药后 0~2、0~4 及 0~6 小时内的血糖 AUC 值 (Mean ± SEM, n=8)

组别	血糖 AUC 值 (mmol/L·h)		
	0~2 小时	0~4 小时	0~6 小时
德谷胰岛素	39.92±1.35\$\$	57.24±3.54\$	62.49±3.84\$
INS-A	38.17±1.09\$\$	50.93±2.96\$\$	55.03±3.34\$\$
INS-B	39.52±1.40\$\$	56.56±3.49\$	61.74±4.40\$
INS-C	45.42±1.25	69.52±3.74	76.81±5.09

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

10 INS-C 和德谷胰岛素对于 STZ 大鼠, 给药后 INS-C 组血糖值下降幅度小于德谷胰岛素, 且在给药 1 小时后显著高于德谷胰岛素组 (见图 2 和表 1)。具体数值如表 1 所示。另由图 3 和表 2 可见, INS-C 在给药后 0~2、0~4 和 0~6 小时内血糖-时间曲线下面积 (AUC) 均显著高于德谷胰岛素。这表明, 若与速效胰岛素联合给药或组成复方制剂给药, INS-C+速效胰岛素在给药后 0~6 小时内 (速效胰岛素发挥降血糖作用的时间段) 发生低血糖的风险明显低于德谷胰岛素+速效胰岛素。

15 INS-C 和 INS-A 对于 STZ 大鼠, 给药后 INS-C 组血糖值下降幅度小于 INS-A, 且在给药 1、2 和 4 小时后显著高于 INS-A 组; 而在给药 10 和 12 小时后则显著低于 INS-A 组, 给药 24 小时后血糖值也有低于 INS-A 组的趋势。表明 INS-C 降血糖速度慢于 INS-A, 且长效作用也优于 INS-A, 更符合长效胰岛素的作用特点。此外, 由图 3 可见, INS-C 在给药后 0~2、0~4 和 0~6 小时内血糖 AUC 均显著高于

INS-A。这表明，若与速效胰岛素联合给药或组成复方制剂给药，INS-C+速效胰岛素在给药后 0~6 小时内发生低血糖的风险明显低于 INS-A+速效胰岛素。

INS-C 和 INS-B 对于 STZ 大鼠，给药后 INS-C 组血糖值下降幅度小于 INS-B，且在给药 1 和 2 小时后显著高于 INS-B 组，表明 INS-C 降血糖速度慢于 INS-B。

- 5 此外，由图 3 可见，INS-C 在给药后 0~2、0~4 和 0~6 小时内血糖 AUC 均显著高于 INS-B。这表明，若与速效胰岛素联合给药或组成复方制剂给药，INS-C+速效胰岛素在给药后 0~6 小时内发生低血糖的风险明显低于 INS-B+速效胰岛素。

- 综合 24 小时和 0~6 小时内降血糖的效果，INS-C 有降糖作用持久且初期降糖平缓的特点，是最为理想的长效胰岛素，特别适合于与速效胰岛素联合或组成复方，从而减少注射次数，提高患者的依从性。

实施例 4：犬 PK 试验（INS-B 和 INS-C 与实施例 3 中具有相同的含义）

- 6 只雄性比格犬（每组 3 只）单次皮下注射 INS-B 或 INS-C（3 nmol/kg）后，不同时间点采血并分离血清，检测血清中 INS-B 或 INS-C 的浓度。结果显示，INS-B 在 4.7 ± 1.2 小时（3 只动物分别为 4、4 和 6 小时）内达峰，而 INS-C 则为 8 小时（三只动物均为 8 小时）达峰。INS-B 和 INS-C 的半衰期分别为 6.0 ± 1.2 和 7.8 ± 1.1 小时。这提示 INS-C 作用更为平缓且作用时间更长。

实施例 5：稳定性比较

- INS-A、INS-B、INS-C（各种代号与实施例 3 含义相同）、德谷胰岛素均按照德谷胰岛素上市处方制备成制剂，然后考察它们的稳定性，使用 HPLC 测定起始和各时间点主峰纯度以及杂质含量，具体结果如表 3 所示。从表 3 可以看出，INS-C 的稳定性明显优于 INS-A 和 INS-B；略优于德谷胰岛素。

表 3 稳定性数据比较

供试品	条件/时间	主峰纯度%	归一化总杂%
INS-C	0 天	99.40	0.60
INS-A		99.22	0.78
INS-B		98.48	1.52
德谷胰岛素		99.02	0.98
INS-C	40℃7 天	98.86	1.14
INS-A		95.86	4.14
INS-B		94.86	5.14
德谷胰岛素		98.11	1.89
INS-C	55℃7 天	93.15	6.85
INS-A		52.00	48.00
INS-B		53.56	46.44
德谷胰岛素		91.67	8.33
INS-C	40℃14 天	98.38	1.62
德谷胰岛素		97.75	2.25

INS-C	55℃ 14 天	87.94	12.06
德谷胰岛素		86.71	13.29

注：由于 7 天时 INS-A 和 INS-B 杂质增长已经过快，所以后续未再测 14 天数据。

权利要求书:

1. 一种人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物, 所述人胰岛素类似物的酰化衍生物具有如下通式如示的结构:



其中 S 为 B 链第 30 位苏氨酸缺失的人胰岛素; -W-X-Y-Z 为胰岛素类似物的酰化修饰基团;

10 其中 W 为具有 $-\text{OC}(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ 的二酰基结构, 其中 n 为 2~10 之间整数, 该结构以其酰基之一和母体胰岛素或其类似物的 A-链或 B-链 N-末端氨基酸残基的 α -氨基或 B-链上存在的赖氨酸残基的 ϵ -氨基形成酰胺键;

X 为含羧酸基团的二氨基化合物, 该化合物以其氨基之一与 W 中的一个酰基连接形成酰胺键;

15 Y 为 $-\text{A}(\text{CH}_2)_m-$, 其中 m 为 6-32 的整数, 优选 10-16 的整数, 特别优选 12-14 的整数, A 不存在或为 $\text{CO}-$;

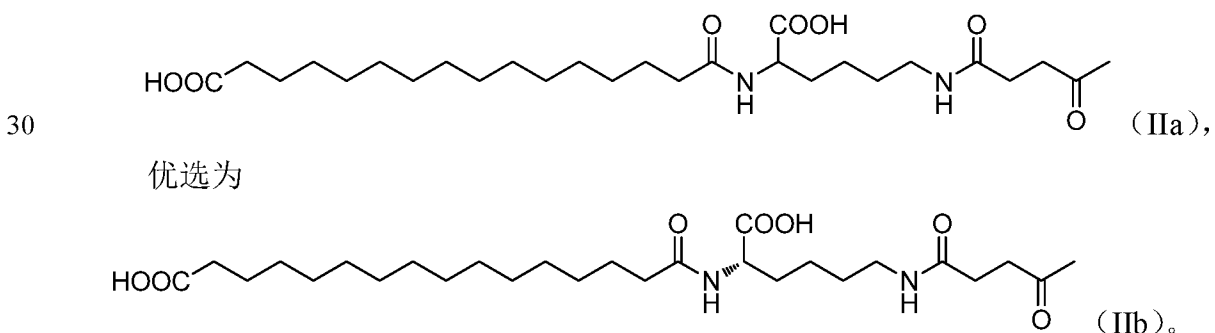
Z 为 $-\text{COOH}$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物, 其中 W 与 B-链上存在的赖氨酸残基的 ϵ -氨基形成酰胺键。

20 3. 根据权利要求 1 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物, 其中 n 为 2~5 之间的整数, 优选 2。

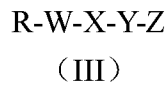
25 4. 根据权利要求 1 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物, 其中 X 为 $-\text{HN}(\text{CH}_2)_p\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, p 为 2-10 的整数, 优选 2-6 的整数, 特别优选 2-4 的整数, 最优选 4。

5. 根据权利要求 1 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物, 其中 -W-X-Y-Z 具有如下结构:

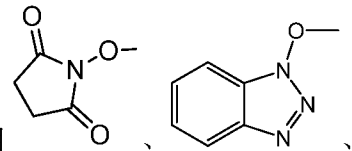
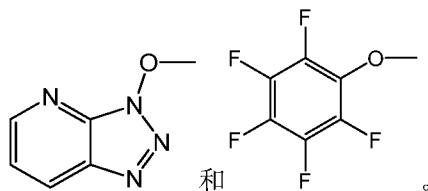


6. N^{α} -($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}$)- N^{ϵ} -($\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ -($N^{\epsilon\text{B29}}$ -Des(B30)人胰岛素))-Lys-OH 或其锌复合物, 优选赖氨酸 B29 (N^{ϵ} -(N^{α} -十六烷脂肪二酸-L-赖氨酸- N^{ϵ} -氧代丁酰基))des(B30)人胰岛素或其锌复合物。

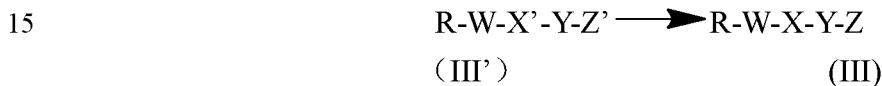
- 5 7. 一种权利要求 1 至 5 任意一项所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物的制备方法, 其包括使式 (III) 化合物与 B 链第 30 位苏氨酸缺失的人胰岛素反应的步骤,



10 其中 R 为离去基团, 优选活化酯基团, 更优选选自



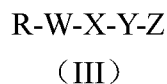
8. 根据权利要求 7 所述的方法, 还包括式 (III') 化合物脱除羧基保护基得到式 (III) 化合物的步骤,



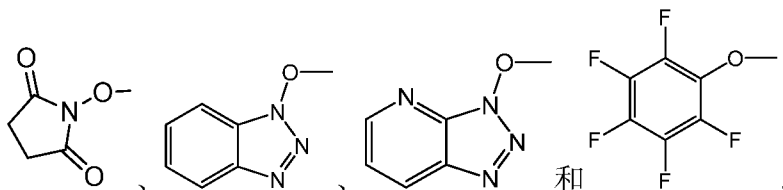
其中, X' 、 Z' 分别代表 X、Z 中所有的羧基被保护基保护的形式, 所述的保护基优选 C_1 - C_6 的烷基, 优选 C_1 - C_4 的烷基, 特别优选甲基或特丁基; R 如权利要求 7 中定义。

