



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 200942256 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：098100281

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 01 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K38/28 (2006.01) C07K14/62 (2006.01)

(30)優先權：2008/01/09 德國 10 2008 003 568.8

2008/05/24 德國 10 2008 025 008.2

(71)申請人：賽諾菲阿凡提斯德意志有限公司(德國) SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(DE)

德國

(72)發明人：哈柏曼 保羅 HABERMANN, PAUL (DE)；賽博克 葛哈德 SEIPKE, GERHARD (DE)；庫爾 羅藍德 KURRLE, ROLAND (DE)；穆勒 古特 MUELLER, GUENTER (DE)；索莫菲爾德 馬克 SOMMERFELD, MARK (DE)；天納格斯 諾伯特 TENNAGELS, NORBERT (DE)；齊翰克 喬治 TSCHANK, GEORG (AT)；沃勒 巫瑞奇 WERNER, ULRICH (DE)

(74)代理人：林秋琴；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：40 項 圖式數：4 共 71 頁

(54)名稱

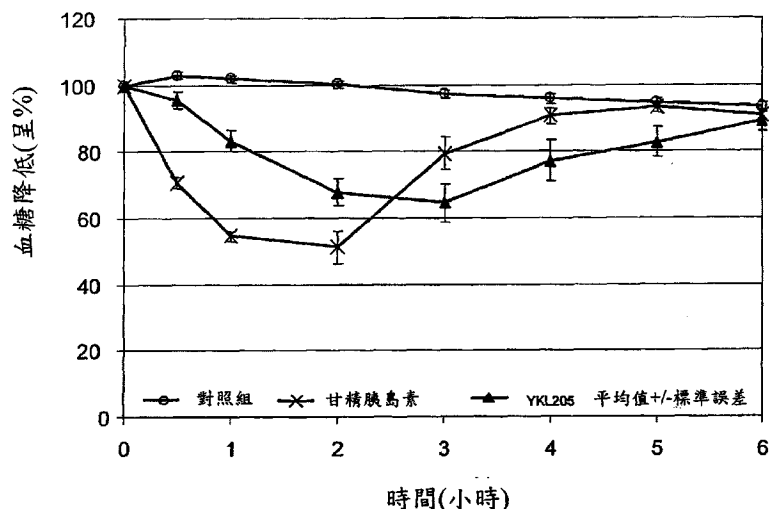
具有極度延遲時間 / 作用型態之新穎胰島素衍生物 (一)

NOVEL INSULIN DERIVATIVES WITH EXTREMELY DELAYED TIME/ACTION PROFILE

(57)摘要

本發明是有關於具有基礎時間/作用型態的新穎胰島素類似物，其特徵在於下列特性：• B 鏈末端由一醯胺化鹼性胺基酸殘基(諸如離胺酸或精胺醯胺)所構成，• 此外胰島素 A 鏈的 N-端胺基酸殘基是一離胺酸或精胺酸殘基，• A8 胺基酸位置是被一組胺酸殘基所佔據，• A21 胺基酸位置是被一甘胺酸殘基所佔據，以及• 造成在位置 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 以及 B4 上一或多個帶負電的胺基酸殘基的置換和/或添加。

新穎的胰島素類似物在大鼠中的低血糖效果
(劑量 = 9 nmol/kg s.c.; n = 8)





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 200942256 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：098100281

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 01 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K38/28 (2006.01) C07K14/62 (2006.01)

(30)優先權：2008/01/09 德國 10 2008 003 568.8

2008/05/24 德國 10 2008 025 008.2

(71)申請人：賽諾菲阿凡提斯德意志有限公司(德國) SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(DE)

德國

(72)發明人：哈柏曼 保羅 HABERMANN, PAUL (DE)；賽博克 葛哈德 SEIPKE, GERHARD (DE)；庫爾 羅藍德 KURRLE, ROLAND (DE)；穆勒 古特 MUELLER, GUENTER (DE)；索莫菲爾德 馬克 SOMMERFELD, MARK (DE)；天納格斯 諾伯特 TENNAGELS, NORBERT (DE)；齊翰克 喬治 TSCHANK, GEORG (AT)；沃勒 巫瑞奇 WERNER, ULRICH (DE)

(74)代理人：林秋琴；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：40 項 圖式數：4 共 71 頁

(54)名稱

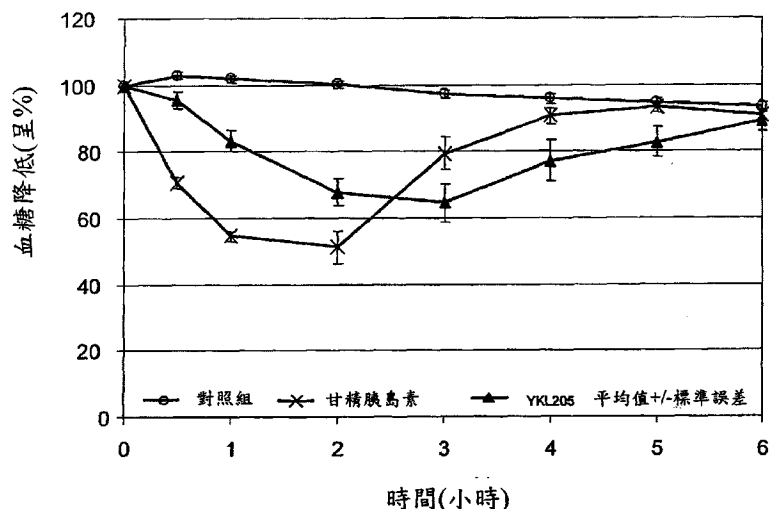
具有極度延遲時間 / 作用型態之新穎胰島素衍生物 (一)

NOVEL INSULIN DERIVATIVES WITH EXTREMELY DELAYED TIME/ACTION PROFILE

(57)摘要

本發明是有關於具有基礎時間/作用型態的新穎胰島素類似物，其特徵在於下列特性：• B 鏈末端由一醯胺化鹼性胺基酸殘基(諸如離胺酸或精胺醯胺)所構成，• 此外胰島素 A 鏈的 N-端胺基酸殘基是一離胺酸或精胺酸殘基，• A8 胺基酸位置是被一組胺酸殘基所佔據，• A21 胺基酸位置是被一甘胺酸殘基所佔據，以及• 造成在位置 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 以及 B4 上一或多個帶負電的胺基酸殘基的置換和/或添加。

新穎的胰島素類似物在大鼠中的低血糖效果
(劑量 = 9 nmol/kg s.c.; n = 8)



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於具有基礎時間/作用型態的新穎胰島素類似物，它們的製備以及用途。

【先前技術】

5 糖尿病的發生率(incidence)在近年來已上升至一個近乎流行性的程度。該疾病可能造成預期壽命(life expectancy)的一個嚴重縮短。帶有糖尿病的人必須頻繁地為他們的身體從外面補充胰島素。最適化使用胰島素的治療是實用的。
10 具有專一性藥理學特性的不同胰島素目前是可取得的。實際上，不同的胰島素是依據它們的作用期間(duration of action)而被區分成短效胰島素(short-acting insulins)、速效胰島素(fast-acting insulins)、長效胰島素(long-acting insulins)以及混合型胰島素(mixed insulins)。就長效胰島素而言被同義地使用的命名是慢胰島素(slow insulins)、貯存胰島素(depot insulin)要不然就是基礎胰島素(basal insulin)。
15 在許多這些胰島素產品中的活性成分是所謂的胰島素類似物，其已藉由置換、刪除和/或添加一或多個胺基酸而衍生自人類胰島素。術語“胰島素類似物”以及“胰島素”在這裡被同義地使用。
20

經強化的胰島素治療的策略嘗試要藉由針對血糖水準的一個穩定控制而透過基礎胰島素的早期投藥來減低健康風險。一個流行的基礎胰島素的一個實例是藥劑蘭德仕[®](medicament Lantus[®])(活性成分：甘精胰島素(insulin

glargin) = Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)人類胰島素)。發展新穎、經改良的基礎胰島素的普遍目標是要將低血糖事件(hypoglycemic events)減至最低。就這點而論一個理想的基礎胰島素是一個在每位病患體內確實地作用達至少 24 小時者。這個胰島素效果理想地具有一個延遲開始(delayed onset)以及一盡可能為淺的時間/作用型態，以使得短暫的低血糖症(hypoglycemia)的風險確實地被減至最低並且投藥甚至可能不需要預先攝取食物。當胰島素效果盡可能長時間地存留於相同的水準時，有一個基礎胰島素的良好補充，亦即身體被補充以一恆定數量的胰島素。低血糖事件的風險因而是低的並且一個病患-與一個天數-專一性的變異性(a patient- and a day-specific variability)被減至最低。因而一理想的基礎胰島素的藥物動力學型態之特徵理應在於作用的一延遲開始以及在於一延遲，亦即長效與一致的作用。

然而-儘管治療利益已經達成-至今沒有所述的慢胰島素顯示出一理想的基礎胰島素的藥物動力學特性。所欲的胰島素具有這樣一個淺的並且長效時間/作用型態而使得在病患體內的低血糖事件與天數-依賴型變異之風險被進一步降至最低以及作用的期間被更為延長，以至於在某些情況下不再需要每天投藥胰島素。這將使得糖尿病的簡化治療變得可行，特別是年長的糖尿病患者與那些需要照護者(他們不能夠自行注射胰島素)，並且將因而有極大的經濟利益。這樣的基礎胰島素在第 2 型糖尿病的早期中是額外

有幫助的。臨床醫師報導，存在於許多人中的注射恐怖
(injection phobia)會遏嚇他們在適合的時間開始胰島素治
療。因此，血糖的控制是差的，導致糖尿病的後遺症。一
基礎胰島素(其降低藉由注射而被給予的胰島素劑量之數
目)可能具有讓病患更能接受胰島素治療的效果。

