



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102007143 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 200980101962.3

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2009.01.06

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

102008003568.8 2008.01.09 DE

102008025008.2 2008.05.24 DE

61/044,659 2008.04.14 US

(51) Int. Cl.

G07K 14/62(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/000017 2009.01.06

(87) PCT申请的公布数据

WO2009/087081 DE 2009.07.16

(71) 申请人 塞诺菲 - 安万特德国有限公司

地址 德国美因河畔法兰克福

(72) 发明人 P · 哈伯曼 G · 赛普克

R · 库尔勒 G · 米勒

M · 索默费尔德 N · 特纳格尔斯

G · 钱克 U · 韦尔纳

权利要求书 5 页 说明书 19 页 序列表 10 页
附图 3 页

(54) 发明名称

具有超延迟时效特征的新型胰岛素衍生物

(57) 摘要

本发明涉及具有基础时效特征的新型胰岛素类似物，其特征为：a) B 链末端由酰胺化的碱性氨基酸残基组成，如赖氨酸或精氨酸；b) 胰岛素 A 链 N 末端氨基酸残基是赖氨酸或精氨酸残基；c) A8 氨基酸位置被组氨酸残基占据；d) A21 氨基酸位置被甘氨酸残基占据；e) 在 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 和 B4 位置上实现带负电荷氨基酸残基的一个或者多个替换和 / 或添加。

10. 根据一项或更多项前述权利要求所述的胰岛素类似物,其中 B3 对应于 Asp。
11. 根据一项或更多项前述权利要求所述的胰岛素类似物,其中 B4 对应于 Glu。
12. 根据一项或更多项前述权利要求所述的胰岛素类似物,其中 B29 对应于 Lys。
13. 根据一项或更多项前述权利要求所述的胰岛素类似物,其中 B30 对应于 Thr。
14. 根据一项或更多项前述权利要求所述的胰岛素类似物,其中 B31 对应于 Arg 或 Lys。
15. 根据一项或更多项前述权利要求所述的胰岛素类似物,其中 B32 对应于 Arg-NH₂ 或 Lys-NH₂。
16. 根据一项或更多项前述权利要求所述的胰岛素类似物,其选自:
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Glu(A15), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Glu(A15), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Asp(B3), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Asp(B3), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,

Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素, Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素, Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Glu(B0), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素, Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Glu(B0), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素, Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B30), Arg(B31)-NH₂ 人胰岛素, Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B30), Lys(B31)-NH₂ 人胰岛素。

17. 制备根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的方法。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中重组制备胰岛素类似物前体,该前体酶法加工为双链胰岛素,在存在具有胰蛋白酶活性的酶的情况下与精氨酸偶联,分离该胰岛素类似物。

19. 根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物在制备用于治疗糖尿病的药物中的用途。

20. 根据权利要求 19 所述的用途,用于制备用于治疗 I 型或 II 型糖尿病或用于协助治疗 β 细胞再生的药物的用途。

21. 包含根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物和 / 或其生理上可接受的盐的药物。

22. 根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂是包含溶解的胰岛素类似物的水性溶液形式。

23. 根据权利要求 1 至 16 任一项所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂是粉末形式。

24. 根据权利要求 23 所述的制剂,其中根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物以结晶和 / 或非结晶形式存在。

25. 根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂是悬浮液形式。

26. 根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂额外包含化学分子伴侣。

27. 编码根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的前体的 DNA。

28. 编码根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的 A 链的 DNA。

29. 编码根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的 B 链的 DNA。

30. 包含根据权利要求 27 至 29 一项或更多项所述的 DNA 的载体。

31. 包含根据权利要求 27 至 29 一项或更多项所述的 DNA 或根据权利要求 30 所述载体的宿主生物。

32. 一种前胰岛素原类似物,其中 C 肽在其 N 末端带有精氨酸残基且在其 C 末端带有两个精氨酸残基或一个精氨酸残基和一个赖氨酸残基,且在后一情况下,赖氨酸残基形成了真正的 C 末端。

33. 根据权利要求 22 至 26 一项或更多项所述的制剂,其额外包含胰高血糖素样肽 1 (GLP1) 或其类似物或衍生物,或胰高血糖素样肽的抑制剂 -3 或 -4 或其类似物或衍生物。

34. 根据权利要求 33 所述的制剂,其额外包含胰高血糖素样肽的抑制剂 -4。

35. 根据权利要求 33 所述的制剂,其中胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 的类似物选自:

H-desPro³⁶-胰高血糖素样肽的抑制剂 -4-Lys₆-NH₂,

H-des(Pro^{36,37})-胰高血糖素样肽的抑制剂-4-Lys₄-NH₂ 和
 H-des(Pro^{36,37})-胰高血糖素样肽的抑制剂-4-Lys₅-NH₂,
 或其药理学上可耐受的盐。

36. 根据权利要求 33 所述的制剂,其中胰高血糖素样肽的抑制剂-4 的类似物选自:

desPro³⁶[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39),
 desPro³⁶[IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39),
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39),
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39),
 desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-2(1-39),
 desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-2(1-39),
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39) 和
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39),
 或其药理学上可耐受的盐。

37. 根据权利要求 36 所述的制剂,其中肽-Lys₆-NH₂ 被连到胰高血糖素样肽的抑制剂-4 类似物的 C 末端。

38. 根据权利要求 33 所述的制剂,其中胰高血糖素样肽的抑制剂-4 类似物选自:

H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-Lys₆-NH₂
 des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,
 H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 H-des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,
 H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 des Met(O)¹⁴Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ 胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-NH₂,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-Lys₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-Lys₆-NH₂,

des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-NH₂,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-NH₂,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

或其药理学上可耐受的盐。

39. 根据权利要求 33 所述的制剂,其还包含 Arg³⁴,Lys²⁶(N^ε(γ-谷氨酰基(N^α-十六酰基)))GLP-1(7-37)[利拉糖肽]或其药理学上可耐受的盐。

40. 根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的水性溶液制剂,其不包含锌或包含低于 15 μg/ml 的锌。

41. 根据权利要求 1 至 16 任意项所述的胰岛素类似物的水性溶液制剂,其不包含锌或包含低于 15 μg/ml 至 2mg/ml 的锌。

42. 根据权利要求 41 所述的制剂,其中锌含量为 200 μg/ml。

具有超延迟时效特征的新型胰岛素衍生物

[0001] 本发明涉及具有基础时效特征的新型胰岛素类似物、其制备及用途。

[0002] 糖尿病发病率近些年逐年增高,几近流行的程度。该病能严重缩短预期寿命。糖尿病患者必须频繁补充外源胰岛素。优化胰岛素治疗是合情理的。现在可获得具有特定药理性质的不同胰岛素。实际上,根据作用持续时间,不同胰岛素可区分为短效胰岛素、速效胰岛素、长效胰岛素和混合型胰岛素。长效胰岛素也称为慢效胰岛素 (slow insulin)、贮库型胰岛素 (depot insulin) 或基础胰岛素 (basal insulin)。在许多这些胰岛素产品中的活性成分是所谓的胰岛素类似物,其通过取代、删除和 / 或添加一个或更多个氨基酸而从人胰岛素制得。术语“胰岛素类似物”和“胰岛素”在此处具有相同的意思。

[0003] 强化的胰岛素治疗策略试图通过针对稳定控制血糖水平而降低健康风险,该稳定控制血糖水平通过早期施予基础胰岛素而实现。现有的一个基础胰岛素例子是药物 **Lantus®** (活性成分:甘精胰岛素 = Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) 人胰岛素)。开发新型的改良型基础胰岛素的一般目标是将低血糖事件降至最低。关于这一点,理想的基础胰岛素是在每一位患者中可靠地作用至少 24 小时的胰岛素。理想的胰岛素效力应延迟开始且时效特征应尽可能平缓,以使短暂的低血糖症风险明显降到最低并甚至可在未提前进食的情况下施予胰岛素。当胰岛素效力以相同水平持续尽可能长时间时基础胰岛素供应良好,即身体得到了恒定量的胰岛素供应。因此低血糖事件风险得以降低并将患者特异的差异和日期特异的差异降至最低。因此,理想基础胰岛素的药物动力学谱的特征是作用延迟开始且作用延迟,即作用长效且均一。

[0004] 然而,尽管已经获得了治疗上的优点,截至目前公开的慢效胰岛素均未显示出理想基础胰岛素的药物动力学性质。目标胰岛素的时效特征应尽量平缓且长效,以使患者的低血糖事件风险和日期依赖的差异风险进一步降低并使作用时间进一步延长,以便在某些环境下不必再每日施予胰岛素。这可简化糖尿病患者的治疗,特别是均不再能自己注射胰岛素的老年糖尿病患者和需要照料的糖尿病患者,因此也将具有重大的经济利益。此外,这样的基础胰岛素也有利于早期 II 型糖尿病。临床医师报道,许多人对注射存在恐惧感从而不能及时开始进行胰岛素治疗。结果不能很好的控制血糖,导致后期的胰岛素后遗症。基础胰岛素减少了注射给与的胰岛素剂量数,使胰岛素治疗更为患者所接受。