20

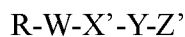
9. 一种式 (III) 所示化合物,



25 其中 W、X、Y、Z 如权利要求 1 至 5 中任意一项所定义, R 为离去基团, 优选活化酯基团, 更优选选自



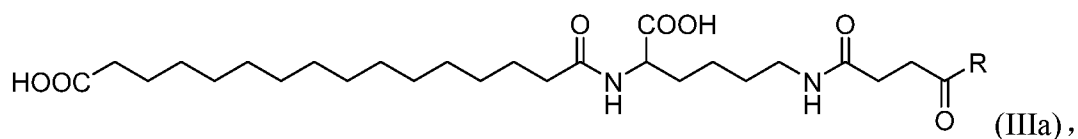
10. 一种通过将权利要求 9 中式(III)化合物的 X 和 Z 中所有羧基经过羧基保护得到的式 (III') 所示的化合物,



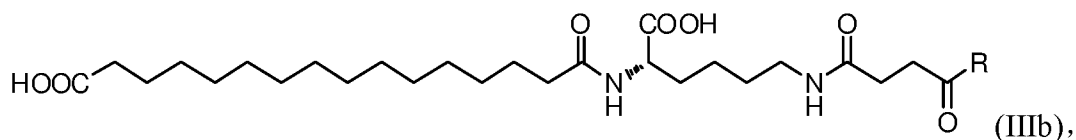
(III')

其中, X'、Z'分别代表 X、Z 中所有的羧基被保护基保护的形式, 所述的保护基优选 C₁-C₆ 的烷基, 优选 C₁-C₄ 的烷基, 特别优选甲基或特丁基。

11. 根据权利要求 9 所述的化合物, 其为



优选



其中 R 如权利要求 9 中定义。

12. 根据权利要求 1 至 6 任意一项所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物的锌复合物, 其中每 6 分子酰化胰岛素包含多于 4 个锌原子。

13. 一种药物组合物, 含权利要求 1-5 任意一项所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物或权利要求 12 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物的锌复合物, 还含有药学上可接受的载体。

14. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 还含有速效胰岛素。

15. 权利要求 1 至 6 任意一项所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、权利要求 12 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物的锌复合物、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物在制备治疗糖尿病的药物中的用途。

16. 权利要求 1 至 6 任意一项所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、权利要求 12 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物的锌复合物、或权利要求 13 所述的药物组合物与速效胰岛素联合在制备治疗糖尿病的药物中的用途。

17. 一种治疗糖尿病的方法, 所述方法包括对需要治疗的患者给予权利要求 1 至 6 任意一项所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、权利要求 12 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物的锌复合物、或权利要求 13 或 14 所述的药物组合物。

18. 一种治疗糖尿病的方法,所述方法包括对需要治疗的患者给予权利要求 1 至 6 任意一项所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物或其锌复合物、权利要求 12 所述的人胰岛素类似物的酰化衍生物的锌复合物、或权利要求 13 所述的药物组合物和速效胰岛素。