Kohn 等人(Peptides 28 (2007) 935-948)描述在相較於
人類胰島素的等電點($pI = 5.6$)的鹼性範圍方面，如何藉由
製備胰島素類似物(其等電點(pI)是藉由在 B 鏈末端或在 A
與 B 鏈的 N 端處添加離胺酸或精胺酸而被改變)而將胰島素
的藥物動力學予以最佳化，以使得在生理條件下的溶解度
被降低以及一個被延長的時間/作用型態結果。來自於 Kohn
等人的化合物 18 (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)
人類胰島素(實驗地被決定的 $pI = 7.3$ ；經計算的 $pI = 7.58$))
就這點而論被描述有如該計畫之全文中的最佳化合物。
Kohn 等人因此認為將帶正電的胺基酸添加到人類胰島素
的胺基酸序列中以將等電點從 $pI = 5.6$ 增高至中性範圍在
設計新穎胰島素類似物中是主要目標。

【發明內容】

這個在設計新穎胰島素類似物中的目的是藉由酸性胺
基酸來置換人類胰島素中的中性胺基酸和/或添加酸性胺
基酸的相反，因為這樣一個置換和/或添加在一定程度上至
少會破壞引入帶正電的胺基酸的效果。然而，現在已驚訝
地發現到，被描述的所欲基礎時間/作用型態是利用胰島素
類似物而被獲得，該胰島素類似物的特徵在於：

• B 鏈末端由一醯胺化鹼性胺基酸殘基(amidated basic amino acid residue)(諸如離胺酸或精胺醯胺(argininamide))所構成，以及

• 胰島素 A 鏈的 N-端胺基酸殘基是一離胺酸或精胺酸殘基，以及

• A8 胺基酸位置是被一組胺酸殘基所佔據，以及

• A21 胺基酸位置是被一甘胺酸殘基所佔據；以及

• 在 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 以及 B4 位置處已有兩個藉由酸性胺基酸的中性胺基酸的置換，兩個帶負電的胺基酸殘基的添加或分別有一個這樣的置換或一個這樣的添加。

鑑於前三個所述特徵有助於透過正電的引入或負電的消除來促成增高一對應胰島素類似物的 pI，最後所述之帶負電的胺基酸殘基的置換和/或添加具有相反的效果並且促成降低 pI。令人驚訝地，所述胰島素類似物精確地具有所欲的有利時間/作用型態。這些化合物的 pI 值要比來自於 Kohn 等人的化合物 18 (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)人類胰島素)所具有者還低，不過但是更顯示出一個延遲的作用開始以及一個較長的作用期間，亦即一個極度淺並且長效、一致的作用型態。低血糖事件的風險因而無疑地被減至最低。延遲是這樣地明顯以使得即使在大鼠身上的模型實驗可以令人驚訝地偵測到效果，然而甘精胰島素的延遲作用相較之下在大鼠中無法被明確地觀察到。第 1 圖顯示本發明的化合物 YKL205 相較於甘精胰島素所具有

本發明因而是有關於一個具有式 I 的胰島素類似物



A0 對應於 Lys 或 Arg ;
A5 對應於 Asp、Gln 或 Glu ;
A15 對應於 Asp、Glu 或 Gln ;
A18 對應於 Asp、Glu 或 Asn ;
B-1 對應於 Asp、Glu 或一胺基基團 ;
B0 對應於 Asp、Glu 或一化學鍵 ;
B1 對應於 Asp、Glu 或 Phe ;
B2 對應於 Asp、Glu 或 Val ;

B3 對應於 Asp、Glu 或 Asn；

B4 對應於 Asp、Glu 或 Gln；

B29 對應於 Lys 或一化學鍵；

B30 對應於 Thr 或一化學鍵；

B31 對應於 Arg、Lys 或一化學鍵；

B32 對應於 Arg-醯胺、Lys-醯胺或一胺基基團，

其中包含有 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 以及 B4 之群組中的兩個胺基酸殘基同時地或彼此獨立地對應於 Asp 或 Glu。

本發明特別是有關於如上所詳述的胰島素類似物，其中彼此獨立地 A0 對應於 Arg，或其中 A5 對應於 Glu，或其中 A15 對應於 Glu，或其中 A18 對應於 Asp，或其中 B-1 對應於一胺基基團，或其中 B0 對應於 Glu，或其中 B1 對應於 Asp，或其中 B2 對應於 Val，或其中 B3 對應於 Asp，或其中 B4 對應於 Glu，或其中 B29 對應於 Lys，或其中 B30 對應於 Thr，或其中 B31 對應於 Arg 或 Lys。

本發明特別較佳地是有關於一種選自於包含有下列的群組的胰島素類似物：

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

5 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg
(B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

10 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg
(B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

15 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

20 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg
(B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg
(B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg
(B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

5 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

10 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

20 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

5 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

10 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

15 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31)-NH₂ 人類胰島素，

20 在所提到的胰島素類似物的命名中，術語“人類胰島素”的詳述是參照人類胰島素的 A 鏈與 B 鏈的胺基酸序列，並且出自於其的所有偏差(添加、置換、刪除)在一胰島素類似物的一給定命名中被指明。

本發明進一步是有關於一種用以製備一如上所述之胰島素類似物的方法，特別地其中該胰島素類似物的一前驅

物被重組地製備，該前驅物被酵素地加工處理成雙-鏈胰島素，以及與精胺鹽胺的偶合在一具有胰蛋白酶活性的酵素存在下被執行，並且該胰島素類似物被分離。

5 本發明進一步是有關於一種如上所述之胰島素類似物供製造一用以治療糖尿病的一藥劑的用途，特別是第 I 型或第 II 型糖尿病。本發明亦有關於一種如上所述之胰島素類似物供製造一用以輔助貝他細胞再生 (beta cell regeneration) 的藥劑的用途。

10 本發明進一步是有關於一種包含如上所述之胰島素類似物的藥品 (pharmaceutical)。

本發明進一步是有關於一種如上所述之胰島素類似物的調配物，其中該調配物是呈包含有被溶解的胰島素類似物的水性形式 (aqueous form)。

15 本發明進一步是有關於一種如上所述之胰島素類似物的調配物，其中該調配物是呈粉末的形式。

20 本發明進一步是有關於一種如上所述之調配物，其中如上所述的胰島素類似物是呈結晶和/或無定形形式而存在。

本發明進一步是有關於一種如上所述之胰島素類似物的調配物，其中該調配物是呈一懸浮液的形式。

本發明進一步是有關於一種如上所述之胰島素類似物的調配物，其中該調配物額外地包含一化學伴隨蛋白 (chemical chaperone)。

本發明進一步是有關於一種編碼如上所述之胰島素類

似物的一前驅物，或如上所述之胰島素類似物的 A 鏈或 B 鏈的 DNA。

本發明進一步是有關於一種包含如上所述之 DNA 的載體。

5 本發明進一步是有關於一種包含如上所述之 DNA 或一如上所述之載體的宿主生物。

10 本發明進一步是有關於一種前原胰島素類似物 (preproinsulin analogue)，其中 C 肽在它的 N 端帶有胺基酸殘基精胺酸並且在它的 C 端帶有兩個精胺酸殘基或一個精胺酸殘基與一個離胺酸殘基，並且在後者中該離胺酸殘基形成實際的 C 端。

15 本發明進一步是有關於一種如上所述的調配物，其額外地包含有一類升糖素肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 或其一類似物或衍生物，或艾塞那肽-3 (exendin-3) 或-4 或其一類似物或衍生物，較佳地艾塞那肽-4。

20 本發明進一步是有關於一種如上所述的調配物，其中艾塞那肽-4 的一類似物是選自於一包含下列的群組
H-desPro³⁶-艾塞那肽-4-Lys₆-NH₂，
H-des(Pro^{36,37})-艾塞那肽-4-Lys₄-NH₂ 以及
H-des(Pro^{36,37})-艾塞那肽-4-Lys₅-NH₂，
或其一藥理學上可耐受的鹽類。

本發明進一步是有關於一種如上所述的調配物，其中艾塞那肽-4 的一類似物是選自於一包含下列的群組
desPro³⁶ [Asp²⁸]艾塞那肽-4 (1-39)，

desPro³⁶ [IsoAsp²⁸] 艾塞那肽-4 (1-39) ,
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽-4 (1-39) ,
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸] 艾塞那肽-4 (1-39) ,
 desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽-2 (1-39) ,
 5 desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸] 艾塞那肽-2 (1-39) ,
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽-4 (1-39) 以及
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸] 艾塞那肽-4 (1-39) ,
 或其藥理學上可耐受的鹽類。

本發明進一步是有關於一種如在前段中所述的調配
 10 物，其中該肽-Lys₆-NH₂ 被接附至艾塞那肽-4 的類似物的 C
 端。

本發明進一步是有關於一種如上所述的調配物，其中
 艾塞那肽-4 的類似物是選自於一包含下列的群組

H-(Lys)₆-des Pro³⁶ [Asp²⁸] 艾塞那肽-4(1-39)-Lys₆-NH₂

15 des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ 艾塞那肽-4(1-39)-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
 -4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
 -4(1-39)-NH₂ ,

20 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

H-des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞
那肽-4(1-39)-NH₂ ,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞
那肽-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那
肽-4(1-39)-NH₂ ,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽

-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽

-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那

5 肽 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽

-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵] 艾塞那肽

-4(1-39)-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]

艾塞那肽 -4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那

肽 -4(1-39)-NH₂ ,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽

-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]

艾塞那肽 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵,

Asp²⁸] 艾塞那肽 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

或其藥理學上可耐受的鹽類。

本發明進一步是有關於一種如上所述的調配物，其額外地包含 Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-麩胺鹽基(N^α-十六鹽基))) GLP-1 (7-37)[利拉魯肽(liraglutide)]或其藥理學上可耐受的