[0005] Kohn 等 (peptides 28 (2007) 935-948) 描述了如何能通过制备胰岛素类似物优化胰岛素药效动力学的做法,与人胰岛素的等电点 ($pI = 5.6$) 相比,通过在 B 链末端或 A 链和 B 链的 N 末端添加赖氨酸或精氨酸,所述胰岛素类似物的等电点向碱性方向移动,因此降低了在生理条件下的溶解度并使时效特征得以延长。关于这一点,Kohn 等人文中的化合物 18 (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) 人胰岛素 (实验测定的 $pI = 7.3$; 计算的 $pI = 7.58$) 被描述为上下文中理想的最佳化合物。因此, Kohn 等把设计新型胰岛素类似物的主要目标理解为将带正电荷的氨基酸添加到人胰岛素的氨基酸序列,以将等电点从 $pI = 5.6$ 增加到中性范围。

[0006] 该新型胰岛素类似物的设计目标与用酸性氨基酸取代人胰岛素的中性氨基酸和 / 或添加酸性氨基酸的做法相反,因为这样的取代和 / 或添加至少部分抵消了引入带正电荷

的氨基酸的效果。然而，现在惊奇地发现，用胰岛素类似物获得了所描述的目标基础时效特征，所述胰岛素类似物的特征为：

[0007] • B 链末端由如赖氨酰胺或精氨酰胺 (argininamide) 的酰胺化碱性氨基酸残基组成，及，

[0008] • 胰岛素 A 链 N 末端氨基酸残基是赖氨酸或精氨酸残基，及

[0009] • A8 氨基酸位置被组氨酸残基占据，及

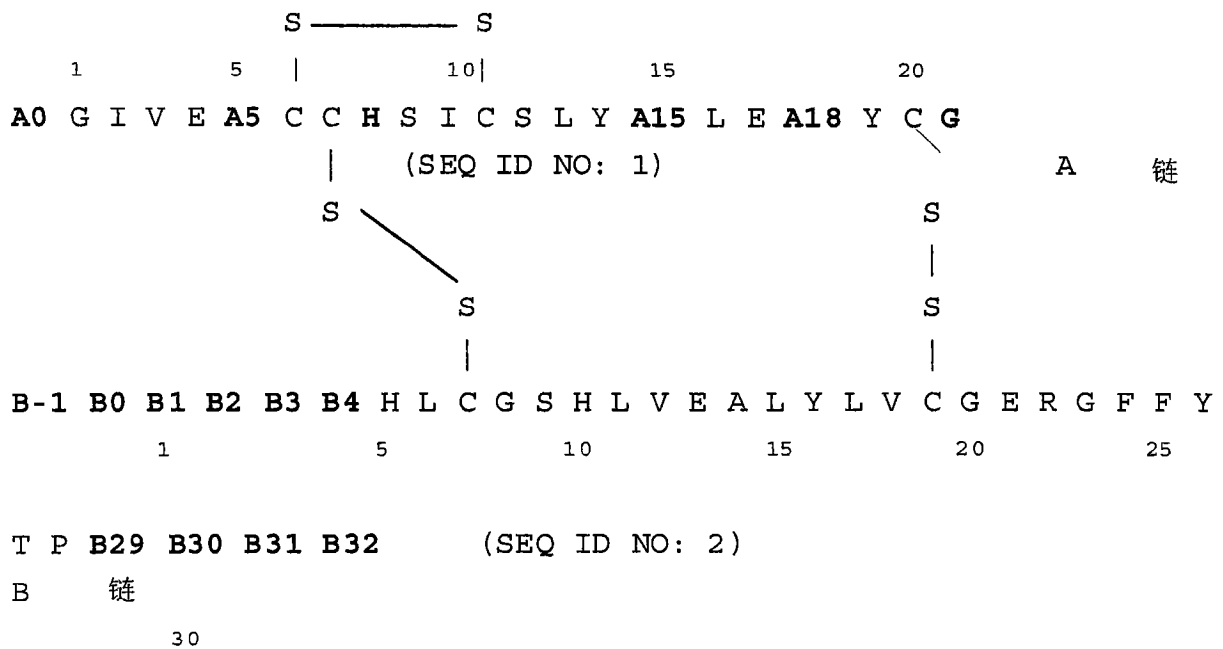
[0010] • A21 氨基酸位置被甘氨酸残基占据，即在 B 链末端的酰胺化碱性氨基酸残基上，末端氨基酸的羧基以其酰胺化形式存在，及

[0011] • 在 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 和 B4 位置上用酸性氨基酸替换了两个中性氨基酸，添加了两个带负电荷的氨基酸残基或一个所述替换和一个所述添加。

[0012] 由于上述前三个特征通过引入正电荷或消除负电荷而倾向于增加相应胰岛素类似物的 pI，最后述及的替换和 / 或添加带负电荷的氨基酸残基具有相反效应并能降低 pI。令人惊奇地，恰好是该所述的胰岛素类似物具有目标时效特征优点。这些化合物的 pI 值低于 Kohn 等的文章中化合物 18 (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) 人胰岛素) 的 pI 值，但仍然显示了延迟的作用开始和更长的作用持续时间，即超平缓、长效、均一的作用特征。因此，低血糖事件风险被明显降低。该延迟是如此显著以至于可以令人惊奇地在大鼠实验模型中检测到该效力，尽管作为对比，不能在大鼠中明确地观察到甘精胰岛素的延迟作用。图 1 显示了与甘精胰岛素的降血糖效力相比，本发明的化合物 YKL205 的降血糖效力。在犬中获得了相似的结果 (参见图 2)。因此，提供了可以以明显低的频率施予的新型基础胰岛素。除了这些所述的药物动力学优点，与甘精胰岛素相比，本发明的类似物具有明显更好的药理学性质，如受体特异性和体外促有丝分裂性。请求保护的胰岛素也具有理化优点。

[0013] 因此，本发明涉及通式 I 的胰岛素类似物

[0014]



[0015] 其中

[0016] A0 对应于 Lys 或 Arg；

- [0017] A5 对应于 Asp、Gln 或 Glu ;
[0018] A15 对应于 Asp、Glu 或 Gln ;
[0019] A18 对应于 Asp、Glu 或 Asn ;
[0020] B-1 对应于 Asp、Glu 或氨基 ;
[0021] B0 对应于 Asp、Glu 或化学键 ;
[0022] B1 对应于 Asp、Glu 或 Phe ;
[0023] B2 对应于 Asp、Glu 或 Val ;
[0024] B3 对应于 Asp、Glu 或 Asn ;
[0025] B4 对应于 Asp、Glu 或 Gln ;
[0026] B29 对应于 Lys 或化学键 ;
[0027] B30 对应于 Thr 或化学键 ;
[0028] B31 对应于 Arg、Lys 或化学键 ;
[0029] B32 对应于 Arg- 酰胺、Lys- 酰胺或氨基。

[0030] 其中,包含 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 和 B4 的组的两种氨基酸残基同时且彼此独立地对应于 Asp 或 Glu。

[0031] 本发明特别涉及如上详述的胰岛素类似物,其中彼此独立地, A0 对应于 Arg,或其中 A5 对应于 Glu,或其中 A15 对应于 Glu,或其中 A18 对应于 Asp,或其中 B-1 对应于氨基,或其中 B0 对应于 Glu,或其中 B1 对应于 Asp,或其中 B2 对应于 Val,或其中 B3 对应于 Asp,或其中 B4 对应于 Glu,或其中 B29 对应于 Lys,或其中 B30 对应于 Thr,或其中 B31 对应于 Arg 或 Lys。

[0032] 本发明特别优选地涉及选自下组的胰岛素类似物 :

- [0033] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0034] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0035] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0036] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0037] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Glu(A15), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0038] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Glu(A15), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0039] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0040] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0041] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0042] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0043] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0044] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0045] Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Asp(B3), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0046] Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Asp(B3), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0047] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0048] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0049] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
[0050] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,

- [0051] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0052] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B4), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0053] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0054] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0055] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0056] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0057] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0058] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0059] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0060] Arg(A0), His(A8), Glu(A5), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0061] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0062] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0063] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0064] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0065] Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Glu(B0), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0066] Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Glu(B0), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂ 人胰岛素,
- [0067] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B30), Arg(B31)-NH₂ 人胰岛素,
- [0068] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B30), Lys(B31)-NH₂ 人胰岛素。
- [0069] 在提及的胰岛素类似物命名中说明的术语“人胰岛素”指人胰岛素 A 链和 B 链的氨基酸序列,在给定名称的胰岛素类似物中指明人胰岛素的所有衍生物(添加、取代、删除)。
- [0070] 本发明进一步涉及制备如上所述的胰岛素类似物的方法,具体地其中重组制备胰岛素类似物前体,该前体酶法加工为双链胰岛素,在存在具有胰蛋白酶活性的酶的情况下与精氨酸偶联,分离胰岛素类似物。
- [0071] 本发明进一步涉及如上所述的胰岛素类似物在制备用于治疗糖尿病,特别是 I 型或 II 型糖尿病的药物中的用途。本发明同样涉及如上所述的胰岛素类似物在制备协助 β 细胞再生的药物中的用途。
- [0072] 本发明进一步涉及包含如上所述的胰岛素类似物和 / 或其生理上可接受的盐的药物。
- [0073] 本发明进一步涉及如上所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂是包含溶解的胰岛素类似物的水性溶液形式。
- [0074] 本发明进一步涉及如上所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂是粉末形式。
- [0075] 本发明进一步涉及如上所述的制剂,其中如上所述的胰岛素类似物是结晶形式和 / 或非结晶形式。
- [0076] 本发明进一步涉及如上所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂是悬浮液形式。
- [0077] 本发明进一步涉及如上所述的胰岛素类似物的制剂,其中该制剂还包含化学伴侣分子。
- [0078] 本发明进一步涉及编码如上所述的胰岛素类似物前体的 DNA,或编码如上所述的胰岛素类似物 A 链或 B 链的 DNA。
- [0079] 本发明进一步涉及包含如上所述的 DNA 的载体。

