



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101970477 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 200980109927. 6

(22) 申请日 2009. 03. 13

(30) 优先权数据

08102598. 3 2008. 03. 14 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 09. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/053019 2009. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/112583 EN 2009. 09. 17

(73) 专利权人 诺沃 - 诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 P · K · 尼尔森 F · 胡巴莱克

I · 劳特鲁普 - 拉森 P · 巴尔施密特

S · 路德维格森 T · B · 谢尔德森

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公司 72001

代理人 赵向辉 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 14/62 (2006. 01)

A61K 38/28 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2008015099 A2, 2008. 02. 07, 说明书全文.

W0 2008132229 A2, 2008. 11. 06, 说明书全文.

W0 2008145730 A1, 2008. 12. 04, 说明书全

文.

W0 2009010428 A1, 2009. 01. 22, 说明书全文.

文.

W0 2007096431 A1, 2007. 08. 30, 说明书全文.

文.

W0 2007096332 A1, 2007. 08. 03, 说明书全

文.

W0 9629344 A1, 1996. 09. 26, 说明书全文.

W0 20030104981 A1, 2003. 06. 05, 说明书全

文.

Paul J. SEABRIGHT 等. The

characterization of endosomal insulin

degradation intermediates and their

sequence of production. 《Biochem. J. 》. 1996, 第 320 卷 (第 3 期), 947-956.

Frankie B. Stentz 等. Identification of Insulin Intermediates and Sites of Cleavage of Native Insulin by Insulin Protease from Human Fibroblasts. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 1989, 第 264 卷 (第 34 期), 20275-20282.

ying-chi Chu 等. The A14 Position of Insulin Tolerates Considerable Structural Alterations with Modest Effects on the Biological Behavior of the Hormone. 《Journal of protein chemistry》. 1992, 第 11 卷 (第 5 期), 571-577.

审查员 张林

权利要求书1页 说明书45页
序列表11页

(54) 发明名称

蛋白酶稳定的胰岛素类似物

(57) 摘要

本发明涉及新型胰岛素类似物, 其包含胰岛素 A 链中位点 A14 和 B 链中位点 B27、B28、B29 和 B30 处的 (多个) 突变并且对于蛋白酶表现出抗性, 还涉及制备这样的胰岛素类似物的方法、包含本发明的胰岛素类似物的胰岛素制备物、以及使用这样的胰岛素类似物治疗糖尿病的方法。

1. 一种胰岛素类似物,其中

胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,其中一个突变位于位点 A14,其被氨基酸 Glu 替代;

胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变,其中 B 链上的所述两个或更多个突变为位点 B30 的氨基酸删除和位点 B25 的氨基酸被替代为 His 的组合的形式,和其中所述胰岛素类似物选自:

A14E, A15E, B25H, desB30 人类胰岛素;

A14E, B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素;

A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素;

A8H, A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素;

A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素;

A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素;和

A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素。

2. 药物组合物,其包含生物活性量的根据权利要求 1 的胰岛素类似物和药学上可接受的载体。

3. 根据权利要求 1 的胰岛素类似物在制备用于治疗或预防下述病症的药物中的用途,所述病症指高血糖症包括应激性高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良、1 型糖尿病、和烧伤、手术创伤和其它的在治疗中需要合成代谢效应的疾病或损伤、心肌梗塞、中风、冠心病和其它心血管失调。

4. 根据权利要求 1 的胰岛素类似物在制备用于延缓或阻止 2 型糖尿病的疾病进展的药物中的用途。

5. 编码根据权利要求 1 的胰岛素类似物的核酸序列。

6. 编码根据权利要求 1 的胰岛素类似物的前体的核酸序列。

蛋白酶稳定的胰岛素类似物

技术领域

[0001] 本发明涉及显示出蛋白酶抗性的新型胰岛素类似物、制备这样的胰岛素类似物的方法、含有本发明的胰岛素类似物的胰岛素制备物和使用这些胰岛素类似物治疗糖尿病的方法。

背景技术

[0002] 糖尿病是一种代谢失调,其中部分或完全丧失利用葡萄糖的能力。所有人口中大约有 5%患有糖尿病,该失调达到了流行病的比例。

[0003] 人类胰岛素由两条多肽链组成:分别含有 21 和 30 个氨基酸残基的 A 和 B 链。A 和 B 链通过两个二硫桥连接在一起。来自多数其它物种的胰岛素是相似的,但是可能在一些位点含有氨基酸替换。在糖尿病的治疗中,提出并使用了很多胰岛素制剂,例如常规胰岛素、低精蛋白锌胰岛素(称为 NPH)、胰岛素锌悬浮液(例如 Semilente[®]、Lente[®]和 Ultralente[®])和双时相低精蛋白锌胰岛素。也已经开发了人类胰岛素类似物。它们被设计为特定的作用模式,即速效或缓效。包含这样的胰岛素类似物的商售产品包括 Levemir[®]、NovoRapid[®]、Humalog[®]、Apidra[®]和 Lantus[®]。

[0004] 通常,胰岛素制剂是通过皮下注射给予的。

[0005] 但是,由于患者依从、安全和方便性的原因,通过口服途径给药将是有利的。

[0006] 蛋白药物例如胰岛素的口服给药经常引起极低的生物利用度,这是由于以下几种障碍,例如胃肠道(GI)中酶的降解、药物流出泵、从肠粘膜吸收不足和易变、以及肝脏中的首过代谢。人类胰岛素被发现于胃(胃蛋白酶和胃亚蛋白酶)、肠腔(糜蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、羧基肽酶等)以及胃肠道粘膜表面(氨基肽酶、羧基肽酶、肠肽酶、二肽基肽酶、内肽酶等)的各种消化酶降解。设计为口服递送的蛋白/肽的最近的制剂包括与蛋白酶抑制剂、渗透增强剂、基于聚合物的递送系统和胰岛素偶联物的联合制剂。后者包括己基-胰岛素-单一偶联物(HIM2)(Nobex Cooperation 和 GSK),其为具有结合至 B29 的 PEG 7-己基基团的人类胰岛素类似物。在例如 US 7,030,082、US 6,867,183 和 US 6,770,625 中报道了口服 HIM2 与胰岛素相比具有增强的蛋白水解稳定性和生物利用度。

[0007] 蛋白酶抗性胰岛素类似物与口服蛋白递送系统的组合代表口服胰岛素给药的理想策略。此外,不需要在递送系统中引入酶抑制剂。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及具有增强的蛋白水解稳定性并保持胰岛素生物活性的胰岛素类似物。

[0010] 在一个实施方式中提供了胰岛素类似物,其中

[0011] 胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,其中一个突变位于位点 A14,其被替代为选自 Lys、Glu、Arg、Asp、Pro、Gln 和 His 的氨基酸;和

[0012] 胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变,其中两个或更多个突变是位点 B27、B28、B29 和 B30 的氨基酸删除的形式,或位点 B30 的氨基酸删除与氨基酸替代的组合,所述氨基酸替代选自下列位点的氨基酸替代:B24 被替代为 Gly 或 His, B25 被

替代为 His, B26 被替代为 Gly、Glu 或 Lys, B27 被替代为 Gly、Glu 或 Lys, 和 B28 被替代为 Asp、His、Gly、Lys 或 Glu ;

[0013] 其选自 :

[0014] A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0015] A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0016] A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素

[0017] A8H, A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素

[0018] A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0019] A8H, A14H, A22K, B 16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0020] A8H, A14H, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素

[0021] A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0022] A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0023] A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0024] A14E, B24G, desB30 人类胰岛素

[0025] A14E, B28E, desB29, desB30 人类胰岛素

[0026] A14E, B28E, desB30 人类胰岛素

[0027] A14E, B28H, desB30 人类胰岛素

[0028] A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0029] A14E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0030] A14P, B25H, desB30 人类胰岛素

[0031] A21G, desB27, desB30 人类胰岛素

[0032] B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0033] A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素,

[0034] A14E, A15E, B25H, desB30 人类胰岛素

[0035] A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素

[0036] A14E, A21G, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素

[0037] A14E, A21G, B25H, desB30 人类胰岛素

[0038] A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0039] A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0040] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素

[0041] A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素

[0042] A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素

[0043] A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0044] A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0045] A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0046] A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0047] A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0048] A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素

[0049] A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素

- [0050] A14E, B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0051] A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0052] A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0053] A14E, B25H, B26G, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0054] A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0055] A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0056] A14E, B25H, B26G, desB30 人类胰岛素
- [0057] A14E, B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0058] A14E, B25H, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0059] A14E, B25H, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0060] A14E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0061] A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0062] A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0063] A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0064] A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0065] A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0066] A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0067] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0068] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0069] A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0070] A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0071] A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0072] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0073] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0074] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0075] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0076] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0077] A14E, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0078] A14E, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0079] A14E, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0080] A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0081] A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0082] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0083] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0084] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0085] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0086] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0087] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0088] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素

- [0089] A14Q, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0090] A14Q, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0091] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0092] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0093] A14Q, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0094] A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0095] A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0096] A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0097] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0098] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0099] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0100] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0101] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0102] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0103] A14Q, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0104] A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0105] A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0106] A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0107] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0108] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0109] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0110] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0111] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0112] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0113] A14P, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0114] A14P, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0115] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0116] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0117] A14P, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0118] A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0119] A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0120] A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0121] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0122] A14P, A22K, B 16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0123] A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0124] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0125] A14P, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0126] A14P, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0127] A14P, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素

- [0128] A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0129] A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0130] A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0131] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0132] A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0133] A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0134] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0135] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0136] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0137] A14D, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0138] A14D, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0139] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0140] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0141] A14D, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0142] A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0143] A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0144] A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0145] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0146] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0147] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0148] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0149] A14D, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0150] A14D, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0151] A14D, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0152] A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0153] A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0154] A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0155] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0156] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0157] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0158] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0159] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0160] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0161] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0162] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0163] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0164] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0165] A14E, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0166] A14E, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素

- [0167] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0168] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0169] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0170] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0171] A14P, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0172] A14P, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0173] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0174] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0175] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0176] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0177] A14D, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0178] A14D, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0179] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0180] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0181] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0182] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0183] A14Q, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0184] A14Q, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素。
- [0185] 在另一个实施方式中提供了包含通式 9 的 A 链氨基酸序列和通式 10 的 B 链氨基酸序列的胰岛素类似物：
- [0186] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
- [0187] 通式 (9) (SEQ ID No :9)
- [0188] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}
- [0189] 通式 (10) (SEQ ID No :10)
- [0190] 其中
- [0191] Xaa_{A14} 独立地选自 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Glu 和 Gln；
- [0192] Xaa_{B24} 独立地选自 Phe、Gly 和 His；
- [0193] Xaa_{B25} 独立地选自 Phe 和 His；
- [0194] Xaa_{B26} 独立地选自 Tyr、Gly、Glu 和 Lys；
- [0195] Xaa_{B27} 不存在或独立地选自 Gly、Lys 或 Thr；
- [0196] Xaa_{B28} 不存在或独立地选自 Pro、Gly、His、Lys、Asp 和 Glu；
- [0197] Xaa_{B29} 不存在或者是 Lys；
- [0198] C 末端可以任选地作为酰胺衍生 (derivatized as an amide)；
- [0199] 其中 A 链氨基酸序列和 B 链氨基酸序列通过 A 链的位点 7 的半胱氨酸和 B 链的位点 7 的半胱氨酸之间、以及 A 链的位点 20 的半胱氨酸和 B 链的位点 19 的半胱氨酸之间的二硫桥连接，并且其中 A 链的位点 6 和 11 的半胱氨酸通过二硫桥连接；
- [0200] 其中胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变，胰岛素类似物

的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变 ; 并且

[0201] 其中, 如果胰岛素类似物 B 链中的 (多个) 突变由位点 B30 的氨基酸删除与位点 B25 的氨基酸替代为 His 的组合组成, 则胰岛素类似物的 A 链的位点 A14 的至少一个突变选自 Lys、Arg 和 Pro。

[0202] 在另一个实施方式中提供了药物组合物, 其包含生物学活性数量的根据本发明的胰岛素类似物和药学上可接受的载体。

[0203] 还提供了用于治疗受试者中的糖尿病和 / 或降低哺乳动物中的血液葡萄糖水平的方法, 包括给予所述受试者或哺乳动物根据本发明的胰岛素类似物或药物组合物。

[0204] 发明描述

[0205] 在本发明的一个实施方式中提供了具有增强的蛋白水解稳定性并保持胰岛素生物活性的胰岛素类似物。

[0206] 本发明人鉴定了对于消化蛋白酶具有改善的稳定性的几种胰岛素类似物。由于与未经修饰的人类胰岛素相比这些胰岛素类似物具有针对蛋白水解降解的增强的抗性, 所以在胃或胃肠道中具有增加的生物利用度, 因此, 这些胰岛素类似物可用于口服糖尿病治疗。

[0207] 可以通过使用人类胰岛素、各种胰岛素类似物、消化酶和提取物 (胃、肠和胰腺) 进行消化物的 HPLC 分析, 从而表征胰岛素类似物的蛋白水解稳定性。可以通过重组表达和突变或通过化学合成来产生胰岛素类似物。