鹽類。

就這點而論對於一熟習技藝者來說清楚的是，本發明的胰島素可以是一藥學調配物的項目，其在投藥之後具有一有利的效果。水溶液就這點而論是起點。更多的成分因此必須是互溶的。病毒動物污染的風險會因為製劑不應該包含有任何衍生自動物來源的成分而被減至最低。更有利的是藉由添加防腐劑來防止微生物污染。藉由添加等張劑來抵銷該調配物在投藥位置處對於組織細胞之生理學的可能負面效果是可行的。魚精蛋白(protamine)的添加可能具有一安定效果，以使得本質上無鹽的胰島素製劑可以藉由將魚精蛋白添加至調配物中而被獲得。一酚成分的添加可能會造成所使用之胰島素類似物的結構的安定並且因而另外引起尤其是對於作用開始的延遲效果。將會穩定本發明之慢胰島素的空間結構並且造成更佳的熱安定性的物質添加至調配物中亦是可行的。此等化學帶位子可以是例如短的合成肽，其亦可能包含有胺基酸類似物或包括例如衍生自胰島素之 C 肽的肽序列。

本發明的胰島素可以被併入奈米粒子以供發展成貯存形式(depot forms)。亦可理解的是所謂緩慢釋放調配物(其中存在有本發明的慢胰島素)是可逆地被結合至一聚合物載體。

本發明的胰島素可以與速效胰島素(諸如 Apidra[®]、NovoRapid[®]、Humalog[®]或正在經歷發展中的胰島素衍生物或具有一適當的時間/作用型態的調配物)或可吸入胰島素

或經鼻地或口服地被投藥的胰島素(其正在經歷發展中)平行地被投藥。就這點而論對於一熟習技藝者將為清楚的是，速效以及本發明的慢胰島素的適當調配物混合物可以被用於這個目的。本發明的胰島素類似物可進一步被用在藥學製劑中，該藥學製劑包含有被描述為一活性可比擬 GLP-1(類升糖素肽-1)或艾塞那肽-4 或艾塞那肽-3 的肽。 GLP-1 (7-37)、艾塞那肽(Byetta[®])或肽(其製劑被描述於專利申請案 WO 2006/058620、WO 2001/04156、WO 2004/005342 以及 WO 98/08871)代表此等肽的實例。在這點而論尤為有利的調配物是那些包含有這些肽的一貯存調配物者。在第 II 型糖尿病的初期中特別有利的治療類型是那些與本發明的藥品的投藥平行地被提供者(諸如，例如甲福明(metformin))，其會增高胰島素的效果。與二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4)抑制劑(其會增高腸促胰液素(incretins)的水準)的組合治療是盡可能地像是與磺醯尿素(sulfonylureas)(其在胰臟中會增高胰島素分泌)的組合。當胰臟貝他細胞從適當的幹細胞中的再生藉由分化因子的投藥而被起始時，本發明的慢胰島素可以特別有利地而被採用。所有這些應用是藉著有關糖尿病的治療為例而被提及，並且本發明亦與其相關。本發明因而進一步是有關於本發明的胰島素組合其他用於治療糖尿病(特別是第 I 型或第 II 型的糖尿病)之活性成分的用途。

本發明進一步是有關於一種藥品，其包含有本發明的一胰島素類似物，其特別地表現一水性調配物或一粉末。

該藥品是一種藥學製劑，其較佳地是一用於注射目的之溶液或懸浮液；其特徵在於本發明的至少一胰島素類似物的一含量，和/或其至少一生理學上可耐受的鹽類呈溶解的，無定形和/或結晶-較佳地呈溶解的-形式。

5 該製劑在無菌水溶液中較佳地具有一介於大約 2.5 至 8.5 的 pH，特別地介於 4.0 與 8.5，較佳地包含有一適當的張力劑(tonicity agent)、一適當的防腐劑以及，若適當的話，一適當的緩衝劑，並且亦較佳地一特定的鋅離子濃度。除了活性成分以外的製劑成分的總體形成製劑載體。適當的張力劑是例如甘油、葡萄糖、甘露糖醇、NaCl、鈣或鎂化合物(諸如 CaCl_2 等等)。本發明之胰島素或其生理學上可耐受的鹽類的溶解度在弱酸性 pH 值下是受到張力劑和/或防腐劑的選擇所影響。

15 適當的防腐劑的實例是酚、m-甲酚、苯甲醇和/或 p-對羥苯甲酸酯。

可以特別被用於調整一 pH 介於大約 4.0 與 8.5 之間的緩衝物質是例如醋酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉等等。除此之外，生理學上可接受的稀酸(典型地 HCl)或鹼(典型地 NaOH)亦適用於調整 pH。

20 若該製劑具有一鋅含量，偏好是給予從 1 至 2 mg/ml 的一者，特別地從 1 $\mu\text{g/ml}$ 至 200 μg 鋅/ml。

本發明之胰島素類似物的作用型態令人驚訝地是藉由添加 Zn 而被令人滿意地影響。這容許在作用的總期間、作用開始的速度以及效果曲線的型態上有所不同的製劑並且

因而容許病患的個別安定。另一個可能性是透過使用一個“雙容室胰島素裝置”(其容許一個要被投藥的調配物視有效期狀況而帶有一個快速的作用開始和/或作用的緩慢的逐步開始的調配物)而產生。

5 爲了要改變本發明之製劑的活性成分型態，混合未經修飾的胰島素(較佳地牛、豬或人類胰島素，特別是人類胰島素)或其胰島素類似物與衍生物亦是可行的。混合一或多個艾塞那肽-4 衍生物或肽(其特徵在於一與 GLP-1(類升糖素肽-1)可相比擬或直接地對應於 GLP-1 的活性)亦是可行的。
10 的。本發明亦有關於此等藥品(製劑)。

被偏好的活性成分濃度是那些對應於大約 1-1500，更佳地大約 5-1000 以及特別地大約 40-400 國際單位/ml 者。

本發明的胰島素類似物起初地有如前驅物而被生物技術地製備，該前驅物尚未包括醯胺。習於技藝者熟悉一大數目的有關製備胰島素的可能性。所使用的宿主細胞系統就這點而論是藉由發酵以供用於培育的細菌、真菌以及植物或植物細胞。若費用考量允許的話，使用動物細胞作為宿主系統的表現系統亦是可推想的。然而，針對其的先決條件確實沒有動物病毒。因此明顯的是，藉由實例而被描述
15 的表現系統僅表現被發展出的宿主/載體系統的一小片段以供蛋白質的重組製備。舉例來說，以真菌或植物系統(諸如苔蘚、藻類或高等植物(諸如菸草、豌豆、紅花、大麥、玉米或歐洲油菜))為基礎的生物技術方法並未被描述在申請案中。然而，本發明亦包括宿主/載體系統以及容許目標
20

肽在適當的生物技術表現系統中被製備的編碼 DNA 序列。宿主生物因而可以特別選自於植物界，來自於包含有裂殖菌類(Schizomycetes)、細菌或藍藻的第一分類裂殖植物 (Schizophyta) 的生物、來自於第二分類藻類門 (Phycophyta)第 V 綱綠藻綱(Chlorophyceae)的生物、第二分類藻類門第 VII 綱紅藻綱(Rhodophyceae)的生物、第三分類黏菌類(Mycophyta)的生物、第五分類苔蘚類(Bryophyta)的生物以及第七分類種子植物門(Spermatophyta)的生物。

歐洲專利申請案 EP-A 1 222 207 描述一種質體 pINT358d，其編碼有關一包括一經修飾之 C 肽的前原胰島素。在聚合酶鏈反應(PCR)的協助下來專一地修飾原胰島素-編碼序列是可行的，以使得表現可當作本發明之胰島素的前驅物的前原胰島素是可行的。對應的融合蛋白不必然地需要被細胞內地製備。對於熟習技藝者來說明顯的是，此等蛋白質也可以藉由具有隨後分泌至胞外質(periplasm)中和/或至培養物上清液中的細菌表現而被製備。歐洲專利申請案 EP-A 1 364 029 藉由實例來描述此者。本發明亦有關於會致使本發明之類似物的原胰島素前驅物。

以這個方法來製備的原胰島素原則上可以被轉換成一胰島素類似物前驅物，其在位置 A0 包括離胺酸以及精胺酸並且在 B 鏈的 C 端末端帶有離胺酸或精胺酸。

若本發明的原胰島素在細菌中的細胞內表現之後呈包涵體(inclusion bodies)的形式或可溶解的形式，這些前驅物必須藉由活體外摺疊而在加工與生化修飾可以被進行之前

被摺疊成正確的構形。就此點而論，所述的融合蛋白容許在變性之後藉由尿素或胍鹽酸鹽 (guanidinium hydrochloride) 來直接摺疊，並且本發明亦有關於摺疊中間產物。

5 生化方法被用來濃縮個別的中間產物，特別是其基本原則已被公開並且事實上在教科書之題材內的分離步驟。對於熟習技藝者來說為清楚的是，此等原則因此可以被組合並且因而可能造成先前尚未按照它們的順序而被發表的步驟。本發明因而亦有關於造成本發明之類似物的純化的方法。

10 本發明進一步是有關於一種用以製備本發明之胰島素類似物的方法，其中該胰島素類似物的一前驅物是重組地被製備並且被酵素地轉換成一個雙-鏈胰島素前驅物，該雙-鏈胰島素前驅物在 N 端帶有關於 A 鏈之胺基酸 1 的精胺酸或離胺酸，並且在 B 鏈的 C 末端具有一離胺酸或精胺酸殘基，該離胺酸或精胺酸殘基在一具有胰蛋白酶活性之酵素存在下隨著精胺醯胺或離胺醯胺被轉換成醯胺並且因而成為本發明的慢胰島素，並且藉由一生化純化方法而以高純度來被製備。

15 20 透過至少一天然存在的胺基酸殘基藉由其他胺基酸殘基的置換和/或至少一胺基酸殘基從對應的，不然從完全相同之天然存在的蛋白質的添加和/或刪除而有所不同的蛋白質被意指為蛋白質的“類似物”。就此點而論，對於被添加和/或被置換的胺基酸殘基來說成為不是天然存在者是