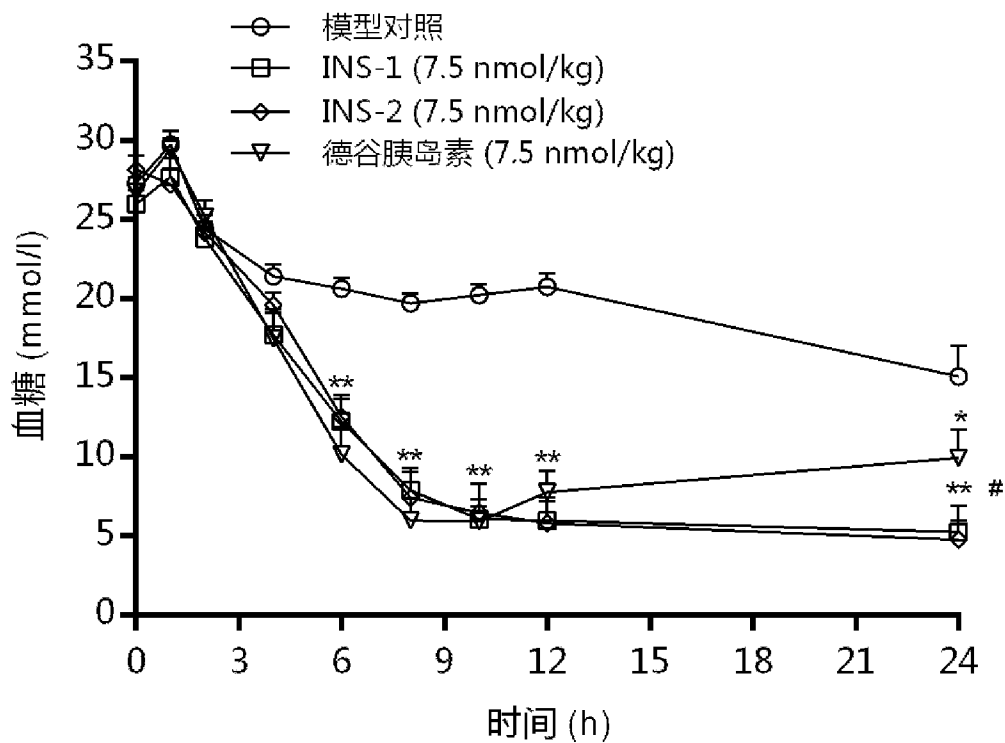


图 1

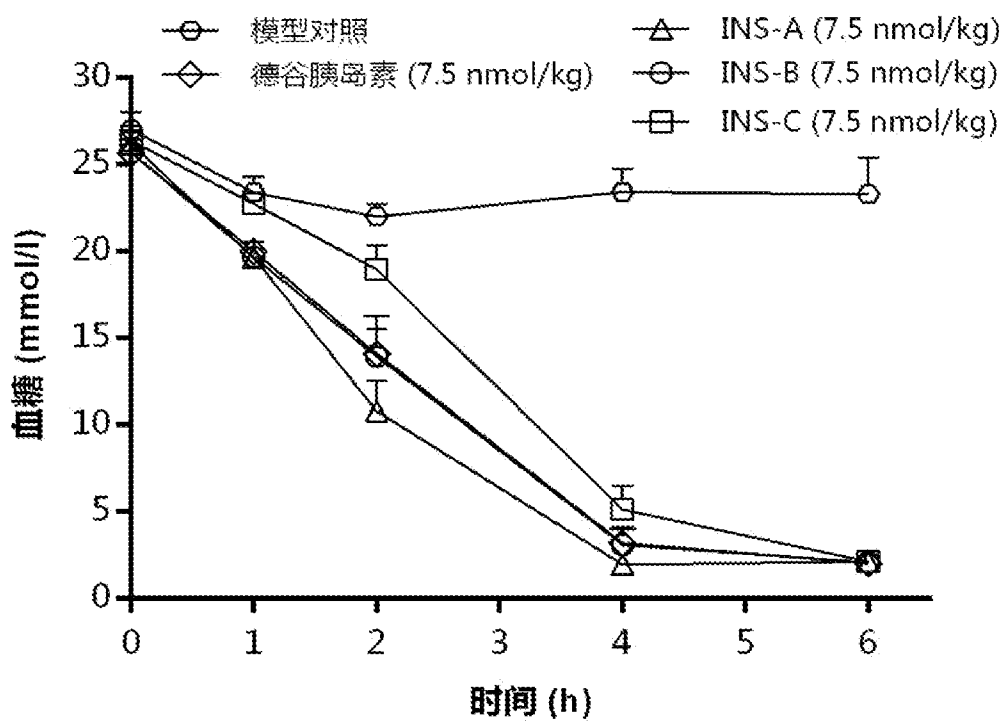


图 2

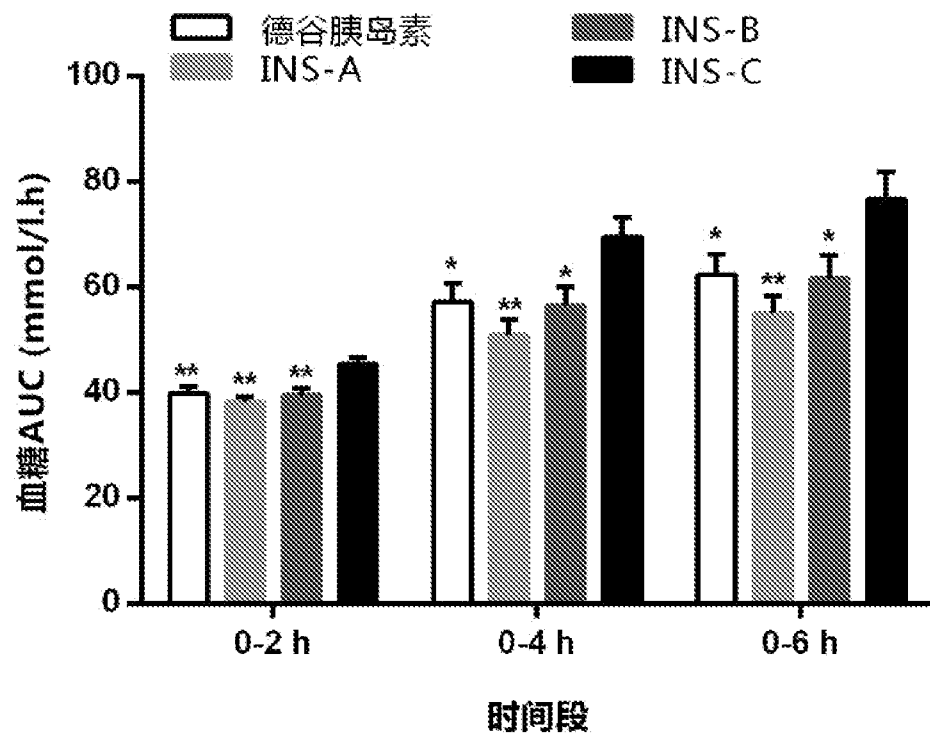


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/095377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/62 (2006.01) i; C07K 1/107 (2006.01) i; C07K 1/06 (2006.01) i; A61K 38/28 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/- C07K 1/- A61K 38/- A61P 3/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Database: CNKI, DWPI, CNABS, CNTXT;

