



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110234339 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201780067797.9

克列奥梅尼斯·巴罗斯

(22)申请日 2017.09.05

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

(30)优先权数据

20160100458 2016.09.06 GR

代理人 张珂珂 金小芳

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.30

(51)Int.Cl.

A61K 38/28(2006.01)

C07K 14/62(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2017/055336 2017.09.05

A61P 3/10(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/047062 EN 2018.03.15

(71)申请人 佩特雷化学和生物制药学实验室有限公司

地址 希腊佩特雷

(72)发明人 季米特里奥斯·加托斯

亚历山德拉·阿纳斯塔西奥

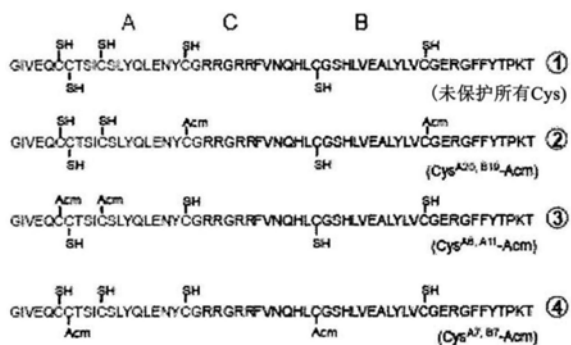
权利要求书4页 说明书27页 附图3页

(54)发明名称

胰岛素原衍生物

(57)摘要

本发明的第一方面涉及式(I)的多肽化合物:A-C-B(I)其中:A为胰岛素或其功能性衍生物或变体的A链;B为胰岛素或其功能性衍生物或变体的B链;C为式(X1)p-(X2)n-(X3)q的肽,其中:各X1和X3独立地为碱性氨基酸;各X2独立地为天然或非天然氨基酸;p为1或2;q为0、1或2;n为0、1、2或3.本发明的其他方面涉及含有所述多肽化合物的药物组合物及其治疗用途.另一个方面涉及所述多肽化合物在制备胰岛素及其衍生物中的用途.



1. 式(I)的多肽化合物:

A-C-B (I)

其中:

A为胰岛素或其功能性衍生物或变体的A链;

B为胰岛素或其功能性衍生物或变体的B链;

C为下式的肽:

$(X_1)_p - (X_2)_n - (X_3)_q$

其中:

各 X_1 和 X_3 独立地为碱性氨基酸;

各 X_2 独立地为天然或非天然氨基酸;

P为1或2;

q为0、1或2;

n为0、1、2或3。

2. 根据权利要求1所述的多肽化合物,其中各 X_2 独立地选自碱性氨基酸、Gly、 β -Ala、Pro、Hyp、假脯氨酸和酸性或亲水性氨基酸。

3. 根据权利要求2所述的多肽化合物,其中所述酸性或亲水性氨基酸选自Ser、Asp和Glu。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中所述碱性氨基酸选自Lys、Arg、Orn和His。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物,其中各 X_2 独立地选自Gly和Arg。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中 X_1 和 X_3 均为Arg。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中p和q均为2。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中n为1或2。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中n为1。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中A为天然胰岛素的A链,优选人胰岛素或其变体的A链,其中:(a)一个或多个氨基酸残基被天然或非天然存在的氨基酸残基置换,(b)两个或多个氨基酸残基的顺序颠倒,(c)缺失一个、两个或三个氨基酸,(d)任意两个氨基酸残基之间存在间隔基团,(e)一个或多个氨基酸残基为类肽形式,(f)肽的一个或多个氨基酸残基的(N-C-C)主链被修饰,(g)一个或多个其他氨基酸存在于N末端和/或C末端,或(a)至(g)的任意组合。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中B为天然胰岛素的B链,优选人胰岛素或其变体的B链,其中:(a)一个或多个氨基酸残基被天然或非天然存在的氨基酸残基置换,(b)两个或多个氨基酸残基的顺序颠倒,(c)缺失一个、两个或三个氨基酸,(d)任意两个氨基酸残基之间存在间隔基团,(e)一个或多个氨基酸残基为类肽形式,(f)肽的一个或多个氨基酸残基的(N-C-C)主链被修饰,(g)一个或多个其他氨基酸存在于N末端和/或C末端,或(a)至(g)的任意组合。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中C为SEQ ID NO:1所示序列的肽,

RRGRR[SEQ ID NO:1]。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中A包含SEQ ID NO:2所示序列的肽,

$^1\text{GIVEQCCTSICSLYQLENYCG}^{21}$ [SEQ ID NO:2] 其中各氨基酸为未保护的或任选地受保护的。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其中B包含SEQ ID NO:3所示序列的肽,

$^1\text{FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT}^{30}$ [SEQ ID NO:3] 其中各氨基酸为未保护的或任选地受保护的。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽化合物,其选自SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:7,

SEQ ID NO:4

$^1\text{GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRRGRFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT}^{56}$

SEQ ID NO:5

$^1\text{GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRRGRFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT}^{56}$

SEQ ID NO:6

$^1\text{GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRRGRFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT}^{56}$

SEQ ID NO:7

$^1\text{GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRRGRFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT}^{56}$

其中在SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:7中,C表示用保护基团保护的半胱氨酸,而c表示未保护的半胱氨酸。

16. 根据权利要求15所述的多肽化合物,其中半胱氨酸保护基团为Acm或Trt。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽,其为式(I.1)的多肽:



其中PG₁和PG₂各自独立地为半胱氨酸保护基团。

18. 一种制备胰岛素或其衍生物的方法,所述方法包括以下步骤:

- (i) 制备根据权利要求1至17中任一项所述的多肽化合物,和
- (ii) 切割所述多肽,以切除C肽。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中胰岛素A链的第7位的半胱氨酸残基和胰岛素B链的第7位的半胱氨酸残基各自用保护基团进行保护。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述保护基团为Acm或Trt,更优选Acm。

21. 根据权利要求19或权利要求20所述的方法,其包括多肽化合物的逐步氧化折叠,所述方法包括以下步骤:

- (i) 使根据权利要求19所述的肽氧化,以形成第一中间体;
- (ii) 使所述第一中间体氧化,以形成第二中间体;
- (iii) 切割所述第二中间体,以切除C肽。

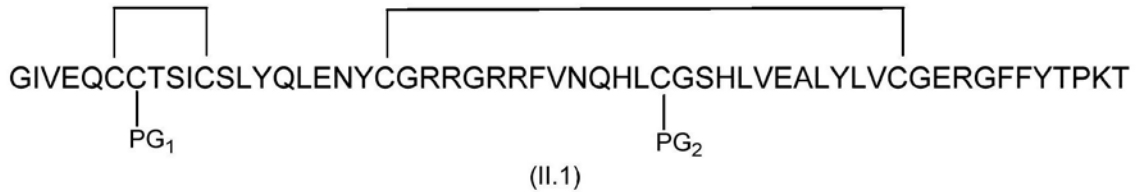
22. 根据权利要求21所述的方法,其中步骤(i)包括用DMSO处理根据权利要求19所述的

肽。

23. 根据权利要求21或权利要求22所述的方法,其中步骤(ii)包括在乙酸/水中用碘处理所述第一中间体。

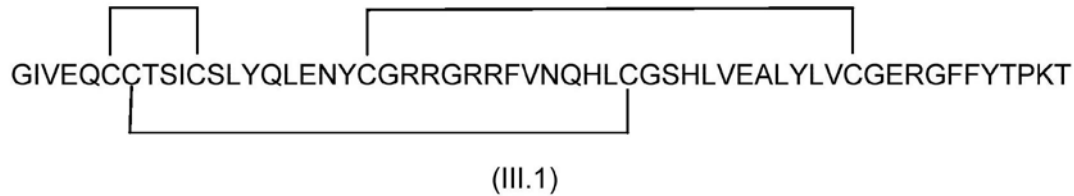
24. 根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中步骤(iii)包括用胰蛋白酶处理所述第二中间体。

25. 式(II.1)的多肽化合物:



其中PG₁和PG₂各自独立地为半胱氨酸保护基团。

26. 式(III.1)的多肽化合物:



27. 根据权利要求1至17中任一项所述的肽化合物在制备胰岛素或其衍生物中的用途。

28. 一种药物制剂,其包含作为活性成分的根据权利要求1至17、25或26中任一项所述的多肽化合物,以及一种或多种可药用的载体、赋形剂或稀释剂。

29. 一种编码根据权利要求1至17中任一项所述的肽化合物的DNA序列。

30. 一种重组DNA载体,其包含根据权利要求29所述的DNA化合物。

31. 一种用于根据权利要求1至17中任一项所述的多肽化合物的重组制备的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 构建编码权利要求1至17中任一项所述的多肽化合物的DNA序列,

(ii) 将所述DNA序列引入合适的载体中,所述载体含有在宿主细胞中具有功能的启动子-操纵子区域,

(iii) 使所述DNA序列在所述载体中定向,以实现所述DNA序列的转录和翻译,并且进一步地,使所述DNA序列处于所述启动子-操纵子区域的转录调控之下,

(iv) 用所述载体转化所述宿主细胞,

(v) 在适当的条件下培养所述经转化的宿主细胞,以诱导所述基因的转录和翻译,以及

(vi) 回收并纯化由所述DNA序列编码的多肽产物。

32. 一种使用固相肽合成制备根据权利要求1至17中任一项所述的多肽化合物的方法。

33. 一种制备胰岛素或其衍生物的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 构建编码权利要求1至17中任一项所述的多肽化合物的DNA序列;

(ii) 将所述DNA序列引入合适的载体中,所述载体含有在宿主细胞中具有功能的启动子-操纵子区域,

(iii) 使所述DNA序列在所述载体中定向,以实现所述DNA序列的转录和翻译,并且进一步地,使所述DNA序列处于所述启动子-操纵子区域的转录调控之下,

- (iv) 用所述载体转化所述宿主细胞,
- (v) 在适当的条件下培养所述经转化的宿主细胞,以诱导所述基因的转录和翻译,以及
- (vi) 回收并纯化由所述DNA序列编码的多肽产物,
- (vii) 切割由所述基因编码的所述多肽产物,以切除C肽。

34. 根据权利要求1至17、25或26中任一项所述的多肽化合物在医药中的用途。

35. 根据权利要求1至17、25或26中任一项所述的多肽化合物在治疗糖尿病中的用途。

36. 根据权利要求35所述多肽化合物在治疗2型糖尿病中的用途。

37. 一种用于治疗有需要的受试者的糖尿病,或者治疗或预防有需要的受试者的高血糖症的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至17中任一项所述的多肽化合物。

胰岛素原衍生物

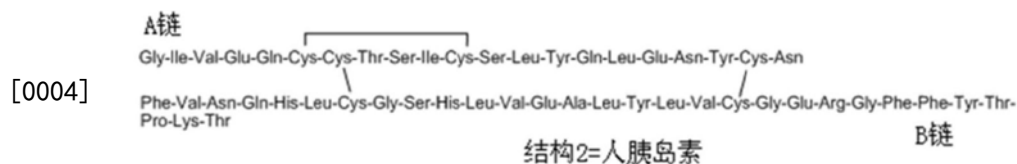
技术领域

[0001] 本发明涉及可用于制备胰岛素的胰岛素原衍生物,更具体而言,涉及反序胰岛素原衍生物。本发明的胰岛素原衍生物本身也具有作为治疗性部分的潜在应用。

背景技术

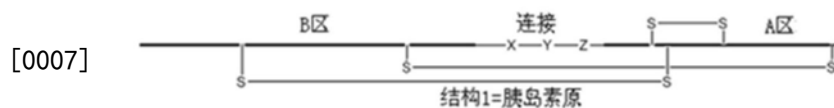
[0002] 胰岛素及其衍生物是用于治疗糖尿病的最重要的药物,年销售额超过200亿,并且具有稳定增长的市场。

[0003] 胰岛素是由胰腺β细胞分泌的肽激素。胰岛素由两条肽链(A和B)组成,这二者由分子间二硫键连接在一起。A链还包含另外的分子内二硫键。人胰岛素具有结构2。



[0005] 通常从重组生产的胰岛素原开始大规模地(数百千克)制造胰岛素。随后使胰岛素原折叠,并使用胰蛋白酶和羧肽酶B酶促除去连接C肽,从而得到成熟的胰岛素肽。

[0006] 更具体而言,胰岛素是由单链前体前胰岛素原得到的,前胰岛素原由24个氨基酸的前肽和其后的包含86个氨基酸的胰岛素原构成。前肽原的序列为前肽-[B链]-Arg-Arg-[连接肽]-Lys-Arg-[A链],其中所述连接肽由31个氨基酸构成。酶解法除去前肽后,形成三个二硫键并且产生胰岛素原。