可行的。

藉由起始蛋白質的特定胺基酸殘基的化學修飾而被獲得的蛋白質被意指為蛋白質的“衍生物”。化學修飾可能例如由一或多個特定化學基團添加至一或多個胺基酸所構成。

【實施方式】

下列實例意欲要說明本發明的概念但就此點而論不具有一限制效果。

實例 1：製備編碼 Gly (A21)-胰島素以及一在 C/A 鏈邊界處帶有 Arg Arg 之經修飾之 C 肽的載體衍生物 pINT3580

歐洲專利申請案 EP-A 1 222 207 描述質體 pINT358d、pINT91d 以及引子序列 Tir。這些產物的 DNA 被用來建構質體 pINT3580。此外該質體 pINT358d 的特徵在於一編碼有關一具有特定特性之經修飾的 C 肽的基因序列。三個引子序列被合成：

pint3580_glya21rev

5'-CAAAGGTCGACTATTAGCCGCGAGTAGTTCTCCAGCTGG-3' (序列辨識編號：3)

這個引子在加工之後可以在由 pINT358d 所編碼之原胰島素序列的 A 鏈的位置 21 處引入甘胺酸(粗體，底線)來代替天門冬醯胺酸。

arg_cjuncf

5'-GTCCCTGCAGCGTCGCGGCATCGTGGAGCAG-3' (序列辨識編號：4)

這個引子類似引子 arg_cjunc_rev 可以用於將精胺酸引入胰島素 A/B 鏈邊界來代替離胺酸。

arg_cjunc_rev

5'-CCACGATGCC GCGACGCTGC AGGGACCCCT CCAGCG-3' (序列辨識編號：5)

有關於要被引入的精胺酸的密碼子在兩個引子中是呈粗體印刷。一個 PCR 是依據歐洲專利申請案 EP-A 1 222 207 而使用引子對 Tir/arg_cjunc_rev 以及 arg_cjuncf/pint3580_glya21rev 的各者並且使用質體 pINT358d 的 DNA 作為模版而被執行。兩個反應的產物的部分被組合並且在一個第三 PCR 中使用引子對 Tir/pint3580_glya21rev 而被一起採用。這個反應的產物在反應混合物藉由凝膠電泳的分離之後被純化並且依據製造商的操作指南在一個以及相同的反應中使用限制酵素 Sal1/Nco1 予以消化，反應混合物藉由凝膠電泳而被分離，並且編碼原胰島素序列的 DNA 片段被分離。該片段接著藉由一 DNA 接合酶反應而被插入至 Nco1 / Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。

接合混合物被用來轉形勝任 E. coli 細菌細胞。轉形混合物被取出到在含有 25 mg/l 安比西林的選擇平盤上。質體 DNA 從菌落被分離且藉由 DNA 序列分析而被特徵鑑定。正確的質體被稱為 pINT3580。

實例 2：建構編碼 His (A8), Gly (A21)-前原胰島素的質體 pINT3581

建構有如在實例 1 中所描述的藉由 3 個聚合酶鏈反應

而發生。第三個反應的產物在 Nco1 / Sal1 切割之後被插入至 Nco1 / Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 以及 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成：

pint3580_Ha8f

5' **5'-AGCAGTGCTGCCACAGCATCTGCTCCCTCTAC-3'** (序列辨識編號：6)

pint3580_Ha8rev

5'-GAG CAGATGCT **GTG** GCAGCACTG CTCCACGATG-3' (序列辨識編號：7)

10 編碼有關在 A 鏈的位置 8 之組胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。建構有如在實例 1 中所描述的被執行。用於 PCR1 與 2 的模版為質體 pINT3580 的 DNA。PCR1 是使用引子對 Tir/pint3580_Ha8rev 而被執行以及 PCR2 是使用引子對 pint3580_Ha8f/pint3580_glya21rev 而被執行。引子對 Tir/pint3580_glya21rev 在 PCR3 中被採用。在 15 在這個例子中模版是 PCR1 與 PCR2 的反應產物的一混合物。正確的質體被稱為 pINT3581。

實例 3：建構編碼 His (A8), Glu (A5), Gly (A21)-前原胰島素的質體 pINT3582

20 建構有如在實例 1 與 2 中所描述的藉由 3 個聚合酶鏈反應而發生。第三個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 以及 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成。

pint3581_Ea5f

5'GCATCGTGGAGGAGTGCTGCCACAGCATCTG 3' (序列辨識編號：8)

pint3581_Ea5rev

5'-CTGT GGCAGCACTC CTCCACGATG CCGCGACG-3' (序列辨識編號：9)

編碼有關在 A 鏈的位置 5 的麩胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。建構有如在實例 1 中所描述的被執行。模版是質體 pINT3581 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3582。

實例 4：建構編碼有關 His (A8), Asp (A18), Gly (A21)-前原胰島素的質體 pINT3583

建構是藉由透過僅有一個聚合酶鏈反應的發生而不同於實例 1。這個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 被使用。一個另外的引子被合成：

pint3580_Da18rev

5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCGAGTAGTCCTCCAGCTGGTAGAGGGAG 3' (序列辨識編號：10)

編碼有關在 A 鏈的位置 18 的天門冬醯胺酸的密碼子藉由粗體而被強調。模版是質體 pINT3581 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3583。

實例 5：建構編碼 His (A8), Glu (A5) Asp (A18), Gly (A21)-前原胰島素的質體 pINT3584

建構是藉由透過僅有一個聚合酶鏈反應的發生而不同

於實例 1。這個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1- 打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir. pint3580_Da18rev (ex. 4)被使用。模版是質體 pINT3582 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3584。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-1 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

與離胺醯胺的對應醯胺化造成化合物 YKL205-1b：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 6：建構編碼 His (A8), Glu (A15), Gly (A21)-前原胰島素的質體 pINT3585

建構是藉由透過僅有一個聚合酶鏈反應的發生而不同於實例 1。這個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 被使用。一個另外的引子被合成：

pint3580_Ea15rev

5'-CAAAGGTCGA CTATTAGCCG CAGTAGTTCTCCAGCTCGTA GAGGGAGCAG ATGCTG-3'(序列辨識編號：11)

編碼有關在 A 鏈的位置 15 的麩胺酸的密碼子藉由粗體而被強調。模版是質體 pINT3581 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3585。

實例 7：建構編碼 His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly

(A21)-前原胰島素的質體 pINT3586

建構是藉由透過僅有一個聚合酶鏈反應的發生而不同於實例 1。這個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 被使用。一個另外的引子被合成：

pint3585_Ea15_Da18rev

5'-CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTCGTAGAGGGAGCAG
ATGCTG-3'(序列辨識編號：12)

編碼有關在 A 鏈的位置 15 的麩胺酸以及在 A 鏈的位置 A18 的天門冬醯胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。模版是質體 pINT3581 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3586。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 8：建構編碼 Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21)-前原胰島素的質體 pINT3587

建構是藉由透過僅有一個聚合酶鏈反應的發生而不同

於實例 1。這個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 以及在實例 6 中所顯示的 pint3580_Eal5rev 被使用。模版是質體 pINT3582 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3587。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-2 的前驅物，其在與精胺鹽胺的鹽胺化之後產生並且形成下列結構：Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-2b 的前驅物，其在與離胺鹽胺的鹽胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 9：建構編碼有關 His (A8), Gly (A21), Asp (B3)-前原胰島素的質體 pINT3588

建構有如在實例 1 與 2 中所描述的藉由 3 個聚合酶鏈反應而發生。第三個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 以及 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成：

pint3581_Db3f

5'-GCACGATTTGTGG**ACC**AGCACCTGTGCGGC-3' (序列辨識編號：13)

pint3581_Db3rev

5'-CACAGG TGCTGGTCCA CAAATCGTGC CGAATTTTC-3' (序列辨識

編號：14)

5 編碼有關在 B 鏈的位置 3 的天門冬醯胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。建構有如在實例 1 中所描述的被執行。模版是質體 pINT3581 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3588。

實例 10：建構編碼 Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3)-前原胰島素的質體 pINT3589

10 有如在實例 9 中所描述的執行反應但是在 PCR1 與 PCR2 中使用質體 pINT3582 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3589。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-3 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

15 由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-3b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

20 實例 11：建構編碼 His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3)-前原胰島素的質體 pINT3590

有如在實例 9 中所描述的執行反應但是在 PCR1 與 PCR2 中使用質體 pINT3585 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3590。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物

YKL205-4 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

5 由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-4b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

10 實例 12：建構編碼 His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3)-前原胰島素的質體 pINT3591

有如在實例 9 中所描述的執行反應但是在 PCR1 與 PCR2 中使用質體 pINT3586 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3591。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-5 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

20 由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-5b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 13：建構編碼 His (A8), Gly (A21), Asp (B3)-Glu (B4)-

前原胰島素的質體 pINT3592

建構有如在實例 1 與 2 中所描述的藉由 3 個聚合酶鏈反應而發生。第三個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 以及 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成：

pint3581_Db3_Eb4f

5'- GCACGATTTGTGG**ACGAG**CACCTGTGCGGCTC -3' (序列辨識編號：15)

pint3581_Db3_Eb4rev

5'- CGCACAGG TGCT**CGT**CCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (序列辨識編號：16)

編碼有關在胰島素 B 鏈的位置 3 的天門冬醯胺酸以及在位置 4 的麩胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。建構有如在實例 1 中所描述的被執行。模版是質體 pINT3581 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3592。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-6 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-6b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 14：建構編碼有關 His (A8), Gly (A21), Glu (B4)-前原胰島素的質體 pINT3593

建構有如在實例 1 與 2 中所描述的藉由 3 個聚合酶鏈反應而發生。第三個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。引子 Tir 以及 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成：

pint3581_Eb4f

5'-ACGATTTGTGAACGAGCACCTGTGCGGCTC-3' (序列辨識編號：17)

pint3581_Eb4rev

5'-CGCACAGG TGCTCGTTCA CAAATCGTGC CGAATTTC-3' (序列辨識編號：18)

編碼有關在胰島素 B 鏈的位置 4 的麩胺酸的密碼子藉由粗體而被強調。建構有如在實例 1 中所描述的被執行。模版是質體 pINT3581 的 DNA。正確的質體被稱為 pINT3593。

實例 15：建構編碼 Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4)-前原胰島素的質體 pINT3594

有如在實例 9 中所描述的執行反應但是在 PCR1 與 PCR2 中使用質體 pINT3582 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3594。