[0208] 在一个实施方式中, 根据本发明的胰岛素类似物相对于人类胰岛素显示出在存在胃蛋白酶的情况下的延长的半衰期。

[0209] 在一个实施方式中, 根据本发明的胰岛素类似物选自 :

[0210] A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0211] A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0212] A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素

[0213] A8H, A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素

[0214] A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0215] A8H, A14H, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0216] A8H, A14H, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素

[0217] A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素,

[0218] A14E, A15E, B25H, desB30 人类胰岛素

[0219] A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素

[0220] A14E, A21G, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素

[0221] A14E, A21G, B25H, desB30 人类胰岛素

[0222] A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0223] A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0224] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素

[0225] A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素

[0226] A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素

[0227] A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0228] A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

- [0229] A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0230] A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0231] A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0232] A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0233] A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0234] A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0235] A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0236] A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0237] A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0238] A14E, B24G, desB30 人类胰岛素
- [0239] A14E, B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0240] A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0241] A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0242] A14E, B25H, B26G, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0243] A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0244] A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0245] A14E, B25H, B26G, desB30 人类胰岛素
- [0246] A14E, B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0247] A14E, B25H, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0248] A14E, B25H, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0249] A14E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0250] A14E, B28E, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0251] A14E, B28E, desB30 人类胰岛素
- [0252] A14E, B28H, desB30 人类胰岛素
- [0253] A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0254] A14E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0255] A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0256] A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0257] A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0258] A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0259] A14P, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0260] A21G, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0261] B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素。
- [0262] 在另一个实施方式中,根据本发明的胰岛素类似物选自:
- [0263] desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0264] desB27, desB30 人类胰岛素
- [0265] desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0266] B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0267] B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素

- [0268] B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0269] B24G, desB30 人类胰岛素
- [0270] B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0271] B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0272] B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0273] B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0274] B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0275] B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0276] B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0277] B25H, B26G, B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0278] B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0279] B25H, B26G, B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0280] B25H, B26G, B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素
- [0281] B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0282] B25H, B26G, B27T, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0283] B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0284] B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0285] B25H, B26G, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0286] B25H, B26G, desB30 人类胰岛素
- [0287] B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0288] B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0289] B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0290] B25H, B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0291] B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0292] B25H, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0293] B25H, B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0294] B25H, B29R, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0295] B25H, B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素
- [0296] B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0297] B25H, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0298] B25H, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0299] B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0300] B25H, desB30 人类胰岛素
- [0301] B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0302] B26G, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0303] B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0304] B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0305] B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0306] B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素

- [0307] B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素
- [0308] B28E, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0309] B28E, desB30 人类胰岛素
- [0310] B28H, desB30 人类胰岛素,
- [0311] 其中所述胰岛素类似物进一步包含选自下列的替代:
- [0312] A14D
- [0313] A14E
- [0314] A14H
- [0315] A14P
- [0316] A14Q
- [0317] A21G
- [0318] A14D, A22K
- [0319] A14D, B16E
- [0320] A14D, B16H
- [0321] A14E, A15E
- [0322] A14E, A21G
- [0323] A14E, A22K
- [0324] A14E, B10E
- [0325] A14E, B16D
- [0326] A14E, B16E
- [0327] A14E, B16H
- [0328] A14E, B22K
- [0329] A14H, A22K
- [0330] A14H, B16E
- [0331] A14H, B16H
- [0332] A14P, A22K
- [0333] A14P, B16E
- [0334] A14P, B16H
- [0335] A14Q, A22K
- [0336] A14Q, B16E
- [0337] A14Q, B16H
- [0338] A8H, A14E, A22K
- [0339] A8H, A14E, B10E
- [0340] A8H, A14E, B10E
- [0341] A8H, A14E, B10H
- [0342] A8H, A14E, B22K
- [0343] A8H, A14H, A22K
- [0344] A8H, A14H, B16H
- [0345] A14D, A22K, B16E

[0346] A14D, A22K, B16H

[0347] A14E, A22K, B16E

[0348] A14E, A22K, B16H

[0349] A14P, A22K, B16E

[0350] A14P, A22K, B16H

[0351] A14Q, A22K, B16E

[0352] A14Q, A22K, B16H

[0353] A14E, B16E, B22K

[0354] A14E, B16H, B22K

[0355] A14E, B16H, B24H

[0356] A14E, A18Q, A21G, B3Q

[0357] A14E, desB1, desB2, des3。

[0358] 以下是实施方式的非限制性列举,在本文的其它地方进一步描述:

[0359] 实施方式 1:一种胰岛素类似物,其中

[0360] 胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,其中一个突变位于位点 A14,其被替代为选自 Lys、Glu、Arg、Asp、Pro 和 His 的氨基酸;和

[0361] 胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变,其中两个或更多个突变是位点 B27、B28、B29 和 B30 的氨基酸删除的形式,或位点 B30 的氨基酸删除与氨基酸替代的组合,所述氨基酸替代是选自下列位点的氨基酸替代: B25 被替代为 His, B26 被替代为 Gly 或 Glu, B27 被替代为 Gly 或 Lys, 和 B28 被替代为 Asp、His、Gly、Lys 或 Glu;

[0362] 其中,如果胰岛素类似物 B 链的突变由位点 B30 的氨基酸删除与一个氨基酸替代的组合组成,所述一个氨基酸替代是位点 B25 的氨基酸被替代为 His,则胰岛素类似物的 A 链的位点 A14 的至少一个突变选自 Lys、Arg 和 Pro。

[0363] 实施方式 2. 根据实施方式 1 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变: A22K、B16D、B16E、B16H、B24H、B25H、B26E、B26G、B27G、B27K、B28D、B28G、B28E、B28H、B28K、B29K、desB26、desB27、desB28 和 desB29。

[0364] 实施方式 3. 根据实施方式 1 的胰岛素类似物,其中所述的 B 链中的两个或更多个突变是位点 B27、B28、B29 和 B30 的氨基酸删除的形式。

[0365] 实施方式 4. 根据实施方式 3 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变: A22K、B16D、B16E、B16H、B24H、B25H、B26E、B26G、B27G、B27K、B28D、B28G、B28E、B28H、B28K、B29K 和 desB26。

[0366] 实施方式 5. 根据实施方式 1 的胰岛素类似物,其中所述的 B 链中的两个或更多个突变是位点 B30 的氨基酸删除和位点 B25 的氨基酸被替代为 His 的组合的形式。

[0367] 实施方式 6. 根据实施方式 5 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变: A22K、B16D、B16E、B16H、B24H、B26E、B26G、B27G、B27K、B28D、B28G、B28E、B28H、B28K、B29K、desB26、desB27、desB28 和 desB29。

[0368] 实施方式 7. 根据实施方式 1 的胰岛素类似物,其中所述的 B 链中的两个或更多个突变是位点 B30 的氨基酸删除和位点 B26 的氨基酸被替代为 Glu 或 Gly 的组合的形式。

[0369] 实施方式 8. 根据实施方式 7 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或

多个突变 :A22K、B16D、B16E、B16H、B24H、B25H、B27G、B27K、B28D、B28G、B28E、B28H、B28K、B29K、desB26、desB27、desB28 和 desB29。

[0370] 实施方式 9. 根据实施方式 1 的胰岛素类似物,其中所述的 B 链中的两个或更多个突变是位点 B30 的氨基酸删除和位点 B27 的氨基酸被替代为 Gly 或 Lys 的组合的形式。

[0371] 实施方式 10. 根据实施方式 9 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变 :A22K、B16D、B16E、B16H、B24H、B25H、B26E、B26G、B28D、B28G、B28E、B28H、B28K、B29K、desB26、desB27、desB28 和 desB29。

[0372] 实施方式 11. 根据实施方式 1 的胰岛素类似物,其中所述的 B 链中的两个或更多个突变是位点 B30 的氨基酸删除和位点 B28 的氨基酸被替代为 Asp、His、Gly、Lys 或 Glu 的组合的形式。

[0373] 实施方式 12. 根据实施方式 11 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变 :A22K、B16D、B16E、B16H、B24H、B25H、B26E、B26G、B27G、B27K、B29K、desB26、desB27、desB28 和 desB29。

[0374] 实施方式 13. 一种胰岛素类似物,其中

[0375] 胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,其中一个突变位于位点 A14,其被替代为选自 Lys、Glu、Arg、Asp、Pro、Gln 和 His 的氨基酸 ;和

[0376] 胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变,其中两个或更多个突变是位点 B27、B28、B29 和 B30 的氨基酸删除的形式,或位点 B30 的氨基酸删除与氨基酸替代的组合,所述氨基酸替代是选自下列位点的氨基酸替代 :B24 被替代为 Gly 或 His, B25 被替代为 His, B26 被替代为 Gly、Glu 或 Lys, B27 被替代为 Gly、Glu 或 Lys, 和 B28 被替代为 Asp、His、Gly、Lys 或 Glu ;

[0377] 其选自 :

[0378] A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0379] A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0380] A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素

[0381] A8H, A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素

[0382] A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0383] A8H, A14H, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素

[0384] A8H, A14H, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素

[0385] A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0386] A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0387] A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0388] A14E, B24G, desB30 人类胰岛素

[0389] A14E, B28E, desB29, desB30 人类胰岛素

[0390] A14E, B28E, desB30 人类胰岛素

[0391] A14E, B28H, desB30 人类胰岛素

[0392] A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0393] A14E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0394] A14P, B25H, desB30 人类胰岛素

- [0395] A21G, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0396] B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0397] A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素,
- [0398] A14E, A15E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0399] A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0400] A14E, A21G, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0401] A14E, A21G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0402] A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0403] A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0404] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0405] A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0406] A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0407] A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0408] A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0409] A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0410] A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0411] A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0412] A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0413] A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0414] A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0415] A14E, B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0416] A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0417] A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0418] A14E, B25H, B26G, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0419] A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0420] A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0421] A14E, B25H, B26G, desB30 人类胰岛素
- [0422] A14E, B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0423] A14E, B25H, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0424] A14E, B25H, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0425] A14E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0426] A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0427] A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0428] A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0429] A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素。
- [0430] 实施方式 14. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变 :A8H、A18Q、A21A、A21G、A21Q、A22K、B3G、B3A、B3Q、B10E、B10D、B16H、B16E、B16D 和 B22K。
- [0431] 实施方式 15. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或

多个突变 :B16H、B16E 和 B16D。

[0432] 实施方式 16. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含 A22K 或 B22K。

[0433] 实施方式 17. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变 :A21A、A21G 和 A21Q。

[0434] 实施方式 18. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变 :B3Q、B3G、B3A。

[0435] 实施方式 19. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含 A18Q。

[0436] 实施方式 20. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含 A8H。

[0437] 实施方式 21. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其进一步包含选自下列的一个或多个突变 :B10E 和 B10D。

[0438] 实施方式 22. 根据实施方式 13 的胰岛素类似物,其中所述母体胰岛素是人类胰岛素。

[0439] 实施方式 23. 包含通式 1 的 A 链氨基酸序列和通式 2 的 B 链氨基酸序列的胰岛素类似物 :

[0440] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A8}-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa_{A21}-Xaa_{A22}

[0441] 通式 (1) (SEQ ID No :1)

[0442] Phe-Val-Xaa_{B3}-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Xaa_{B22}-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}

[0443] 通式 (2) (SEQ ID No :2)

[0444] 其中

[0445] Xaa_{A8} 独立地选自 Thr 和 His ;

[0446] Xaa_{A14} 独立地选自 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Gln 和 Glu ;

[0447] Xaa_{A15} 独立地选自 Gln 和 Glu ;

[0448] Xaa_{A21} 独立地选自 Asn、Gln、Gly 和 Ala ;

[0449] Xaa_{A22} 不存在或是 Lys ;

[0450] Xaa_{B3} 独立地选自 Asn、Gln、Gly 和 Ala ;

[0451] Xaa_{B10} 独立地选自 His、Glu 和 Asp ;

[0452] Xaa_{B16} 独立地选自 Tyr、Asp、His 和 Glu ;

[0453] Xaa_{B22} 不存在或独立地选自 Arg 和 Lys ;

[0454] Xaa_{B24} 不存在或独立地选自 Phe、Gly 和 His ;

[0455] Xaa_{B25} 不存在或独立地选自 Phe、Asn、Ala 和 His ;

[0456] Xaa_{B26} 不存在或独立地选自 Tyr、Gly、Lys 和 Glu ;

[0457] Xaa_{B27} 不存在或独立地选自 Gly、Lys 和 Thr ;

[0458] Xaa_{B28} 不存在或独立地选自 Pro、Gly、His、Lys、Asp 和 Glu ;

[0459] Xaa_{B29} 不存在或是 Lys ;

[0460] C 末端可以任选地作为酰胺衍生 ;

[0461] 其中 A 链氨基酸序列和 B 链氨基酸序列通过 A 链的位点 7 的半胱氨酸和 B 链的位点 7 的半胱氨酸之间、以及 A 链的位点 20 的半胱氨酸和 B 链的位点 19 的半胱氨酸之间的