[0080] 本发明进一步涉及包含如上所述的 DNA 或如上所述的载体的宿主生物。

[0081] 本发明进一步涉及前胰岛素原类似物,其中 C 肽在其 N 末端带有精氨酸残基,其 C 末端带有两个精氨酸残基或一个精氨酸残基和一个赖氨酸残基,且在后一情况下,赖氨酸残基形成真正的 C 末端。

[0082] 本发明进一步涉及如上所述的制剂,其额外包含胰高血糖素样肽 1 (GLP1) 或其类似物或衍生物,或胰高血糖素样肽的抑制剂 -3 或 4 或其类似物或衍生物,优选胰高血糖素样肽的抑制剂 -4。

[0083] 本发明进一步涉及如上所述的制剂,其中胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 的类似物选自:

[0084] H-desPro³⁶- 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4-Lys₆-NH₂,

[0085] H-des (Pro^{36,37})- 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4-Lys₄-NH₂ 或

[0086] H-des (Pro^{36,37})- 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4-Lys₅-NH₂,

[0087] 或其药学上可耐受的盐。

[0088] 本发明进一步涉及如上所述的制剂,其中胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 的类似物选自:

[0089] desPro³⁶[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39),

[0090] desPro³⁶[IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39),

[0091] desPro³⁶[Met (O)¹⁴, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39),

[0092] desPro³⁶[Met (O)¹⁴, IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39),

[0093] desPro³⁶[Trp (O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -2 (1-39),

[0094] desPro³⁶[Trp (O₂)²⁵, IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -2 (1-39),

[0095] desPro³⁶[Met (O)¹⁴Trp (O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39) 和

[0096] desPro³⁶[Met (O)¹⁴Trp (O₂)²⁵, IsoAsp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39),

[0097] 或其药学上可耐受的盐。

[0098] 本发明进一步涉及如前面段落中所述的制剂,其中肽 -Lys₆-NH₂ 被连到胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 类似物的 C 末端。

[0099] 本发明进一步涉及如上所述的制剂,其中胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 类似物选自:

[0100] H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39)-Lys₆-NH₂

[0101] des Asp²⁸pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39)-NH₂,

[0102] H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39)-NH₂,

[0103] H-Asn-(Glu)₅des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39)-NH₂,

[0104] des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0105] H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0106] H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸[Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 (1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0107] H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Trp (O₂)²⁵, Asp²⁸] 胰高血糖素样肽的抑制

剂 -4(1-39)-Lys₆-NH₂,

[0108] H-des Asp²⁸Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0109] H-(Lys)₆-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0110] H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0111] des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0112] H-(Lys)₆-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0113] H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0114] H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Met(O)¹⁴,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

[0115] des Met(O)¹⁴Asp²⁸Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0116] H-(Lys)₆-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0117] H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0118] des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0119] H-(Lys)₆-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

[0120] H-Asn-(Glu)₅des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0121] H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Met(O)¹⁴,Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

[0122] des Asp²⁸Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Trp(O₂)²⁵]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0123] H-(Lys)₆-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0124] H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-NH₂,

[0125] des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0126] H-(Lys)₆-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

[0127] H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶,Pro³⁷,Pro³⁸[Met(O)¹⁴,Trp(O₂)²⁵,Asp²⁸]胰高血糖素样肽的抑制剂-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂

[0128] 或其药学上可耐受的盐。

[0129] 本发明进一步涉及如上所述的制剂,其额外包含 Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε(γ 谷氨酰基(N^α-十六酰基)))GLP-1(7-37)[利拉糖肽]或其药学上可耐受的盐。

[0130] 关于这一点本领域技术人员清楚,本发明的胰岛素可以是施予后具有有益效应的药物制剂产品。就这一点而言,水性溶液是起点。相应地,其他组分必须是易混的。将病毒性动物污染风险降至最低,因为该制品不应含有任何动物源组分。进一步有利的是加入防腐剂以阻止微生物污染。可通过加入等张剂消除该制剂对施予位点组织细胞生理的可能的不良影响。加入鱼精蛋白可具有稳定效应,所以可通过向制剂中加入鱼精蛋白获得基本不含盐的胰岛素制品。加入酚组分可稳定使用的胰岛素类似物的结构,因此额外带来除其它之外的对作用开始的延迟作用。也可向制剂中加入稳定本发明的慢效胰岛素空间结构的物质并使热稳定性更高。这样的化学分子伴侣可例如是短的合成肽,其也可包含氨基酸类似物或包括例如胰岛素 C 肽来源的肽序列。

[0131] 可将本发明的胰岛素装入纳米颗粒以开发贮库型胰岛素。也可能是所谓的缓释制剂,其中本发明的慢效胰岛素可逆地结合到多聚体载体。

[0132] 本发明的胰岛素可与下述药物平行施予:速效胰岛素如 **Apidra®**、**诺和锐® (NovoRapid®)**、**优泌乐® (Humalog®)**或在研的胰岛素衍生物或具有适当时效特征的制剂或吸入型胰岛素,或在研的经鼻或经口给药的胰岛素。本领域技术人员清楚,在这一点上也可将进行适当配制的速效胰岛素和本发明的慢效胰岛素的混合物用于该目的。本发明的胰岛素类似物能进一步用于药物制品中,所述制品包含具有可与 GLP-1(胰高血糖素样肽 1)或胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 或胰高血糖素样肽的抑制剂 -3 相比的活性的肽。这样的肽的例子是 GLP-1(7-37)、依泽那太(exenatide) (**Byetta®**)或在专利申请 WO 2006/058620、WO 2001/04156、WO 2004/005342 和 WO 98/08871 中公开了制备方法的肽。在这一点上特别有利的制剂是那些包含这些肽的贮库型剂型的制剂。在 II 型糖尿病初发期特别有利的治疗类型是那些提供平行施予本发明的药物的类型,其增加了胰岛素效力,如二甲双胍。如与增加胰腺胰岛素分泌的磺脲类药物的联用一样,也可能采用与增加肠降血糖素水平的二肽基肽酶 -4 抑制剂的联合治疗。当通过施予分化因子启动来源于适当干细胞的胰脏 β 细胞再生时,使用本发明的慢效胰岛素特别有利。通过治疗糖尿病的例子提及了所有这些应用,本发明同样涉及这些应用。因此,本发明进一步涉及本发明的胰岛素与其他活性成分联合用于治疗糖尿病,特别是 I 型或 II 型糖尿病用途。。

[0133] 本发明进一步涉及包含本发明的胰岛素类似物的药物,其特别表现为水性溶液制剂或粉末。

[0134] 该药物是优选用于注射目的溶液或悬浮液的药物制品;其特征在于包含至少一种本发明的胰岛素类似物,和/或至少一种其生理上可耐受的盐,该胰岛素类似物和/或盐为溶解、非结晶和/或结晶形式,优选溶解形式。

[0135] 该制品的 pH 优选介于约 2.5 至 8.5,特别是介于 4.0 至 8.5,包含合适的张度剂、合适的防腐剂,及,在适当的情况下,合适的灭菌缓冲水溶液,也优选特定锌离子浓度的灭菌缓冲水溶液。除了活性成分外的其他全部制品成分构成了制品的载体。合适的张度剂的例子如甘油、葡萄糖、甘露醇、NaCl、钙化合物或镁化合物如 CaCl₂ 等。张度剂和/或防腐剂

的选择可影响本发明胰岛素或其生理上可耐受的盐在弱酸性 pH 值条件下的溶解度。

[0136] 合适防腐剂的例子是酚、间 - 甲酚、苯甲醇和 / 或对 - 羟基苯甲酸酯。

[0137] 能特别用于调节 pH 使之介于约 4.0 ~ 8.5 的缓冲物质的例子是醋酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠等。此外,生理上可接受的稀酸(一般为 HCl)或稀碱(一般为 NaOH)也适于调节 pH。

[0138] 如果制品含有锌,优选 1 ~ 2mg/ml,特别是 1 μ g/ml ~ 200 μ g/ml 的浓度。令人惊奇的是,加入锌可令人满意地影响本发明胰岛素类似物的作用特征。这允许生产总作用持续时间、作用开始速度和效力曲线特征不同的制品,因此能个体化稳定患者。产生通过“双室胰岛素装置”的另一种可能,其允许根据生活情况而给予具有作用快速发生和 / 或作用慢速逐步发生的制剂。

[0139] 为了改变本发明制品的活性成分特征,也可混合未修饰的胰岛素,优选牛胰岛素、猪胰岛素或人胰岛素,特别是人胰岛素,或其胰岛素类似物和衍生物。同样可能混合一种或更多种胰高血糖素样肽的抑制剂 -4 衍生物或肽,其特征在于其活性可与 GLP-1(胰高血糖素样肽 1) 相比或直接对应于 GLP-1。本发明同样涉及这样的药物(制品)。