原胰島素是有關 YKL205-7 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg

(B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

該原胰島素是有關化合物 YKL205-7b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 16: 建構編碼 His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4)-前原胰島素的質體 pINT3595

有如在實例 9 中所描述的執行反應但是在 PCR1 與 PCR2 中使用質體 pINT3585 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3595。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-8 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-8b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 17: 建構編碼 His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4)-前原胰島素的質體 pINT3596

有如在實例 9 中所描述的執行反應但是在 PCR1 與 PCR2 中使用質體 pINT3586 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3596。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物

YKL205-9 的前驅物，其在與精胺鹽胺的鹽胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

5 由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-9b 的前驅物，其在與離胺鹽胺的鹽胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

10 實例 18：建構編碼 His (A8), Gly (A21), Glu (B0)-前原胰島素的質體 pINT3597

建構是藉由 2 個聚合酶鏈反應而發生。引子 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成：

pint3581_Eb0f1

15 5'- CAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAG**TTTGTG AACCAGCACC TGTG-3' (序列辨識編號：19)

pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAG**-3'(序列辨識編號：20)

20 在這個例子中兩個引子有部分重疊。Pint3581_Eb0f2 含有一個 NcoI 辨識序列。這被畫上底線。編碼有關在 B 鏈起始處的位置 0 的麩胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。用於 PCR1 的模版是質體 pINT3581 的 DNA。

PCR1 是 使 用 引 子 對 pint3581_Eb-1f2

/pint3580_glya21rev 而被執行。用於 PCR2 的模版是來自於 PCR1 的產物。PCR2 是使用引子對 pint3581_Eb-1f2 /pint3580_glya21rev 而被執行。來自於 PCR2 的產物涵蓋完整的前原胰島素序列。第二個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。正確的質體被稱為 pINT3597。有關於藉由天門冬醯胺酸的密碼子以及下列的實例來置換有關在位置 B0 的麩胺酸造成在位置 B0 具有天門冬醯胺酸取代麩胺酸的質體。

實例 19：建構編碼 Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0)-前原胰島素的質體 pINT3598

有如在實例 18 中所描述的執行反應但是在 PCR1 中使用質體 pINT3582 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3598。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-10 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-10b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 20：建構編碼 His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0)-前原胰島素的質體 pINT3599

有如在實例 18 中所描述的執行反應但是在 PCR1 中使用質體 pINT3585 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3599。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-11 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-11b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 21: 建構編碼 His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0)-前原胰島素的質體 pINT3600

有如在實例 18 中所描述的執行反應但是在 PCR1 中使用質體 pINT3586 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3600。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-12 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-12b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 22：建構編碼 His (A8), Gly (A21), Asp (B1)-前原胰島素的質體 pINT3601

5 建構是藉由 2 個聚合酶鏈反應而發生。引子 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成：

pint3581_Db1f1

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG AGACGTG AACCAGCACC TGTGCG-3'

(序列辨識編號：21)

10 pint3581_Db1f2

5'-TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAC-3'

(序列辨識編號：22)

在這個例子中兩個引子有部分重疊。Pint3581_Db-1f2 含有一個 NcoI 辨識序列。這被畫上底線。編碼有關在 B 鏈的位置 1 的天門冬醯胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。用於 PCR1 的模版是質體 pINT3581 的 DNA。PCR1 是使用引子對 pint3581_Db1f1/pint3580_glya21rev 而被執行。用於 PCR2 的模版是來自於 PCR1 的產物。PCR2 是使用引子對 pint3581_Db1f2/pint3580_glya21rev 而被執行。來自於 PCR2 的產物涵蓋完整的前原胰島素序列。第二個反應的產物在 NcoI/SalI 切割之後被插入至 NcoI/SalI-打開的 pINT91d 載體 DNA。正確的質體被稱為 pINT3601。

實例 23：建構編碼 Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1)-前原胰島素的質體 pINT3602

有如在實例 22 中所描述的藉由在 PCR1 中使用質體 pINT3582 的 DNA 作為模版來執行反應而造成質體 pINT3602。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-13 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-13b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 24: 建構編碼 His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1)-前原胰島素的質體 pINT3603

有如在實例 22 中所描述的藉由在 PCR1 中使用質體 pINT3585 的 DNA 作為模版執行反應而造成質體 pINT3603。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-14 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-14b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 25：建構編碼 His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1)-前原胰島素的質體 pINT3604

5 有如在實例 22 中所描述的執行反應但是在 PCR1 中使用質體 pINT3586 的 DNA 作為模版而造成質體 pINT3604。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-15 的前驅物，其在與精胺鹽胺的鹽胺化之後產生並且形成下列結構：

10 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-15b 的前驅物，其在與離胺鹽胺的鹽胺化之後產生並且形成下列結構：

15 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 26：建構編碼 His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1)-前原胰島素的質體 pINT3605

20 建構是藉由 2 個聚合酶鏈反應而發生。引子 pint3580_glya21rev 以及被描述在實例 18 中的引子 pint_Eb01f2 被使用。引子 pint3597_Db1f 被合成：

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGGACGTG AACCAGCACC
TGTGC-3'(序列辨識編號：23)

編碼有關在 B 鏈的位置 0 的天門冬鹽胺酸以及在編碼

有關各個例子中 B 鏈起始處的天門冬醯胺酸的密碼子藉由在各個例子中的粗體而被強調。用於 PCR1 的模版是質體 pINT3597 的 DNA。PCR1 是使用引子對 pint3597_Db1f /pint3580_glya21rev 而被執行。用於 PCR2 的模版是來自於 PCR1 的產物。PCR2 是使用引子對 pint3581_Eb1f2 /pint3580_glya21rev 而被執行。來自於 PCR2 的產物涵蓋完整的前原胰島素序列。第二個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-打開的 pINT91d 載體 DNA。正確的質體被稱為 pINT3605。由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-16 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物 YKL205-16a 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-人類胰島素

實例 27：建構編碼 His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), desThr (B30)-前原胰島素的質體 pINT3606

建構有如在實例 1 與 2 中所描述的藉由 3 個聚合酶鏈反應而發生。引子 Tir 以及 pint3580_glya21rev 被使用。兩個另外的引子被合成：

desB30f

5'-TTCTACACACCCAAGCGCGATGTTTCCTCAGGTGG-3' (序列
辨識編號：24)

desB30rev

5'-AGG AACATCGCGC TTGGGTGTGT AGAAGAAGC-3' (序列辨識
編號：25)

用於 PCR1 與 PCR2 的模版是質體 pINT3586 的 DNA。
PCR 使用引子對 desB30f/pint3580_glya21rev 而被執行並且
PCR2 使用引子對 Tir/desB30rev 模版而被執行。被用於
PCR3 的模版是相同莫耳的來自於 PCR1 與 PCR2 之產物的
混合物。反應是使用引子對 Tir/pint3580_glya21rev 而被執
行。來自於 PCR3 的產物涵蓋完整的前原胰島素序列。第
三個反應的產物在 Nco1/Sal1 切割之後被插入至 Nco1/Sal1-
打開的 pINT91d 載體 DNA。由該質體所編碼的前原胰島素
是有關化合物 YKL205-17 的前驅物，其在與精胺醯胺的醯
胺化之後產生並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg
(B30), Arg (B31)-NH₂-人類胰島素

由該質體所編碼的前原胰島素是有關化合物
YKL205-17b 的前驅物，其在與離胺醯胺的醯胺化之後產生
並且形成下列結構：

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg
(B30), Lys (B31)-NH₂-人類胰島素

實例 28：原胰島素衍生物的表現

表現是依據歐洲專利申請案 EP-A 1 222 207 的實例 1

而被執行。

實例 29：原胰島素衍生物的摺疊

摺疊原則是藉由在 EP-A 0 668 282 中所描述的方法而發生。

5 實例 30：經摺疊的前原胰島素的酵素加工處理以給予 2-鏈 Arg (A0)-胰島素前驅物，其 C 端 B 鏈末端的特徵在於離胺酸或精胺酸

10 經摺疊的前原胰島素的酵素加工處理有如例如在 WO91/03550 的實例 4 中所描述的發生。在這個例子中採用在 WO 2007/031187 A1 中所描述的胰蛋白酶變異體被證實是特別有利的。

實例 31：製備 Arg (A0), His (A8). Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-人類胰島素

15 不問額外的酸性胺基酸的定位，一個標準反應如下被執行：100 mg 的 Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31)-胰島素類似物被溶解於 0.95 ml 的精胺鹽胺溶液(446 g/L)中，並且 0.13 mL 的 M Na 醋酸緩衝液(pH 5.8)與 2 ml 的 DMF 被添加。反應混合物被冷卻至 12°C 並且藉由添加 0.094 ml 的胰蛋白酶(0.075 mg, Roche Diagnostics)而被開始。反應在 8
20 小時後藉由添加 TFA 達至 pH 2.5 而被停止並且藉由 HPLC 而被分析。有>60% Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31). Arg (B32)-NH₂-人類胰島素的形成。胰蛋白酶抑制劑溶液的添加繼而是類似於 US 5,656,722 的經鹽胺化之類似物的純化。

對應的離胺醯胺化合物的製備類似地發生。然而，在溶液中含有 366 g/L 離胺醯胺的一水性離胺醯胺原液形成起始材料。

實例 32：經醯胺化的胰島素衍生物的調配物

爲了要試驗本發明之胰島素衍生物有關它們的生物藥理學以及物理化學特性，化合物的一溶液如下被製備：本發明的胰島素衍生物被溶解於一具有 80 $\mu\text{g/mL}$ 鋅的 1 mM 鹽酸(有如氯化鋅)中而具有一為 $240\pm 5 \mu\text{M}$ 的目標濃度。

下列化合物被用作為溶解介質：

- a) 1 mM 鹽酸
- b) 1 mM 鹽酸，5 $\mu\text{g/mL}$ 鋅(有如氯化鋅或鹽酸而被添加)
- c) 1 mM 鹽酸，10 $\mu\text{g/mL}$ 鋅(有如氯化鋅或鹽酸而被添加)
- d) 1 mM 鹽酸，15 $\mu\text{g/mL}$ 鋅(有如氯化鋅或鹽酸而被添加)
- e) 1 mM 鹽酸，30 $\mu\text{g/mL}$ 鋅(有如氯化鋅或鹽酸而被添加)
- f) 1 mM 鹽酸，80 $\mu\text{g/mL}$ 鋅(有如氯化鋅或鹽酸而被添加)
- g) 1 mM 鹽酸，120 $\mu\text{g/mL}$ 鋅(有如氯化鋅或鹽酸而被添加)