Search Words: LIU, Deyu; HENGRUI; human insulin, insulin, acylated, diabetes mellitus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106496322 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.), 15 March 2017 (15.03.2017), claims 1-16	1-18
X	WO 2013086927 A1 (SHANGHAI HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.), 20 June 2013 (20.06.2013), abstract, claims 1-29, and description, embodiment 2	1-18
Y	WO 2013086927 A1 (SHANGHAI HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.), 20 June 2013 (20.06.2013), abstract, claims 1-29, and description, embodiment 2	1-8, 12-18
Y	CN 101389650 A (NOVO NORDISK A/S), 18 March 2009 (18.03.2009), abstract, and claims 1-36	1-8, 12-18
A	CN 1829738 A (NOVO NORDISK A/S), 06 September 2006 (06.09.2006), the whole document	1-18
A	CN 101784563 A (NOVO NORDISK A/S), 21 July 2010 (21.07.2010), the whole document	1-18
A	CN 1133598 A (NOVO NORDISK A/S), 16 October 1996 (16.10.1996), the whole document	1-18
A	CN 86106574 A (NOVO NORDISK A/S), 03 August 1988 (03.08.1988), the whole document	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 August 2017 (25.08.2017)	Date of mailing of the international search report 13 September 2017 (13.09.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer GAO, Chao Telephone No.: (86-10) 010-62413747

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/095377

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/095377

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 [1] claims 17 and 18 set forth a method for treating diabetes, which relates to a method of treatment of a human body by therapy according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). Therefore, a search to claims 17 and 18 is carried out based on the purposes of the corresponding acyl derivatives in preparing drugs for treating diabetes.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/095377

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106496322 A	15 March 2017	None	
WO 2013086927 A1	20 June 2013	HK 1188795 A1	21 July 2017
		CN 104788556 A	22 July 2015
		AU 2012350586 B2	02 February 2017
		CN 103443122 B	11 May 2016
		CN 103443122 A	11 December 2013
		MX 2014006698 A	09 July 2014
		JP 6153206 B2	28 June 2017
		EP 2784085 A4	08 July 2015
		CA 2858253 A1	20 June 2013
		US 9458219 B2	04 October 2016
		IN 933MUN2014 A	01 May 2015
		TW 201323439 A	16 June 2013
		EP 2784085 A1	01 October 2014
		RU 2014127270 A	10 February 2016
		AU 2012350586 A1	03 July 2014
		US 2014329745 A1	06 November 2014
		KR 20140104994 A	29 August 2014
		JP 2015501819 A	19 January 2015
CN 101389650 A	18 March 2009	EP 2505593 A1	03 October 2012
		JP 5026567 B2	12 September 2012
		WO 2007074133 A3	11 October 2007
		JP 2009522231 A	11 June 2009
		US 2014328943 A1	06 November 2014
		JP 4808785 B2	02 November 2011
		WO 2007074133 A2	05 July 2007
		CN 101389650 B	10 October 2012
		AT 519780 T	15 August 2011
		ES 2371361 T3	30 December 2011
		JP 2011121963 A	23 June 2011
		DK 1969004 T3	28 November 2011
		EP 1969004 A2	17 September 2008
		US 2009074882 A1	19 March 2009
		JP 2011006428 A	13 January 2011
		PT 1969004 E	25 November 2011
		PL 1969004 T3	31 January 2012
		EP 1969004 B1	10 August 2011
CN 1829738 A	06 September 2006	RU 2352581 C2	20 April 2009
		RU 2006103280 A	20 September 2007
		EP 2287184 A2	23 February 2011
		PT 2275439 E	25 June 2014
		EP 2275439 B1	26 March 2014
		PT 2107069 E	23 April 2013
		EP 2264066 A2	22 December 2010
		SI 2107069 T1	30 April 2013
		DK 2275439 T3	12 May 2014
		ZA 200600846 B	25 April 2007
		ES 2402592 T3	07 May 2013
		KR 101186851 B1	02 October 2012
		DK 2107069 T3	15 April 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/095377