[0008] 然后在连接肽的Arg-Arg和Lys-Arg位点通过酶切割释放成熟的胰岛素。

[0009] 由于与受体结合所必需的残基(即A链的N端氨基官能和B链的C端羧基官能)受阻,所以胰岛素原与胰岛素受体的亲和力比天然胰岛素低100倍。

[0010] 在胰岛素疗法的情况中,胰岛素的稳定性和溶解性是非常重要的。许多胰岛素类似物是本领域已知的。举例来说,EP1193272公开了具有胰岛素活性的单链胰岛素类似物。这些单链胰岛素具有在第5位至第18位的氨基酸被修饰的C肽,并且据报道其具有高达42%的胰岛素活性。

[0011] US 5,597,796公开了一种胰岛素类似物,其中两个或多个氨基酸残基被Glu和/或Asp置换。类似地,US 20090069216和WO 2007/096332公开了含有经修饰的B链和连接肽的速效单链胰岛素。所得类似物特别适合于经皮给药。US 8,192,957公开了抗纤颤胰岛素和胰岛素类似物。US 2010/0216690中公开了聚乙二醇化的单链胰岛素,而WO 2007/104738中公开了酰化的单链胰岛素。

[0012] WO 2005/054291公开了一种单链胰岛素类似物,其中A链和B链通过5至11个氨基酸的连接肽连接。同样地,WO 95/16708也公开了单链胰岛素类似物,其中A链和B链通过1至15个氨基酸的连接肽连接,其中的C端氨基酸残基是除Lys或Arg之外的氨基酸。EP0427296

公开了由通式B(1-29)-X_n-Y-A(1-21)表示的人胰岛素前体,其中X_n为具有n个天然存在的氨基酸残基的肽链,其中n为0至33并且Y为Arg或Lys。类似地,EP0741188公开了由式b-BP-a表示的单链胰岛素衍生物,其具有显著的胰岛素活性,其中BP为10至14个氨基酸的桥连肽;据报道,这些单链胰岛素具有胰岛素活性,而且还对IGF-1受体具有高的亲和力。虽然做了许多努力,但尚未开发出胰岛素在化学上和经济上可行的途径。迄今为止应用的方法包括线性A链和B链的随机混合及它们的空气氧化、磺化的A链和B链的混合、三个二硫键的定点构建和单链前体的仿生折叠(Sohma, Y. 和Kent, S. B. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 16313-16318; Tofteng, A. P.; Jensen, K. J.; Schaffer, L.; Hoeg-Jensen, T. Chem-BioChem 2008, 9, 2989-2996)。

[0013] 还已知具有连接C肽的A-C-B“反序”胰岛素原可产生胰岛素衍生物。举例来说,EP0518587公开了A-C-B胰岛素原衍生物,其中连接肽C为式X₁-X₂-P-X₃-X₄的片段,其中X₁至X₄为碱性氨基酸,并且P为不含半胱氨酸残基的4至35个氨基酸的肽(参见WF Heath等, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 1, 第419-425页)。通常理解的是,天然或反序胰岛素原的C肽必须具有最小长度,以具有正确折叠至天然成熟胰岛素原或反序胰岛素原所需的柔韧性。

[0014] 本发明旨在提供可替代的胰岛素原衍生物,其可用于制备胰岛素,并且本身也可用作治疗性部分。特别地,本发明旨在提供胰岛素原衍生物,其在溶解度、活性、产率、纯度和/或合成容易度方面具有一种或多种优势。

发明内容

[0015] 本发明涉及胰岛素原衍生物,更具体地涉及式A-C-B的反序胰岛素原衍生物。

[0016] 因此,本发明的第一方面涉及式(I)的多肽化合物:

[0017] A-C-B (I)

[0018] 其中:

[0019] A为胰岛素或其功能性衍生物或变体的A链;

[0020] B为胰岛素或其功能性衍生物或变体的B链;

[0021] C为下式的连接肽:

[0022] (X₁)_p-(X₂)_n-(X₃)_q

[0023] 其中:

[0024] 各X₁和X₃独立地为碱性氨基酸;

[0025] 各X₂独立地为天然或非天然氨基酸;

[0026] P为1或2;

[0027] q为0、1或2;

[0028] n为0、1、2或3。

[0029] 本发明要求保护的反序胰岛素原衍生物由于其含有较短的连接肽(其为“超迷你”胰岛素),因而与本领域已知的反序胰岛素原衍生物不同。令人惊讶的是,申请人发现含有7个以下氨基酸的C肽(包括仅具有单个氨基酸的C肽,如反序胰岛素原A-Arg-B)及其相应的受保护的或部分受保护的衍生物是有用的胰岛素原前体。

[0030] 发明详述

[0031] 为了改进胰岛素原的固相化学合成,开发了本发明要求保护的肽化合物。

[0032] 理想地,该肽必须不包含有问题的肽合成区域,例如,在树脂上的肽链延伸期间引起 β -转角和 β -折叠的形成的肽合成区域。本发明要求保护的肽为反序胰岛素原衍生物,其顺序为A-C-B,而不是天然的B-C-A顺序。与相应的B-C-A胰岛素原相比,这些反序胰岛素原衍生物表现为在合成上更易于制备。

[0033] 优选地,本发明的反序胰岛素原在C肽中包含这样的残基(例如,作为氨基酸 X_2),该残基可破坏 β -折叠和 β -转角的形成。在这方面,合适的残基包括Pro、Hyp和假脯氨酸。在C肽中插入这些残基能够有效地合成反序胰岛素原。

[0034] 优选地,C肽包含这样的残基,该残基能够提高纯化步骤中所用的溶剂中的溶解度。在这方面,合适的残基包括Pro、Hyp、诸如Arg或Lys之类的碱性氨基酸或诸如Glu和Ser之类的酸性和亲水性氨基酸。

[0035] 可以在溶液中或在固相上缩合较小的受保护的肽,以得到高纯度的胰岛素原。优选地,为了避免缩合反应中的外消旋化,片段的C末端氨基酸通常选自Gly、Pro、 β -Ala以及在其结构中含有寡聚乙二醇或聚乙二醇部分(例如 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n'}-\text{CO}-$ 结构单元)的氨基酸,其中 n' 是整数,例如1至10,更优选1至5。

[0036] 优选地,为了便于切除C肽,使一个或多个碱性氨基酸位于A链的C末端和B链的氨基末端,即 $(X_1)_p$,其中 p 为1或2,以及 $(X_3)_q$,其中 q 为1或2。

[0037] 如本文所用,术语“变体”包括任意变体,其中(a)一个或多个氨基酸残基被一个天然或非天然存在的氨基酸残基置换,(b)两个或多个氨基酸残基的顺序颠倒,(c)缺失一个、两个或三个氨基酸,(d)任意两个氨基酸残基之间存在间隔基团,(e)一个或多个氨基酸残基为类肽形式,(f)肽的一个或多个氨基酸残基的(N-C-C)主链被修饰,(g)一个或多个其他氨基酸存在于N末端和/或C末端,或(a)至(g)的任意组合。优选地,所述变体为(a)、(b)或(c)之一。

[0038] 更优选地,一个至五个、或一个至四个、或一个至三个氨基酸残基被一个或多个其他的氨基酸残基置换。还更优选地,两个氨基酸残基被另一个氨基酸残基置换。还更优选地,一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基置换。优选地,所述置换是同源性的。

[0039] 可能发生同源置换(本文使用的置换和替代均是指现存的氨基酸残基与可选的残基的互换),即同性置换,如碱性置换碱性、酸性置换酸性、极性置换极性等。也可能发生非同源置换,即一种残基置换为另一种、或可选地包括非天然氨基酸,如鸟氨酸、二氨基丁酸鸟氨酸、正亮氨酸鸟氨酸、吡啶基丙氨酸、噻吩基丙氨酸、萘基丙氨酸和苯甘氨酸,下面列出了更详细的列表。同时可以有多个氨基酸残基被修饰。

[0040] 如本文所用,根据以下类别对氨基酸分类:

[0041] 碱性:H、K、R

[0042] 酸性:D、E

[0043] 非极性:A、F、G、I、L、M、P、V、W

[0044] 极性:C、N、Q、S、T、Y,

[0045] (使用国际接受的单字母氨基酸符号),并且使用这些种类来定义同源和非同源置换。因此,同源置换用于指在相同种类内的置换,而非同源置换用于指被不同种类的置换或被非天然氨基酸置换。

[0046] 除了氨基酸间隔基团(如甘氨酸或 β -丙氨酸残基),可以插入到载体部分的任意两个氨基酸残基之间的合适的间隔基团包括:烷基,如甲基、乙基或丙基。本领域技术人员能够理解另一种变体形式,(e)型,包括以类肽形式存在的一个或多个氨基酸残基。为了避免疑问,本文使用“类肽形式”来表示 α -C取代基位于所述残基的N原子而非 α -C上的变体氨基酸残基。制备类肽形式的肽是本领域已知的,例如Simon RJ等,PNAS (1992) 89 (20), 9367-9371和Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13 (4), 132-134。(f)型修饰可由国际公开PCT/GB99/01855(WO 99/64574)中描述的方法进行。

[0047] 氨基酸变体(优选为(a)或(b)型)优选独立地发生在任意位置。如上所述,可能同时发生多于一个的同源或非同源置换。通过在序列内反转一些氨基酸残基的序列可得到其他变体。

[0048] 在一个实施方案中,替换氨基酸残基选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

[0049] 替换氨基酸残基另外也可以选自如下所述的非天然氨基酸。

[0050] 如本文所用,术语“衍生物”是指(例如)在N末端和/或C末端的氨基酸侧链经化学修饰的胰岛素。优选地,该化学修饰用于改变该类似物的吸收、分布、代谢和分泌特性。基于对动物胰岛素的化学修饰,半合成的胰岛素在临床上已经使用了一段时间,例如Novo Nordisk公司的通过除去与人类多样性不同的单个氨基酸并化学添加人类氨基酸而将猪胰岛素酶促转化为半合成的“人”胰岛素。

[0051] 在一个优选的实施方案中,胰岛素经化学修饰以改变其等电点。正常的未修饰的胰岛素在生理pH值下可溶。已经获得了具有等电点位移的胰岛素经修饰的衍生物,从而它们以溶解平衡的形式存在,其中大部分沉淀但是缓慢溶解在血液中,并且最终由肾脏排出。

[0052] 如本文所用,术语“胰岛素的功能性衍生物”是指可发挥与胰岛素相似或等同的生物学功能的任意分子。就其化学结构而言,功能性衍生物可在结构上与胰岛素相似或不相似。

[0053] 在一个优选的实施方案中,本发明的单链胰岛素类似物来自动物胰岛素。

[0054] 不同哺乳动物中动物胰岛素的氨基酸序列类似于人胰岛素(人胰岛素INN)。然而,在脊椎动物物种中有相当大的差异。猪胰岛素与人类多样性仅有一个氨基酸不同,并且牛胰岛素仅有三个氨基酸不同。二者都对人类受体有大致相同强度的活性。当无法生物合成人胰岛素(人胰岛素rDNA)时,牛胰岛素和猪胰岛素是首先用于临床的胰岛素类似物(自然发生,通过从动物胰脏提取得到)。来自鲨鱼和一些鱼类的胰岛素也可能是有效的。

[0055] 在另一个优选的实施方案中,本发明的单链胰岛素类似物来自人胰岛素或其类似物。更优选地,胰岛素为生物合成胰岛素(人胰岛素rDNA)。在一个优选的实施方案中,胰岛素为选自甘精胰岛素(Lantus)、赖脯胰岛素(Humalog)、地特胰岛素(Levemir)、门冬胰岛素(novolog)、德谷胰岛素和生物素化胰岛素的衍生物。

[0056] 本发明的其他实施方案包括兔、猴、马、大鼠I、大鼠II、猪、牛羊、狗、豚鼠、南美栗鼠或鸭的ACB胰岛素原分子。

[0057] 在一个优选的实施方案中,A链为天然存在的胰岛素A链的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,B链为天然存在的胰岛素B链的氨基酸序列。优选地,这些物种的ACB胰岛

素原分子的氨基酸序列为天然存在的A链的氨基酸序列和天然存在的B链的序列。本发明的其他实施方案可涉及来自前述物种的胰岛素原分子的功能性类似物。

[0058] 因此,在一个优选的实施方案中,A链为胰岛素A链的变体或功能性衍生物。在另一个优选的实施方案中,B链为胰岛素B链的变体或功能性衍生物。在另一个优选的实施方案中,A链为胰岛素A链的变体或功能性衍生物,并且B链为胰岛素B链的变体或功能性衍生物。