爲了這個目的，起初一數量的冷凍乾燥材料(其比所需要的高出大約 30%)依據分子量以及所欲的濃度而被秤出。目前的濃度接著藉由分析 HPLC 而被決定並且該溶液隨後被作成要達到具有 5 mM 鹽酸(具有 80 $\mu\text{g/mL}$ 鋅)之目

標濃度所需的體積。若需要的話，pH 被再調整至 3.5 ± 0.1 。在藉由 HPLC 的最後分析以確認目標濃度為 $240 \pm 5 \mu\text{M}$ 之後，完成的溶液藉由一具有 $0.2 \mu\text{m}$ 過濾器接頭的注射器而被轉移至一無菌管(其被一個隔片以及一捲曲蓋所封閉)中。對於本發明之胰島素衍生物的短期單一試驗而言，沒有調配物的最佳化(例如，關於等張劑、防腐劑或緩衝物質的添加)被執行。

實例 33：評估新穎胰島素類似物在大鼠中的血糖-降低效果

所選定的新穎胰島素類似物的血糖-降低效果在健康的雄性血糖濃度正常韋斯大鼠(healthy male normoglycemic Wistar rats)中被試驗。雄性大鼠接受一劑量為 9 nmol/kg 的一胰島素類似物的皮下注射。血液樣品在胰島素類似物的注射之前立即地並且按規律間隔直到注射之後的 8 小時從動物被取出，並且其中的血糖含量被決定。實驗明確地顯示(參照第 1 圖)，所採用之本發明的胰島素類似物致使一作用的清楚延遲開始以及一較長的，一致的作用期間。

實例 34：評估新穎胰島素類似物在狗中的血糖-降低效果

所選定的新穎胰島素類似物的血糖-降低效果在健康的雄性血糖濃度正常米格魯犬中被試驗。雄性動物接受一劑量為 6 nmol/kg 的一胰島素類似物的皮下注射。血液樣品在胰島素類似物的注射之前立即地並且按規律間隔直到注射之後的 48 小時從動物被取出，並且其中的血糖含量被決定。實驗明確地顯示(參照第 2 圖)，所採用之本發明的胰島素類似物致使一作用的清楚延遲開始以及一較長的，一致

的作用期間。

實例 35：評估在狗中使用一劑量被增加至 2 倍的血糖降低效用

所選定的新穎胰島素類似物的血糖-降低效果在健康的雄性血糖濃度正常米格魯犬中被試驗。雄性動物接受一劑量為 6 nmol/kg 與 12 nmol/kg 的一胰島素類似物的皮下注射。血液樣品在胰島素類似物的注射之前立即地並且按規律間隔直到注射之後的 48 小時從動物被取出，並且其中的血糖含量被決定。實驗明確地顯示(參照第 3 圖)，所採用之本發明的胰島素類似物具有一劑量-依賴性效果，但是儘管劑量被增加 2 倍，作用型態具有一淺的型態，亦即沒有顯著的低點(最低點(nadir))被觀察到。從這點可以推論，藉由與已知的慢胰島素的比較，本發明的胰島素會造成明顯較少的低血糖事件

實例 36：評估在狗中使用調配物中的不同鋅濃度的血糖-降低效用

實驗有如在實例 35 中所描述的被執行。第 4 圖顯示結果。依據這點，在相同的胰島素濃度的情況下，本發明之胰島素類似物的時間-效果曲線可以透過在調配物中的鋅離子含量以在一個 0 或低鋅含量的情況下作用的一個快速開始被觀察到這樣一個方式而受到影響，並且效果被維持達 24 小時，而在一較高的鋅含量的情況下，作用的一個逐漸開始被觀察到，並且胰島素效果被維持達明顯地高於 24 小時。

【圖式簡單說明】

第 1 圖：新穎的胰島素類似物在大鼠中的血糖-降低效果。

第 2 圖：新穎的胰島素類似物在狗中的血糖-降低效果。

5 第 3 圖：YKL205 在狗中的血糖-降低效果。

第 4 圖：YKL205 在狗中的低血糖效果的鋅依賴性。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 賽諾菲阿凡提斯德意志有限公司
 <120> 具有極度延遲時間/作用型態之新穎胰島素衍生物(一)
 <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> 人工的
 <220>
 <223> A-鏈
 <220>
 <221> 混合_特徵
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 對應於 Lys 或 Arg
 <220>
 <221> 混合_特徵
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 對應於 Asp、Gln 或 Glu
 <220>
 <221> 混合_特徵
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa 對應於 Asp、Glu 或 Gln
 <220>
 <221> 混合_特徵
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa 對應於 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> 人工的
 <220>
 <223> B-鏈
 <220>
 <221> 混合_特徵
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 對應於 Asp、Glu 或一胺基基團
 <220>
 <221> 混合_特徵
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa 對應於 Asp、Glu 或一化學鍵
 <220>

<221> 混合_特徵
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 對應於 Asp、Glu 或 Phe

<220>
<221> 混合_特徵
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 對應於 Asp、Glu 或 Val

<220>
<221> 混合_特徵
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 對應於 Asp、Glu 或 Asn

<220>
<221> 混合_特徵
<222> (6)..(6)
<223> Xaa 對應於 Asp、Glu 或 Gln

<220>
<221> 混合_特徵
<222> (31)..(31)
<223> Xaa 對應於 Lys 或一化學鍵

<220>
<221> 混合_特徵
<222> (32)..(32)
<223> Xaa 對應於 Thr 或一化學鍵

<220>
<221> 混合_特徵
<222> (33)..(33)
<223> Xaa 對應於 Arg、Lys 或一化學鍵

<220>
<221> 混合_特徵
<222> (34)..(34)
<223> Xaa 對應於 Arg-醯胺、Lys-醯胺或一胺基基團

<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> 人工的

<220>
<223> pint3580_glya21rev

<400> 3
caaaggTCga cTattagccg cagtagttct ccagctgg 38

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> arg_cjuncf

<400> 4
gtccctgcag cgtcgcggca tcgtggagca g 31

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> arg_cjunc_rev

<400> 5
ccacgatgcc gcgacgctgc agggacccct ccagcg 36

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3580_Ha8f

<400> 6
agcagtgctg ccacagcatc tgctccctct ac 32

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3580_Ha8rev

<400> 7
gagcagatgc tgtggcagca ctgctccacg atg 33

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3581_Ea5f

<400> 8
gcatcgtgga ggagtgcctgc cacagcatct g 31

<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3581_Ea5rev

<400> 9
ctgtggcagc actcctccac gatgccgca cg 32

<210> 10
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3580_Da18rev

<400> 10
caaaggtcga ctattagccg cagtagtcct ccagctggta gagggag 47

<210> 11

<211> 56
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3580_Eal5rev

<400> 11
caaaggtcga ctattagccg cagtagttct ccagctcgta gagggagcag atgctg 56

<210> 12
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3585_Eal5_Dal8rev

<400> 12
caaaggtcga ctattagccg cagtagtcct ccagctcgta gagggagcag atgctg 56

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3581_Db3f

<400> 13
gcacgatttg tggaccagca cctgtgcggc 30

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3581_Db3rev

<400> 14
cacagggtgct ggtccacaaa tcgtgccgaa ttic 34

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3581_Db3_Eb4f

<400> 15
gcacgatttg tggacgagca cctgtgcggc tc 32

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pint3581_Db3_Eb4rev

<400> 16
cgcacagggtg ctctgccaca aatcgtgccg aatttc 36

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
 <223> pint3581_Eb4f
 <400> 17
 acgatttgtg aacgagcacc tgtgcggctc 30

<210> 18
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pint3581_Eb4rev
 <400> 18
 cgcacagggtg ctcgttcaca aatcgtgccg aatttc 36

<210> 19
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pint3581_Eb0f1
 <400> 19
 caacaggaaa ttccggcacga gagtttgtga accagcacct gtg 43

<210> 20
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pint3581_Eb0lf2
 <400> 20
 tatcgacat ggcaacaaca tcaacaggaa attcggcacg agag 44

<210> 21
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pint3581_Db1f1
 <400> 21
 caacaggaaa ttccggcacga gacgtgaacc agcacctgtg cg 42

<210> 22
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pint3581_Db1f2
 <400> 22
 tatcgacat ggcaacaaca tcaacaggaa attcggcacg agac 44

<210> 23
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pint3597_Db1f

<400> 23
caacaggaaa ttcggcacga gaggacgtga accagcacct gtgc 44

<210> 24
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工的 |

<220>
<223> desB30f

<400> 24
ttctacacac ccaagcgaga ttttcctcag gtgg 34

<210> 25
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工的 |

<220>
<223> desB30rev

<400> 25
aggaacatcg cgcttgggtg tgiagaagaa gc 32

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98/00281

A61K38/28 (2006.01)

※申請日：98.1.7

※IPC 分類：

C07K14/62 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

具有極度延遲時間/作用型態之新穎胰島素衍生物(一)
NOVEL INSULIN DERIVATIVES WITH EXTREMELY
DELAYED TIME/ACTION PROFILE

二、中文發明摘要：

本發明是有關於具有基礎時間/作用型態的新穎胰島素類似物，其特徵在於下列特性：

- B 鏈末端由一醯胺化鹼性胺基酸殘基(諸如離胺酸或精胺醯胺)所構成，
- 此外胰島素 A 鏈的 N-端胺基酸殘基是一離胺酸或精胺酸殘基，
- A8 胺基酸位置是被一組胺酸殘基所佔據，
- A21 胺基酸位置是被一甘胺酸殘基所佔據，以及
- 造成在位置 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3 以及 B4 上一或多個帶負電的胺基酸殘基的置換和/或添加。