[0140] 优选的活性成分浓度为约 1-1500,更优选约 5-1000,特别是约 40-400 国际单位 / ml 的那些。

[0141] 本发明的胰岛素类似物利用生物技术最初制备为尚未包括酰胺的前体。技术人员熟知大量制备胰岛素的技术。用于此目的的宿主细胞系统是通过发酵用于培养的细菌、酵母和植物或植物细胞。假如费用方面的考虑允许,也可使用以动物细胞作为宿主系统的表达系统。然而,其先决条件是确保不含动物病毒。因此,清楚的是,利用范例描述的表达系统仅代表了开发用于重组制备蛋白质的宿主 / 载体系统的一小部分。例如,基于酵母或植物系统的生物技术方法未在本申请中描述,所述酵母或植物系统如藓类、藻类或更高等植物如烟草、豌豆、红花、大麦、玉米或油菜 (oilseed rape)。然而,本发明同样包括允许在合适的生物技术表达系统中制备目标肽的宿主 / 载体系统和编码 DNA 序列。因此,宿主生物可具体选自植物界,选自包含裂殖菌纲、细菌或蓝藻的第一门裂殖植物门的生物,第二门藻类植物 V 纲绿藻纲的生物,第二门藻类植物 VII 纲红藻纲的生物,第三门真菌植物门的生物,第五门苔藓植物门的生物和第七门种子植物门的生物。

[0142] 欧洲专利申请 EP-A 1 222 207 公开了编码包括修饰的 C 肽的前胰岛素原的质粒 pINT358d。现在可借助聚合酶链式反应 (PCR) 特定地修饰编码胰岛素原的序列,从而能表达可作为本发明胰岛素前体的前胰岛素原。相应的融合蛋白不必在细胞内制备。技术人员清楚,也可利用随后分泌至周质和 / 或培养基上清的细菌表达系统制备这样的蛋白质。欧洲专利申请 EP-A 1 364 029 利用实施例公开了这一点。本发明同样涉及可产生本发明的类似物的胰岛素原前体。

[0143] 原则上,可将如此制备的胰岛素原转变成胰岛素类似物前体,其在位置 A0 包括赖氨酸或精氨酸并在 B 链 C 末端携带赖氨酸或精氨酸。

[0144] 假如本发明的胰岛素原在细菌胞内表达后为包涵体或可溶形式,在进行加工和生化修饰前必须利用体外折叠技术将这些前体折叠为正确构象。在这一点上,公开的融合蛋白在用尿素或盐酸胍变性后可直接折叠,本发明同样涉及折叠中间体。

[0145] 使用生化方法浓缩单个中间体,尤其是采用了已出版的及事实上为教科书主题的

原理的分离方法。技术人员清楚,这样的原理可以因此组合并产生先前并未以此结果公开的方法。因此,本发明同样涉及可纯化本发明的类似物的方法。

[0146] 本发明进一步涉及制备本发明的胰岛素类似物的方法,其中利用重组方法制备胰岛素类似物前体并利用酶法将其转变为双链的胰岛素前体,其在涉及 A 链氨基酸 1 的 N 末端携带有精氨酸或赖氨酸,在 B 链的 C 末端带有赖氨酸或精氨酸残基,其在存在具有胰蛋白酶活性的酶时用精氨酸酰胺或赖氨酸酰胺 (lysineamide) 转变成酰胺并因此转变成本发明的慢效胰岛素,然后利用生化纯化方法以高纯度制得本发明的胰岛素类似物。

[0147] 蛋白质“类似物”指通过用其他氨基酸残基取代相应的或相同的天然蛋白质的至少一个天然氨基酸残基和 / 或添加和 / 或删除相应的或相同的天然蛋白质的至少一个氨基酸残基而不同的蛋白质。就这一点而言,也可添加非天然氨基酸残基和 / 或用非天然氨基酸残基取代氨基酸残基。

[0148] 蛋白质“衍生物”指利用化学修饰起始蛋白质的某些氨基酸残基而获得的蛋白质。化学修饰可例如由向一个或更多个氨基酸添加一个或更多个特定化学基团组成。

附图说明

[0149] 图 1 :新型胰岛素类似物在大鼠中的降血糖效力

[0150] 图 2 :新型胰岛素类似物在犬中的降血糖效力

[0151] 图 3 :YKL205 在犬中的降血糖效力

[0152] 图 4 :YKL205 在犬中的降血糖效力的锌依赖性

[0153] 下述实施例意图说明本发明的概念而非限制本发明。

[0154] 实施例 1 :制备编码 Gly (A21) - 胰岛素和在 C/A 链交界带有 Arg Arg 的修饰 C 肽的衍生载体 pINT3580

[0155] 欧洲专利申请 EP-A 1 222 207 公开了质粒 pINT358d、pINT91d 和引物序列 Tir。使用这些产品的 DNA 构建质粒 pINT3580。质粒 pINT358d 的特征还包括编码具有特定性质的修饰 C 肽的基因序列。合成了三条引物序列 :

[0156] pint3580_glya21rev

[0157] 5' -CAAAGGTCGACTATTAGCCGCGAGTAGTTCTCCAGCTGG-3' (SEQ ID NO :3)

[0158] 该引物用于在 pINT358d 编码的胰岛素原序列 A 链的位置 21 引入甘氨酸 (粗体、加下划线) 而不是天冬酰胺。

[0159] arg_cjuncf

[0160] 5' -GTCCCTGCAGCGTCGCGGCATCGTGGAGCAG-3' (SEQ ID NO :4)

[0161] 该引物与引物 arg_cjunc_rev 的作用一样,用于在胰岛素 A/B 链交界处引入精氨酸而不是赖氨酸。

[0162] arg_cjunc_rev

[0163] 5' -CCACGATGCC GCGACGCTGC AGGGACCCCT CCAGCG-3' (SEQ ID NO :5)

[0164] 在两条引物中,待引入的精氨酸密码子均以粗体表示。按照欧洲专利申请 EP-A 1 222 207 的方法,分别用引物对 Tir/arg_cjunc_rev 和 arg_cjuncf/pint3580_glya21rev 和质粒 pINT358d 的 DNA 作为模板进行 PCR。组合两个反应产物的等份样品并在第三个 PCR 中与引物对 Tir/pint3580_glya21rev 共同使用。按照厂商说明书在一个或相同反应中,在用

凝胶电泳分离该反应混合物后纯化该反应产物,用限制酶 SalI/NcoI 消化该反应产物,利用凝胶电泳分离该反应混合物,分离编码胰岛素原序列的 DNA 片段。然后,利用 DNA 连接酶反应将该片段插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。

[0165] 用连接混合物转化大肠杆菌感受态细胞。将转化混合物涂布在含 25mg/l 氨苄青霉素的选择平板上。从长出的克隆中分离质粒 DNA 并用 DNA 序列分析进行鉴定。正确的质粒称为 pINT3580。

[0166] 实施例 2:构建编码 His (A8), Gly (A21) - 前胰岛素原的质粒 pINT3581

[0167] 如实施例 1 中所述,用 3 个聚合酶链式反应完成该构建。将第三个反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入用 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA 中。使用了引物 Tir 和 pint3580_glya21rev。另外合成了两条引物:

[0168] pint3580_Ha8f

[0169] 5' -AGCAGTGTGCCACAGCATCTGCTCCCTCTAC-3' (SEQ ID NO :6)

[0170] pint3580_Ha8rev

[0171] 5' -GAG CAGATGCT GTG GCAGCACTG CTCCACGATG-3' (SEQ ID NO :7)

[0172] 通过加粗每个字母强调了编码 A 链位置 8 组氨酸的密码子。按实施例 1 中所述的方法完成该构建。PCR1 和 2 的模板为质粒 pINT3580 的 DNA。分别用引物对 Tir/pint3580_Ha8rev 和 pint3580_Ha8f/pint3580_glya21rev 进行 PCR1 和 PCR2。PCR3 使用了引物对 Tir/pint3580_glya21rev。该反应的模板为 PCR1 和 PCR2 反应产物的混合物。正确的质粒称为 pINT3581。

[0173] 实施例 3:构建编码 His (A8), Glu (A5), Gly (A21) - 前胰岛素原的质粒 pINT3582

[0174] 按实施例 1 和 2 所述方法用 3 个聚合酶链式反应完成该构建过程。第三个反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir 和 pint3580-glya21rev。另外合成了两条引物。

[0175] pint3581_Ea5f

[0176] 5' GCATCGTGGAGGAGTGCTGCCACAGCATCTG 3' (SEQ ID NO :8)

[0177] pint3581_Ea5rev

[0178] 5' -CTGT GGCAGCACTC CTCCACGATG CCGCGACG-3' (SEQ ID NO :9)

[0179] 通过加粗每个字母强调了编码 A 链位置 5 谷氨酸的密码子。按实施例 1 所述方法完成该构建过程。模板为质粒 pINT3581 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3582。

[0180] 实施例 4:构建编码 His (A8), Asp (A18), Gly (A21) - 前胰岛素原的质粒 pINT3583

[0181] 该构建过程与实施例 1 不同,仅利用一个聚合酶链式反应完成。该反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir。另外合成了一条引物:

[0182] pint3580_Da18rev

[0183] 5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCGAGTAGTCCTCCAGCTGGTAGAGGGAG 3' (SEQ ID NO :10)

[0184] 加粗强调了编码 A 链位置 18 天冬氨酸的密码子。模板是质粒 pINT3581 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3583。

[0185] 实施例 5:构建编码 His (A8), Glu (A5) Asp (A18), Gly (A21) - 前胰岛素原的质粒 pINT3584

[0186] 不同于实施例 1, 该构建方法仅利用一个聚合酶链式反应完成。该反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入用 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir.pint3580_Da18rev(ex. 4)。模板是质粒 pINT3582 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3584。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-1 的前体, 其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0187] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0188] 用赖氨酸酰胺化后获得了化合物 YKL205-1b:

[0189] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0190] 实施例 6: 构建编码 His(A8), Glu(A15), Gly(A21)- 前胰岛素原的质粒 pINT3585

[0191] 该构建过程与实施例 1 不同, 仅利用一个聚合酶链式反应完成。该反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir。另外合成了一条引物:

[0192] pint3580_Ea15rev

[0193] 5' -CAAAGGTCGA CTATTAGCCG CAGTAGTTCTCCAGCTCGTAGAGGGAGCAGATGCTG-3' (SEQ ID NO:11)

[0194] 加粗强调了编码 A 链位置 15 谷氨酸的密码子。模板是质粒 pINT3581 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3585。

[0195] 实施例 7: 构建编码 His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21)- 前胰岛素原的质粒 pINT3586

[0196] 与实施例 1 不同, 该构建方法仅利用一个聚合酶链式反应完成。该反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入用 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir。另外合成了一条引物:

[0197] pint3585_Ea15_Da18rev

[0198] 5' -CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTCGTAGAGGGAGCAGATGCTG-3' (SEQ ID NO:12)

[0199] 通过加粗每一个字母强调了 A 链位置 15 的谷氨酸及 A 链位置 A18 的天冬氨酸的密码子。模板是质粒 pINT3581 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3586。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205 的前体, 其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0200] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0201] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205b 的前体, 其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0202] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0203] 实施例 8: 构建编码 Glu(A5), His(A8), Glu(A15), Gly(A21)- 前胰岛素原的质粒 pINT3587

[0204] 与实施例 1 不同, 该构建过程仅利用一个聚合酶链式反应完成。该反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir 和实施例 6

所述的引物 pint3580_Ea15rev。模板是质粒 pINT3582 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3587。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-2 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0205] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0206] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-2b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0207] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0208] 实施例 9:构建编码 His(A8), Gly(A21), Asp(B3)-前胰岛素原的质粒 pINT3588

[0209] 按实施例 1 和 2 所述方法用 3 个聚合酶链式反应完成了该构建过程。第三个反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir 和 pint3580_glya21rev。另外合成了两条引物:

[0210] pint3581_Db3f

[0211] 5' -GCACGATTTGTGGACCAGCACCTGTGCGGC-3' (SEQ ID NO:13)

[0212] pint3581_Db3rev

[0213] 5' -CACAGG TGCTGGTCCA CAAATCGTGC CGAATTC-3' (SEQ ID NO:14)

[0214] 通过加粗每一个字母强调了编码胰岛素 B 链位置 3 天冬氨酸的密码子。按实施例 1 所述方法完成了该构建过程。模板是质粒 pINT3581 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3588。

[0215] 实施例 10:构建编码 Glu(A5), His(A8), Gly(A21), Asp(B3)-前胰岛素原的质粒 pINT3589

[0216] 按实施例 9 所述方法进行该反应,但在 PCR1 和 PCR2 中使用质粒 pINT3582 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3589。

[0217] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-3 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0218] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0219] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-3b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0220] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0221] 实施例 11:构建编码 His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B3)-前胰岛素原的质粒 pINT3590

[0222] 按实施例 9 所述方法进行该反应,但在 PCR1 和 PCR2 中使用质粒 pINT3585 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3590。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-4 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0223] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B3), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0224] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-4b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具

有下述结构：

[0225] Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0226] 实施例 12 :构建编码 His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3)- 前胰岛素原的质粒 pINT3591

[0227] 按实施例 9 所述方法进行该反应,但在 PCR1 和 PCR2 中使用质粒 pINT3586 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3591。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-5 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构：

[0228] Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0229] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-5b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构：

[0230] Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0231] 实施例 13 :构建编码 His (A8), Gly (A21), Asp (B3)-Glu (B4)- 前胰岛素原的质粒 pINT3592

[0232] 按实施例 1 和 2 所述方法用 3 个聚合酶链式反应进行该构建过程。第三个反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir 和 pint3580_glya21rev。另外合成了两条引物：

[0233] pint3581_Db3_Eb4f

[0234] 5' -GCACGATTTGTGGACGAGCACCTGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO :15)

[0235] pint3581_Db3_Eb4rev

[0236] 5' -CGCACAGG TGCTCGTCCA CAAATCGTGC CGAATTC-3' (SEQ ID NO :16)

[0237] 通过加粗每一个字母强调了编码胰岛素 B 链位置 3 天冬氨酸和位置 4 谷氨酸的密码子。按实施例 1 所述方法完成了该构建过程。模板是质粒 pINT3581 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3592。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL202-6 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构：

[0238] Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0239] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL202-6b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构：

[0240] Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素

[0241] 实施例 14 :构建编码 His (A8), Gly (A21), Glu (B4) 前胰岛素原的质粒 pINT3593

[0242] 按实施例 1 和 2 所述方法用 3 个聚合酶链式反应完成了该构建过程。第三个反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。使用了引物 Tir 和 pint3580_glya21rev。另外合成了两条引物：

[0243] pint3581_Eb4f

[0244] 5' -ACGATTTGTGAACGAGCACCTGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO :17)

[0245] pint3581_Eb4rev

[0246] 5' -CGCACAGG TGCTCGTTCA CAAATCGTGC CGAATTTC-3' (SEQ ID NO:18)

[0247] 加粗强调了编码胰岛素 B 链位置 4 谷氨酸的密码子。按实施例 1 所述方法完成了该构建过程。模板是质粒 pINT3581 的 DNA。正确的质粒称为 pINT3593。

[0248] 实施例 15 :构建编码 Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4) - 前胰岛素原的质粒 pINT3594

[0249] 按实施例 9 所述方法进行该反应,但在 PCR1 和 PCR2 中使用质粒 pINT3582 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3594。

[0250] 该质粒编码的胰岛素原是化合物 YKL205-7 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0251] Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0252] 该质粒编码的胰岛素原是化合物 YKL205-7b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0253] Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0254] 实施例 16 :构建编码 His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4) - 前胰岛素原的质粒 pINT3595

[0255] 按实施例 9 所述方法进行该反应,但在 PCR1 和 PCR2 中使用质粒 pINT3585 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3595。

[0256] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-8 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0257] Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0258] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-8b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0259] Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0260] 实施例 17 :构建编码 His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4) - 前胰岛素原的质粒 pINT3596

[0261] 按实施例 9 所述方法进行该反应,但在 PCR1 和 PCR2 中使用质粒 pINT3586 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3596。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-9 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0262] Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0263] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-9b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0264] Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素。

- [0265] 实施例 18 :构建编码 His (A8), Gly (A21), Glu (B0) - 前胰岛素原的质粒 pINT3597
- [0266] 利用 2 个聚合酶链式反应完成了该构建过程。使用了引物 pint3580_glya21rev。另外合成了两条引物:
- [0267] pint3581_Eb0f1
- [0268] 5' -CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGTTTGTG AACCAGCACC TGTG-3' (SEQ ID NO :19)
- [0269] pint3581_Eb01f2
- [0270] 5' -TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAG-3' (SEQ ID NO :20)
- [0271] 该实施例中的两条引物有部分重叠。Pint3581_Eb0f2 含有 NcoI 识别序列。用下划线标出了该序列。通过加粗每一个字母强调了编码 B 链开始部分位置 0 谷氨酸的密码子。PCR1 的模板是质粒 pINT3581 的 DNA。
- [0272] 用引物对 pint3581_Eb-1f2/pint3580_glya21rev 进行 PCR1。PCR2 的模板是 PCR1 的产物。用引物对 pint3581_Eb-1f2/pint3580_glya21rev 进行 PCR2。PCR2 的产物包含完整的前胰岛素原序列。第二个反应的产物用 NcoI/SaII 酶切后插入 NcoI/SaII 切开的 pINT91d 载体 DNA。正确的质粒称为 pINT3597。用天冬氨酸密码子替换位置 B0 的谷氨酸密码子并依照该实施例产生了在 B0 位置为天冬氨酸而不是谷氨酸的质粒。
- [0273] 实施例 19 :构建编码 Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0) - 前胰岛素原的质粒 pINT3598
- [0274] 按实施例 18 所述方法进行该反应,但在 PCR1 中使用质粒 pINT3582 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3598。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-10 的前体,其用精氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:
- [0275] Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。
- [0276] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-10b 的前体,其用赖氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:
- [0277] Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素。
- [0278] 实施例 20 :构建编码 His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0) - 前胰岛素原的质粒 pINT3599
- [0279] 按实施例 18 所述方法进行该反应,但在 PCR1 中使用质粒 pINT3585 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3599。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-11 的前体,其用精氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:
- [0280] Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。
- [0281] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-11b 的前体,其用赖氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:
- [0282] Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂- 人胰岛素。
- [0283] 实施例 21 :构建编码 His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0) - 前胰岛素原的质粒

pINT3600

[0284] 按实施例 18 所述方法进行该反应,但在 PCR1 中使用质粒 pINT3586 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3600。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-12 的前体,其用精氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:

[0285] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0286] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-12b 的前体,其用赖氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:

[0287] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Glu(B0), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0288] 实施例 22:构建编码 His(A8), Gly(A21), Asp(B1)- 前胰岛素原的质粒 pINT3601

[0289] 利用两个聚合酶链式反应完成了该构建过程。使用了引物 pint3580_glya21rev。另外合成了两条引物:

[0290] pint3581_Db1f1

[0291] 5' -CAACAGGAA ATTCGGCACG AGACGTG AACCAGCACC TGTGCG-3' (SEQ IDNO :21)