二硫桥连接,并且其中 A 链的位点 6 和 11 的半胱氨酸通过二硫桥连接;

[0462] 其中胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变;并且

[0463] 其中,如果胰岛素类似物 B 链的突变由位点 B30 的氨基酸删除与位点 B25 的氨基酸被替代为 His 的组合组成,则胰岛素类似物的 A 链的位点 A14 的至少一个突变选自 Lys、Arg 和 Pro。

[0464] 实施方式 24. 包含通式 3 的 A 链氨基酸序列和通式 4 的 B 链氨基酸序列的胰岛素类似物:

[0465] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa_{A21}-Xaa_{A22}

[0466] 通式 (3) (SEQ ID No :3)

[0467] Phe-Val-Xaa_{B3}-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Xaa_{B22}-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}

[0468] 通式 (4) (SEQ ID No :4)

[0469] 其中

[0470] Xaa_{A14} 独立地选自 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Gln 和 Glu ;

[0471] Xaa_{A15} 独立地选自 Gln 和 Glu ;

[0472] Xaa_{A21} 独立地选自 Asn、Gln、Gly 和 Ala ;

[0473] Xaa_{A22} 不存在或是 Lys ;

[0474] Xaa_{B3} 独立地选自 Asn、Gln、Gly 和 Ala ;

[0475] Xaa_{B16} 独立地选自 Tyr、Asp、His 和 Glu ;

[0476] Xaa_{B22} 不存在或独立地选自 Arg 和 Lys ;

[0477] Xaa_{B24} 不存在或独立地选自 Phe、Gly 和 His ;

[0478] Xaa_{B25} 不存在或独立地选自 Phe、Asn、Ala 和 His ;

[0479] Xaa_{B26} 不存在或独立地选自 Tyr、Gly、Lys 和 Glu ;

[0480] Xaa_{B27} 不存在或独立地选自 Gly、Lys 和 Thr ;

[0481] Xaa_{B28} 不存在或独立地选自 Pro、Gly、His、Lys、Asp 和 Glu ;

[0482] Xaa_{B29} 不存在或是 Lys ;

[0483] C 末端可以任选地作为酰胺衍生 ;

[0484] 其中 A 链氨基酸序列和 B 链氨基酸序列通过 A 链的位点 7 的半胱氨酸和 B 链的位点 7 的半胱氨酸之间、以及 A 链的位点 20 的半胱氨酸和 B 链的位点 19 的半胱氨酸之间的二硫桥连接,并且其中 A 链的位点 6 和 11 的半胱氨酸通过二硫桥连接;

[0485] 其中胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变;并且

[0486] 其中,如果胰岛素类似物 B 链的突变由位点 B30 的氨基酸删除与位点 B25 的氨基酸被替代为 His 的组合组成,则胰岛素类似物的 A 链的位点 A14 的至少一个突变选自 Lys、Arg 和 Pro。

[0487] 实施方式 25. 包含通式 5 的 A 链氨基酸序列和通式 6 的 B 链氨基酸序列的胰岛素类似物:

[0488] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa_{A21}-Xaa_{A22}

[0489] 通式 (5) (SEQ ID No :5)

[0490] Phe-Val-Xaa_{B3}-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}

[0491] 通式 (2) (SEQ ID No :6)

[0492] 其中

[0493] Xaa_{A14} 独立地选自 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Gln 和 Glu ;

[0494] Xaa_{A21} 独立地选自 Asn、Gln、Gly 和 Ala ;

[0495] Xaa_{A22} 不存在或是 Lys ;

[0496] Xaa_{B3} 独立地选自 Asn、Gln、Gly 和 Ala ;

[0497] Xaa_{B16} 独立地选自 Tyr、Asp、His 和 Glu ;

[0498] Xaa_{B24} 不存在或独立地选自 Phe、Gly 和 His ;

[0499] Xaa_{B25} 不存在或独立地选自 Phe、Asn、Ala 和 His ;

[0500] Xaa_{B26} 不存在或独立地选自 Tyr、Gly、Lys 和 Glu ;

[0501] Xaa_{B27} 不存在或独立地选自 Gly、Lys 和 Thr ;

[0502] Xaa_{B28} 不存在或独立地选自 Pro、Gly、His、Lys、Asp 和 Glu ;

[0503] Xaa_{B29} 不存在或是 Lys ;

[0504] C 末端可以任选地作为酰胺衍生 ;

[0505] 其中 A 链氨基酸序列和 B 链氨基酸序列通过 A 链的位点 7 的半胱氨酸和 B 链的位点 7 的半胱氨酸之间、以及 A 链的位点 20 的半胱氨酸和 B 链的位点 19 的半胱氨酸之间的二硫桥连接,并且其中 A 链的位点 6 和 11 的半胱氨酸通过二硫桥连接 ;

[0506] 其中胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变 ;并且

[0507] 其中,如果胰岛素类似物 B 链的突变由位点 B30 的氨基酸删除与位点 B25 的氨基酸被替代为 His 的组合组成,则胰岛素类似物的 A 链的位点 A14 的至少一个突变选自 Lys、Arg 和 Pro。

[0508] 实施方式 26. 包含通式 7 的 A 链氨基酸序列和通式 8 的 B 链氨基酸序列的胰岛素类似物 :

[0509] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-Xaa_{A22}

[0510] 通式 (7) (SEQ ID No :7)

[0511] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}

[0512] 通式 (8) (SEQ ID No :8)

[0513] 其中

[0514] Xaa_{A14} 独立地选自 Asp、His、Lys、Arg、Pro 和 Glu ;

[0515] Xaa_{A22} 不存在或是 Lys ;

[0516] Xaa_{B16} 独立地选自 Tyr、Asp、His 和 Glu ;

- [0517] Xaa_{B24} 独立地选自 Phe 和 His ;
- [0518] Xaa_{B25} 独立地选自 Phe 和 His ;
- [0519] Xaa_{B26} 独立地选自 Tyr、Gly 和 Glu ;
- [0520] Xaa_{B27} 不存在或独立地选自 Gly、Lys 和 Thr ;
- [0521] Xaa_{B28} 不存在或独立地选自 Pro、Gly、His、Lys、Asp 和 Glu ;
- [0522] Xaa_{B29} 不存在或是 Lys ;
- [0523] C 末端可以任选地作为酰胺衍生 ;
- [0524] 其中 A 链氨基酸序列和 B 链氨基酸序列通过 A 链的位点 7 的半胱氨酸和 B 链的位点 7 的半胱氨酸之间、以及 A 链的位点 20 的半胱氨酸和 B 链的位点 19 的半胱氨酸之间的二硫桥连接,并且其中 A 链的位点 6 和 11 的半胱氨酸通过二硫桥连接 ;
- [0525] 其中胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变 ;并且
- [0526] 其中,如果胰岛素类似物 B 链的突变由位点 B30 的氨基酸删除与位点 B25 的氨基酸被替代为 His 的组合组成,则胰岛素类似物的 A 链的位点 A14 的至少一个突变选自 Lys、Arg 和 Pro。
- [0527] 实施方式 27. 包含通式 9 的 A 链氨基酸序列和通式 10 的 B 链氨基酸序列的胰岛素类似物 :
- [0528] Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
- [0529] 通式 (9) (SEQ ID No :9)
- [0530] Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}
- [0531] 通式 (10) (SEQ ID No :10)
- [0532] 其中
- [0533] Xaa_{A14} 独立地选自 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Glu 和 Gln ;
- [0534] Xaa_{B24} 独立地选自 Phe, Gly 和 His ;
- [0535] Xaa_{B25} 独立地选自 Phe 和 His ;
- [0536] Xaa_{B26} 独立地选自 Tyr、Gly、Glu 和 Lys ;
- [0537] Xaa_{B27} 不存在或独立地选自 Gly、Lys 和 Thr ;
- [0538] Xaa_{B28} 不存在或独立地选自 Pro、Gly、His、Lys、Asp 和 Glu ;
- [0539] Xaa_{B29} 不存在或是 Lys ;
- [0540] C 末端可以任选地作为酰胺衍生 ;
- [0541] 其中 A 链氨基酸序列和 B 链氨基酸序列通过 A 链的位点 7 的半胱氨酸和 B 链的位点 7 的半胱氨酸之间、以及 A 链的位点 20 的半胱氨酸和 B 链的位点 19 的半胱氨酸之间的二硫桥连接,并且其中 A 链的位点 6 和 11 的半胱氨酸通过二硫桥连接 ;
- [0542] 其中胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变,胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变 ;并且
- [0543] 其中,如果胰岛素类似物 B 链的突变由位点 B30 的氨基酸删除与位点 B25 的氨基酸被替代为 His 的组合组成,则胰岛素类似物的 A 链的位点 A14 的至少一个突变选自 Lys、

Arg 和 Pro。

[0544] 实施方式 28. 一种胰岛素类似物, 其中

[0545] 胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变, 其中一个突变位于位点 A14, 其被替代为选自 Lys、Glu、Arg、Asp、Pro、Gln 和 His 的氨基酸; 和

[0546] 胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变, 其中两个或更多个突变是位点 B27、B28、B29 和 B30 的氨基酸删除的形式, 或位点 B30 的氨基酸删除与氨基酸替代的组合, 所述氨基酸替代是选自下列位点的氨基酸替代: B24 被替代为 Gly 或 His, B25 被替代为 His, B26 被替代为 Gly, B27 被替代为 Gly、His、Thr 或 Lys 和 B28 被替代为 His、Gly、Lys 或 Glu;

[0547] 其选自:

[0548] B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0549] B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0550] B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0551] B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0552] B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0553] B25H, B26G, B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0554] B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素

[0555] B25H, B26G, B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素

[0556] B25H, B26G, B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素

[0557] B25H, B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0558] B25H, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素

[0559] B25H, B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素

[0560] B25H, B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素

[0561] B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0562] B26G, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0563] B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0564] B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

[0565] B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素

[0566] B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素, 和

[0567] B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素,

[0568] 其中所述胰岛素类似物进一步包含选自下列的替代:

[0569] A14E

[0570] A14D

[0571] A14H

[0572] A14E, A22K

[0573] A14D, A22K

[0574] A14H, A22K

[0575] A14D, B16H

[0576] A14E, B16H

- [0577] A14H, B16H
- [0578] A14E, A22K, B16H
- [0579] A14H, A22K, B16H, 和
- [0580] A14D, A22K, B16H。
- [0581] 实施方式 29. 一种胰岛素类似物, 其中
- [0582] 胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变, 其中一个突变位于位点 A14, 其被替代为选自 Lys、Glu、Arg、Asp、Pro、Gln 和 His 的氨基酸; 和
- [0583] 胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变, 其中两个或更多个突变是位点 B27、B28、B29 和 B30 的氨基酸删除的形式, 或位点 B30 的氨基酸删除与氨基酸替代的组合, 所述氨基酸替代是选自下列位点的氨基酸替代: B24 被替代为 Gly 或 His, B25 被替代为 His, B26 被替代为 Gly, B27 被替代为 Gly、His、Thr 或 Lys 和 B28 被替代为 His、Gly、Lys 或 Glu;
- [0584] 其选自:
- [0585] desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0586] desB27, desB30 人类胰岛素
- [0587] desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0588] B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0589] B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0590] B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0591] B24G, desB30 人类胰岛素
- [0592] B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0593] B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0594] B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0595] B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0596] B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0597] B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0598] B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0599] B25H, B26G, B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0600] B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0601] B25H, B26G, B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0602] B25H, B26G, B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素
- [0603] B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0604] B25H, B26G, B27T, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0605] B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0606] B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0607] B25H, B26G, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0608] B25H, B26G, desB30 人类胰岛素
- [0609] B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0610] B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素

- [0611] B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0612] B25H, B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0613] B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0614] B25H, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0615] B25H, B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0616] B25H, B29R, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0617] B25H, B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素
- [0618] B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0619] B25H, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0620] B25H, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0621] B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0622] B25H, desB30 人类胰岛素
- [0623] B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0624] B26G, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0625] B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0626] B27G, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0627] B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0628] B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0629] B27G, B28G, B29K, desB30 人类胰岛素
- [0630] B28E, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0631] B28E, desB30 人类胰岛素
- [0632] B28H, desB30 人类胰岛素,
- [0633] 其中所述胰岛素类似物进一步包含选自下列的替代：
- [0634] A14D
- [0635] A14E
- [0636] A14H
- [0637] A14P
- [0638] A14Q
- [0639] A14D, A22K
- [0640] A14D, B16E
- [0641] A14D, B16H
- [0642] A14E, A15E
- [0643] A14E, A21G
- [0644] A14E, A22K
- [0645] A14E, B10E
- [0646] A14E, B16D
- [0647] A14E, B16E
- [0648] A14E, B16H
- [0649] A14E, B22K