[0059] 天然氨基酸包括:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

[0060] 如本文所用,术语“非天然氨基酸”包括天然氨基酸的 α 和 α -双取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、卤化物衍生物,如三氟酪氨酸、对-氯-苯丙氨酸、对-氟-苯丙氨酸、对-溴-苯丙氨酸、p-NO₂-苯丙氨酸、苯基甘氨酸、肌氨酸、青霉素、D-2-甲基色氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸、p-I-苯丙氨酸、L-烯丙基-甘氨酸、 β -丙氨酸、 β -天冬氨酸、 β -环己基丙氨酸、瓜氨酸、高丝氨酸、高半胱氨酸、焦谷氨酸、L- α -氨基丁酸、L- γ -氨基丁酸、L- α -氨基异丁酸、 α -环己基甘氨酸、二氨基丁酸、二氨基庚二酸、N- ϵ -二硝基苯基-赖氨酸、L-1-萘基丙氨酸、L-2-萘基丙氨酸、3-(2-吡啶基)-L-丙氨酸、3-(3-吡啶基)-L-丙氨酸、3-(4-吡啶基)-L-丙氨酸、N- ϵ -甲基-赖氨酸、N,N- ϵ -二甲基-赖氨酸、N,N,N- ϵ -三甲基-赖氨酸、3-巯基丙氨酸、L- ϵ -氨基己酸、7-氨基庚酸、6-氨基己酸、L-蛋氨酸、鸟氨酸、L-正亮氨酸、L-正缬氨酸、p-硝基-L-苯丙氨酸、L-羟基脯氨酸、 γ -谷氨酸、 γ -氨基丁酸、L-巯基脯氨酸、苯丙氨酸(Phe)的甲基衍生物(如4-甲基-Phe、五甲基-Phe、L-Phe(4-氨基)、L-Tyr(甲基)、L-Phe(4-异丙基)、L-Tic(1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸)、L-二氨基丙氨酸和L-Phe(4-苄基))。

[0061] 有利的是,一个或多个非天然氨基酸的引入致使肽的酶稳定性升高。

[0062] 本发明的胰岛素类似物可包含氨基酸的L型或D型,即一个或多个残基,优选所有残基均可以为L型或D型。

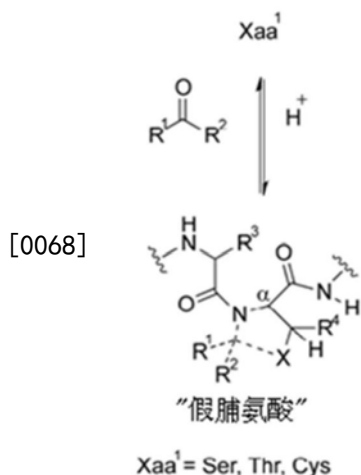
[0063] 在本发明的肽中,X₁和X₃各自独立地为碱性氨基酸。在连接肽中存在碱性氨基酸使得能够用胰蛋白酶和羧肽酶对肽进行切割。

[0064] 在本发明的肽中,各X₂独立地为天然或非天然氨基酸。当X₂为半胱氨酸残基时,本领域技术人员会理解需要进行保护以避免在随后的氧化折叠期间形成不希望的S-S键。合适的半胱氨酸保护基团是本领域技术人员所熟悉的,并且包括Acm和Trt。

[0065] 在一个优选的实施方案中,X₂不为半胱氨酸。

[0066] 在一个优选的实施方案中,各X₂独立地选自碱性氨基酸、Gly、 β -Ala、Pro、Hyp、假脯氨酸、酸性氨基酸和亲水性氨基酸。

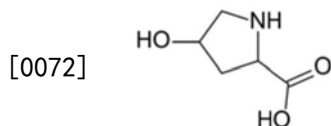
[0067] 在一个优选的实施方案中,X₂为假脯氨酸。假脯氨酸是人造的二肽,其能够使肽的FMOC固相合成期间的聚集最小化。假脯氨酸由丝氨酸- α (Oxa)或苏氨酸衍生的噁唑烷[Oxa(5-Me)]和半胱氨酸衍生的噁唑烷(THz)构成,并具有脯氨酸样环形结构(见下文)。



[0069] 由于优选以顺式酰胺键连接前述C2取代的假脯氨酸残基,其引入可得到肽主链的扭结构象,从而防止肽的聚集、自组装或 β -结构形成。因此,假脯氨酸可同时实现两种功能:首先,假脯氨酸对于Ser、Thr和Cys起到临时性侧链保护的作用,其次,假脯氨酸在肽合成及随后的链组装期间起到使结构单元增溶以提高溶剂化作用和偶联速率的作用。

[0070] 通过使游离的氨基酸与醛或酮反应来得到假脯氨酸。可以与其他氨基酸衍生物相同的方式引入假脯氨酸二肽。优选地,假脯氨酸来自Ser-X、Thr-X或CysX基团,其中X-为天然或非天然氨基酸。在含有丝氨酸和苏氨酸的肽的Fmoc固相肽合成(SPPS)中常规使用的假脯氨酸(恶唑烷)二肽使得粗产物的质量和产率的显著提高。一旦使肽脱保护,假脯氨酸就变成X-Ser、X-Thr或X-Cys形式的常规二肽,其中X为天然或非天然氨基酸。

[0071] 在一个优选的实施方案中,X₂为Hyp。如本文所用,Hyp是指(2S,4R)-4-羟基脯氨酸或L-羟基脯氨酸,其为具有以下结构的非蛋白原氨基酸:



[0073] 在一个优选的实施方案中,X₂为酸性或亲水性酸。Asp和Glu为酸性氨基酸的实例,而Ser、Cys、Asn、Gln和Thr为亲水性氨基酸包括的实例。优选地,酸性或亲水性氨基酸选自Ser、Asp和Glu。

[0074] 在一个优选的实施方案中,X₂为碱性氨基酸。更优选地,该碱性氨基酸选自Lys、Arg、Orn和His。甚至更优选地,该碱性氨基酸为Arg。

[0075] 在一个高度优选的实施方案中,各X₂独立地选自Gly和Arg。更优选地,X₂为Gly。

[0076] 在一个优选的实施方案中,X₁和X₃均为Arg。

[0077] 在一个优选的实施方案中,p和q均为1。

[0078] 在另一个优选的实施方案中,p和q均为2。

[0079] 在一个优选的实施方案中,n为1或2。

[0080] 在一个特别优选的实施方案中,n为1。

[0081] 在一个特别优选的实施方案中,p和q均为2,并且n为1。

[0082] 在一个优选的实施方案中,n和q均为0且p为1,即A链和B链被单个碱性氨基酸隔开。对于该实施方案,X₁优选为Arg或Lys,更优选为Arg。

[0083] 在另一个优选的实施方案中,X₁和X₃均为Arg,并且p和q均为2。

[0084] 在另一个优选的实施方案中, X_2 为Gly并且 n 为1。

[0085] 在一个特别优选的实施方案中, A链和B链通过肽RRGRR连接, 即C为这样的肽: 其中 X_1 为Arg, X_2 为Gly, X_3 为Arg, p 和 q 均为2, 并且 n 为1。

[0086] 在一个优选的实施方案中, A为天然胰岛素的A链, 优选人胰岛素或其变体的A链, 其中: (a) 一个或多个氨基酸残基被天然或非天然存在的氨基酸残基置换, (b) 两个或多个氨基酸残基的顺序颠倒, (c) 缺失一个、两个或三个氨基酸, (d) 任何两个氨基酸残基之间存在间隔基团, (e) 一个或多个氨基酸残基为类肽形式, (f) 肽的一个或多个氨基酸残基的(N-C-C)主链被修饰, (g) 一个或多个其他氨基酸存在于N末端和/或C末端, 或(a)至(g)的任意组合。

[0087] 在一个优选的实施方案中, 天然的A链的一个至五个氨基酸被置换, 优选为一个至四个氨基酸, 更优选为一个至三个氨基酸, 甚至更优选为一个或两个氨基酸。在一个优选的实施方案中, 单个氨基酸被置换。

[0088] 在一个高度优选的实施方案中, A链包含人胰岛素从A链N末端起始的1至21个氨基酸。

[0089] 在一个高度优选的实施方案中, A链由人胰岛素从A链N末端起始的1至21个氨基酸构成。

[0090] 在另一个高度优选的实施方案中, A链包含人胰岛素从A链N末端起始的1至20个氨基酸。

[0091] 在另一个高度优选的实施方案中, A链由人胰岛素从A链N末端起始的1至20个氨基酸构成。

[0092] 在一个优选的实施方案中, B为天然胰岛素的B链, 优选人胰岛素或其变体的B链, 其中: (a) 一个或多个氨基酸残基被天然或非天然存在的氨基酸残基置换, (b) 两个或多个氨基酸残基的顺序颠倒, (c) 缺失一个、两个或三个氨基酸, (d) 任何两个氨基酸残基之间存在间隔基团, (e) 一个或多个氨基酸残基为类肽形式, (f) 肽的一个或多个氨基酸残基的(N-C-C)主链被修饰, (g) 一个或多个其他氨基酸存在于N末端和/或C末端, 或(a)至(g)的任意组合。

[0093] 在一个优选的实施方案中, 天然的B链的一个至五个氨基酸被置换, 优选为一个至四个氨基酸, 更优选为一个至三个氨基酸, 甚至更优选为一个或两个氨基酸。在一个优选的实施方案中, 单个氨基酸被置换。

[0094] 在一个优选的实施方案中, B链包含人胰岛素从A链N末端起始的1至29个氨基酸。

[0095] 在一个优选的实施方案中, B链由人胰岛素从A链N末端起始的1至29个氨基酸构成。

[0096] 在一个优选的实施方案中, 本发明的肽在氨基和/或羧基末端延伸出一个或多个氨基酸。例如, 在一个高度优选的实施方案中, 肽在其C末端包含两个额外的氨基酸, 例如Arg-Arg。

[0097] 在一个优选的实施方案中, 胰岛素B链在C末端还含有至多20个额外的天然或非天然氨基酸。优选地, B链在C末端还含有1至10个、或更优选1至5个额外的天然或非天然氨基酸。在一个高度优选的实施方案中, B链在C末端还含有1、2或3个额外的天然或非天然氨基酸。在一个还更优选的实施方案中, B链在C末端还含有1、2或3个额外的天然氨基酸。

[0098] 在一个优选的实施方案中,肽包含来自天然序列的单个氨基酸改变。优选地,该单个氨基酸变化位于位置A21、B9、B10、B12、B16、B17、B20、B25、B26、B27、B28或B30,其中A表示胰岛素的A链,而B表示胰岛素的B链。

[0099] 优选地,单个氨基酸置换选自以下置换:

[0100] Gly A21、Glu A21、hSer A21、Thr B10、Asp B25、Ser A21、Leu A21、Gly A22、Asp B10、His B25、Ala A21、Met A21、Ala A22、Arg B10、Glu B26、His A21、Tyr A21、Asp B9、Ile B12、Glu B27、Asp A21、Val A21、Asn B9、His B16、Asp B28、Thr A21、Ile A21、His B9、Gln B17、Ala B30、Gln A21、Trp A21、Glu B10、Gln B20、des-B30、Thr30-NH₂和Ala30-NH₂。

[0101] 在一个优选的实施方案中,肽包含来自天然序列的两个氨基酸改变。优选地,该两个氨基酸位于:A21和B10、A21和B10、A21和B27、B27和B16、B5和B10、B12和B13、B14和B17、B28和B29、A121和B27、B10和B30、B29和B30、B12和B30、B10和B2、B10和B28、B10和A13、B27和A13、B27和A21、B27和B1、B27和B9、或A21和B30。

[0102] 优选地,该两个氨基酸置换选自以下置换:

[0103] Ser A21和Asp B10

[0104] Asp A21和Lys B27

[0105] Thr A21和Asp B10

[0106] Gly A21和Arg B27

[0107] Ala A21和Asp B10

[0108] Asp B5和Asn B10

[0109] Thr A21和Thr B10

[0110] Glu B12和Gln B13

[0111] Ala A21和Thr B10

[0112] Ser B14和Asp B17

[0113] His A21和Thr B10

[0114] Ser A21和Arg B27

[0115] His A21和Asp B10

[0116] Thr A21和Arg B27

[0117] Asp A21和Asp B10

[0118] Ala A21和Arg B27

[0119] Gly A21和Thr B10

[0120] Gly A21和Asp B10

[0121] His A21和Lys B27

[0122] Glu B27和Glu B16

[0123] Ser A21和Thr B10

[0124] Lys B28和Pro B29

[0125] Asp A21和Thr B10

[0126] His A21和Arg B27

[0127] Gly A21和Arg B10

- [0128] Asp A21和Arg B27
- [0129] Ser A21和Arg B10
- [0130] Glu B12和des B30
- [0131] Thr A21和Arg B10
- [0132] Gly A21和Lys B27
- [0133] Gly A21和Ala B30
- [0134] Ser A21和Lys B27
- [0135] Ser A21和Ala B30
- [0136] Thr A21和Lys B27
- [0137] Thr A21和Ala B30
- [0138] Ala A21和Lys B27
- [0139] Ala A21和Ala B30
- [0140] des B29和des B30
- [0141] hSer A21和Ala B30
- [0142] Asp B10和Ser B2
- [0143] Ala A21和Arg B10
- [0144] Asp B10和Asp B28
- [0145] His A21和Arg B10
- [0146] Glu B10和Glu A13
- [0147] Asp A21和Arg B10
- [0148] Glu B27和Ser A13
- [0149] Asp B10和des-B30
- [0150] Glu B27和Asp A21
- [0151] Thr B10和des-B30
- [0152] Glu B27和Glu B1
- [0153] Arg B10和des-B30
- [0154] Glu B27和Asp B9。