[0292] pint3581_Db1f2

[0293] 5' -TATCGACCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAC-3' (SEQID NO :22)

[0294] 在该实施例中,两条引物有部分重叠。Pint3581_Db-1f2 含有 NcoI 识别序列。用下划线标出了该序列。通过加粗每一个字母强调了编码 B 链位置 1 天冬氨酸的密码子。PCR1 模板是质粒 pINT3581 的 DNA。用引物 pint3581_Db1f1/pint3580_glya21rev 进行 PCR1。PCR2 的模板是 PCR1 的产物。用引物对 pint3581_Db1f2/pint3580_glya21rev 进行 PCR2。PCR2 的产物包含完整的前胰岛素原序列。第二个反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。正确的质粒称为 pINT3601。

[0295] 实施例 23:构建编码 Glu(A5), His(A8), Gly(A21), Asp(B1)- 前胰岛素原的质粒 pINT3602

[0296] 按实施例 22 所述方法进行该反应,但在 PCR1 中使用质粒 pINT3582 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3602。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-13 的前体,其用精氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:

[0297] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0298] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-13b 的前体,其用赖氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:

[0299] Arg(A0), Glu(A5), His(A8), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0300] 实施例 24:构建编码 His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B1)- 前胰岛素原的质粒 pINT3603

[0301] 按实施例 22 所述方法进行该反应,但在 PCR1 中使用质粒 pINT3585 的 DNA 作为模板,产物为质粒 pINT3603。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-14 的前体,其用精氨酸酰胺酰胺化并具有下述结构:

[0302] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0303] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-14b 的前体, 其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0304] Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0305] 实施例 25: 构建编码 His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B1)- 前胰岛素原的质粒 pINT3604

[0306] 按实施例 22 所述方法进行该反应, 但在 PCR1 中使用质粒 pINT3586 的 DNA 作为模板, 产物为质粒 pINT3604。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-15 的前体, 其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0307] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0308] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-15b 的前体, 其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0309] Arg(A0), His(A8), Asp(A18), Gly(A21), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0310] 实施例 26: 构建编码 His(A8), Gly(A21), Glu(B0), Asp(B1)- 前胰岛素原的质粒 pINT3605

[0311] 利用两个聚合酶链式反应完成了该构建过程。使用了实施例 18 中所述的引物 pint3580_glya21rev 和引物 pint3581_Eb01f2。合成了引物 pint3597_Db1f:

[0312] 5' -CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGGACGTG AACCAGCACC TGTGC-3' (SEQID NO:23)

[0313] 通过加粗每一个字母强调了编码位置 0 的谷氨酸和 B 链开始部分的天冬氨酸的密码子。PCR1 的模板是质粒 pINT3597 的 DNA。用引物对 pint3597_Db1f/pint3580_glya21rev 进行 PCR1。PCR2 的模板是 PCR1 产物。用引物对 pint3581_Eb1f2/pint3580_glya21rev 进行 PCR2。PCR2 的产物包含完整前胰岛素原序列。第二个反应的产物用 NcoI/Sa1I 酶切后插入 NcoI/Sa1I 切开的 pINT91d 载体 DNA。正确的质粒称为 pINT3605。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-16 的前体, 其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0314] Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Glu(B0), Asp(B1), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0315] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-16a 的前体, 其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0316] Arg(A0), His(A8), Gly(A21), Glu(B0), Asp(B1), Arg(B31), Lys(B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0317] 实施例 27: 构建编码 His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), desThr(B30)- 前胰岛素原的质粒 pINT3606

[0318] 按实施例 1 和 2 所述方法用 3 个聚合酶链式反应进行该构建过程。使用了引物 Tir 和 pint3580_glya21rev。另外合成了两条引物:

[0319] desB30f

[0320] 5' -TTCTACACACCCAAGCGCGATGTTCCCTCAGGTGG-3' (SEQ ID NO :24)

[0321] desB30rev

[0322] 5' -AGG AACATCGCGC TTGGGTGTGT AGAAGAAGC-3' (SEQ ID NO :25)

[0323] PCR1 和 PCR2 的模板是质粒 pINT3586 的 DNA。用引物对 desB30f/pint3580_glya21rev 进行 PCR1,用引物对 Tir/desB30rev template 进行 PCR2。PCR3 的模板是 PCR1 和 PCR2 产物的等摩尔混合物。用引物对 Tir/pint3580_glya21rev 进行该反应。PCR3 的产物包含完整前胰岛素原序列。第三个反应的产物用 NcoI/SalI 酶切后插入 NcoI/SalI 切开的 pINT91d 载体 DNA。该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-17 的前体,其用精氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0324] Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Arg (B31)-NH₂- 人胰岛素。

[0325] 该质粒编码的前胰岛素原是化合物 YKL205-17b 的前体,其用赖氨酸酰胺化并具有下述结构:

[0326] Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Lys (B31)-NH₂- 人胰岛素

[0327] 实施例 28 :表达胰岛素原衍生物

[0328] 按照欧洲专利申请 EP A 1 222 207 实施例 1 的方法进行该表达。

[0329] 实施例 29 :折叠胰岛素原衍生物

[0330] 基本按照 EP-A 0 668 282 公开的方法进行该折叠。

[0331] 实施例 30 :酶法加工经折叠的前胰岛素原以给出 B 链末端 C 末端的特征为赖氨酸或精氨酸的双链 Arg (A0)- 胰岛素前体。

[0332] 按照例如 W091/03550 实施例 4 中公开的方法酶法加工经折叠的前胰岛素原前体。证明使用 WO 2007/031187A1 中公开的胰蛋白酶变体在本实施例中具有特别有利的效果。

[0333] 实施例 31 :制备 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。

[0334] 不用考虑其它酸性氨基酸的定位,可进行下述标准反应 :在 0.95ml 精氨酸酰胺溶液 (446g/L) 中溶解 100mg Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31)- 胰岛素类似物,加入 0.13ml 的 M 醋酸钠缓冲液 (pH 5.8) 和 2ml DMF。将反应混合物冷却至 12°C 并通过加入 0.094ml 胰蛋白酶 (0.075mg, RocheDiagnostics) 而起始反应。8 小时后通过加入 TFA 使 pH 降至 2.5 而终止反应,进行 HPLC 分析。形成了 > 60% 的 Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- 人胰岛素。加入胰蛋白酶抑制剂溶液,然后以与 US5,656,722 所述方法相似的方法纯化酰胺化的类似物。

[0335] 以类似方法制备相应的赖氨酸酰胺化合物。然而,该反应的起始材料是溶液形式的含有 366g/L 赖氨酸酰胺的赖氨酸酰胺水性储液。

[0336] 实施例 32 :配制酰胺化的胰岛素衍生物

[0337] 为了测试本发明胰岛素衍生物的生物药理学 (biopharmacological) 性质和理化性质,按如下方法制备该化合物的溶液 :在含有 80 μ g/mL 锌 (氯化锌形式) 的 1mM 盐酸溶液中将本发明的胰岛素衍生物溶解至 240 ± 5 μ

[0338] M 的靶浓度。

[0339] 使用下述组成作为溶解介质：

[0340] a) 1mM 盐酸

[0341] b) 1mM 盐酸, 5 μ g/ml 锌 (以氯化锌或盐酸形式加入)

[0342] c) 1mM 盐酸, 10 μ g/ml 锌 (以氯化锌或盐酸形式加入)

[0343] d) 1mM 盐酸, 15 μ g/ml 锌 (以氯化锌或盐酸形式加入)

[0344] e) 1mM 盐酸, 30 μ g/ml 锌 (以氯化锌或盐酸形式加入)

[0345] f) 1mM 盐酸, 80 μ g/ml 锌 (以氯化锌或盐酸形式加入)

[0346] g) 1mM 盐酸, 120 μ g/ml 锌 (以氯化锌或盐酸形式加入)

[0347] 为了该目的, 首先称出一定量的冷冻干燥材料, 该材料的量比基于分子量和目标浓度所需的量高大约 30%。然后, 利用分析型 HPLC 测定本浓度, 然后用含有 80 μ g/mL 锌的 5mM 盐酸溶液将该溶液制备成获取靶浓度所需要的体积。需要时可将 pH 重新调整至 3.5 ± 0.1 。在用 HPLC 分析以最终确认 $240 \pm 5 \mu$ M 的靶浓度后, 利用具有 0.2 μ m 滤器配件的注射器将该终溶液转移至灭菌管, 该管用隔膜和螺口盖封闭。在短期单个测试本发明的胰岛素衍生物时并未优化制剂, 例如关于加入等张剂、防腐剂或缓冲材料等。

[0348] 实施例 33 : 评估新型胰岛素类似物在大鼠中的降血糖效力

[0349] 在健康、雄性、血糖正常的 Wistar 大鼠中测试了所选新型胰岛素类似物的降血糖效力。雄性大鼠皮下注射剂量为 9nmol/kg 的胰岛素类似物。临在注射胰岛素类似物前以及在注射后的规律间隔时间 (最多至 8 小时) 收集动物血样并测其血糖含量。该实验清楚显示 (参见图 1), 使用的本发明的胰岛素类似物明显延迟了作用开始并使作用持续时间更长且均一。

[0350] 实施例 34 : 评估新型胰岛素类似物在犬中的降血糖效力

[0351] 在健康、雄性、血糖水平正常的比格犬 (beagle dog) 中测试了所选新型胰岛素类似物的降血糖效力。雄性比格犬皮下注射剂量为 6nmol/kg 的胰岛素类似物。临在注射胰岛素类似物前以及在注射后的规律间隔时间 (最多至 48 小时) 收集动物血样并测其血糖含量。该实验清楚显示 (参见图 2), 使用的本发明的胰岛素类似物明显延迟了作用开始并使作用持续时间更长且均一。