- [0650] A14H, A22K
- [0651] A14H, B16E
- [0652] A14H, B16H
- [0653] A14P, A22K
- [0654] A14P, B16E
- [0655] A14P, B16H
- [0656] A14Q, A22K
- [0657] A14Q, B16E
- [0658] A14Q, B16H
- [0659] A8H, A14E, A22K
- [0660] A8H, A14E, B10E
- [0661] A8H, A14E, B10E
- [0662] A8H, A14E, B10H
- [0663] A8H, A14E, B22K
- [0664] A8H, A14H, A22K
- [0665] A8H, A14H, B16H
- [0666] A14D, A22K, B16E
- [0667] A14D, A22K, B16H
- [0668] A14E, A22K, B16E
- [0669] A14E, A22K, B16H
- [0670] A14P, A22K, B16E
- [0671] A14P, A22K, B16H
- [0672] A14Q, A22K, B16E
- [0673] A14Q, A22K, B16H
- [0674] A14E, B16E, B22K
- [0675] A14E, B16H, B22K
- [0676] A14E, B16H, B24H
- [0677] A14E, A18Q, A21G, B3Q
- [0678] A14E, desB1, desB2, des3。
- [0679] 实施方式 30. 一种胰岛素类似物, 其中
- [0680] 胰岛素类似物的 A 链包含相对于母体胰岛素的至少一个突变, 其中一个突变位于位点 A14, 其被替代为选自 Lys、Glu、Arg、Asp、Pro、Gln 和 His 的氨基酸 ; 和
- [0681] 胰岛素类似物的 B 链包含相对于母体胰岛素的至少两个突变, 其中两个或更多个突变是位点 B27、B28、B29 和 B30 的氨基酸删除的形式, 或位点 B30 的氨基酸删除与氨基酸替代的组合, 所述氨基酸替代是选自下列位点的氨基酸替代 : B24 被替代为 Gly 或 His, B25 被替代为 His, B26 被替代为 Gly, B27 被替代为 Gly、His、Thr 或 Lys 和 B28 被替代为 His、Gly、Lys 或 Glu ;
- [0682] 其选自 :
- [0683] desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

- [0684] desB27, desB30 人类胰岛素
- [0685] desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0686] B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0687] B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0688] B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0689] B24G, desB30 人类胰岛素
- [0690] B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0691] B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0692] B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0693] B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0694] B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0695] B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0696] B25H, B26G, B27T, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0697] B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0698] B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0699] B25H, B26G, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0700] B25H, B26G, desB30 人类胰岛素
- [0701] B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0702] B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0703] B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0704] B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0705] B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0706] B25H, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0707] B25H, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0708] B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0709] B25H, desB30 人类胰岛素
- [0710] B28E, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0711] B28E, desB30 人类胰岛素
- [0712] B28H, desB30 人类胰岛素,
- [0713] 其中所述胰岛素类似物进一步包含选自下列的替代：
- [0714] A14D
- [0715] A14E
- [0716] A14P
- [0717] A14E, A15E
- [0718] A14E, A21G
- [0719] A14E, A22K
- [0720] A14E, B10E
- [0721] A14E, B16D
- [0722] A14E, B16E

- [0723] A14E, B16H
- [0724] A14E, B22K
- [0725] A14H, B16H
- [0726] A8H, A14E, A22K
- [0727] A8H, A14E, B10E
- [0728] A8H, A14E, B10E
- [0729] A8H, A14E, B10H
- [0730] A8H, A14E, B22K
- [0731] A8H, A14H, A22K
- [0732] A8H, A14H, B16H
- [0733] A14E, A22K, B16E
- [0734] A14E, A22K, B16H
- [0735] A14E, B16E, B22K
- [0736] A14E, B16H, B22K
- [0737] A14E, B16H, B24H
- [0738] A14E, A18Q, A21G, B3Q
- [0739] A14E, desB1, desB2, des3。
- [0740] 实施方式 31. 根据实施方式 28-30 任一项的胰岛素类似物,其中所述胰岛素类似物不是:
- [0741] A14E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0742] A14H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0743] A14E, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0744] A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0745] A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0746] A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0747] A14E, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0748] A14E, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0749] A14E, B27G, B28K, desB29, desB30 人类胰岛素,或
- [0750] A14E, B27G, B28G, desB29, desB30 人类胰岛素。
- [0751] 实施方式 32. 根据实施方式 29 的胰岛素类似物,其选自:
- [0752] A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0753] A14E, A22K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0754] A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0755] A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0756] A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0757] A14E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0758] A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0759] A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0760] A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素

- [0761] A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0762] A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0763] A14E, B28E, desB30 人类胰岛素
- [0764] A14E, B28H, desB30 人类胰岛素
- [0765] A14E, B28E, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0766] A14P, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0767] A14K, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0768] A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0769] A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素。
- [0770] 实施方式 33. 根据实施方式 29 的胰岛素类似物, 其选自:
- [0771] A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0772] A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0773] A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0774] A8H, A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0775] A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0776] A8H, A14H, A22K, B 16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0777] A8H, A14H, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0778] A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素,
- [0779] A14E, A15E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0780] A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0781] A14E, A21G, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0782] A14E, A21G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0783] A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0784] A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0785] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0786] A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0787] A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0788] A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0789] A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0790] A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0791] A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0792] A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0793] A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0794] A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0795] A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0796] A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0797] A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0798] A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0799] A14E, B24G, desB30 人类胰岛素

- [0800] A14E, B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0801] A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0802] A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0803] A14E, B25H, B26G, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0804] A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0805] A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0806] A14E, B25H, B26G, desB30 人类胰岛素
- [0807] A14E, B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0808] A14E, B25H, B27G, desB30 人类胰岛素
- [0809] A14E, B25H, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0810] A14E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0811] A14E, B28E, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0812] A14E, B28E, desB30 人类胰岛素
- [0813] A14E, B28H, desB30 人类胰岛素
- [0814] A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0815] A14E, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0816] A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0817] A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0818] A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素
- [0819] A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0820] A14P, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0821] A21G, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0822] B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素。
- [0823] 实施方式 34. 根据实施方式 29 的胰岛素类似物,其选自:
- [0824] A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0825] A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0826] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0827] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0828] A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0829] A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0830] A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0831] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0832] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0833] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0834] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0835] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0836] A14E, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0837] A14E, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0838] A14E, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素

- [0839] A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0840] A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0841] A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0842] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0843] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0844] A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0845] A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0846] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0847] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0848] A14Q, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0849] A14Q, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0850] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0851] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0852] A14Q, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0853] A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0854] A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0855] A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0856] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0857] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0858] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0859] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0860] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0861] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0862] A14Q, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0863] A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0864] A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0865] A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0866] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0867] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0868] A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0869] A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0870] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0871] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0872] A14P, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0873] A14P, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0874] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0875] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0876] A14P, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0877] A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素

- [0878] A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0879] A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0880] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0881] A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0882] A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0883] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0884] A14P, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0885] A14P, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0886] A14P, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0887] A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0888] A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0889] A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0890] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0891] A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0892] A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0893] A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0894] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0895] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0896] A14D, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0897] A14D, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0898] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0899] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0900] A14D, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0901] A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0902] A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0903] A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0904] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0905] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0906] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0907] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0908] A14D, A22K, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0909] A14D, A22K, B16E, B25H, desB30 人类胰岛素
- [0910] A14D, A22K, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0911] A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0912] A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30 人类胰岛素
- [0913] A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0914] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0915] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0916] A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素

- [0917] A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素
- [0918] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0919] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0920] 实施方式 35. 根据实施方式 29 的胰岛素类似物,其选自:
- [0921] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0922] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0923] A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0924] A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0925] A14E, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0926] A14E, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0927] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0928] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0929] A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0930] A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0931] A14P, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0932] A14P, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0933] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0934] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0935] A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0936] A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0937] A14D, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0938] A14D, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0939] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0940] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30 人类胰岛素
- [0941] A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0942] A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0943] A14Q, B16H, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素
- [0944] A14Q, B16E, B25H, desB27, desB30 人类胰岛素。
- [0945] 实施方式 36. 一种药物组合物,其包含生物活性数量的根据实施方式 1-35 任一一项的胰岛素类似物和药学上可接受的载体。
- [0946] 实施方式 37. 一种药物组合物,其包含两种或更多种根据实施方式 1-35 任一一项的胰岛素类似物,其中每种类似物通过具有至少一个突变来定义,所述突变在任何其它变体中是不存在的或者是不相同的。
- [0947] 实施方式 38. 根据实施方式 36-37 任一一项的药物组合物,其还包含药学上可接受的载体和 / 或赋形剂,和任选的佐剂。
- [0948] 实施方式 39. 用于治疗受试者中的糖尿病的方法,包括给予所述受试者根据实施方式 1-35 任一一项的胰岛素类似物或根据实施方式 36-37 任一一项的药物组合物。
- [0949] 实施方式 40. 用于降低哺乳动物中的血液葡萄糖水平的方法,包括给予有此治疗需要的患者治疗活性剂量的根据实施方式 1-35 任一一项的胰岛素类似物或根据实施方式

36-37 任一项的药物组合物。

[0950] 实施方式 41. 根据实施方式 39 或 40 的方法, 其为口服给药。

[0951] 实施方式 42. 根据实施方式 39 或 40 的方法, 其为非肠道给药。

[0952] 实施方式 43. 根据实施方式 39 或 40 的方法, 其为气管内给药。

[0953] 实施方式 44. 根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物用作药物, 所述药物用于治疗或预防高血糖症包括应激性高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良、1 型糖尿病、和烧伤、手术创伤和其它的在治疗中需要合成代谢效应的疾病或损伤、心肌梗塞、中风、冠心病和其它心血管失调, 以及治疗严重的 (critically ill) 糖尿病和非糖尿病患者。

[0954] 实施方式 45. 根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物用作延缓或阻止 2 型糖尿病中疾病进展的药物。

[0955] 实施方式 46. 提供了根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物用作药物, 所述药物用于治疗或预防高血糖症包括应激性高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良、1 型糖尿病、和烧伤、手术创伤和其它的在治疗中需要合成代谢效应的疾病或损伤、心肌梗塞、中风、冠心病和其它心血管失调。

[0956] 实施方式 47. 编码根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物的核酸序列、其衍生物、其部分序列、其简并序列或在严格条件下与其杂交的序列。

[0957] 实施方式 48. 编码根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物的前体的核酸序列、其衍生物、其部分序列、其简并序列或在严格条件下与其杂交的序列。

[0958] 实施方式 49. 包含根据实施方式 47-48 任一项的核酸的载体, 其用于表达根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物。

[0959] 实施方式 50. 包含实施方式 49 的载体的宿主细胞, 其用于生产根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物。

[0960] 实施方式 51. 通过在合适的宿主细胞中表达编码所讨论的胰岛素类似物的实施方式 47-48 的核酸序列来生产根据实施方式 1-35 任一项的胰岛素类似物的方法。

[0961] 胰岛素是由胰腺的 β 细胞分泌的多肽激素。胰岛素由两条多肽链 A 和 B 组成, 这两条链通过两个链间二硫桥连接起来。此外, A 链具有一个链内二硫桥。

[0962] 该激素是作为单链前体胰岛素原 (前胰岛素原) 合成的, 前体胰岛素原由 24 个氨基酸的前肽后跟含有 86 个氨基酸的胰岛素原组成, 其结构为: 前肽-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A, 其中 C 是 31 个氨基酸的连接肽。Arg-Arg 和 Lys-Arg 是用于切割 A 和 B 链的连接肽的切割位点。

[0963] 本文使用的术语“人类胰岛素”意思是结构和性质广为人知的人类激素。人类胰岛素具有两条肽链, 即 A 链和 B 链, 其通过半胱氨酸残基之间的二硫桥连接。A 链是 21 个氨基酸的肽; B 链是 30 个氨基酸的肽, 两条链通过三个二硫桥连接: 一个位于 A 链的位点 6 和 11 的半胱氨酸之间, 第二个位于 A 链的位点 7 的半胱氨酸和 B 链的位点 7 的半胱氨酸之间, 第三个位于 A 链的位点 20 的半胱氨酸和 B 链的位点 19 的半胱氨酸之间。

[0964] 本文中使用的术语“胰岛素类似物”意思是通过突变从天然产生的胰岛素例如人类胰岛素的初级结构衍生而来的多肽。通过删除和 / 或替代天然产生的胰岛素中的至少一个氨基酸残基和 / 或通过添加至少一个氨基酸残基来产生一个或多个突变。所添加的和 / 或替代的氨基酸残基可以是可编码的 (codable) 氨基酸残基或其它天然产生的氨基酸残

基。

[0965] 根据本发明的胰岛素类似物可以是在胰岛素的 A 链中包含一个或多个突变且在 B 链中包含两个或更多个突变的人类胰岛素或其类似物。在一个实施方式中,基于鉴定的蛋白酶切割位点将胰岛素类似物设计为对于蛋白酶具有增强的稳定性。