三、英文發明摘要：

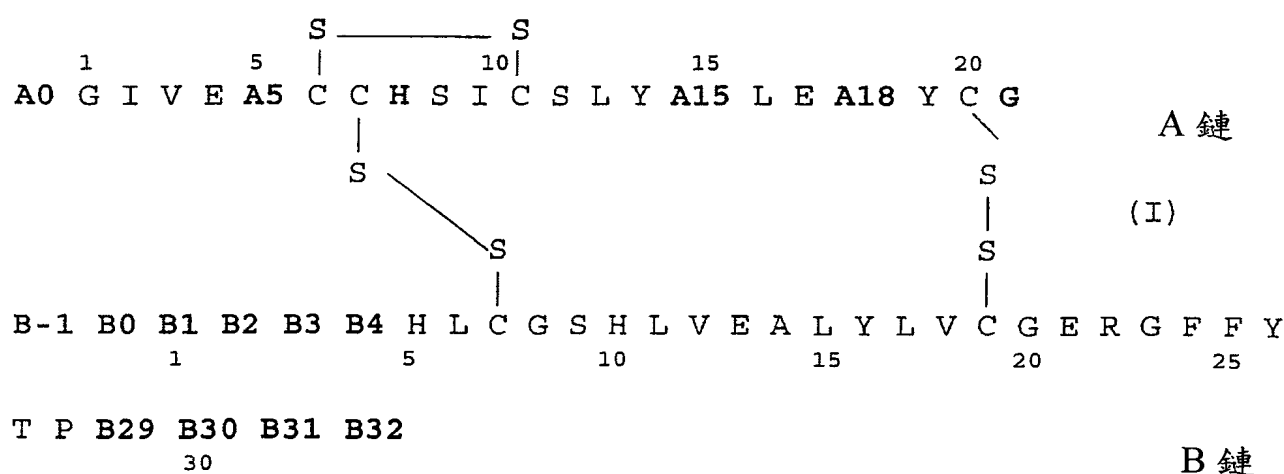
The invention relates to novel insulin analogues with basal time/action profile which are characterized by the features that

- the B chain end consists of an amidated basic amino acid residue such as lysine or argininamide,

- additionally the N-terminal amino acid residue of the insulin A chain is a lysine or arginine residue,
 - amino acid position A8 is occupied by a histidine residue,
 - amino acid position A21 is occupied by a glycine residue,
- and
- one or more substitutions and/or additions of negatively charged amino acid residues in positions A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 and B4 is effected.

七、申請專利範圍：

1. 一種具有式 I 的胰島素類似物：



其中

A0 對應於 Lys 或 Arg ;

A5 對應於 Asp、Gln 或 Glu；

A15 對應於 Asp、Glu 或 Gln；

A18 對應於 Asp、Glu 或 Asn；

B-1 對應於 Asp、Glu 或一胺基基團；

B0 對應於 Asp、Glu 或一化學鍵；

B1 對應於 Asp、Glu 或 Phe；

B2 對應於 Asp、Glu 或 Val；

B3 對應於 Asp、Glu 或 Asn；

B4 對應於 Asp、Glu 或 Gln；

B29 對應於 Lys 或一化學鍵；

B30 對應於 Thr 或一化學鍵；

B31 對應於 Arg、Lys 或一化學鍵；

B32 對應於 Arg-醯胺、Lys-醯胺或一胺基基團，

其中包含有 A5、A15、A18、B-1、B0、B1、B2、B3

以及 B4 之群組中的兩個胺基酸殘基同時地或彼此獨立地對應於 Asp 或 Glu。

2. 如申請專利範圍第 1 項的胰島素類似物，其中 A0 對應於 Arg。

5 3. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 A5 對應於 Glu。

4. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 A15 對應於 Glu。

10 5. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 A18 對應於 Asp。

6. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 B-1 對應於一胺基基團。

7. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 B0 對應於 Glu。

15 8. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 B1 對應於 Asp。

9. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 B2 對應於 Val。

20 10. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 B3 對應於 Asp。

11. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 B4 對應於 Glu。

12. 如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中 B29 對應於 Lys。

13.如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中
B30 對應於 Thr。

14.如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中
B31 對應於 Arg 或 Lys。

5 15.如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其中
B32 對應於 Arg-NH₂ 或 Lys-NH₂。

16.如前述申請專利範圍中之一或多項的胰島素類似物，其是
一選自於包含有下列的群組：

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21),
10 Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21),
20 Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg
(B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg
(B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

10 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg
(B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg
(B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg
(B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg
(B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

20 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4),
Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4),
Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

5 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

10 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

20 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ 人類胰島素，

5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31)-NH₂ 人類胰島素，

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31)-NH₂ 人類胰島素。

10 17. 一種用以製備如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的方法。

18. 如申請專利範圍第 17 項的方法，其中該胰島素類似物的一前驅物被重組地製備，該前驅物被酵素地加工處理成雙-鏈胰島素，以及與精胺醯胺的偶合在一具有胰蛋白酶活性之酵素的存在的下被執行，並且該胰島素類似物被分離。

15 19. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物供製造一用以治療糖尿病的藥劑的用途。

20. 如申請專利範圍第 19 項之用途，其用於製造一供治療第 I 型或第 II 型糖尿病或供治療地輔助貝他細胞再生的藥劑之方法中。

20 21. 一種包含如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的藥品。

22. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的調配物，其中該調配物是呈包含被溶解的胰島素類似物的水性形式。

23. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的調配物，其中該調配物是呈粉末的形式。
24. 如申請專利範圍第 23 項的調配物，其中如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物是呈結晶和/或無定形形式存在。
25. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的調配物，其中該調配物是呈懸浮液的形式。
26. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的調配物，其中該調配物額外地包含有一化學伴隨蛋白(chaperone)。
27. 一種編碼如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的前驅物的 DNA。
28. 一種編碼如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的 A 鏈的 DNA。
29. 一種編碼如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似物的 B 鏈的 DNA。
30. 一種前原胰島素類似物，其中 C 肽在它的 N 端帶有胺基酸殘基精胺酸並且在它的 C 端帶有兩個精胺酸殘基或一個精胺酸殘基與一個離胺酸殘基，並且在後者中該離胺酸殘基形成實際的 C 端。
31. 如申請專利範圍第 22 至 26 項中之一或多項的調配物，其額外地包含一類升糖素肽-1(GLP-1)或其類似物或衍生物，或艾塞那肽-3(exendin-3)或-4 或其類似物或衍生物。
32. 如申請專利範圍第 31 項的調配物，其額外地包含艾塞那

肽-4。

33. 如申請專利範圍第 31 項的調配物，其中艾塞那肽-4 的類似物是選自於一包含有下列的群組：

H-desPro³⁶-艾塞那肽-4-Lys₆-NH₂，

H-des(Pro^{36,37})-艾塞那肽-4-Lys₄-NH₂ 以及

H-des(Pro^{36,37})-艾塞那肽-4-Lys₅-NH₂，

或其一藥理學上可耐受的鹽類。

34. 如申請專利範圍第 31 項的調配物，其中艾塞那肽-4 的類似物是選自於一包含下列的群組：

desPro³⁶[Asp²⁸]艾塞那肽-4 (1-39)，

desPro³⁶[IsoAsp²⁸]艾塞那肽-4 (1-39)，

desPro³⁶[Met(O)¹⁴, Asp²⁸]艾塞那肽-4 (1-39)，

desPro³⁶[Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]艾塞那肽-4 (1-39)，

desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]艾塞那肽-2 (1-39)，

desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]艾塞那肽-2 (1-39)，

desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]艾塞那肽-4 (1-39) 以及

desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]艾塞那肽-4 (1-39)，

或其藥理學上可耐受的鹽類。

35. 如申請專利範圍第 34 項的調配物，其中該肽-Lys₆-NH₂ 被接附至艾塞那肽-4 的類似物的 C 端。

36. 如申請專利範圍第 31 項的調配物，其中艾塞那肽-4 的一類似物是選自於一包含下列的群組：

H-(Lys)₆-des Pro³⁶[Asp²⁸]艾塞那肽-4(1-39)-Lys₆-NH₂

des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro₃₈ 艾塞那肽-4(1-39)-NH₂，

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

5 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

10 H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

15 H-des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

20 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞

那肽-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞
那肽-4(1-39)-NH₂ ,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞
那肽-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-Lys₆-NH₂ ,

des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵] 艾塞那肽
-4(1-39)-NH₂ ,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]
艾塞那肽-4(1-39)-NH₂ ,

H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] 艾塞
那肽-4(1-39)-NH₂ ,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] 艾塞那肽
-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]
艾塞那肽 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

5 H-Asn-(Glu)₅-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵,
Asp²⁸] 艾塞那肽 -4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