[0352] 实施例 35 : 以两倍剂量评估在犬中的降血糖效力

[0353] 在健康、雄性、血糖水平正常的比格犬中测试了所选新型胰岛素类似物的降血糖效力。雄性比格犬皮下注射剂量为 6nmol/kg 和 12nmol/kg 的胰岛素类似物。临在注射胰岛素类似物前以及在注射后的规律间隔时间 (最多至 48 小时) 收集动物血样并测其血糖含量。该实验清楚显示 (参见图 3), 使用的本发明的胰岛素类似物具有剂量依赖性, 但尽管剂量增加了一倍, 作用依然很平缓, 即未观察到显著的低点 (最低点)。由此可推断, 本发明的胰岛素与已知慢效胰岛素相比产生明显少的低血糖事件。

[0354] 实施例 36 : 评估含不同浓度锌的制剂在犬中的降血糖效力

[0355] 按实施例 35 所述方法进行该实验。图 4 显示了结果。根据该结果, 本发明胰岛素类似物的时间-效力曲线可被含相同浓度胰岛素的制剂中锌离子含量以如下方式所影响: 当锌含量为零或低锌含量时, 观察到作用快速开始且效力维持 24 小时, 而当锌含量较高时, 观察到作用逐步开始且胰岛素效力维持时间明显长于 24 小时。

序列表

<110> 塞诺菲 - 安万特德国有限公司

<120> 具有超延迟时效特征的新型胰岛素衍生物

<130>DE2008/001

<140>102008003568.8-43

<141>2008-01-09

<160>25

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>22

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>A 链

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(1)..(1)

<223>Xaa 对应于 Lys 或 Arg

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(6)..(6)

<223>Xaa 对应于 Asp, Gln 或 Glu

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(16)..(16)

<223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或 Gln

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(19).. (19)

<223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或 Asn

<400>1

Xaa Gly Ile Val Glu Xaa Cys Cys His Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Xaa

1

5

10

15

Leu Glu Xaa Tyr Cys Gly

20

<210>2

<211>34

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>B 链

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(1).. (1)

<223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或氨基

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(2).. (2)

<223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或化学键

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3).. (3)

<223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或 Phe

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (4)

<223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或 Val

<220>

<221>MISC_FEATURE
 <222>(5)..(5)
 <223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或 Asn
 <220>

<221>MISC_FEATURE
 <222>(6)..(6)
 <223>Xaa 对应于 Asp, Glu 或 Gln

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(31)..(31)
 <223>Xaa 对应于 Lys 或化学键

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(32)..(32)
 <223>Xaa 对应于 Thr 或化学键

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(33)..(33)
 <223>Xaa 对应于 Arg, Lys 或化学键

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(34)..(34)
 <223>Xaa 对应于 Arg- 酰胺, Lys- 酰胺或氨基

<400>2

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

<210>3
 <211>38
 <212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3580_glya2lrev

<400>3

caaaggtcga ctattagccg cagtagttct ccagctgg 38

<210>4

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>arg_cjuncf

<400>4

gtccctgcag cgtcgcggca tcgtggagca g 31

<210>5

<211>36

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>arg_cjunc_rev

<400>5

ccacgatgcc gcgacgctgc agggaccctt ccagcg 36

<210>6

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3580_Ha8f

<400>6

agcagtgctg ccacagcate tgctccctct ac 32

<210>7

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3580_Ha8rev

<400>7

gagcagatgc tgtggcagca ctgctccacg atg 33

<210>8

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3581_Ea5f

<400>8

gcatcgtgga ggagtgctgc cacagcatct g 31

<210>9

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3581_Ea5rev

<400>9

ctgtggcagc actcctccac gatgccgcca cg 32

<210>10

<211>47

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3580_Da18rev	
<400>10	
caaaggtcga ctattagccg cagtagtctt ccagctggta gagggag	47
<210>11	
<211>56	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>pint3580_Ea15rev	
<400>11	
caaaggtcga ctattagccg cagtagttct ccagctcgta gagggagcag atgctg	56
<210>12	
<211>56	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>pint3585_Ea15_Da18rev	
<400>12	
caaaggtcga ctattagccg cagtagtctt ccagctcgta gagggagcag atgctg	56
<210>13	
<211>30	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>pint3581_Db3f	
<400>13	
gcacgatttg tggaccagca cctgtgcggc	30
<210>14	
<211>34	

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3581_Db3rev

<400>14

cacaggtgct ggtccacaaa tcgtgccgaa tttc 34

<210>15

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3581_Db3_Eb4f

<400>15

gcacgatttg tggacgagca cctgtgcggc tc 32

<210>16

<211>36

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3581_Db3_Eb4rev

<400>16

cgcacaggtg ctcgtccaca aatcgtgccg aatttc 36

<210>17

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3581_Eb4f

<400>17

acgatttgtg aacgagcacc tgtgcggctc	30
<210>18	
<211>36	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>pint3581_Eb4rev	
<400>18	
cgcacaggtg ctcgttcaca aatcgtgccg aatttc	36
<210>19	
<211>43	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>pint3581_Eb0f1	
<400>19	
caacaggaaa ttcggcacga gagtttgtga accagcacct gtg	43
<210>20	
<211>44	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>pint3581_Eb01f2	
<400>20	
tatcgacat ggcaacaaca tcaacaggaa attcggcacg agag	44
<210>21	
<211>42	
<212>DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223>pint3581_Db1f1