[0966] 在一个实施方式中,根据本发明的胰岛素类似物相对于母体胰岛素包含少于 8 个的修饰(替代、删除、添加)。在一个实施方式中,胰岛素类似物相对于母体胰岛素包含少于 7 个的修饰(替代、删除、添加)。在一个实施方式中,胰岛素类似物相对于母体胰岛素包含少于 6 个的修饰(替代、删除、添加)。在另一个实施方式中,胰岛素类似物相对于母体胰岛素包含少于 5 个的修饰(替代、删除、添加)。在另一个实施方式中,胰岛素类似物相对于母体胰岛素包含少于 4 个的修饰(替代、删除、添加)。

[0967] 根据本发明的胰岛素类似物可以包含进一步的突变。胰岛素分子中的突变这样表示:指明链(A或B)、位点和编码替代原始(native)氨基酸的氨基酸的三字符。“desB30”或“B(1-29)”意思是缺少 B30 氨基酸残基的天然胰岛素 B 链或其类似物;“A(1-21)”意思是天然胰岛素 A 链。

[0968] 本文中的术语例如 A1、A2、A3 等分别代表胰岛素 A 链中的位点 1、2 和 3(从 N 末端开始数)。类似地,术语例如 B1、B2、B3 等分别代表胰岛素 B 链中的位点 1、2 和 3(从 N 末端开始数)。使用氨基酸的单字符,术语例如 A21A、A21G 和 A21Q 代表 A21 位点的氨基酸分别是 A、G 和 Q。使用氨基酸的三字符,相应的表达分别为 A21Ala、A21Gly 和 A21Gln。因此, A14D、B25H、desB27、desB28、desB29、desB30 人类胰岛素是这样的人类胰岛素类似物:其中 A 链中的位点 14 突变为天冬氨酸, B 链中的位点 25 突变为组氨酸,并且 B 链中的位点 27、28、29 和 30 皆被删除。

[0969] 术语“糖尿病”包括 1 型糖尿病、2 型糖尿病和引起高血糖症的其它病况。

[0970] 术语疾病的“治疗”包括治疗、预防或缓解该疾病。

[0971] 在本发明的一个实施方式中,胰岛素类似物特别适合于口服给药。

[0972] 根据本发明的“胰岛素”在本文中理解为人类胰岛素、胰岛素类似物或胰岛素衍生物。

[0973] 本文中使用的术语“母体胰岛素”意思是未进行本发明的任何突变的胰岛素。母体胰岛素的非限制性例子为,例如,野生型胰岛素例如人类胰岛素或猪胰岛素,人类胰岛素的类似物或人类胰岛素的衍生物或胰岛素类似物例如经过聚乙二醇化或乙酰化的人类胰岛素或胰岛素类似物。

[0974] 在一个实施方式中,根据本发明的母体胰岛素是人类胰岛素。

[0975] “蛋白酶(protease)”或“蛋白酶(protease enzyme)”是降解蛋白和肽的消化酶,其被发现于人身体的各种组织中,例如,如胃(胃蛋白酶)、肠腔(糜蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、羧基肽酶等)或胃肠道的粘膜表面(氨基肽酶、羧基肽酶、肠肽酶、二肽基肽酶、内肽酶等)、肝脏(胰岛素降解酶、组织蛋白酶 D 等)以及其它组织中。

[0976] 根据本发明的胰岛素类似物可以是蛋白水解稳定的胰岛素类似物。

[0977] 蛋白水解稳定的胰岛素类似物在本文中理解为这样的胰岛素类似物:其相对于人类胰岛素而言被一种或多种蛋白酶降解得更慢。在一个实施方式中,根据本发明的蛋白水解稳定的胰岛素类似物相对于母体胰岛素而言被一种或多种蛋白酶降解得更慢。在本发明

的另一个实施方式中,根据本发明的胰岛素类似物对于一种或多种选自下列的酶的降解是稳定的:胃蛋白酶(例如,如同工型胃蛋白酶A、胃蛋白酶B、胃蛋白酶C和/或胃蛋白酶F)、糜蛋白酶(例如,如同工型糜蛋白酶A、糜蛋白酶B和/或糜蛋白酶C)、胰蛋白酶、胰岛素降解酶(IDE)、弹性蛋白酶(例如,如同工型胰腺弹性蛋白酶I和/或II)、羧基肽酶(例如,如同工型羧基肽酶A、羧基肽酶A2和/或羧基肽酶B)、氨基肽酶(例如,如同工型羧基肽酶A、羧基肽酶A2和/或羧基肽酶B)、氨基肽酶(例如,如同工型羧基肽酶A、羧基肽酶A2和/或羧基肽酶B)、氨基肽酶(例如,如同工型羧基肽酶A、羧基肽酶A2和/或羧基肽酶B)、组织蛋白酶D和它的存在于源自大鼠、猪、狗或人类的肠提取物中的酶。

[0978] 在一个实施方式中,根据本发明的胰岛素类似物对于一种或多种选自下列的酶的降解是稳定的:糜蛋白酶、胰蛋白酶、胰岛素降解酶(IDE)、弹性蛋白酶、羧基肽酶、氨基肽酶和组织蛋白酶D。在进一步的实施方式中,根据本发明的胰岛素类似物对于一种或多种选自下列的酶的降解是稳定的:糜蛋白酶、羧基肽酶和IDE。在进一步的实施方式中,根据本发明的胰岛素类似物对于一种或多种选自下列的酶的降解是稳定的:糜蛋白酶和羧基肽酶。

[0979] 根据本发明的胰岛素类似物的半衰期($T_{1/2}$)可以按照实施例中的描述作为根据本发明的胰岛素类似物针对蛋白酶类例如糜蛋白酶、胃蛋白酶和/或羧基肽酶A的蛋白水解酶稳定性的测定来确定。在本发明的一个实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于人类胰岛素增加。在进一步的实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于母体胰岛素增加。在进一步的实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于母体胰岛素增加。在进一步的实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于母体胰岛素增加至少2倍。在进一步的实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于母体胰岛素增加至少3倍。在进一步的实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于母体胰岛素增加至少4倍。在进一步的实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于母体胰岛素增加至少5倍。在进一步的实施方式中, $T_{1/2}$ 相对于母体胰岛素增加至少10倍。

[0980] 当测定后进行比较时,根据本发明的胰岛素类似物相对于母体胰岛素可以具有增加的效力和/或生物利用度。

[0981] 用于测定胰岛素效力的标准分析对于本领域技术人员是已知的,其中主要包括(1)胰岛素放射受体分析,其中胰岛素的相对效力定义为替换50%的特异性结合至细胞膜例如大鼠肝脏质膜组分上存在的胰岛素受体的 ^{125}I -胰岛素所需的胰岛素与所需的胰岛素类似物之比;(2)以例如大鼠脂肪细胞进行的脂肪生成分析,其中胰岛素的相对效力定义为达到 $[3\text{-}^3\text{H}]$ 葡萄糖50%最大转化为有机可抽提材料(即脂)所需的胰岛素与所需的胰岛素类似物之比;(3)在分离的脂肪细胞中进行的葡萄糖氧化分析,其中胰岛素类似物的相对效力定义为达到葡萄糖 $\text{-1-}[^{14}\text{C}]$ 50%最大转化为 $[^{14}\text{CO}_2]$ 所需的胰岛素与所需的胰岛素类似物之比;(4)胰岛素放射免疫分析,其能够通过测定胰岛素或胰岛素类似物与 ^{125}I -胰岛素竞争性地结合至特异性抗胰岛素抗体的有效性来确定胰岛素类似物的免疫原性;和(5)其它分析,其测定胰岛素或胰岛素类似物与动物血液血浆样品中抗体的结合,例如具有特异性胰岛素抗体的ELISA分析。每次口服给药后胰岛素类似物的生物利用度可以例如按照每次口服给药后血浆中的胰岛素类似物浓度相对于静脉内给药后血浆中的胰岛素类似物浓度之比来测定。或者,皮下给药可以替代静脉内给药。可以通过例如上述的方法(5)确定胰岛素类似物的浓度。

[0982] 任选地可以分析根据本发明的胰岛素类似物的另外的蛋白酶位点,其可以进行进一步的替代:以亲水性氨基酸替代一个或多个疏水性氨基酸。

[0983] 多肽例如胰岛素的生产在本领域是熟知的。例如可以通过经典的肽合成例如使用 t-Boc 或 Fmoc 化学的固相肽合成或其它完善建立的技术来生产根据本发明的胰岛素类似物,参见例如 Greene 和 Wuts,“Protective Groups Inorganic Synthesis”,John Wiley & Sons,1999。还可以通过这样的方法来生产胰岛素类似物,所述方法包括:在允许胰岛素类似物表达的条件下在合适的营养液中培养含有编码该类似物的 DNA 序列并能够表达胰岛素类似物的宿主细胞。对于包含非天然氨基酸残基的胰岛素类似物,应该对重组细胞进行修饰从而使非天然氨基酸残基掺入该类似物中,例如通过使用 tRNA 变体。因此,简而言之,以类似于制备已知胰岛素类似物的方式来制备根据本发明的胰岛素类似物。

[0984] 可以使用几种方法来生产人类胰岛素和人类胰岛素类似物。例如,在 WO2008034881 中公开了用于在微生物中生产胰岛素的三种主要方法。其中的两种涉及大肠杆菌,在细胞质中表达大的融合蛋白 (Frank 等人 (1981), Peptides :Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. pp 729-739),或使用信号肽以使其分泌到周质空间 (Chan 等人 (1981) PNAS 78 :5401-5404)。第三种方法利用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 以使胰岛素前体分泌到培养基中 (Thim 等人 (1986) PNAS 83 :6766-6770)。现有技术公开了很多在大肠杆菌或酿酒酵母中表达的胰岛素前体,参见 US. 5, 962, 267、WO 95/16708、EP 0055945、EP 0163529、EP 0347845 和 EP 0741188。

[0985] 通过广为人知的技术例如 US 6500645 中公开的技术在合适的宿主细胞中表达编码所讨论的胰岛素类似物的 DNA 序列来生产胰岛素类似物。胰岛素类似物是直接表达的,或者作为在 B 链具有 N 末端延伸或在 B 链具有 C 末端延伸的前体分子表达。N 末端延伸可以具有增加直接表达的产物的产率的功能,其可以由长达 15 个氨基酸残基构成。在从培养液中分离之后, N 末端延伸将在体外被切割,因此将在挨着 B1 处具有切割位点。在 US 5, 395, 922 和 EP 765, 395 中公开了适合于本发明的 N 末端延伸的类型。C 末端延伸可以具有保护成熟胰岛素或胰岛素类似物分子抵抗速宿主细胞外切蛋白酶的细胞内蛋白水解处理的功能。C 末端延伸在培养液中被分泌的活性的羧基肽酶以细胞外的方式切割,或者在从培养液分离之后在体外被切割。在 WO 08037735 中公开了生产成熟胰岛素和在 B 链具有 C 末端延伸的胰岛素类似物的方法,所述 C 末端延伸被羧基肽酶除去。该方法的靶胰岛素产物可以是两条链的人类胰岛素或两条链的人类胰岛素类似物,其可以具有或不具有 B 链的短的 C 末端延伸。如果靶胰岛素产物在 B 链不具有 C 末端延伸,则所述 C 末端延伸应该能够在进一步纯化步骤之前从 B 链上被切割掉。

[0986] 通常通过羧基肽酶活性实现延伸的切除。通过这样的羧基肽酶活性催化的蛋白水解步骤可以这样进行:直接向发酵液中添加合适的酶类以处理结合至细胞分泌的前体分子的 B 链的 C 末端的剩余氨基酸残基。

[0987] 除了 B 链的 C 末端的延伸之外,可以进一步在 A- 和 / 或 B- 链对胰岛素分子进行修饰,只要这样的修饰对于靶胰岛素分子的胰岛素活性没有有害效应。

[0988] 本发明还涉及编码要求保护的胰岛素类似物的核酸序列。在进一步的实施方式中,本发明涉及包含这样的核酸序列的载体和包含这样的核酸序列或载体的宿主细胞。

[0989] 在另一个进一步的实施方式中,本发明涉及生产胰岛素类似物的方法,其包括 (i) 培养包含编码胰岛素前体的核酸序列的宿主细胞;(ii) 从培养基中分离胰岛素前体;和

(iii) 将胰岛素前体通过体外酶学转化方式转化为本发明的胰岛素类似物。

[0990] 在另一个进一步的实施方式中,本发明涉及生产胰岛素类似物的方法,其包括 (i) 培养包含编码胰岛素前体的核酸序列的宿主细胞;(ii) 从培养基中分离胰岛素前体;和 (iii) 将胰岛素前体转化为本发明的胰岛素类似物。

[0991] 在本发明的一个实施方式中,宿主细胞是酵母宿主细胞,在进一步的实施方式中,酵母宿主细胞选自酵母属。在进一步的实施方式中,酵母宿主细胞选自酿酒酵母种。

[0992] 药物组合物

[0993] 本发明的另一个目标是提供包含根据本发明的胰岛素类似物的药物组合物,所述胰岛素类似物以 0.1mg/ml 至 500mg/ml 的浓度存在,并且其中所述制剂的 pH 为 2.0 至 10.0。制剂可以进一步包含(一种或多种)蛋白酶抑制剂、缓冲剂系统、(一种或多种)防腐剂、(一种或多种)张度剂(tonicity agent)、(一种或多种)螯合剂、(多种)稳定剂和(多种)表面活性剂。在本发明的一个实施方式中,药物制剂是水性制剂,即包含水的制剂。这样的制剂通常是溶液或悬浮液。在本发明的进一步的实施方式中,药物制剂是水性溶液。术语“水性制剂”定义为包含至少 50% w/w 水的制剂。同样的,术语“水性溶液”定义为包含至少 50% w/w 水的溶液,术语“水性悬浮液”定义为包含至少 50% w/w 水的悬浮液。