或其藥理學上可耐受的鹽類。

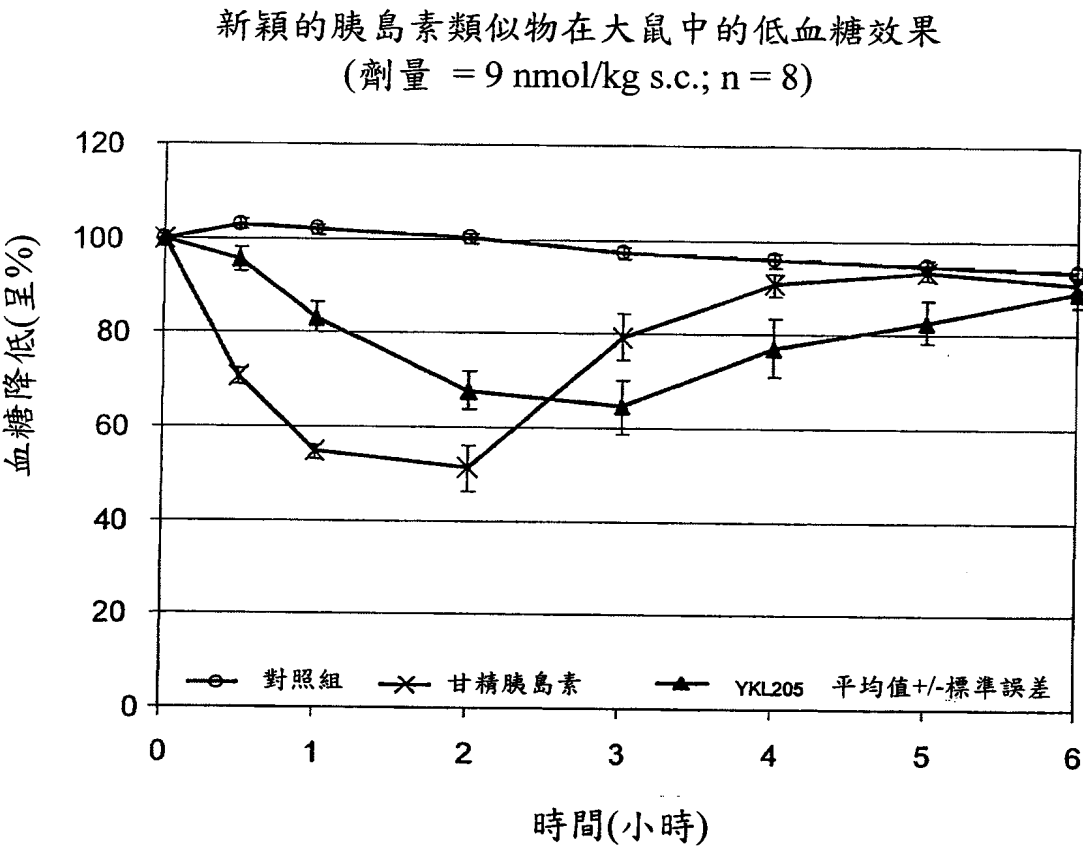
37. 如申請專利範圍第 31 項的調配物，其額外地包含 Arg³⁴,
Lys²⁶ (N^ε(γ-麩胺醯基(N^α-十六醯基))) GLP-1 (7-37)[利拉魯
10 肽(liraglutide)]或其藥理學上可耐受的鹽類。

38. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似
物的水性調配物，其不包含鋅或包含少於 15 μg/ml 的鋅。

39. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之胰島素類似
物的水性調配物，其不包含鋅或包含少於 15 μg/ml 至 2
15 mg/ml 的鋅。

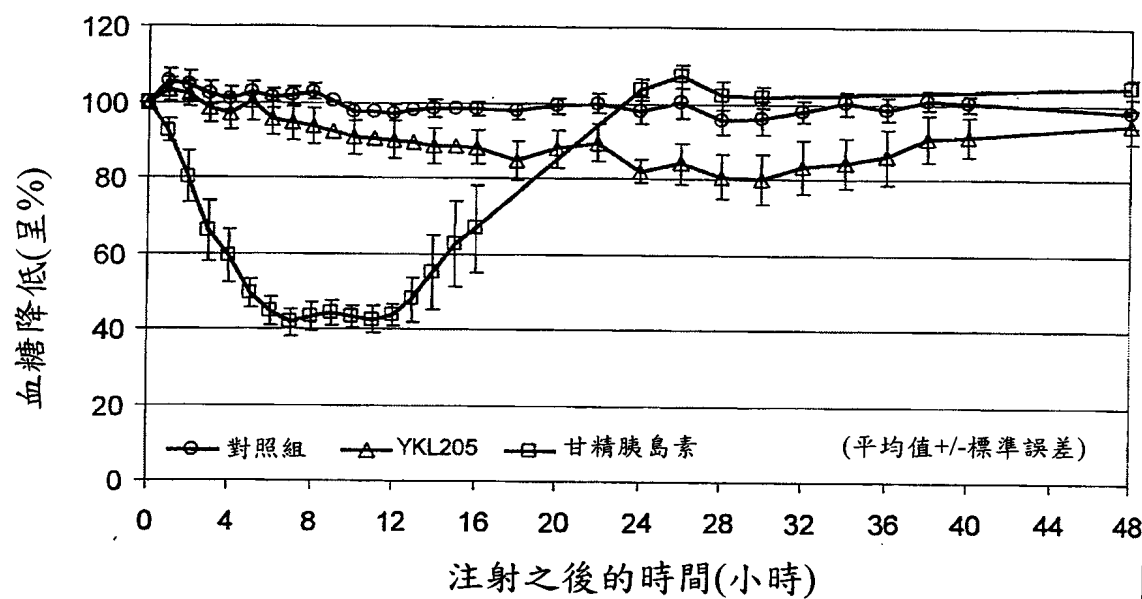
40. 如申請專利範圍第 39 項的調配物，其中鋅含量為 200
μg/ml。

八、圖式：

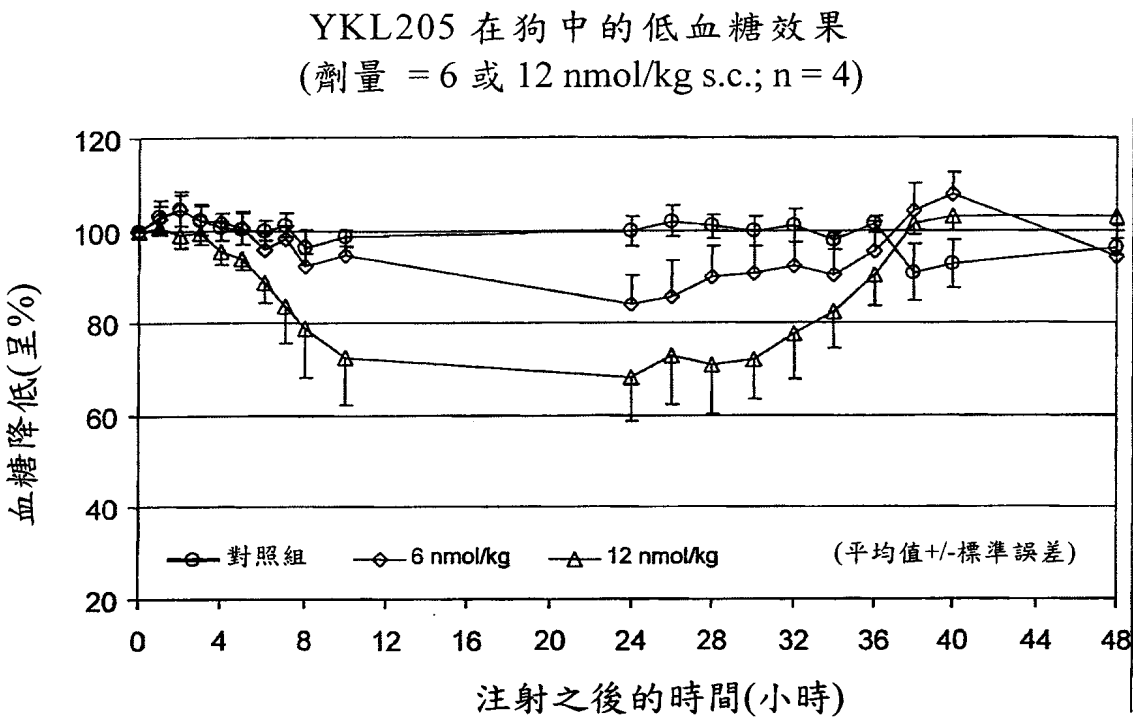


第 1 圖

新穎的胰島素類似物在狗中的低血糖效果
(劑量 = 6 nmol/kg s.c.; n = 6)

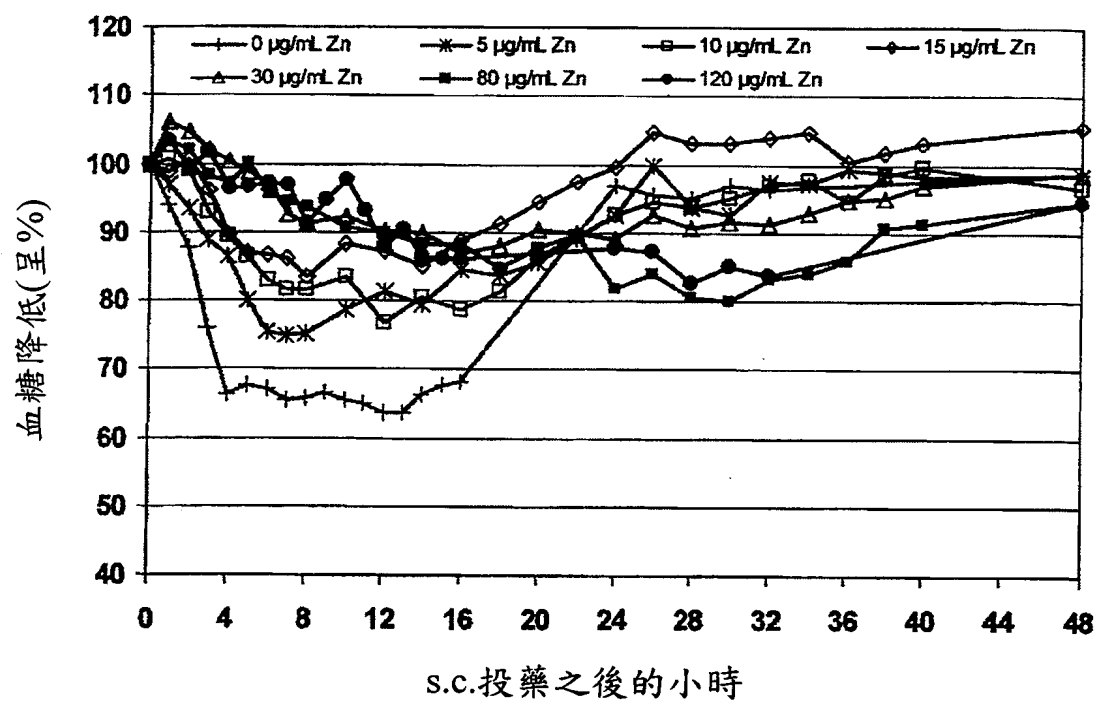


第 2 圖



第 3 圖

YKL205 在狗中的低血糖效果的鋅依賴性
(劑量 = 6 nmol/kg s.c.; n = 5-6)



第 4 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無