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101784563 A	21 July 2010	CN 1829738 B	04 July 2012
		EP 2264066 A3	27 July 2011
		KR 20120026629 A	19 March 2012
		ZA 200600846 A	25 April 2007
		ES 2472421 T3	01 July 2014
		CN 101955527 B	20 April 2016
		EP 2275439 A2	19 January 2011
		CN 101955527 A	26 January 2011
		EP 2287184 A3	10 August 2011
		EP 2275439 A3	23 March 2011
		JP 5721432 B2	20 May 2015
		EP 2178910 B1	08 October 2014
		JP 2010535849 A	25 November 2010
		US 8962794 B2	24 February 2015
		WO 2009022006 A1	19 February 2009
		ES 2526924 T3	16 January 2015
		CN 101784563 B	04 February 2015
		US 2011098439 A1	28 April 2011
CN 1133598 A	16 October 1996	EP 2178910 A1	28 April 2010
		US 9035020 B1	19 May 2015
		US 2015148521 A1	28 May 2015
		CZ 287945 B6	14 March 2001
		NO 2004006 12	04 February 2008
		IL 110977 D0	28 November 1994
		NZ 273285 A	24 October 1997
		JP H09502867 A	25 March 1997
		HU 217684 B	28 March 2000
		NO 316944 B1	05 July 2004
		JP 3014764 B2	28 February 2000
		AT 204882 T	15 September 2001
		EP 0792290 A1	03 September 1997
		LU 91101 12	08 November 2004
		NL 300160 11	01 December 2004
		FI 961220 A0	15 March 1996
		FI 961220 A	14 May 1996
		PL 178466 B1	31 May 2000
		BG 100420 A	31 December 1996
		HU T75991 A	28 May 1997
		HU 9600676 D0	28 May 1996
		JP 2000060556 A	29 February 2000
		NL 300160 12	01 July 2005
		NO 961070 A	15 May 1996
		AU 4846197 A	19 February 1998
		SK 282495 B6	05 February 2002
		SI 792290 T1	31 December 2001
		CA 2171424 A1	23 March 1995
		PL 313444 A1	08 July 1996
		CN 1056618 C	20 September 2000
		DK 792290 T3	01 October 2001
		AU 7652094 A	03 April 1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/095377

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 86106574 A	03 August 1988	DE 122004000035 11	24 February 2005
		DE 69428134 T2	02 May 2002
		FI 117055 B	31 May 2006
		NO 961070 D0	15 March 1996
		EP 0792290 B1	29 August 2001
		BG 61611 B1	30 January 1998
		ES 2163451 T3	01 February 2002
		DE 122004000035 12	06 August 2009
		JP 3917333 B2	23 May 2007
		IL 110977 A	29 June 2000
		JP 4060583 B2	12 March 2008
		EP 1132404 A3	27 March 2002
		PT 792290 E	30 January 2002
		CA 2171424 C	04 June 2002
		WO 9507931 A1	23 March 1995
		SK 32496 A3	06 November 1996
		DK 0792290 T3	01 October 2001
		EP 1132404 A2	12 September 2001
		JP 2002308899 A	23 October 2002
		RU 2164520 C2	27 March 2001
		US 5618913 A	08 April 1997
		AU 593274 B2	08 February 1990
		NO 863474 A	02 March 1987
		AU 6206686 A	05 March 1987
		CS 8606310 A2	12 September 1990
		AT 113061 T	15 November 1994
		GR 862233 B	31 December 1986
		FI 863512 A	01 March 1987
		NO 863474 D0	29 August 1986
		CA 1306212 C	11 August 1992
		FI 102182 B1	30 October 1998
		NO 177009 C	05 July 1995
		NL 990042 12	01 March 2000
		HU T42526 A	28 July 1987
		NO 177009 B	27 March 1995
		KR 940000756 B1	29 January 1994
		YU 46023 B	21 December 1992
		EP 0214826 B1	19 October 1994
		JP 2662390 B2	08 October 1997
		YU 148486 A	30 April 1991
		NL 990042 11	01 February 2000
		CS 275613 B6	18 March 1992
		DE 3650101 D1	24 November 1994
		FI 102182 B	30 October 1998
		PH 25772 A	18 October 1991
		YU 46857 B	24 June 1994
		IL 79887 D0	30 November 1986
		JP S6253999 A	09 March 1987
		HU 206518 B	30 November 1992
		FI 863512 A0	29 August 1986

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/095377

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CN 1029977 C	11 October 1995
		LU 90484 12	21 February 2000
		IE 862317 L	28 February 1987
		YU 4188 A	30 June 1990
		ES 2001624 A6	01 June 1988
		DE 10075008 12	21 October 2004
		IL 79887 A	21 November 1991
		DE 3650101 T2	23 February 1995
		EP 0214826 A2	18 March 1987
		AR 241801 A1	30 December 1992
		EP 0214826 A3	03 June 1987
		DE 10075008 11	18 May 2000
		IE 66138 B1	13 December 1995
		NZ 217406 A	29 May 1989

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/095377

A. 主题的分类

C07K 14/62(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; C07K 1/06(2006.01)i; A61K 38/28(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K14/- C07K1/- A61K38/- A61P3/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNKI, DWPI, CNABS, CNTXT; 检索词: 恒瑞, 刘德玉, 人胰岛素, 酰化, 糖尿病, hengrui, human insulin, insulin, acylated, diabetes mellitus