[0994] 在另一个实施方式中,药物制剂是冷冻干燥的制剂,在使用之前医生或患者向其中加入溶剂和/或稀释剂。

[0995] 在另一个实施方式中,药物制剂是干燥的制剂(例如,冷冻干燥的或喷雾干燥的),不需要任何预先融化即可使用。

[0996] 在进一步的实施方式中,本发明涉及药物制剂,其包含本发明的胰岛素类似物的水性溶液和缓冲剂,其中所述胰岛素类似物以 0.1mg/ml 或更高的浓度存在,并且其中所述制剂的 pH 为 2.0 至 10.0。

[0997] 可以根据任何已知的方法制备意欲用于口服使用的制剂,这样的制剂可以包含一种或多种选自下列的试剂:甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂,以提供药学上雅致的和适口的制备物。药片可以包含活性成分与非毒性的药学上可接受的适合于生产药片的赋形剂的混合物。这些赋形剂可以是例如惰性稀释剂,例如甘露醇、麦芽糊精、高岭土、碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;制粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉;粘合剂,例如淀粉、白明胶、聚合物或阿拉伯树胶;和润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或云母。药片可以无包被或者它们可以通过已知的技术进行包被以延缓治疗活性多肽的崩解或释放。

[0998] 可以根据药物化学中熟知的方法来制备并给予本发明的口服给药的制剂,参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (A. Osol ed., 1985)。

[0999] 在本发明的一个实施方式中,本发明的药物组合物可以通过固体剂型例如药片和胶囊的方式给药。药片可以通过湿法制粒、干法制粒、直接压缩或熔融法制粒来制备。

[1000] 可以利用常规压片技术来制备用于本发明的药片。一般的生产方法包括将胰岛素类似物、水溶性稀释剂、亲水性粘合剂和任选的崩解剂的一部分混合。然后将该混合物与亲水性粘合剂的水溶液或亲水性粘合剂的水溶液和表面活性剂制成粒,如果需要的话,进行研磨。将粒进行干燥并减小至合适的尺寸。向粒中加入任何其它成分,例如润滑剂(例如硬脂酸镁)和另外的崩解剂并混合。然后将该混合物压缩至合适的尺寸并使用常规压片机器例如旋转药片压缩机将其塑形。可以通过本领域熟知的技术以薄膜将药片包被。

[1001] 用于口服使用的制剂还可以配制为硬的或软的白明胶胶囊,其中活性成分与惰性固体稀释剂例如如甘露醇、麦芽糊精、碳酸钙、碳酸钠、乳糖、高岭土、磷酸钙或磷酸钠混合;或者配制为软的白明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[1002] 可以利用常规方法来制备用于本发明的胶囊。一般的生产方法包括将治疗活性肽、藻酸盐、水溶性稀释剂、亲水性粘合剂和任选的崩解剂的一部分混合。然后将该混合物与亲水性粘合剂的水溶液或亲水性粘合剂的水溶液和水中的表面活性剂制成粒,如果需要的话,进行研磨。将粒进行干燥并减小至合适的尺寸。向粒中加入任何其它成分,例如润滑剂并混合。然后使用常规胶囊填充机器将得到的混合物填充至合适尺寸的硬壳白明胶胶囊中。

[1003] 在本发明的进一步的实施方式中,缓冲剂选自:醋酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、双甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、N-二(羟乙基)甘氨酸、三羟甲基甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特异性缓冲剂中的每一个构成本发明的可替换的实施方式。

[1004] 在本发明的进一步的实施方式中,制剂进一步包含药学上可接受的防腐剂。防腐剂以足以获得防腐效应的量存在。药物制剂中防腐剂的量对于本领域技术人员是熟知的,可以从例如本领域的文献中确定和/或从防腐剂例如商售产物的中的已知数量来确定。这些特异性防腐剂中的每一个构成本发明的可替换的实施方式。在药物组合物中使用防腐剂对于本领域技术人员是熟知的。可方便地参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[1005] 在本发明的进一步的实施方式中,制剂还包含螯合剂。在药物组合物中使用螯合剂对于本领域技术人员是熟知的。可方便地参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[1006] 在本发明的进一步的实施方式中,制剂还包含稳定剂。本文中使用的术语“稳定剂”是指向包含多肽的药物制剂中加入的、为了稳定该多肽即增加这样的制剂的保质期和/或使用时间的化学物质。在药物组合物中使用稳定剂对于本领域技术人员是熟知的。可方便地参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[1007] 在本发明的进一步的实施方式中,制剂还包含表面活性剂。本文中使用的术语“表面活性剂”是指由水溶性(亲水性)部分、头部、和脂溶性(亲脂性)部分组成的任何分子或离子。表面活性剂优选在界面处积累,其中亲水性部分朝向水(亲水相)而亲脂性部分朝向油或疏水相(即玻璃、空气、油等)。表面活性剂开始形成胶团的浓度被称为临界胶团浓度或 CMC。此外,表面活性剂降低液体的表面张力。表面活性剂还被称为两性化合物。术语“去污剂”一般用作表面活性剂的同义词。在药物组合物中使用表面活性剂对于本领域技术人员是熟知的。可方便地参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

[1008] 在本发明的进一步的实施方式中,制剂还包含蛋白酶抑制剂。

[1009] 其它成分也可以存在于本发明的胰岛素类似物药物制剂中。这样的另外的成分可以包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、膨胀剂、张度调节剂、螯合剂、金属离子、油质载体、蛋白

质（例如，人类血清白蛋白、白明胶或蛋白质）和两性离子（例如氨基酸，例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸）。当然，这样的另外的成分不应该对本发明的药物制剂的总体稳定性具有有害影响。

[1010] 可以在数个位点给予有此治疗需要的患者包含根据本发明的胰岛素类似物的药物组合物，所述位点是例如局部位点，例如皮肤和粘膜位点；旁路吸收位点，例如在动脉、静脉、心脏给药；涉及吸收的位点，例如在皮肤、皮肤以下、肌肉或腹部给药。

[1011] 可以通过数种给药途径给予有此治疗需要的患者根据本发明的药物组合物，例如，舌、舌下、口腔、口、口服、胃和肠、鼻、肺例如通过支气管和肺泡或其组合、表皮、真皮、透皮、阴道、直肠、眼例如通过结膜、输尿管和非肠道。

[1012] 可以以数种剂型给予本发明的组合物，例如，作为溶液、悬浮液、乳液、微乳液、多乳液、泡沫、油膏 (salve)、糊剂、硬膏剂 (plaster)、软膏、片剂、包衣片剂、润洗剂 (rinses)、胶囊例如硬白明胶胶囊和软白明胶胶囊、栓剂、直肠胶囊、滴液、凝胶、喷雾剂、粉末、气雾剂、吸入剂、眼滴液、眼膏、眼润洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道膏、注射溶液、原位转化溶液例如原位凝胶化、原位凝固、原位沉淀、原位结晶、灌注溶液和植入物。

[1013] 本发明的组合物还可以通过例如共价、疏水和静电相互作用配合于或附着于药物载体、药物递送系统和高级药物递送系统，从而进一步增强胰岛素类似物化合物的稳定性、提高生物利用度、增加溶解度、减少副作用、达到本领域技术人员熟知的慢性治疗、增加患者依从性或其任何组合。

[1014] 本发明的组合物可用于配制用于胰岛素类似物的肺部给药的固体、半固体、粉末和溶液，使用例如计量吸入器、干粉吸入器和喷雾器，所有这些设备对本领域技术人员都是熟知的。

[1015] 本发明的组合物还可用于配制控制释放的、持续释放的、延长释放的、延迟释放的、缓慢释放的药物递送系统。更特别的但不限于，组合物可用于配制本领域技术人员熟知的非肠道控制释放和持续释放系统（这两种系统皆造成给药次数的很多倍的减少）。更优选的是通过皮下给药的控制释放和持续释放系统。不限制本发明的范围，有用的控制释放系统和组合物的例子有水凝胶、油质凝胶、液晶、聚合物胶团、微球体、纳米颗粒。

[1016] 生产用于本发明的组合物的控制释放系统的方法包括但不限于，结晶、缩合、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀质、封装、喷雾干燥、微封装、凝聚、相分离、溶剂蒸发以产生微球体、挤出和超临界液体过程。一般的参考文献见 Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D. L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) 和 Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E. J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000)。

[1017] 非肠道给药可以通过皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射进行，使用注射器，任选为笔样注射器。或者，非肠道给药可以通过输液泵的方式进行。另一个选择是：组合物作为溶液或悬浮液以给予鼻或肺喷雾剂形式的胰岛素类似物化合物。作为另一个选择，包含本发明的胰岛素类似物化合物的药物组合物还可以适用于透皮给药，例如通过无针头注射或从贴片，任选为离子电渗法贴片或透过粘膜的，例如口腔给药。

[1018] 根据本发明的胰岛素类似物可以通过肺部途径给药：使用任意已知类型的适合于肺部药物递送的设备将其在载体中作为溶液、悬浮液或干粉给药。这些的例子包括但不

限于,产生气雾剂的用于肺部药物递送的三种一般类型,可以包括喷射或超声喷雾器、计量吸入器或干粉吸入器 (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery : Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453)。

[1019] 在进一步的实施方式中,可以通过任何已知的雾化技术例如气雾化将制剂雾化,以达到 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下的气雾剂颗粒的 MMAD,更优选为 $1\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$,最优选为 $1\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$ 。优选的颗粒尺寸是基于将药物递送至深肺的最有效的尺寸,其中蛋白质被最优化吸收 (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385)。

[1020] 任选地,可以通过使用吸入技术的改良进一步优化包含胰岛素类似物化合物的肺制剂的深肺沉积,例如,但不限于:缓慢吸入速率(例如 30L/ 分钟)、呼吸暂停 (breath-holding) 和定时刺激 (timing of actuation)。

[1021] 术语“稳定的制剂”是指具有增加的物理稳定性、增加的化学稳定性或增加的物理和化学稳定性的制剂。

[1022] 本文使用的蛋白制剂的术语“物理稳定性”是指:由于蛋白暴露于热-机械压力和/或与不稳定的界面和表面(例如疏水性表面和界面)的相互作用而导致蛋白形成生物学上无活性的和/或不可溶的蛋白聚集体的趋势。水性蛋白制剂的物理稳定性这样来评价:在不同的温度将填充在合适的容器(例如筒或管)中的制剂暴露于机械/物理压力(例如搅动)中持续不同的时间段,然后通过目测和/或混浊度测定的方式来评价物理稳定性。制剂的目测在具有黑暗背景的清晰聚焦光下进行。制剂的混浊度的特征在于对于浑浊程度等级的目视评分,例如从 0 至 3 的级别(显示没有浑浊的制剂对应于目视 0 分,在日光下显示出目视浑浊的制剂对应于目视 3 分)。当其在日光下显示出目视浑浊时,根据蛋白质的聚集情况将制剂分类为物理上不稳定的。或者,可以通过技术人员熟知的简单的混浊度测定来评价制剂的混浊度。还可以使用蛋白的构象状态的分光镜试剂或探针来评价水性蛋白制剂的物理稳定性。探针优选为小分子,其优先结合至蛋白的非天然构象。蛋白结构的小分子分光镜探针的一个例子是 Thioflavin T。Thioflavin T 是一种广泛用于检测淀粉质小纤维的荧光染料。在小纤维存在的情况下,并且还可能存在其它蛋白构象,当与小纤维蛋白形式结合时, Thioflavin T 在大约 450nm 处产生新的激发最大值;在大约 482nm 处产生增强的发射。在该波长,未结合的 Thioflavin T 基本上是无荧光的。

[1023] 其它小分子可用作蛋白结构从天然向非天然状态改变的探针。例如,优先与蛋白的暴露的疏水性缀片结合的“疏水性缀片”探针。疏水性缀片一般埋藏于蛋白质天然状态下的三级结构中,但是当蛋白开始打开折叠或变性时,其变得暴露。这些小分子分光镜探针的例子有芳香族疏水性探针,例如葱、吡啶、邻二氮杂菲等。其它的分光镜探针有金属-氨基酸复合物,例如疏水性氨基酸例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸和缬氨酸等的钴金属复合物。

[1024] 本文使用的蛋白制剂的术语“化学稳定性”是指:蛋白结构中的化学共价变化,其引起与天然蛋白结构相比具有潜在较低的生物效力和/或潜在升高的免疫原性特性的化学降解产物的形成。取决于天然蛋白的种类和性质以及该蛋白暴露的环境,可以形成各种化学降解产物。如本领域技术人员熟知的那样,化学降解的消除在很大程度上不可避免,在储存和使用蛋白制剂的过程中经常见到化学降解产物的数量的增加。多数蛋白易