[0155] 在一个优选的实施方案中,肽包含来自天然序列的三个氨基酸改变。优选地,这三个氨基酸改变选自以下变化:

- [0156] Gly A21+Lys B27+Gln A17
- [0157] Ser A21+Lys B27+Gln A17
- [0158] Thr A21+Lys B27+Gln A17
- [0159] Ala A21+Lys B27+Gln A17
- [0160] His A21+Lys B27+Gln A17
- [0161] Asp A21+Lys B27+Gln A17
- [0162] Gly A21+Lys B27+Gln B13
- [0163] Ser A21+Lys B27+Gln B13
- [0164] Thr A21+Lys B27+Gln B13
- [0165] Ala A21+Lys B27+Gln B13

[0166] His A21+Lys B27+Gln B13
[0167] Asp A21+Lys B27+Gln B13
[0168] Gly A21+Arg B27+Gln A17
[0169] Ser A21+Arg B27+Gln A17
[0170] Thr A21+Arg B27+Gln A17
[0171] Ala A21+Arg B27+Gln A17
[0172] His A21+Arg B27+Gln A17
[0173] Asp A21+Arg B27+Gln A17
[0174] Gly A21+Arg B27+Gln B13
[0175] Ser A21+Arg B27+Gln B13
[0176] Thr A21+Arg B27+Gln B13
[0177] Ala A21+Arg B27+Gln B13
[0178] His A21+Arg B27+Gln B13
[0179] Asp A21+Arg B27+Gln B13
[0180] Asp B10+His A8+His B25
[0181] Glu B10+Glu A3+Glu B22
[0182] Glu B27+Ser B5+Asp B5
[0183] Glu B27+His A5+Asp B9
[0184] Glu B27+Asp A21+Asp B9
[0185] des B28+des B29+des B30
[0186] Gly A21+Asp B10+Ala B30
[0187] Ser A21+Asp B10+Ala B30
[0188] Thr A21+Asp B10+Ala B30
[0189] Ala A21+Asp B10+Ala B30
[0190] His A21+Asp B10+Ala B30
[0191] Asp A21+Asp B10+Ala B30
[0192] Gly A21+Thr B10+Ala B30
[0193] Ser A21+Thr B10+Ala B30
[0194] Thr A21+Thr B10+Ala B30
[0195] Ala A21+Thr B10+Ala B30
[0196] His A21+Thr B10+Ala B30
[0197] Asp A21+Thr B10+Ala B30
[0198] Gly A21+Arg B10+Ala B30
[0199] Ser A21+Arg B10+Ala B30
[0200] Thr A21+Arg B10+Ala B30
[0201] Ala A21+Arg B10+Ala B30
[0202] His A21+Arg B10+Ala B30
[0203] Asp A21+Arg B10+Ala B30
[0204] Gly A21+Asp B10+des B30

- [0205] Ser A21+Asp B10+des B30
- [0206] Thr A21+Asp B10+des B30
- [0207] Ala A21+Asp B10+des B30
- [0208] His A21+Asp B10+des B30
- [0209] Asp A21+Asp B10+des B30
- [0210] Gly A21+Thr B10+des B30
- [0211] Ser A21+Thr B10+des B30
- [0212] Thr A21+Thr B10+des B30
- [0213] Ala A21+Thr B10+des B30
- [0214] His A21+Thr B10+des B30
- [0215] Asp A21+Thr B10+des B30
- [0216] Gly A21+Arg B10+des B30
- [0217] Ser A21+Arg B10+des B30
- [0218] Thr A21+Arg B10+des B30
- [0219] Ala A21+Arg B10+des B30
- [0220] His A21+Arg B10+des B30
- [0221] Asp A21+Arg B10+des B30
- [0222] Thr B10+Glu B28+Pro B29
- [0223] Arg B10+Glu B28+Pro B29
- [0224] Asp B10+Lys B28+Pro B29
- [0225] Thr B10+Lys B28+Pro B29
- [0226] Arg B10+Lys B28+Pro B29
- [0227] Gly A21+Glu B28+Pro B29
- [0228] Ser A21+Glu B28+Pro B29
- [0229] Thr A21+Glu B28+Pro B29
- [0230] Ala A21+Lys B28+Pro B29
- [0231] His A21+Lys B28+Pro B29
- [0232] Glu B28+Pro B29+Ala B30
- [0233] Glu B28+Pro B29+des B30
- [0234] Asp A21+Lys B28+ProB29
- [0235] Lys B28+Pro B29+Ala B30
- [0236] Lys B28+Pro B29+des B30
- [0237] Arg B27+Gly A21+Thr B30NH₂。

[0238] 在一个优选的实施方案中,肽包含来自天然序列的四个氨基酸改变。优选地,该四个氨基酸改变选自以下变化:

- [0239] Ser A21+Arg B27+Gln A17+Gln B13
- [0240] Thr A21+Arg B27+Gln A17+Gln B13
- [0241] Ala A21+Arg B27+Gln A17+Gln B13
- [0242] Asp A21+Arg B27+Gln A17+Gln B13

[0243] His A21+Arg B27+Gln A17+Gln B13
[0244] Glu B10+His A8+His B4+His B27
[0245] Gly A21+Lys B27+Gln A17+Gln B13
[0246] Ser A21+Lys B27+Gln A17+Gln B13
[0247] Thr A21+Lys B27+Gln A17+Gln B13
[0248] Ala A21+Lys B27+Gln A17+Gln B13
[0249] Asp A21+Lys B27+Gln A17+Gln B13
[0250] His A21+Lys B27+Gln A17+Gln B13
[0251] Gly A21+Arg B27+Gln A17+Gln B13
[0252] des B27+des B28+des B29+des B30
[0253] Gly A21+Asp B10+Glu B28+Pro B29
[0254] Ser A21+Asp B10+Glu B28+Pro B29
[0255] Thr A21+Asp B10+Glu B28+Pro B29
[0256] Ala A21+Asp B10+Glu B28+Pro B29
[0257] His A21+Asp B10+Glu B28+Pro B29
[0258] Asp A21+Asp B10+Glu B28+Pro B29
[0259] Gly A21+Thr B10+Glu B28+Pro B29
[0260] Ser A21+Thr B10+Glu B28+Pro B29
[0261] Thr A21+Thr B10+Glu B28+Pro B29
[0262] Ala A21+Thr B10+Glu B28+Pro B29
[0263] His A21+Thr B10+Glu B28+Pro B29
[0264] Asp A21+Thr E10+Glu B28+Pro B29
[0265] Ala A21+Arg B10+Glu B28+Pro B29
[0266] Ala A21+Asp B10+Lys B28+Pro B29
[0267] His A21+Asp B10+Lys B28+Pro B29
[0268] Asp A21+Asp B10+Lys B28+Pro B29
[0269] Gly A21+Arg B10+Glu B28+Pro B29
[0270] Ser A21+Arg B10+Glu B28+Pro B29
[0271] Thr A21+Arg B10+Glu B28+Pro B29
[0272] Gly A21+Thr B10+Lys B28+Pro B29
[0273] Ser A21+Thr B10+Lys B28+Pro B29
[0274] His A21+Arg B10+Glu B28+Pro B29
[0275] Asp A21+Arg B10+Glu B28+Pro B29
[0276] Gly A21+Asp B10+Lys B28+Pro B29
[0277] Ser A21+Asp B10+Lys B29+Pro B29
[0278] Thr A21+Asp B10+Lys B28+Pro B29
[0279] Ser A21+Arg B10+Lys B28+Pro B29
[0280] Thr A21+Arg B10+Lys B28+Pro B29
[0281] Ala A21+Arg B10+Lys B28+Pro B29

[0282] His A21+Arg B10+Lys B28+Pro B29
[0283] Asp A21+Arg B10+Lys B28+Pro B29
[0284] Gly A21+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0285] Ser A21+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0286] Thr A21+Lys B28+Pro B29+Ala B30
[0287] Ala A21+Lys B28+Pro B29+Ala B30
[0288] His A21+Lys B28+Pro B29+Ala B30
[0289] Asp A21+Lys B28+Pro B29+Ala B30
[0290] Thr A21+Thr B10+Lys B28+Pro B29
[0291] Ala A21+Thr B10+Lys B28+Pro B29
[0292] His A21+Thr B10+Lys B28+Pro B29
[0293] Asp A21+Thr B10+Lys B28+Pro B29
[0294] Gly A21+Arg B10+Lys B28+Pro B29
[0295] Gly A21+Glu B28+Pro B29+des B30
[0296] Ser A21+Glu B28+Pro B29+des B30
[0297] Thr A21+Glu B28+Pro B29+des B30
[0298] Ala A21+Glu B28+Pro B29+des B30
[0299] His A21+Glu B28+Pro B29+des B30
[0300] Thr B10+Glu B28+Pro B29+des B30
[0301] Arg B10+Glu B28+Pro B29+des B30
[0302] Asp B10+Lys B28+Pro B29+des B30
[0303] Thr B10+Lys B28+Pro B29+des B30
[0304] Arg B10+Lys B28+Pro B29+des B30
[0305] des B27+des B29+des B29+des B30
[0306] Asp A21+Glu B28+Pro B29+des B30
[0307] Gly A21+Lys B28+Pro B29+des B30
[0308] Ser A21+Lys B28+Pro B29+des B30
[0309] Thr A21+Lys B28+Pro B29+des B30
[0310] Ala A21+Lys B28+Pro B29+des B30
[0311] His A21+Lys B28+Pro B29+des B30
[0312] Asp A21+Lys B28+Pro B29+des B30
[0313] Asp B10+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0314] Thr B10+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0315] Arg B10+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0316] Asp B10+Lys B28+Pro B29+Ala B30
[0317] Thr A21+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0318] His A21+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0319] Asp A21+Glu B28+Pro B29+Ala B30
[0320] Gly A21+Lys B28+Pro B29+Ala B30