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 106496322 A (江苏恒瑞医药股份有限公司) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 权利要求1-16	1-18
X	WO 2013086927 A1 (上海恒瑞医药有限公司等) 2013年 6月 20日 (2013 - 06 - 20) 说明书摘要, 权利要求1-29, 说明书实施例2	1-18
Y	WO 2013086927 A1 (上海恒瑞医药有限公司等) 2013年 6月 20日 (2013 - 06 - 20) 说明书摘要, 权利要求1-29, 说明书实施例2	1-8, 12-18
Y	CN 101389650 A (诺沃-诺迪斯克有限公司) 2009年 3月 18日 (2009 - 03 - 18) 摘要, 权利要求1-36	1-8, 12-18
A	CN 1829738 A (诺沃诺第克公司) 2006年 9月 6日 (2006 - 09 - 06) 全文	1-18
A	CN 101784563 A (诺沃-诺迪斯克有限公司) 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21) 全文	1-18
A	CN 1133598 A (诺沃诺第克公司) 1996年 10月 16日 (1996 - 10 - 16) 全文	1-18
A	CN 86106574 A (诺沃工业联合股票公司) 1988年 8月 3日 (1988 - 08 - 03) 全文	1-18

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 8月 25日

国际检索报告邮寄日期

2017年 9月 13日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

高超

电话号码 (86-10)010-62413747

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☐ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☒ 为检索之用随后提交本单位
2. ☒ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 17-18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求17-18请求保护一种治疗糖尿病的方法，涉及对人体进行治疗的方法，属于细则39.1(IV)规定的情形。因此，对权利要求17-18的检索是基于相应酰化衍生物等在制备治疗糖尿病的药物中的用途进行的。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/095377

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106496322	A	2017年 3月 15日	无			
WO	2013086927	A1	2013年 6月 20日	HK	1188795	A1	2017年 7月 21日
				CN	104788556	A	2015年 7月 22日
				AU	2012350586	B2	2017年 2月 2日
				CN	103443122	B	2016年 5月 11日
				CN	103443122	A	2013年 12月 11日
				MX	2014006698	A	2014年 7月 9日
				JP	6153206	B2	2017年 6月 28日
				EP	2784085	A4	2015年 7月 8日
				CA	2858253	A1	2013年 6月 20日
				US	9458219	B2	2016年 10月 4日
				IN	933MUN2014	A	2015年 5月 1日
				TW	201323439	A	2013年 6月 16日
				EP	2784085	A1	2014年 10月 1日
				RU	2014127270	A	2016年 2月 10日
				AU	2012350586	A1	2014年 7月 3日
				US	2014329745	A1	2014年 11月 6日
				KR	20140104994	A	2014年 8月 29日
				JP	2015501819	A	2015年 1月 19日
CN	101389650	A	2009年 3月 18日	EP	2505593	A1	2012年 10月 3日
				JP	5026567	B2	2012年 9月 12日
				WO	2007074133	A3	2007年 10月 11日
				JP	2009522231	A	2009年 6月 11日
				US	2014328943	A1	2014年 11月 6日
				JP	4808785	B2	2011年 11月 2日
				WO	2007074133	A2	2007年 7月 5日
				CN	101389650	B	2012年 10月 10日
				AT	519780	T	2011年 8月 15日
				ES	2371361	T3	2011年 12月 30日
				JP	2011121963	A	2011年 6月 23日
				DK	1969004	T3	2011年 11月 28日
				EP	1969004	A2	2008年 9月 17日
				US	2009074882	A1	2009年 3月 19日
				JP	2011006428	A	2011年 1月 13日
				PT	1969004	E	2011年 11月 25日
				PL	1969004	T3	2012年 1月 31日
				EP	1969004	B1	2011年 8月 10日
CN	1829738	A	2006年 9月 6日	RU	2352581	C2	2009年 4月 20日
				RU	2006103280	A	2007年 9月 20日
				EP	2287184	A2	2011年 2月 23日
				PT	2275439	E	2014年 6月 25日
				EP	2275439	B1	2014年 3月 26日
				PT	2107069	E	2013年 4月 23日
				EP	2264066	A2	2010年 12月 22日
				SI	2107069	T1	2013年 4月 30日
				DK	2275439	T3	2014年 5月 12日
				ZA	200600846	B	2007年 4月 25日
				ES	2402592	T3	2013年 5月 7日
				KR	101186851	B1	2012年 10月 2日
				DK	2107069	T3	2013年 4月 15日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/095377