于脱酰胺化,在该过程中谷氨酰胺或天冬酰胺残基中的侧链氨基基团被水解以形成自由羧基酸。其它的降解途径包括高分子量转化产物的形成,其中两个或更多个蛋白分子通过转酰胺作用和 / 或二硫键相互作用彼此共价结合从而引起共价结合的二体、寡聚体和多聚体降解产物的形成 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T. J. & Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。(例如蛋氨酸残基)的氧化可以被提及作为化学降解的另一种变体。可以在暴露于不同环境条件(通常例如升高的温度可以加速降解产物的形成)之后的不同时间点通过测定化学降解产物的量来评价蛋白制剂的化学稳定性。通常根据分子大小和 / 或电荷,通过使用各种层析技术(例如 SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC)分离降解产物来确定每种单独的降解产物的数量。

[1025] 因此,如上所述,“稳定的制剂”是指具有增加的物理稳定性、增加的化学稳定性或增加的物理和化学稳定性的制剂。一般而言,在使用和储存过程中(符合推荐的使用和储存条件),制剂必须是稳定的,直至到达失效期。

[1026] 在本发明的一个实施方式中,包含胰岛素类似物化合物的药物制剂在超过 6 周的使用和超过 3 年的储存中是稳定的。

[1027] 在本发明的另一个实施方式中,包含胰岛素类似物化合物的药物制剂在超过 4 周的使用和超过 3 年的储存中是稳定的。

[1028] 在本发明的进一步的实施方式中,包含胰岛素类似物化合物的药物制剂在超过 4 周的使用和超过 2 年的储存中是稳定的。

[1029] 在本发明的更进一步的实施方式中,包含胰岛素类似物化合物的药物制剂在超过 2 周的使用和超过 2 年的储存中是稳定的。

[1030] 水性悬浮液可以包含活性化合物与适合于生产水性悬浮液的赋形剂的混合物。

[1031] 油质悬浮液可以这样来配制:将活性成分悬浮于植物油中,例如落花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油,或悬浮于矿物油中,例如液体石蜡。油悬浮液可以包含增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂例如上面列出的那些,和矫味剂,以提供适口的口服制备物。可以通过加入抗氧化剂例如抗坏血酸使这些制剂防腐。

[1032] 适合于通过加水来制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒提供了活性化合物与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂的混合物。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂已经在本文中示例给出。另外的赋形剂,例如,甜味剂、矫味剂和着色剂也可以存在。

[1033] 包含用于根据本发明的用途的化合物的药物制剂也可以是水包油乳液的形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或落花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或其混合物。合适的乳化剂可以是天然产生的树胶,例如阿拉伯树胶或黄芪胶,天然产生的磷脂,例如大豆卵磷脂,和衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯类或部分酯类,例如单油酸山梨糖醇酯,和所述部分酯类与氧化乙烯的缩合产物,例如聚氧乙烯单油酸山梨糖醇酯。乳液还可以包含甜味剂和矫味剂。

[1034] 糖浆和酏剂可以使用甜味剂来配制,例如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖。这样的制剂还可以包含缓和剂、防腐剂和矫味剂和着色剂。

[1035] 在本发明的进一步的实施方式中,制剂还包含渗透增强剂。胆汁盐和脂肪酸最经常考虑被用于增强胃肠道的上皮细胞线的脂双层膜的口服渗透性。一般而言,渗透增强剂通过可逆地改变膜的完整性而增加大分子的细胞旁路和跨细胞转运。胆汁盐选自胆酸盐、

脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐、甘胆酸盐、牛磺脱氧胆酸盐、熊脱氧胆酸盐、牛磺熊脱氧胆酸盐和鹅脱氧胆酸盐。脂肪酸选自短链、中链和长链脂肪酸，例如辛酸、癸酸、十二烷酸、十四烷酸、棕榈酸、硬脂酸等。其它的增强剂可以是表面活性剂，例如甘油一酸酯、聚氧乙烯酯、山梨聚糖表面活性剂（非离子型）和硫酸盐（阴离子型）。

[1036] 在本发明的进一步的实施方式中，制剂还包含粘膜吸附聚合物。可以通过使用这样的粘膜吸附聚合物获得药物递送系统与胃肠道粘膜的紧密接触。剂型与膜的紧密接触似乎是有利的，因为可以避免治疗活性多肽在递送系统和吸收膜之间的路途上的酶学降解。此外，可以提供吸收膜上的跨度浓度梯度，其代表了被动药物摄取的驱动力。

[1037] 在本发明的进一步的实施方式中，制剂还包含（一种或多种）蛋白水解酶的抑制剂以进一步避开酶屏障并达到治疗活性多肽的递送，所述蛋白水解酶抑制剂例如氨基肽酶抑制剂、抑氨肽酶素、贝他定、boroleucine 和嘌呤霉素。蛋白酶抑制剂的例子有乙醇酸钠、甲磺酸卡莫司他、杆菌肽、大豆胰蛋白酶抑制剂和抑肽酶。

[1038] 包埋和封装是用于治疗活性多肽的药物递送系统中使用的技术，其优化递送性质，包括抵抗酶降解的保护。包埋和封装可以是聚合物药物递送系统的形式，例如水凝胶和纳米微囊 / 微球体，和液体药物递送系统例如脂质体和微乳液。

[1039] 本发明的制剂可以以几种剂型来给药，例如作为溶液、悬浮液、微和纳米悬浮液、乳液、微乳液、多乳液、泡沫、油膏、糊剂、软膏、药片、包衣片剂、发泡药片、舌下药片、口腔药片、胶囊例如硬的白明胶胶囊和软的白明胶胶囊、粉末、颗粒、原位转化溶液例如原位凝胶化、原位凝固、原位沉淀、原位结晶、胃漂浮制剂例如漂浮悬浮液、漂浮药片等。

[1040] 在另一个实施方式中，本发明涉及根据本发明的胰岛素类似物作为药物的用途。

[1041] 术语“糖尿病”或“糖尿病”包括 1 型糖尿病、2 型糖尿病、妊娠糖尿病（怀孕期间）和其它引起高血糖症的病况。该术语用于这样的代谢失调：其中胰腺产生不足量的胰岛素，或者其中身体的细胞不能对胰岛素产生正确的应答，因此，阻止了细胞吸收葡萄糖。结果是，葡萄糖在血液中累积。

[1042] 1 型糖尿病，也称为胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）和幼发性糖尿病，是由 B 细胞的破坏引起的，通常引起绝对的胰岛素缺乏。

[1043] 2 型糖尿病，也称为非胰岛素依赖性糖尿病（NIDDM）和成年发作的糖尿病，其与主导性胰岛素抗性和由此导致的相对胰岛素缺乏和 / 或具有胰岛素抗性的主导性胰岛素分泌缺乏相关。

[1044] 在一个实施方式中，根据本发明的胰岛素类似物用于制备药物，所述药物用于治疗或预防高血糖症包括应激性高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良、1 型糖尿病、和烧伤、手术创伤和其它的在治疗中需要合成代谢效应的疾病或损伤、心肌梗塞、中风、冠心病和其它心血管失调，以及治疗严重的糖尿病和非糖尿病患者。

[1045] 在另一个实施方式中，根据本发明的胰岛素类似物用作延缓或预防 2 型糖尿病疾病进展的药物。

[1046] 在本发明的一个实施方式中，提供了根据本发明的胰岛素类似物用作药物，所述药物用于治疗或预防高血糖症包括应激性高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良、1 型糖尿病、和烧伤、手术创伤和其它的在治疗中需要合成代谢效应的疾病或损伤、心肌梗塞、中风、冠心病和其它心血管失调。

[1047] 在本发明的一个进一步的实施方式中,提供了治疗或预防高血糖症包括应激性高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐受不良、1 型糖尿病、和烧伤、手术创伤和其它的在治疗中需要合成代谢效应的疾病或损伤、心肌梗塞、冠心病和其它心血管失调、中风的方法,所述方法包括给予有此治疗需要的患者对于此种治疗有效量的根据本发明的胰岛素类似物。

[1048] 使用根据本发明的胰岛素类似物的治疗还可以与第二种或更多种药理学活性物质组合,例如选自抗糖尿病试剂、抗肥胖试剂、调节食欲的试剂、抗高血压试剂、用于治疗 and / 或预防糖尿病引起的或与之相关的并发症的试剂以及用于治疗 and / 或预防肥胖引起的或与之相关的并发症和失调的试剂。这些药理学活性物质的例子有:GLP-1 和 GLP-1 的衍生物和类似物、GLP-2 和 GLP-2 的衍生物和类似物、Exendin-4 和 Exendin-4 的衍生物和类似物、胰淀素 (amylin) 和胰淀素的衍生物和类似物、磺脲、双胍、美格列奈、葡萄糖苷酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂、DPP-IV (二肽基肽酶 IV) 抑制剂、参与刺激糖质新生和 / 或肝糖水解的肝酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、调节脂代谢的化合物 (例如抗高脂试剂,例如 HMG CoA 抑制剂 (他丁类))、降低食物摄取的化合物、RXR 激动剂和作用于 β -细胞的 ATP 依赖性的钾通道的试剂;考来烯胺、考来替泊、氯贝丁酯、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考、右旋甲状腺素钠、那格列奈、瑞格列奈; β -阻滞剂 (例如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛和美托洛尔)、ACE (血管紧张素转化酶) 抑制剂 (例如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、alatriopril、喹那普利和雷米普利)、钙离子通道阻滞剂 (例如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米) 和 α -阻滞剂 (例如多沙唑啉、乌拉地尔、哌唑啉和特拉唑啉);CART (可卡因安非他明调控的转录本) 激动剂、NPY (神经肽 Y) 拮抗剂、MC4 (黑素皮质素 4) 激动剂、阿立新拮抗剂、TNF (肿瘤坏死因子) 激动剂、CRF (促肾上腺皮质激素释放因子) 激动剂、CRF BP (促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白) 拮抗剂、urocortin 激动剂、 β 3 激动剂、MSH (黑素细胞刺激性激素) 激动剂、MCH (黑素细胞浓缩性激素) 拮抗剂、CCK (缩胆囊素) 激动剂、5-羟色胺重摄取抑制剂、5-羟色胺和去甲肾上腺素重摄取抑制剂、混合的 5-羟色胺和产生去甲肾上腺素的化合物、5HT (5-羟色胺) 激动剂、蛙皮素激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH (促甲状腺激素释放激素) 激动剂、UCP 2 或 3 (未偶联的蛋白 2 或 3) 调节剂、瘦素激动剂、DA 激动剂、(溴隐亭、doprexin)、脂酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR (类维生素 A X 受体) 调节剂、TR β 激动剂、组胺 H3 拮抗剂、胃泌激素和胃泌激素类似物和衍生物。

[1049] 应该理解:根据本发明的变体与一种或多种以上提及的化合物和任选的一种或多种另外的药理学活性物质的任何合适的组合被认为落在本发明的范围内。

[1050] 本文引用的所有的参考文献,包括公开物、专利申请和专利,皆通过引用以其全文并入本文,仿佛达到等同于每篇参考文献均单独且明确地被指明通过引用并入并以其全文列出的程度 (达到法律允许的最大程度)。

[1051] 本文使用的所有标题和小标题仅仅是为了方便起见,不应该被解释为以任何方式限制本发明。

[1052] 本文提供的任何和所有例子或示例性语言 (例如,“例如”) 的使用仅仅旨在更好的解释本发明,除非另有要求,否则对本发明的范围不具有限制作用。本说明书中的任何语言皆不应被解释为表示任何未要求保护的元素对于实施本发明是必不可少的。

[1053] 在本文中列举和并入专利文献仅仅是为了方便起见,不反映关于这些专利文献的

有效性、可专利性和 / 或实施性的任何观点。

[1054] 本发明包括随附的由适用的法律允许的权利要求中记载的主题的所有修饰和等同物。

实施例

[1055] 实施例 1

[1056] 胰岛素类似物和人类胰岛素对于胃蛋白酶的蛋白水解稳定性 (半衰期)

[1057] 在 37°C 在 10mM HCl, pH 2.0 以 100 μ L 的最终体积孵育之后, 测定人类胰岛素和胰岛素类似物 (0.06mM, 10 μ L) 对于胃蛋白酶的蛋白水解稳定性。在不同的时间 (0、5、15、30 和 60 分钟) 使用等体积的 0.1M TrisHCl, pH8.0 (最终 pH 7.7) 将样品淬灭并转移至 5°C。制备参考样品 (0 分钟), 其中不加入酶。立即通过 RP-HPLC 在 214nm 处分析人类胰岛素和胰岛素类似物并确定对应于完整蛋白的峰下的面积。从曲线获得以分钟测定的半衰期 ($T_{1/2}$) 并计算相对于人类胰岛素 (用作每个实验的内参) 的倍数升高 / 降低 (稳定性相对倍数)。