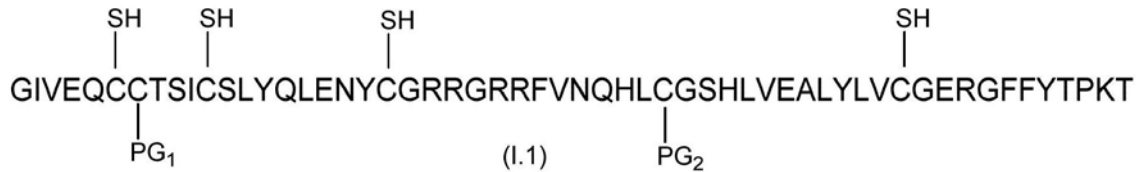
- [0321] Ser A21+Lys B28+Pro B29+Ala B30
- [0322] Thr B10+Lys B28+Pro B29+Ala B30
- [0323] Arg B10+Lys B28+Pro B29+Ala B30
- [0324] Asp B10+Glu B28+Pro B29+des B30
- [0325] 在一个优选的实施方案中,肽包含来自天然序列的五个氨基酸改变。优选地,该五个氨基酸改变于以下位置:
- [0326] B26、B27、B28、B29和B30,例如,des B26+des B27+des B28+des B29+des B30。
- [0327] 在一个优选的实施方案中,C为SEQ ID NO:1所示序列的肽,
- [0328] RRGRR[SEQ ID NO:1]
- [0329] 在一个优选的实施方案中,A包含SEQ ID NO:2所示序列的肽,
- [0330] ¹GIVEQCCTSICSLYQLENYCG²¹[SEQ ID NO:2]
- [0331] 其中各氨基酸为未保护的或任选地受保护的,例如,其中氨基酸侧链包含官能团。优选的保护基团包括酸可裂解的保护基团,如^tBu、Acm、O^tBu、Trt、Mmt、Mtt和Pbf。
- [0332] 在更优选的实施方案中,A由SEQ ID NO:2的肽构成,其中各氨基酸任选地受保护。
- [0333] 在另一个优选的实施方案中,A包含SEQ ID NO:8所示序列的肽,
- [0334] ¹GIVEQCCTSICSLYQLENYCN²¹[SEQ ID NO:8]
- [0335] 其中各氨基酸为未保护的或任选地受保护,例如,其中氨基酸侧链包含官能团。优选的保护基团包括酸可裂解的保护基团,如^tBu、Acm、O^tBu、Trt、Mmt、Mtt和Pbf。
- [0336] 在更优选的实施方案中,A由SEQ ID NO:8的肽构成,其中各氨基酸任选地受保护。
- [0337] 在一个优选的实施方案中,B包含SEQ ID NO:3所示序列的肽,
- [0338] ¹FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT³⁰[SEQ ID NO:3]
- [0339] 其中各氨基酸为未保护的或任选地受保护,例如,其中氨基酸侧链包含官能团。优选的保护基团包括酸可裂解的保护基团,如^tBu、Acm、O^tBu、Trt、Mmt、Mtt和Pbf。
- [0340] 在更优选的实施方案中,B由SEQ ID NO:3的肽构成,其中各氨基酸任选地受保护。
- [0341] 在一个优选的实施方案中,多肽化合物为SEQ ID NO:4:
- [0342] SEQ ID NO:4
- [0343] ¹GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT⁵⁶
- [0344] 其中各氨基酸为未保护的或任选地受保护,例如,其中氨基酸侧链包含官能团。优选的保护基团包括酸可裂解的保护基团,如^tBu、Acm、O^tBu、Trt、Mmt、Mtt和Pbf。
- [0345] 在一个优选的实施方案中,多肽化合物选自SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:7,
- [0346] SEQ ID NO:4
- [0347] ¹GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT⁵⁶
- [0348] SEQ ID NO:5
- [0349] ¹GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT⁵⁶
- [0350] SEQ ID NO:6
- [0351] ¹GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT⁵⁶
- [0352] SEQ ID NO:7
- [0353] ¹GIVEQCCTSICSLYQLENYCGRRGRRFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT⁵⁶
- [0354] 其中在SEQ ID NO:4至SEQ ID NO:7中,C表示用保护基团保护的半胱氨酸,而C表

示未保护的半胱氨酸。

[0355] 在一个优选的实施方案中,半胱氨酸保护基团为Acm或Trt。

[0356] 在一个优选的实施方案中,多肽化合物具有式I.1

[0357]



[0358] 其中PG₁和PG₂各自独立地为半胱氨酸保护基团,并且C-SH代表未保护的半胱氨酸。优选地,PG₁和PG₂各自独立地为Acm或Trt。

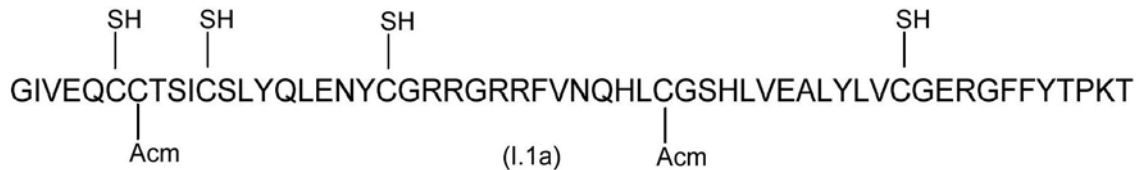
[0359] 合适的氨基酸的保护基团是本领域技术人员所熟悉的。可在T.W.Greene&P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis(第二版)J.Wiley&Sons,1991;以及P.J.Kocienski,Protecting Groups,Georg Thieme Verlag,1994中找到实例。

[0360] 如本文所用,Acm是指S-乙酰胺基甲基(S-acetomidomethyl)保护基团。用碘处理含有S-Acm保护基团的肽可同时造成巯基保护基团的除去和二硫化物的形成。

[0361] 如本文所用,Trt是指三苯基甲基保护基团。Trt保护基团是酸不稳定的并且可以在酸性条件下(例如用TFA处理)除去。

[0362] 在更优选的实施方案中,多肽化合物具有式(I.1a):

[0363]



[0364] 其中C-SH代表未保护的半胱氨酸

[0365] 胰岛素原衍生物的制备方法

[0366] 本发明的胰岛素原衍生物可通过传统的合成方法(例如固相方法)或通过重组方法来制备。

[0367] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及使用固相肽合成来制备如上定义的多肽化合物的方法。所附实施例部分更详细地描述了此类合成。

[0368] 可以使用2-氯三苯甲基树脂作为固体载体,使用Fmoc/tBu保护策略进行合成。为了保护Cys残基,可以使用Trt或Trt/Acm保护基团。

[0369] 在可选的实施方案中,可以通过本领域已知的方法重组制备本发明的肽化合物。进一步的细节参见例如EP0518587A的教导。

[0370] 因此,本发明的一个方面涉及编码如上定义的多肽化合物的DNA序列。

[0371] 本发明的另一个方面涉及包含如上所述的DNA序列的重组DNA载体。

[0372] 本发明的另一个方面涉及如上定义的多肽化合物的重组制备的方法,所述方法包括以下步骤:

[0373] (i) 构建编码如上所述的多肽化合物的DNA序列,

[0374] (ii) 将所述DNA序列引入合适的载体中,所述载体含有在宿主细胞中具有功能的

启动子-操纵子区域，

[0375] (iii) 使所述DNA序列在所述载体中定向，以实现所述DNA序列的转录和翻译，并且进一步地，使所述DNA序列处于所述启动子-操纵子区域的转录调控之下，

[0376] (iv) 用所述载体转化所述宿主细胞，

[0377] (v) 在适当的条件下培养所述经转化的宿主细胞，以诱导所述基因的转录和翻译，以及

[0378] (vi) 回收并纯化由所述DNA序列编码的多肽产物。

[0379] 本发明的另一个方面涉及制备胰岛素或其衍生物的方法，所述方法包括以下步骤：

[0380] (i) 构建编码如上所述的多肽化合物的DNA序列；

[0381] (ii) 将所述DNA序列引入合适的载体中，所述载体含有在宿主细胞中具有功能的启动子-操纵子区域，

[0382] (iii) 使所述DNA序列在所述载体中定向，以实现所述DNA序列的转录和翻译，并且进一步地，使所述DNA序列处于所述启动子-操纵子区域的转录调控之下，

[0383] (iv) 用所述载体转化所述宿主细胞，

[0384] (v) 在适当的条件下培养所述经转化的宿主细胞，以诱导所述基因的转录和翻译，以及

[0385] (vi) 回收并纯化由所述DNA序列编码的多肽产物，

[0386] (vii) 切割由所述基因编码的所述多肽产物，以切除C肽。

[0387] 胰岛素衍生物的氧化折叠的方法及其中的中间体

[0388] 本发明的另一个方面涉及制备胰岛素或其衍生物的方法，所述方法包括以下步骤：

[0389] (i) 制备根据本发明的多肽化合物，和

[0390] (ii) 切割所述多肽，以切除C肽。

[0391] 所得的本文所述的反序“超迷你”胰岛素原的折叠可以通过一步或两步进行。可以由胰蛋白酶和/或羧肽酶B以常规方式除去C肽。所附实施例部分描述了ACB胰岛素原衍生物的合成，其中Cys残基的侧链的保护方式为：被6个Trt基团保护，或被2个Acm基团保护，和被4个Trt基团保护这三种可能的组合。然后比较它们的折叠效率，并通过HPLC分析所得产物的性质。

[0392] 结果表明，可以以高纯度和产率制备A-C-B胰岛素原肽。使用两步氧化步骤表现为特别有效。以这种方式，可以通过酶促除去链桥C肽，从而将折叠的单链胰岛素前体转化为生物活性的双链胰岛素。

[0393] 本发明的另一个方面涉及制备胰岛素或其衍生物的方法，所述方法包括以下步骤：

[0394] (i) 制备A-C-B多肽，和

[0395] (ii) 切割所述多肽，以切除C肽。

[0396] 在优选的实施方案中，A和B如式(I)所定义，并且C为胰岛素或其变体的连接肽。在另一个优选的实施方案中，C为如式(I)所定义的肽，即 $(X_1)_p-(X)_n-(X_3)_q$ 。

[0397] 在一个优选的实施方案中，胰岛素A链第7位的半胱氨酸残基和胰岛素B链第7位的

半胱氨酸残基各自用保护基团进行保护。

[0398] 在一个优选的实施方案中,A链的第6位、第11位和第20位的半胱氨酸残基为未保护的,并且B链的第19位的半胱氨酸残基为未保护的。

[0399] 在另一个优选的实施方案中,A链的第6位、第11位和第20位以及B链的第19位的半胱氨酸残基为未保护的,并且A链的第7位以及B链的第7位的半胱氨酸残基各自用保护基团进行保护。

[0400] 优选地,保护基团为Acm或Trt,更优选Acm。

[0401] 在一个特别优选的实施方案中,该方法包括肽化合物的逐步氧化折叠,所述方法包括以下步骤:

[0402] (i) 使如上定义的肽氧化,以形成第一中间体;

[0403] (ii) 使所述第一中间体氧化,以形成第二中间体;

[0404] (iii) 切割所述第二中间体,以切除C肽。

[0405] 优选地,肽具有如上定义的式I.1或I.1a。

[0406] 在一个优选的实施方案中,步骤(i) (第一氧化步骤) 包括用DMSO处理肽,以形成第一中间体。然后除去剩余的保护基团,然后对所得的中间体进行进一步的(第二氧化步骤),以形成第二中间体。可以通过任何合适的方法除去中间体的保护基团。因此,在起始肽中引入正交半胱氨酸保护基团使得氧化折叠方法能够以优选的方式进行。

[0407] 更优选地,步骤(i) 包括在Gly缓冲液中用DMSO处理,更优选在0.1M的Gly缓冲液用20%的DMSO处理。优选地,混合物的pH大于9,更优选大于10,还更优选为约10.5。优选地,氧化进行的时间为至少4小时,更优选至少8小时,更优选至少21小时,甚至更优选1天。优选地,在室温下进行反应。

[0408] 在一个优选的实施方案中,步骤(ii) (第二氧化步骤) 包括在乙酸/水中用碘处理第一中间体。

[0409] 优选地,在比例为约4:1的AcOH/水中用碘进行第二氧化步骤。优选地,反应进行的时间为至少30分钟,更优选至少1小时。优选地,在室温下进行反应。

[0410] 在一个优选的实施方案中,切割步骤(iii) 包括用胰蛋白酶处理第二中间体。

[0411] 优选地,在室温下进行C肽的切割。优选地,使用胰蛋白酶在tris缓冲液中进行反应。优选地,pH大于7.5,更优选约8。优选地,反应进行的时间为约5分钟。

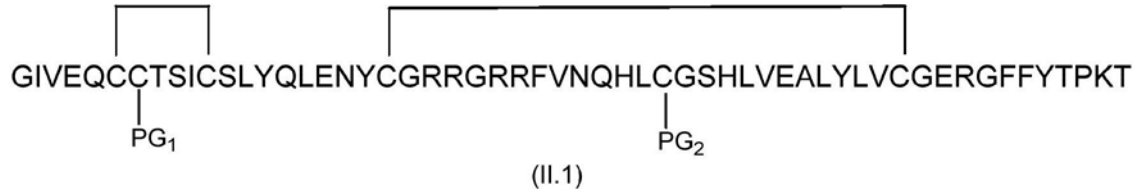
[0412] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的方法如以下方案1中所示:

[0421]



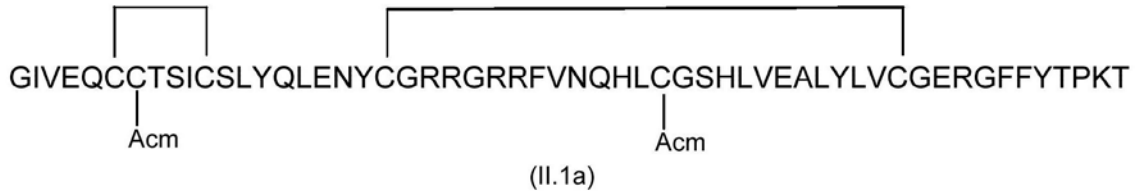
[0422] 在另一个优选的实施方式中,本发明涉及式(II.1)的多肽:

[0423]

[0424] 其中PG₁和PG₂各自独立地为半胱氨酸保护基团,优选Acm或Trt,更优选Acm。

[0425] 因此,在一个优选的实施方式中,本发明涉及式(II.1a)的肽化合物:

[0426]



[0427] 在另一个实施方式中,本发明涉及式(III.1)的肽化合物:

[0428]



[0429] 式I.1、I.1a、II.1和II.1a的肽为胰岛素的制备中有用的中间体。

[0430] 药物组合物

[0431] 本发明的一个方面涉及一种药物组合物,其包含本发明的胰岛素原衍生物,并混有可药用的稀释剂、赋形剂或载体、或其混合物。尽管本发明的胰岛素原衍生物(包括其可药用的盐、酯和可药用的溶剂化物)可以单独施用,但是它们通常与药学载体、赋形剂或稀释剂混合在一起而施用,特别是在用于人类治疗中。该药物组合物可以在人类和兽医学中用于人类或动物。

[0432] 例如,本发明化合物可混有常规药物载体和赋形剂,并以片剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、薄片(wafer)等形式使用。包含ACB胰岛素原化合物的组合物通常含有约0.1重量%至90重量%的活性化合物,并且更通常约10重量%至30重量%。该组合物可包含普通的载体和赋形剂,如玉米淀粉或明胶、乳糖、蔗糖、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、磷酸氢钙、氯化钠和海藻酸。

[0433] 通常用于本发明的制剂的崩解剂包括交联羧甲基纤维素、微晶纤维素、玉米淀粉、淀粉钠,羟乙酸盐和海藻酸。

[0434] 用于本发明所述的药物组合物的各种不同形式的合适的赋形剂的例子可见于由A

Wade和PJ Weller编辑的“Handbook of Pharmaceutical Excipients,第二版,(1994)。

[0435] 用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂是药学领域中所熟知的,例如在Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.(A.R.Gennaro edit.1985)中有所描述。

[0436] 合适的载体的例子包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露醇、山梨醇等。合适的稀释剂包括乙醇、甘油和水。

[0437] 药学载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据意向给药路径和标准药学实践来进行选择。药物组合物可以包括任意合适的粘结剂、润滑剂、悬浮剂、涂层剂、增溶剂作为载体赋形剂或稀释剂,或者除了载体、赋形剂或稀释剂以外包括任意合适的粘结剂、润滑剂、悬浮剂、涂层剂、增溶剂。

[0438] 合适的粘结剂的例子包括淀粉、明胶、天然糖(如葡萄糖、无水乳糖、游离乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂)、天然和合成瓜尔胶(如阿拉伯树胶、黄蓍胶或海藻酸钠)、羧甲基纤维素和聚乙二醇。

[0439] 可包括的片剂粘结剂是阿拉伯树胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮)、羟丙基甲基纤维素、蔗糖、淀粉和乙基纤维素。

[0440] 合适的润滑剂的例子包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁或其他金属硬脂酸盐、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、硬脂酸、硅油、滑石、蜡、油和硅胶等。

[0441] 药物组合物中可以加入防腐剂、稳定剂、染料、甚至调味剂。防腐剂的例子包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可以使用抗氧化剂和悬浮剂。合适的调味剂包括薄荷、冬青油、樱桃调味剂等。可能需要添加着色剂,以使得剂型在外观上更具吸引力或有助于识别产品。

[0442] 对于静脉内(IV)的应用,可以将水溶形式的本发明化合物溶解在一种常用的静脉内液体中并通过输注施用。可以使用此类流体,例如生理盐水、林格氏液或5%的葡萄糖溶液。

[0443] 对于肌肉内制剂,可将本发明的化合物的合适的可溶性盐形式的无菌制剂(例如盐酸盐)在药物稀释剂(如无热原水(由蒸馏得到)、生理盐水或5%的葡萄糖溶液)中溶解并施用。可制备合适的不溶形式的化合物,并作为水基或可药用的油基(例如长链脂肪酸的酯,如油酸乙酯)悬浮液的形式施用。

[0444] 对于口服使用,ACB胰岛素原的合适的盐形式的无菌制剂(例如,配制在诸如蒸馏水或去离子水之类的稀释剂中的盐酸盐)是特别有用的。

[0445] 可供选择地,化合物的单位剂型可以为在无菌气密封安瓿中的合适稀释剂中的化合物(优选其盐形式)溶液。根据化合物的具体形式及其溶解度和医师所需的剂量,单位剂量的化合物的浓度可以(例如)为约1%至约50%不等。

[0446] 盐/酯

[0447] 本发明的胰岛素原衍生物可以盐或酯的形式存在,特别是可药用的盐或酯。

[0448] 本发明的胰岛素原衍生物的可药用的盐包括其合适的酸加成盐或碱盐。合适的可药用的盐可参见Berge等人的综述J Pharm Sci,66,1-19(1977)。可与强无机酸,如矿物酸(例如硫酸、磷酸或氢卤酸);与强有机羧酸,如未取代或取代(如被卤素取代)的具有1至4个碳原子的烷羧酸(例如乙酸);与饱和或不饱和二羧酸,例如草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、

富马酸、邻苯二甲酸或对苯二酸；与羟基羧酸，例如抗坏血酸、乙醇酸、乳酸、苹果酸、酒石酸或柠檬酸；与氨基酸，例如天冬氨酸或谷氨酸；与苯酸；或与有机磺酸，如未取代或取代（例如被卤素取代）的（C₁-C₄）-烷基-或芳基-磺酸（例如甲磺酸或对甲苯磺酸）形成盐。

[0449] 根据待酯化的官能团，可利用有机酸或醇/氢氧化物来形成酯。有机酸包括羧酸，如未取代或取代（如被卤素取代）的具有1至12个碳原子的烷羧酸（例如乙酸）；饱和或不饱和二羧酸，例如草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、邻苯二甲酸或对苯二酸；羟基羧酸，例如抗坏血酸、乙醇酸、乳酸、苹果酸、酒石酸或柠檬酸；与氨基酸，例如天冬氨酸或谷氨酸；苯酸；或与有机磺酸，如未取代或取代（例如被卤素取代）的（C₁-C₄）-烷基-或芳基-磺酸（例如甲磺酸或对甲苯磺酸）。合适的氢氧化物包括无机氢氧化物，如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝。醇包括未取代或取代（如被卤素取代）的具有1至12个碳原子的烷醇。

[0450] 对映异构体/互变异构体

[0451] 在本文所述本发明的所有方面，本发明包括本发明的胰岛素原衍生物的合适的的所有对映异构体和互变异构体。本领域技术人员能够识别具有光学性质（一个或多个手性碳原子）或互变异构特性的化合物。相应的对映异构体和/或互变异构体可通过本领域已知的方法分离或制备。

[0452] 立体异构体和几何异构体

[0453] 本发明的一些胰岛素原衍生物可以立体异构体和/或几何异构体存在，例如它们可具有一个或多个不对称和/或几何中心，从而存在两个或多个立体异构和/或几何形式。本发明包括使用这些类似物及其混合物的所有独立的立体异构体和几何异构体。权利要求中所用的术语包括这些形式，条件是所述形式保留合适的官能团活性（尽管不一定能达到相同程度）。

[0454] 本发明还包括胰岛素原衍生物或其可药用盐的所有合适的同位素变体。同位素变体定义为：至少一个原子被具有相同原子序数但是具有与自然界通常发现的原子质量不同的原子质量的原子替换。可以引入所述试剂及其可药用盐的同位素的例子包括：氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟和氯的同位素，如分别为²H、³H、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F和³⁶Cl。特定同位素变体在药物和/或基体组织分布的研究中是有用的，例如引入³H或¹⁴C的放射性同位素。由于易于制备和检测，氚标记（即³H）和C-14（即¹⁴C）同位素是特别优选的。此外，诸如氘（即²H）的同位素的取代可能由于具有更高的代谢稳定性而具有一定的治疗优势，例如提高体内半衰期或降低所需剂量，因此在一些情况下是优选的。通常可使用适当试剂的合适的同位素变体通过常规方法来制备本发明所述类似物及其可药用的盐的同位素变体。

[0455] 溶剂化物

[0456] 本发明也包括本发明化合物的溶剂化物的形式。权利要求中所用的术语包括这些形式。

[0457] 多形体

[0458] 本发明还涉及本发明化合物的各种晶体形式、多晶形物和（无水型）含水型。药学产业已经建立了这样的方式，化学化合物可以任意这样的形式通过略微改变在化合物的合成制备中所用的溶剂的纯化方法和/或分离方法被分离。

[0459] 前体药物

[0460] 本发明还包括前体药物形式的本发明的胰岛素原衍生物。这种前体药物通常是本

发明类似物,其中一个或多个合适的基团经修饰从而在人或哺乳动物受试者中施用该修饰能够逆转。尽管也可与这样的前体药物一起施用第二种试剂从而在体内进行所述逆转,但是这样的逆转通常是由该受试者体内天然存在的酶进行的。这样的修饰的例子包括酯(例如上述的任意那些),其中所述逆转可由酯酶进行。其它这样的体系是本领域技术人员所熟知的。

[0461] 施用

[0462] 本发明的药物组合物可以通过口服、直肠、阴道、肠胃外、肌肉内、腹腔、动脉内、鞘内、支气管内、皮下、皮肤内、静脉内、鼻内、口腔或舌下路径施用。

[0463] 对于口服施用,特定用途是制成压片、丸剂、片剂、凝胶胶囊(gellules)、滴剂和胶囊剂。优选地,这些组合物单位剂量中包含1mg至250mg的活性成分,并且更优选包含10mg至100mg的活性成分。

[0464] 施用的其它形式包括可通过静脉内、动脉内、鞘内、皮下、皮肤内、腹腔或肌肉内注射的溶液或乳液,并且可由灭菌溶液或可灭菌溶液制备。本发明的药物组合物还可以是栓剂、阴道栓、混悬剂、乳剂、洗剂、软膏剂、霜剂、凝胶剂、喷雾剂、溶液或粉状散剂的形式。

[0465] 经皮施用的可选方式是使用皮肤贴剂。例如可将活性成分引入霜剂(由聚乙二醇的水性乳液或液体石蜡构成)中。也可以1重量%至10重量%的浓度将活性成分引入由白蜡或白软石蜡基以及根据需要的稳定剂和防腐剂构成的膏剂中。

[0466] 可注射形式的单位剂量中可包含10mg至1000mg的活性成分,更优选包含10mg至250mg的活性成分。

[0467] 组合物可以配制成单位剂量形式,即含有单位剂量的离散部分、或单位剂量的多个单元或子单元的形式。

[0468] 剂量

[0469] 无需过度实验,本领域技术人员能够容易地确定对受试者施用的一种已经配制好的组合物的合适剂量。通常,医师将能够确定最适合个体患者的实际剂量,并且这将取决于一系列因素:包括所采用的特定化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和作用时长、受试者年龄、体重、健康状况、性别、饮食、施用方式和时间、排泄速率、药物组合、特定状况的严重程度、以及个体所经历的治疗。本文公开的剂量为示例性的平均情况。这些当然是个体的情况,其中可以包含更高或更低的剂量范围,并且这些均包括在本发明的范围内。

[0470] 治疗用途

[0471] 本发明的另一个方面涉及如上所述的胰岛素原衍生物在药物中的用途。

[0472] 本发明的另一个方面涉及如上所述的胰岛素原衍生物在治疗或预防糖尿病中的用途、或治疗或预防高血糖症中的用途。

[0473] 所述糖尿病优选为2型糖尿病。

[0474] 本发明的另一个方面涉及如上所述的胰岛素原衍生物在制备用于治疗糖尿病、或治疗或预防高血糖症的药物中的用途。

[0475] 如本文所用,短语“制备药物”包括除了本发明的类似物在筛选进一步治疗剂或制备这样的药物的任意阶段中的用途以外,将本发明的类似物直接用作药物的用途。

[0476] 本发明的另一个方面涉及在需要的受试者中治疗糖尿病、或治疗或预防高血糖症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如上所述的单链胰岛素类似物。

[0477] 优选地,该方法包括以约10 μ g/kg至1000 μ g/kg的剂量向生物体施用一定量的ACB胰岛素原。更优选的剂量为约10 μ g/kg至100 μ g/kg的活性化合物。成年人的典型日剂量为约0.5mg至100mg。

[0478] 在实施该方法时,可以以单一日剂量或每日多剂量施用本发明化合物。治疗方案可能需要在较长的时期内施用。每次施用剂量或施用的总量将取决于诸如疾病的性质和严重程度、患者的年龄和一般健康状况以及患者对化合物的耐受性等因素。

[0479] 实施治疗方法的便利方法是通过静脉内输注施用本发明的化合物。在该方法中,将化合物的合适的可溶性盐的无菌制剂掺入生理溶液(如5%的葡萄糖溶液)中,并将所得的溶液缓慢地进行IV输注。可供选择地,也可以使用背负式(piggy-back) IV输注方法。