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CN 1829738 B	2012年 7月 4日
		EP 2264066 A3	2011年 7月 27日
		KR 20120026629 A	2012年 3月 19日
		ZA 200600846 A	2007年 4月 25日
		ES 2472421 T3	2014年 7月 1日
		CN 101955527 B	2016年 4月 20日
		EP 2275439 A2	2011年 1月 19日
		CN 101955527 A	2011年 1月 26日
		EP 2287184 A3	2011年 8月 10日
		EP 2275439 A3	2011年 3月 23日
CN 101784563 A	2010年 7月 21日	JP 5721432 B2	2015年 5月 20日
		EP 2178910 B1	2014年 10月 8日
		JP 2010535849 A	2010年 11月 25日
		US 8962794 B2	2015年 2月 24日
		WO 2009022006 A1	2009年 2月 19日
		ES 2526924 T3	2015年 1月 16日
		CN 101784563 B	2015年 2月 4日
		US 2011098439 A1	2011年 4月 28日
		EP 2178910 A1	2010年 4月 28日
		US 9035020 B1	2015年 5月 19日
		US 2015148521 A1	2015年 5月 28日
CN 1133598 A	1996年 10月 16日	CZ 287945 B6	2001年 3月 14日
		NO 2004006 I2	2008年 2月 4日
		IL 110977 D0	1994年 11月 28日
		NZ 273285 A	1997年 10月 24日
		JP H09502867 A	1997年 3月 25日
		HU 217684 B	2000年 3月 28日
		NO 316944 B1	2004年 7月 5日
		JP 3014764 B2	2000年 2月 28日
		AT 204882 T	2001年 9月 15日
		EP 0792290 A1	1997年 9月 3日
		LU 91101 I2	2004年 11月 8日
		NL 300160 I1	2004年 12月 1日
		FI 961220 A0	1996年 3月 15日
		FI 961220 A	1996年 5月 14日
		PL 178466 B1	2000年 5月 31日
		BG 100420 A	1996年 12月 31日
		HU T75991 A	1997年 5月 28日
		HU 9600676 D0	1996年 5月 28日
		JP 2000060556 A	2000年 2月 29日
		NL 300160 I2	2005年 7月 1日
		NO 961070 A	1996年 5月 15日
		AU 4846197 A	1998年 2月 19日
		SK 282495 B6	2002年 2月 5日
		SI 792290 T1	2001年 12月 31日
		CA 2171424 A1	1995年 3月 23日
		PL 313444 A1	1996年 7月 8日
		CN 1056618 C	2000年 9月 20日
		DK 792290 T3	2001年 10月 1日
		AU 7652094 A	1995年 4月 3日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/095377

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		DE 122004000035 I1	2005年 2月 24日
		DE 69428134 T2	2002年 5月 2日
		FI 117055 B	2006年 5月 31日
		NO 961070 D0	1996年 3月 15日
		EP 0792290 B1	2001年 8月 29日
		BG 61611 B1	1998年 1月 30日
		ES 2163451 T3	2002年 2月 1日
		DE 122004000035 I2	2009年 8月 6日
		JP 3917333 B2	2007年 5月 23日
		IL 110977 A	2000年 6月 29日
		JP 4060583 B2	2008年 3月 12日
		EP 1132404 A3	2002年 3月 27日
		PT 792290 E	2002年 1月 30日
		CA 2171424 C	2002年 6月 4日
		WO 9507931 A1	1995年 3月 23日
		SK 32496 A3	1996年 11月 6日
		DK 0792290 T3	2001年 10月 1日
		EP 1132404 A2	2001年 9月 12日
		JP 2002308899 A	2002年 10月 23日
		RU 2164520 C2	2001年 3月 27日
CN 86106574 A	1988年 8月 3日	US 5618913 A	1997年 4月 8日
		AU 593274 B2	1990年 2月 8日
		NO 863474 A	1987年 3月 2日
		AU 6206686 A	1987年 3月 5日
		CS 8606310 A2	1990年 9月 12日
		AT 113061 T	1994年 11月 15日
		GR 862233 B	1986年 12月 31日
		FI 863512 A	1987年 3月 1日
		NO 863474 D0	1986年 8月 29日
		CA 1306212 C	1992年 8月 11日
		FI 102182 B1	1998年 10月 30日
		NO 177009 C	1995年 7月 5日
		NL 990042 I2	2000年 3月 1日
		HU T42526 A	1987年 7月 28日
		NO 177009 B	1995年 3月 27日
		KR 940000756 B1	1994年 1月 29日
		YU 46023 B	1992年 12月 21日
		EP 0214826 B1	1994年 10月 19日
		JP 2662390 B2	1997年 10月 8日
		YU 148486 A	1991年 4月 30日
		NL 990042 I1	2000年 2月 1日
		CS 275613 B6	1992年 3月 18日
		DE 3650101 D1	1994年 11月 24日
		FI 102182 B	1998年 10月 30日
		PH 25772 A	1991年 10月 18日
		YU 46857 B	1994年 6月 24日
		IL 79887 D0	1986年 11月 30日
		JP S6253999 A	1987年 3月 9日
		HU 206518 B	1992年 11月 30日
		FI 863512 A0	1986年 8月 29日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/095377

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CN 1029977 C	1995年 10月 11日
		LU 90484 I2	2000年 2月 21日
		IE 862317 L	1987年 2月 28日
		YU 4188 A	1990年 6月 30日
		ES 2001624 A6	1988年 6月 1日
		DE 10075008 I2	2004年 10月 21日
		IL 79887 A	1991年 11月 21日
		DE 3650101 T2	1995年 2月 23日
		EP 0214826 A2	1987年 3月 18日
		AR 241801 A1	1992年 12月 30日
		EP 0214826 A3	1987年 6月 3日
		DE 10075008 I1	2000年 5月 18日
		IE 66138 B1	1995年 12月 13日
		NZ 217406 A	1989年 5月 29日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)