[1058] 在稳定性分析中测试胰岛素类似物, 通过根据上述方法获得的升高的半衰期鉴定对蛋白水解消化表现出增强的抗性的类似物。结果证明了由于对蛋白水解降解的抗性增加和改善的溶解性而具有增加的生物利用度的进一步改进的胰岛素类似物的潜力。测试了以下胰岛素类似物与人类胰岛素相比针对胃蛋白酶的稳定性。

[1059] 表 1

[1060]

胰岛素类似物	$T_{1/2}$ [分钟] (倍) 胃蛋白酶
A14H, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素	173.3 (258.6)
A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	385.1 (555.6)
A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	239 (344.8)
人类胰岛素	0.67 (1)

[1061] 实施例 2

[1062] 选择的本发明的胰岛素类似物的胰岛素受体亲和性

[1063] 通过 SPA 分析 (Scintillation Proximity Assay) 微量滴定板抗体捕获分析确定本发明的胰岛素类似物对于人类胰岛素受体的亲和性。将 SPA-PVT 抗体结合珠子、抗小鼠反应剂 (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) 与 25ml 结合缓冲液 (100mM HEPES pH 7.8; 100mM 氯化钠, 10mM $MgSO_4$, 0.025% Tween-20) 混合。用于单一 Packard Optiplat (Packard No. 6005190) 的反应剂混合物由下列组成: 2.4 μ L 1:5000 稀释的纯

化的重组人胰岛素受体（具有或不具有外显子 11）、一定数量的 A14Tyr^[125I]- 人类胰岛素贮存液（其对应于 5000cpm/100 μl 的反应剂混合物）、12 μl 1 : 1000 稀释的 F12 抗体、3mlSPA-珠子和结合缓冲液，总共为 12ml。然后将总共 100 μl 反应剂混合物加入到 Packard Optiplat 的每个孔中，从 Optiplat 中的合适的样品中制备胰岛素衍生物的系列稀释物。然后将样品孵育 16 小时，轻轻摇动。然后通过离心 1 分钟分离相并将板置于 Topcounter 中。使用 GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) 中的非线性回归算法拟合结合数据，亲和性表示为相对于人类胰岛素的亲和性的相对值（以百分率 % 表示）。

[1064] 表 2. 选择的本发明的胰岛素类似物的胰岛素受体亲和性

[1065]

胰岛素类似物	胰岛素受体相对结合 亲和力 (%)
A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	7.61
A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素	59.25
A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	67.09
A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	81.11
A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	0.9
A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素	24.6
A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素	60.67
A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	0.59
A14E, A21G, B25H, desB30 人类胰岛素	13.12
A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	1.9

[1066]

A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	2
A14P, B25H, desB30 人类胰岛素	14
A14E, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	79
A14E, A15E, B25H, desB30 人类胰岛素	23
A14E, B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素	16.5
A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素	144
A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素	136
A8H, A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素	24
A8H, A14H, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素	27
A14E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	26.05
A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	4.61
A14E, B25H, B28G, desB30 人类胰岛素	18.4
A14E, B25H, B26G, B27G, B28K, desB30 人类胰岛素	69.54
A14E, B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素	16.48
A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素	22.71
A14K, B25H, B29R 人类胰岛素	11

[1067] 实施例 3

[1068] 使用十二指肠腔酶降解胰岛素类似物

[1069] 使用来自 SPD 大鼠的十二指肠腔酶（通过过滤十二指肠腔的内容物来制备）降解胰岛素类似物。在 96 孔板（2ml）中以自动机械进行该分析，其中有 16 个孔可用于胰岛素类似物和标准物。在 37°C 在 100mM Hepes, pH = 7.4 中以十二指肠酶孵育 ~ 15 μ M 的胰

胰岛素类似物,在 1、15、30、60、120 和 240 分钟后取出样品,通过加入 TFA 使反应淬灭。通过 RP-HPLC 分析每个点的完整的胰岛素类似物。通过数据的指数拟合并按照每个分析中对于参考胰岛素或人类胰岛素所测的半衰期进行校正,从而确定降解半衰期。为降解加入的酶的量是这样的:使参考胰岛素的降解半衰期介于 60 至 180 分钟之间。结果表述为大鼠十二指肠中胰岛素类似物的降解半衰期除以来自相同实验的参考胰岛素的降解半衰期(相对降解速率)。

[1070] 表 3.

[1071]

胰岛素类似物	十二指肠降解 相对于人类胰岛素的 稳定性
B27K, desB28,desB29,desB30 人类胰岛素	1.1
A14E, B27K, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	3.3
A14E, A15E, B25H, desB30 人类胰岛素	17.6
A14E, B25H, B26E, B27E, desB30 人类胰岛素	11.55
A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	0.88
A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 人类胰岛素	0.88
A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素	8.14
A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G,B28G, desB30 人类胰岛素	14.85
A8H, A14E, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素	11.55

[1072]

A8H, A14H, B16H, B25H, desB30 人类胰岛素	3.3
A14E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	9.9
A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	4.4
A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	6.6
A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素	8.25
A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	7.15
A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	9.9
A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 人类胰岛素	4.4
A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	7.15
A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30 人类胰岛素	20.9
A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30 人类胰岛素	17.05
A14E, A21G, B25H, desB30 人类胰岛素	6.6
A14P, B25H, desB30 人类胰岛素	0
A14E, B25H, B28G, desB30 人类胰岛素	6.05
A14E, B25H, B26G, B27G, B28K, desB30 人类胰岛素	7.7
A14E, B25H, B27G, B28G, desB30 人类胰岛素	11

[1073]

A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30 人类胰岛素	8.25
A14E, B24G, B25H, desB30 人类胰岛素	2.5

[0001]

序列表

- <110> 诺沃—诺迪斯克有限公司 (NOVO NORDISK A/S)
- <120> 蛋白酶稳定的胰岛素类似物
- <130> 7781.204-W0
- <150> EP 08102598.3
- <151> 2008-03-14
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 修饰的胰岛素 A 链
- <220>
- <221> 杂项特征
- <222> (8).. (8)
- <223> Xaa 是 Thr 或 His
- <220>
- <221> 杂项特征
- <222> (14).. (14)
- <223> Xaa 是 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Gln 或 Glu
- <220>
- <221> 杂项特征
- <222> (15).. (15)
- <223> Xaa 是 Gln 或 Glu
- <220>
- <221> 杂项特征
- <222> (21).. (21)
- <223> Xaa 是 Asn、Gln、Gly 或 Ala
- <220>

[0002]

<221> 杂项特征
<222> (22).. (22)
<223> Xaa 不存在或是 Lys

<400> 1

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Xaa	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Leu
1				5				10					15		

Glu	Asn	Tyr	Cys	Xaa	Xaa
				20	

<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 修饰的胰岛素 B 链

<220>
<221> 杂项特征
<222> (3).. (3)
<223> Xaa 是 Asn、Gln、Gly 或 Ala

<220>
<221> 杂项特征
<222> (10).. (10)
<223> Xaa 是 His、Glu 或 Asp

<220>
<221> 杂项特征
<222> (16).. (16)
<223> Xaa 是 Tyr、Asp、His 或 Glu

<220>
<221> 杂项特征
<222> (22).. (22)
<223> Xaa 不存在或是 Arg 或 Lys

<220>

[0003]

<221> 杂项特征
<222> (24).. (24)
<223> Xaa 不存在或是 Phe、Gly 或 His

<220>
<221> 杂项特征
<222> (25).. (25)
<223> Xaa 不存在或是 Phe、Asn、Ala 或 His

<220>
<221> 杂项特征
<222> (26).. (26)
<223> Xaa 不存在或是 Tyr、Gly、Glu 或 Lys

<220>
<221> 杂项特征
<222> (27).. (27)
<223> Xaa 不存在或是 Gly、Lys 或 Thr

<220>
<221> 杂项特征
<222> (28).. (28)
<223> Xaa 不存在或是 Pro、Gly、His、Lys、Asp 或 Glu

<220>
<221> 杂项特征
<222> (29).. (29)
<223> Xaa 不存在或是 Lys

<400> 2

Phe Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser Xaa Leu Val Glu Ala Leu Xaa
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 3
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工的

[0004]

<220>

<223> 修饰的胰岛素 A 链

<220>

<221> 杂项特征

<222> (14).. (14)

<223> Xaa 是 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Gln 或 Glu

<220>

<221> 杂项特征

<222> (15).. (15)

<223> Xaa 是 Gln 或 Glu

<220>

<221> 杂项特征

<222> (21).. (21)

<223> Xaa 是 Asn、Gln、Gly 或 Ala

<220>

<221> 杂项特征

<222> (22).. (22)

<223> Xaa 不存在或是 Lys

<400> 3

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Leu
1				5					10					15	

Glu	Asn	Tyr	Cys	Xaa	Xaa
					20

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的胰岛素 B 链

<220>

[0005]

- <221> 杂项特征
<222> (3).. (3)
<223> Xaa 是 Asn、Gln、Gly 或 Ala
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (16).. (16)
<223> Xaa 是 Tyr、Asp、His 或 Glu
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (22).. (22)
<223> Xaa 不存在或是 Arg 或 Lys
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (24).. (24)
<223> Xaa 不存在或是 Phe、Gly 或 His
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (25).. (25)
<223> Xaa 不存在或是 Phe、Asn、Ala 或 His
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (26).. (26)
<223> Xaa 不存在或是 Tyr、Gly、Glu 或 Lys
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (27).. (27)
<223> Xaa 不存在或是 Gly、Lys 或 Thr
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (28).. (28)
<223> Xaa 不存在或是 Pro、Gly、His、Lys、Asp 或 Glu
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (29).. (29)
<223> Xaa 不存在或是 Lys

[0006]

<400> 4

Phe Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的胰岛素 A 链

<220>

<221> 杂项特征

<222> (14).. (14)

<223> Xaa 是 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Gln 或 Glu

<220>

<221> 杂项特征

<222> (21).. (21)

<223> Xaa 是 Asn、Gln、Gly 或 Ala

<220>

<221> 杂项特征

<222> (22).. (22)

<223> Xaa 不存在或是 Lys

<400> 5

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Xaa Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa
20

[0007]

- <210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的
- <220>
<223> 修饰的胰岛素 B 链
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (3).. (3)
<223> Xaa 是 Asn、Gln、Gly 或 Ala
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (16).. (16)
<223> Xaa 是 Tyr、Asp、His 或 Glu
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (24).. (24)
<223> Xaa 不存在或是 Phe、Gly 或 His
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (25).. (25)
<223> Xaa 不存在或是 Phe、Asn、Ala 或 His
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (26).. (26)
<223> Xaa 不存在或是 Tyr、Gly、Glu 或 Lys
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (27).. (27)
<223> Xaa 不存在或是 Gly、Lys 或 Thr
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (28).. (28)
<223> Xaa 不存在或是 Pro、Gly、His、Lys、Asp 或 Glu

[0008]

<220>

<221> 杂项特征

<222> (29).. (29)

<223> Xaa 不存在或是 Lys

<400> 6

Phe Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的胰岛素 A 链

<220>

<221> 杂项特征

<222> (14).. (14)

<223> Xaa 是 Asp、His、Lys、Arg、Pro 或 Glu

<220>

<221> 杂项特征

<222> (22).. (22)

<223> Xaa 不存在或是 Lys

<400> 7

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Xaa Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn Xaa
20

[0009]

- <210> 8
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的
- <220>
<223> 修饰的胰岛素 B 链
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (16).. (16)
<223> Xaa 是 Tyr、Asp、His 或 Glu
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (24).. (24)
<223> Xaa 是 Phe 或 His
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (25).. (25)
<223> Xaa 是 Phe 或 His
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (26).. (26)
<223> Xaa 是 Tyr、Gly 或 Glu
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (27).. (27)
<223> Xaa 不存在或是 Gly、Lys 或 Thr
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (28).. (28)
<223> Xaa 不存在或是 Pro、Gly、His、Lys、Asp 或 Glu
- <220>
<221> 杂项特征
<222> (29).. (29)
<223> Xaa 不存在或是 Lys

[0010]

<400> 8

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的胰岛素 A 链

<220>

<221> 杂项特征

<222> (14)..(14)

<223> Xaa 是 Asp、His、Lys、Arg、Pro、Gln 或 Glu

<400> 9

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Xaa Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的胰岛素 B 链

<220>

[0011]

<221> 杂项特征
<222> (24).. (24)
<223> Xaa 是 Phe 或 His

<220>
<221> 杂项特征
<222> (25).. (25)
<223> Xaa 是 Phe 或 His

<220>
<221> 杂项特征
<222> (26).. (26)
<223> Xaa 是 Tyr、Gly、Glu 或 Lys

<220>
<221> 杂项特征
<222> (27).. (27)
<223> Xaa 不存在或是 Gly、Lys 或 Thr

<220>
<221> 杂项特征
<222> (28).. (28)
<223> Xaa 不存在或是 Pro、Gly、His、Lys、Asp 或 Glu

<220>
<221> 杂项特征
<222> (29).. (29)
<223> Xaa 不存在或是 Lys

<400> 10

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25