附图说明

[0480] 参照以下附图进一步描述本发明,其中:

[0481] 图1示出了根据本发明的ACB胰岛素原肽1至4。

[0482] 图2示出了肽4(C(Acm)⁷C(Acm)³³)的第一氧化步骤(用DMSO)的示意图。

[0483] 图3示出了具有C=RRGRR的粗还原的C(Acm)⁷C(Acm)³³反序胰岛素原(A)、用DMSO对其进行氧化后所得的产物(B)的HPLC图谱和ESI-MS,以及经纯化的产物(具有C=RRGRR的双氧化的ACB胰岛素原)的HPLC图谱(C)。

[0484] 图4示出了具有C=RRGRR的肽4(C(Acm)⁷C(Acm)³³)反序胰岛素原的第二氧化步骤(用I₂)以及经由胰蛋白酶解的C肽切除的图解说明。

[0485] 图5示出了以下物质的HPLC图谱和相应的MS谱:具有C肽RRGRR的粗制反序胰岛素原(A);经纯化后的具有C肽RRGRR的粗制反序胰岛素原(B);经胰蛋白酶切割后得到的产物混合物(D)和最终经纯化的[Gly^{A21}、Arg^{A22}、Arg^{A23}]胰岛素衍生物(E)。

具体实施方式

[0486] 通过以下非限制性例子进一步描述本发明。

[0487] 实施例

[0488] 缩写

[0489]	Acm	5-乙酰胺基甲基
[0490]	Boc	叔丁氧羰基
[0491]	CTC	氯三苯甲基氯
[0492]	NMP	N-甲基吡咯烷酮
[0493]	DCM	二氯甲烷
[0494]	TFA	三氟乙酸
[0495]	RE	旋转蒸发器
[0496]	DEE	二乙醚
[0497]	DIC	N,N'-二异丙基碳二亚胺
[0498]	HOBt	羟基苯并三唑
[0499]	HOSu	N-羟基琥珀酰亚胺
[0500]	Hyp	(2S,4R)-4-羟基脯氨酸或L-羟基脯氨酸

[0501]	DMF	二甲基甲酰胺
[0502]	EDAC	1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺
[0503]	RT	室温
[0504]	DTT	二硫苏糖醇
[0505]	DMSO	二甲亚砜
[0506]	MMt	单甲氧基三苯甲基
[0507]	Trt	三苯甲基
[0508]	DIPEA/DIEA	N,N-二异丙基乙胺
[0509]	Fmoc	芴甲氧羰基
[0510]	MeOH	甲醇
[0511]	AcOH	乙酸
[0512]	TFE	三氟乙醇
[0513]	Dde	N-(1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基)
[0514]	IPA	异丙醇
[0515]	TES	三乙基硅烷
[0516]	实施例1	

[0517] A-Arg-Arg-Gly-Arg-Arg-B胰岛素原 (ACB胰岛素原) 的固相合成

[0518] 一般步骤:

[0519] A1. 加载的2-氯三苯甲基树脂的制备

[0520] 将来自CBL-Patras的2-氯三苯甲基氯树脂 (CTC-C1) (2g; 载量1.6mmol/g) 置于60ml肽合成反应器中, 并在25°C用15ml二氯甲烷 (DCM) 溶胀15分钟。将树脂过滤, 并添加通过使1mmol Fmoc-氨基酸和8mmol二异丙基乙胺 (DIEA) 溶解于10ml DCM中而获得的溶液。在25°C, 将混合物搅拌2小时。通过添加1ml甲醇 (MeOH) 并反应1小时, 从而对2-CTC树脂的剩余活性位点进行中和。将树脂过滤并用由DCM/MeOH/DIPEA (85:10:5) 构成的混合物洗涤三次, 每次10ml, 并用NMP洗涤三次。洗涤后, 用10ml 25体积%的哌啶的NMP溶液将树脂处理二次, 处理时间为30分钟。用10ml NMP将树脂洗涤五次。用10ml异丙醇 (IPA) 将树脂洗涤3次, 树脂未溶胀, 并干燥至恒重。所用的70%至95%mmol的氨基酸结合在树脂上。

[0521] B. 固相合成, 一般方案

[0522] 如实施例1的A部分中所述, 在24°C进行固相合成, 将1.0g氨基酸酯化至CTC树脂。在整个合成期间, 使用以下方案。

[0523] B1. 树脂的溶胀

[0524] 将树脂置于装配有多孔聚丙烯玻璃料 (frit) 的20ml塑料注射器中, 并用7ml NMP处理两次, 然后过滤。

[0525] B2. 氨基酸的活化

[0526] 在10ml小瓶中, 将氨基酸 (3.0当量) 和1-羟基苯并三唑 (4.0当量) 溶于它们体积2.5倍的NMP中, 并冷却至0°C。然后添加DIC (3.0当量) 并将混合物搅拌15分钟。

[0527] B3. 偶联反应

[0528] 然后将B2中制备的溶液添加到B1反应器中。用一体积的DCM将反应器洗涤一次, 并将其添加到反应器中, 在25°C至30°C搅拌1至3小时。进行Kaiser试验以确定反应的完成。

如果3小时后未完成偶联反应(阳性Kaiser试验),则将反应混合物过滤并用经活化的氨基酸的新制溶液重新偶联。偶联完成后,将反应混合物过滤并用NMP洗涤6次(每次洗涤用5体积)。

[0529] B4.Fmoc基团的除去

[0530] 将B3中得到的树脂过滤,然后用5ml含有25体积%哌啶的溶液处理30分钟。对树脂进行洗涤,3×5ml NMP。

[0531] B5.肽链的延伸

[0532] 在引入各氨基酸后,重复进行步骤B1至B5,直至形成所需的肽链。

[0533] 将以下Fmoc-氨基酸用于单个氨基酸或氨基酸片段的偶联:Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Asp(tBu)-OH、Fmoc-Glu(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH和Fmoc-Cys(Acm)-OH;以及以下Boc-氨基酸:Boc-Gly-OH。

[0534] C.使受保护的ACB胰岛素原肽及其受保护的片段从CTC树脂上裂解的一般方法,受保护的ACB胰岛素原肽的N末端上含有Fmoc基团或Boc基团

[0535] 将如上所述在B1至B5中产生的树脂结合的肽或肽片段用5ml NMP洗涤4次,用5ml IPA洗涤3次,最后用7ml DCM洗涤5次,以完全除去任何残留的NMP或其他碱性成分。然后将树脂冷却至0℃,从DCM中过滤并在5℃下用10ml 1.0%至1.5%的TFA的DCM/TES(95:5)溶液处理六次。

[0536] 然后将混合物在0℃搅拌20分钟并过滤。然后用10ml DCM将树脂洗涤三次。然后将吡啶添加到滤液中(相对于TFA为1.3当量)以中和TFA。然后将裂解液的DCM溶液与等体积的水混合。将所得的混合物减压蒸馏以除去DCM(28℃,350托)。除去DCM后,肽或肽片段析出。将所得的肽用水和乙醚洗涤,并在30℃至35℃、15托真空下干燥。可选择地,在真空中除去DCM,并通过添加乙醚使受保护的肽析出。

[0537] 实施例2

[0538] 受保护的ACB胰岛素原的脱保护

[0539] 一般方法:用10ml TFA/TES/DTT/DCM(93:3:3:3)将如上文实施例1中所述得到的受保护的ACB胰岛素原(100mg,0.01mmol)在5℃处理3小时,并在22℃处理1小时。将所得的溶液真空浓缩,然后通过添加二乙醚使脱保护的肽析出,并用10ml二乙醚洗涤三次。将所得的固体真空干燥(25℃,15托)直至恒重。产量:60mg。

[0540] 实施例3

[0541] 粗制ACB胰岛素原的一步(随机)氧化折叠(未保护所有Cys)

[0542] 将如实施例2中所述制备的10mg粗制脱保护的ACB胰岛素原(未保护所有Cys)溶于2ml DMSO中。向该溶液中添加pH 10.5的0.1M的Gly缓冲液(8ml),然后添加固体Gnd.HCl,直至得到澄清溶液(1.9g,约2M)。将该溶液在室温下静置过夜。在静置期间,形成了少量析出物。在装配有Waters 996PDA检测器的Waters Alliance 2695系统上,使用Purospher RP-8,125x4mm,5μm柱(Merck)和10%B至60%B的线性梯度,流量1ml/min(其中A=1%的TFA的水溶液并且B=1%的TFA的乙腈溶液)对上清液(用CF₃CO₂H酸化至pH 2)进行的HPLC分析表明,形成了三氧化异构体的复杂混合物。

[0543] 实施例4

[0544] [Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原的氧化折叠

[0545] 将如实施例2中所述制备的10mg粗制脱保护的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原溶解于2ml DMSO中。向该溶液中添加pH 10.5的0.1M Gly缓冲液(8ml), 然后添加固体Gnd.HCl, 直至得到澄清溶液(1.9g, 约2M)。将该溶液在室温下静置过夜。在静置期间, 形成了少量析出物。如上文实施例4中所述进行上清液(用CF₃CO₂H酸化至pH 2)的HPLC分析, 表明形成了主要的双氧化产物, 这与通过Waters-Micromass ZQ4000系统上的ESI-MS分析所证实的一样。M计算值6558.56Da, M实测值6558.36Da。

[0546] 实施例5

[0547] 双氧化的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原的纯化

[0548] 将如上文实施例4中所述得到的双氧化的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原溶液通过0.2膜注射式过滤器过滤后, 分两部分加载到Purospher RP-18半制备柱上, 该半制备柱条件: 10x 250mm (Merck); A相=1%的TFA的水溶液, B相=1%的TFA的乙腈溶液; 30%B等度洗脱5分钟, 然后在30分钟内从30%B至40%B进行线性梯度洗脱, 流量4ml/min。将收集的主要产物的级分在液氮中冷冻并冻干。纯化产率为30%。

[0549] 实施例6

[0550] 通过金黄色葡萄球菌V8蛋白酶指纹分析测定双氧化的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原中二硫键的配对

[0551] 将100μg经纯化的双氧化的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原溶解于150μL的0.1M乙酸铵(pH 4.0)中。添加50μL(5μg)金黄色葡萄球菌V8蛋白酶(测序级, 商购自Sigma-Aldrich)在0.1M乙酸铵中的溶液, 并在25℃孵育消化物。通过以下方式监测消化过程: 将20uL溶液注射在Purospher RP-8HPLC柱上, 使用30分钟内10%B至60%B的梯度。54小时后, 起始肽几乎消失。产生的峰的ESI-MS分析证实了双氧化的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原特有的二硫键排列。

[0552] 实施例7

[0553] 用碘氧化双氧化的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原

[0554] 将如上文实施例5中所述得到的经纯化和冻干的双氧化的[Cys (Acm) 7, 33]-ACB-胰岛素原(2mg)溶于乙酸/水(4:1v/v)的混合物(1ml)中。然后在摇动下, 用10分钟的时间将该溶液滴加至碘(4mg)的乙酸/水4:1(1ml)溶液中。在室温下静置1小时并偶尔摇动后, 添加2滴1M抗坏血酸水溶液以中和碘过量(脱色)。然后将该溶液分批加载到Purospher RP-8, 125X4mm HPLC柱(Merck)上, 并使用30分钟内10%B至60%B的梯度、流量1ml/min进行纯化。将收集的主要产物的级分在液氮中冷冻并冻干。产率: 70%。ESI-MS: M计算值6414.39Da, M实测值6413.83Da。

[0555] 实施例8

[0556] ACB胰岛素原的胰蛋白酶切割

[0557] 在室温下, 将500μg ACB胰岛素原溶解于500uL含有2M尿素和5μg胰蛋白酶的0.1M Tris.HCl缓冲液(pH 7.9) (Sigma, 轻微混浊溶液)中。5分钟后, 通过用三氟乙酸(5uL)酸化, 从而停止反应。离心后, 如实施例7所述的那样, 将溶液以100uL的量加载到Purospher RP-8柱上, 从而分离出主要产物。通过ESI-MS分析产物, 并且产物对应于[GlyA21]-胰岛素加2个

Arg残基 (ESI-MS:M计算值6062.97Da,M实测值6062.28Da)。用TCEP还原二硫键并对生成的两条链进行LC-MS分析后,确定产物为[GlyA21,ArgA22,ArgA23]-胰岛素。

[0558] 在不脱离本发明的范围和精神的前提下,本发明所述各方面的各种修改和变化对本领域技术人员来说是显而易见的。尽管已经结合具体的优选的实施方案对本发明进行了描述,应当理解,本发明不仅限于这些具体的实施方案。事实上,对相关领域的技术人员来说显而易见的实施本发明的所述模式的各种修改应包括在如下权利要求的范围内。