<400>21

caacagggaaa ttcggcacga gacgtgaacc agcacctgtg cg 42

<210>22

<211>44

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3581_Db1f2

<400>22

tatcgacat ggcaacaaca tcaacaggaa attcggcacg agac 44

<210>23

<211>44

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>pint3597_Db1f

<400>23

caacagggaaa ttcggcacga gaggacgtga accagcacct gtgc 44

<210>24

<211>34

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>desB30f

<400>24

ttctacacac ccaagegcga tgttcctcag gtgg 34

<210>25

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>desB30rev

<400>25

aggaacatcg cgcttgggtg tgtagaagaa gc 32

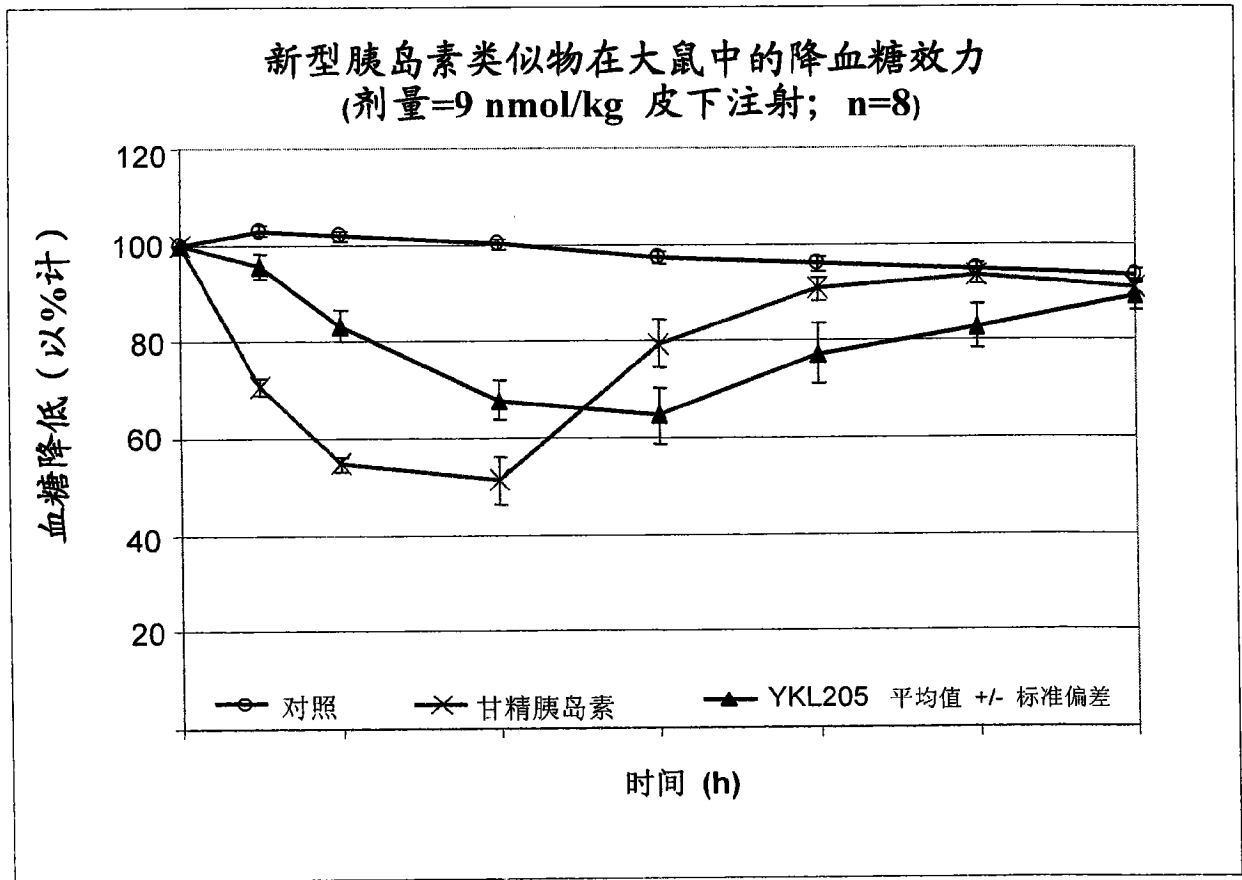


图 1

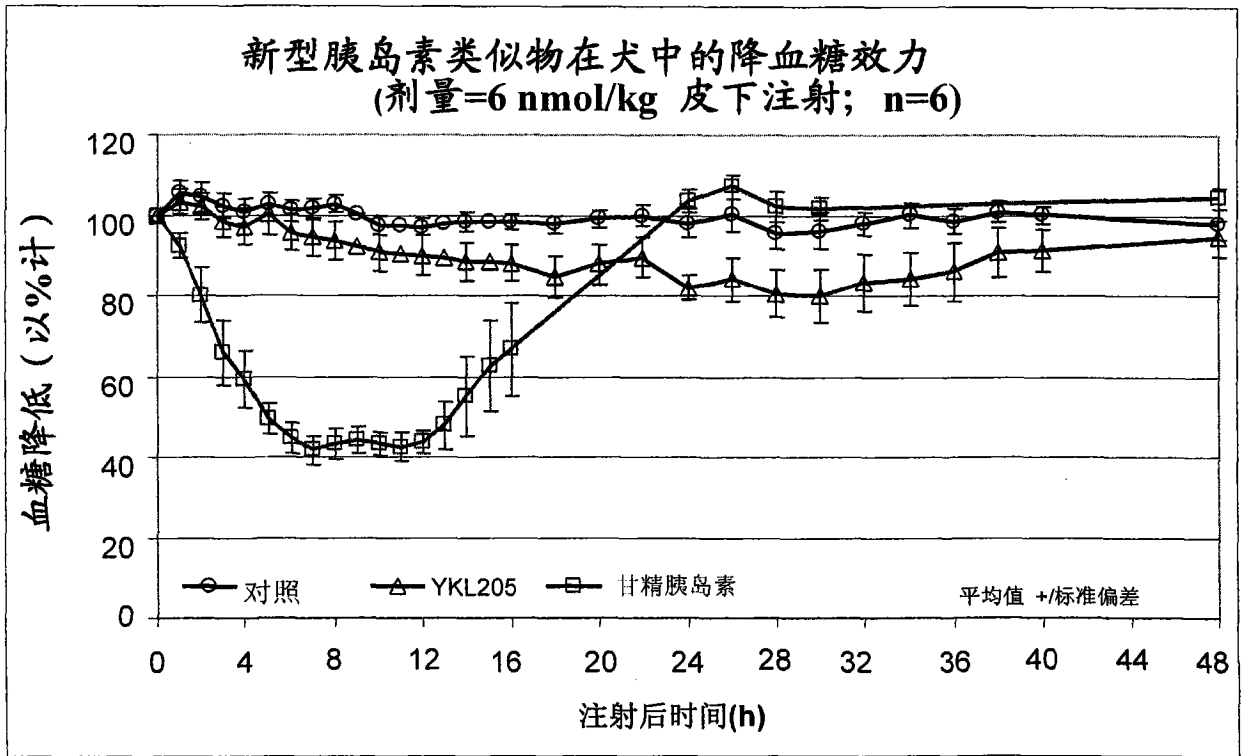


图 2

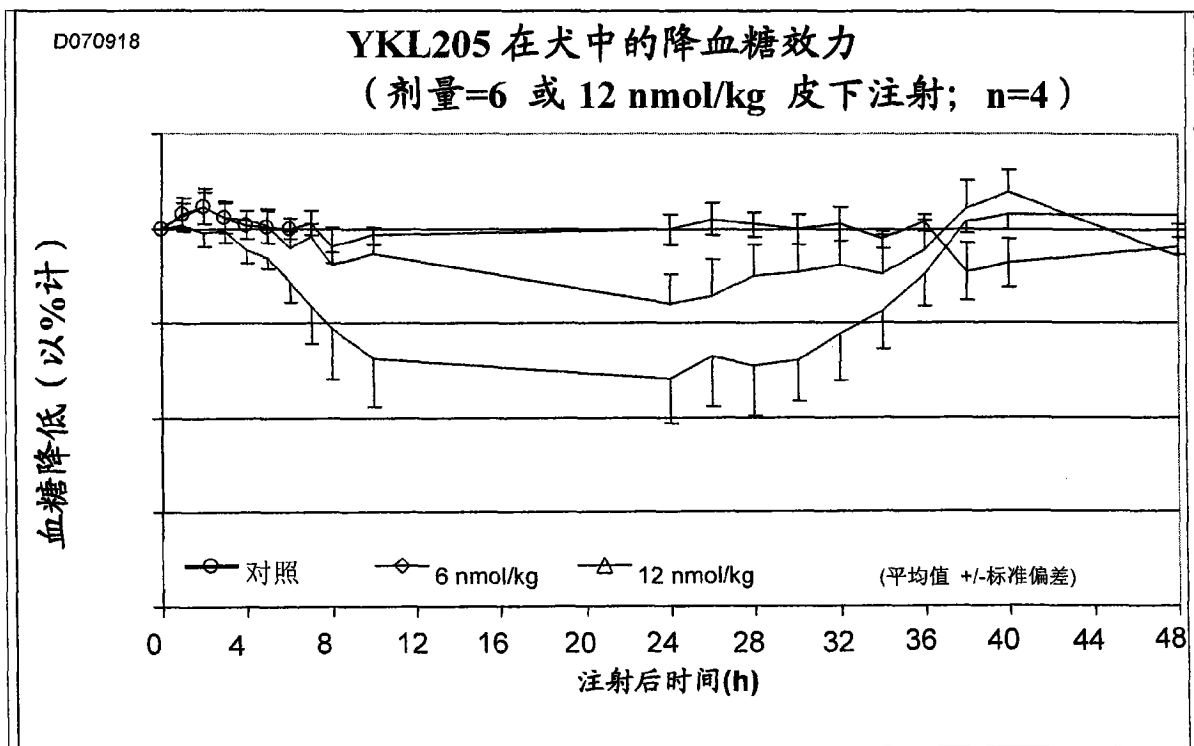


图 3

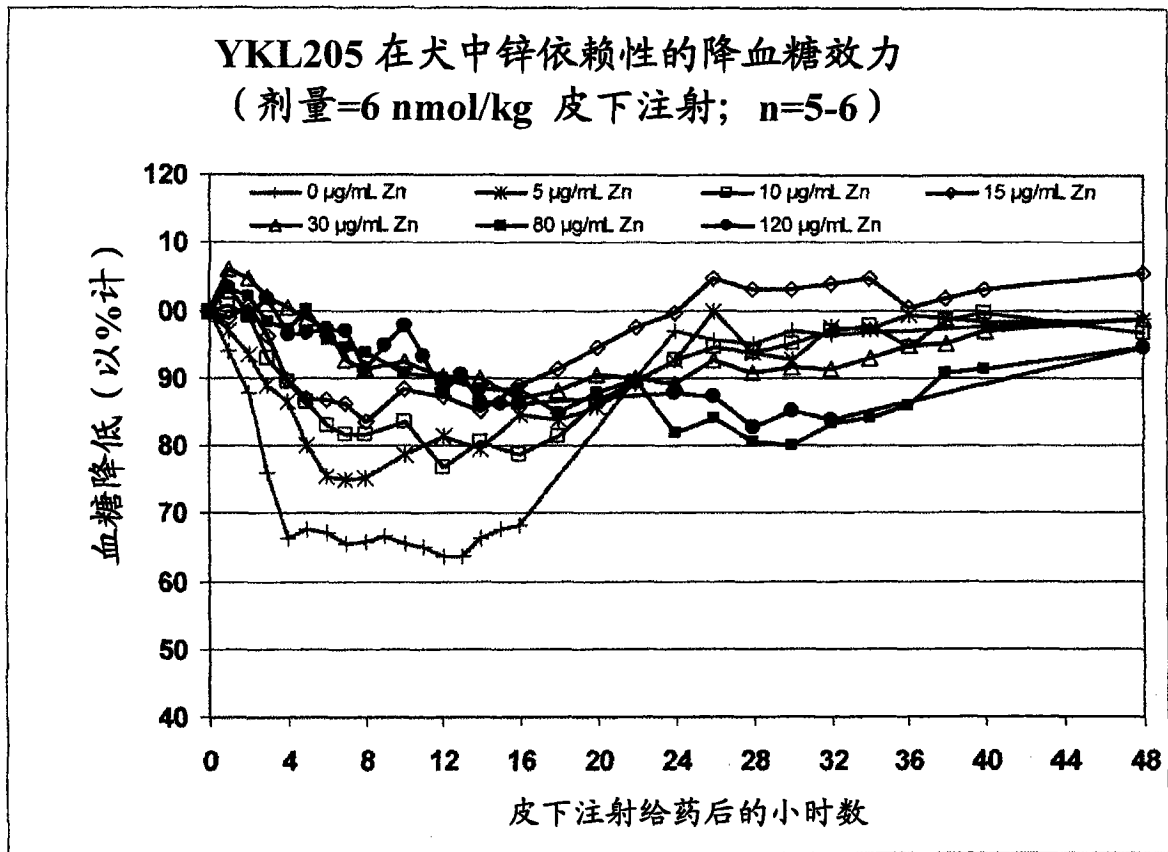


图 4