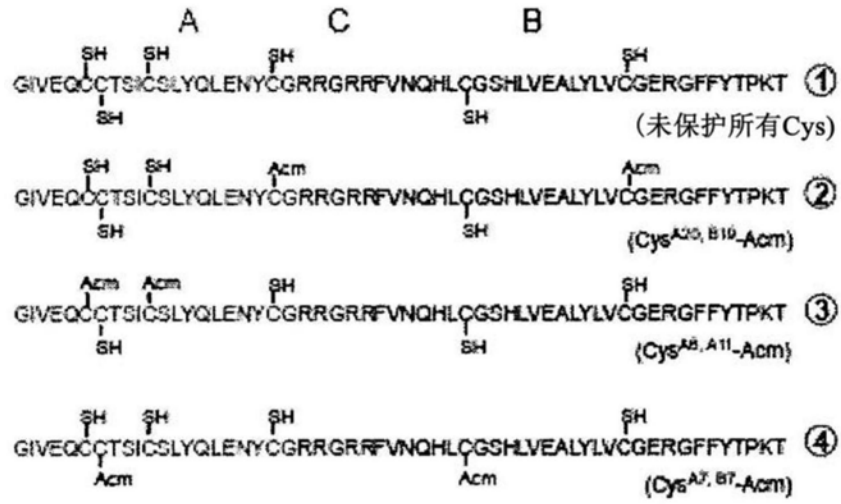


图1

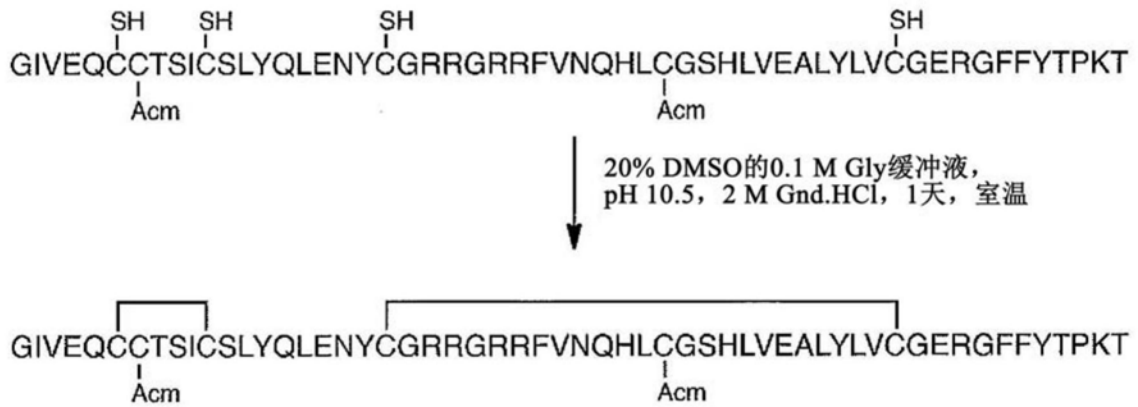


图2

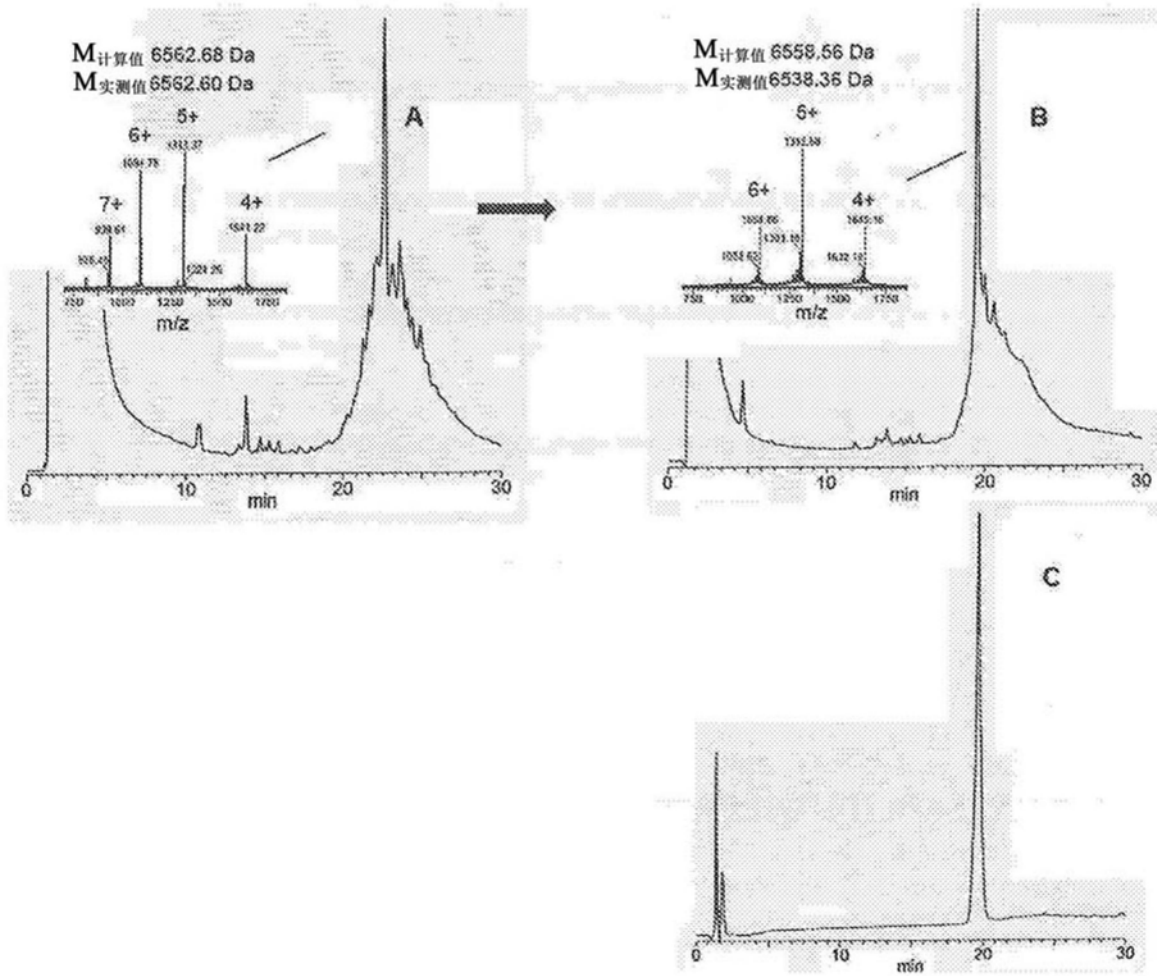


图3

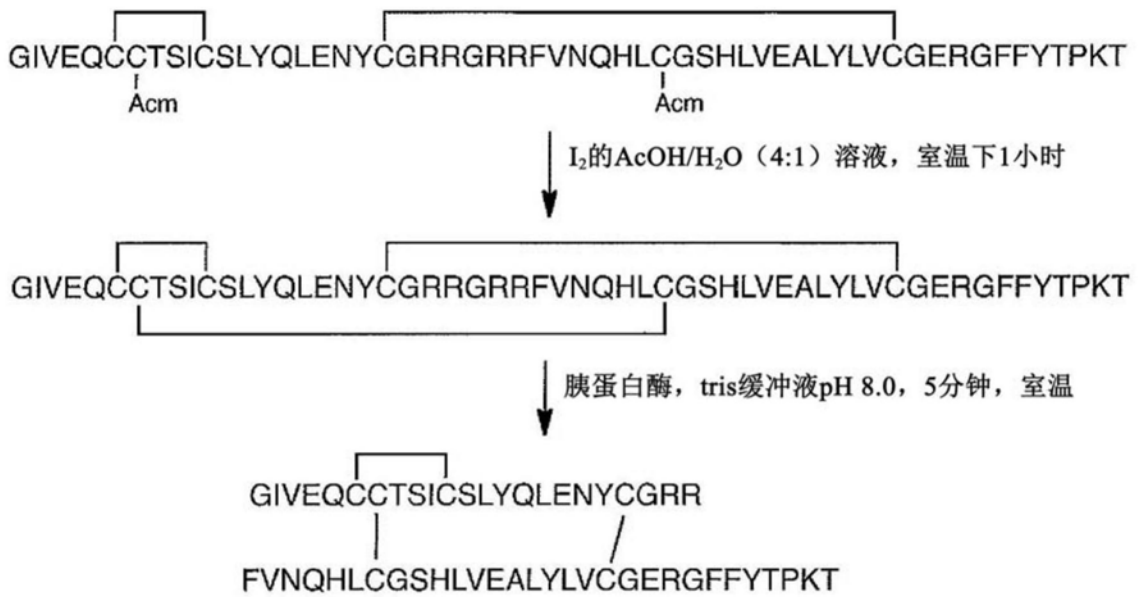


图4

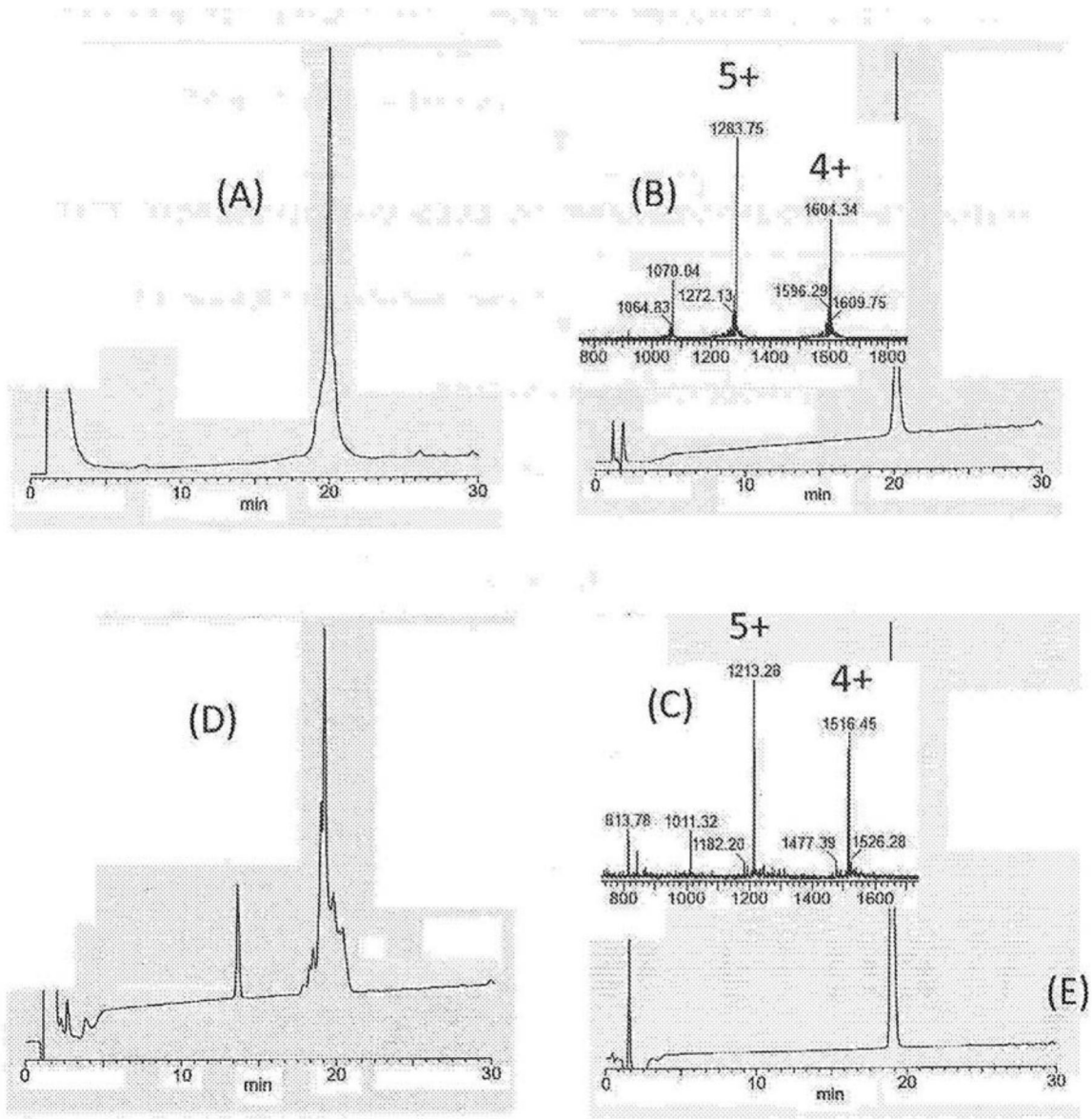


图5