(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115385843 A
(43)申请公布日 2022.11.25

(21)申请号 202210567043.2

(22)申请日 2022.05.23

(66)本国优先权数据
202110570030.6 2021.05.24 CN

(71)申请人 广东东阳光药业有限公司
地址 523808 广东省东莞市松山湖园区工业北路1号

(72)发明人 郑宝液 雷丹 王海刚 林树珊 詹志柱 王茜 刘秋燕 胡杨凌 杨子兰 蒋燕 李文佳

(51)Int.Cl.
C07D 207/46(2006.01)
C07K 14/62(2006.01)
A61K 38/28(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)

权利要求书8页 说明书31页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种新型的酰化胰岛素类似物

(57)摘要

本发明提供了一种新型的酰化的胰岛素类似物,具体提供了一种可以用于制备酰化胰岛素类似物的侧链化合物、酰化胰岛素类似物及其药物组合物、制药用途、给药方法和制备方法。本发明的酰化胰岛素类似物可用于治疗糖尿病,具有作为周制剂或更长效的胰岛素制剂的作用,可一周一次或更低频率用于治疗,增加糖尿病患者的顺应性。

CN 115385843 A

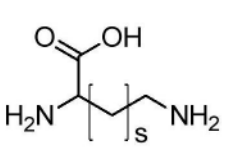
1.一种新型的侧链化合物，具有式(1)所示的结构：

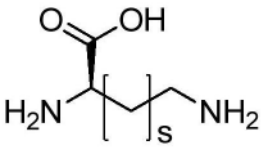
W-X-Y-Z-R　　(I)

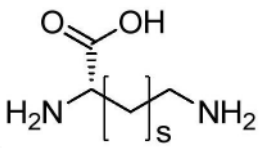
其中：

W为具有10-20个碳原子的脂肪酸或脂肪二酸，结构为-CO(CH$_2$)$_n$COOH的，n为10-20之间整数；

X为含羧酸基团的二氨基化合物，其中连接羧酸基团上的碳原子可为手性碳或为非手性碳，具有式(a1)、(a2)和(a3)所示的结构，



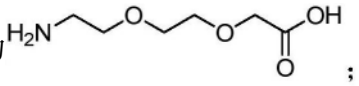
（a1）或


（a2）或


（a3）

其中s为2-20的整数，优选为2-10，更优选为2-8，X以其氨基之一与W中的一个酰基连接形成酰胺键；

Y为-A(CH$_2$)$_m$B-，其中m为1-10的整数，优选为1-6的整数，A和B不存在或-CO-；

Z为-(OEG)$_p$，p为1-3的整数，优选为2，所述的OEG结构为

；

R为离去基团，优选为活化酯基团；

W、X、Y和Z之间的连接基为酰胺肽键或肽键。

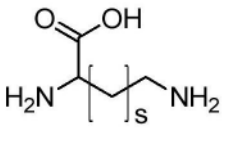
2.一种新型的侧链化合物，具有式(1)所示的结构：

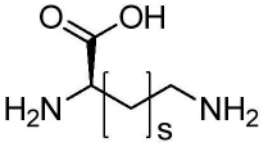
W-X-Y-Z-R　　(I)

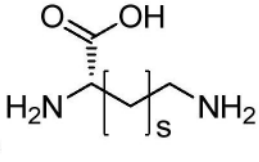
其中：

W为具有10-20个碳原子的脂肪酸或脂肪二酸，结构为-CO(CH$_2$)$_n$COOH的，n为10-20之间整数；

X为含羧酸基团的二氨基化合物，其中连接羧酸基团上的碳原子可为手性碳或为非手性碳，具有式(a1)、(a2)和(a3)所示的结构，



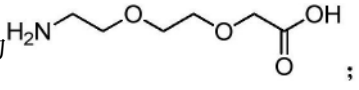
（a1）或


（a2）或


（a3）

其中s为2-20的整数，优选为2-10，更优选为2-8，X以其氨基之一与W中的一个酰基连接形成酰胺键；

Y为-A(CH$_2$)$_m$B-，其中m为1-10的整数，优选为1-6的整数，A和B不存在或-CO-；

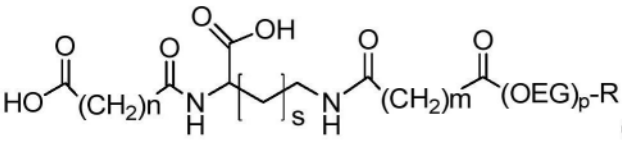
Z为-(OEG)$_p$，p为4-30的整数，所述的OEG结构为

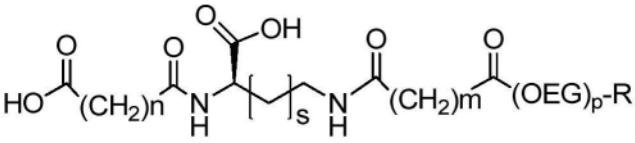
；

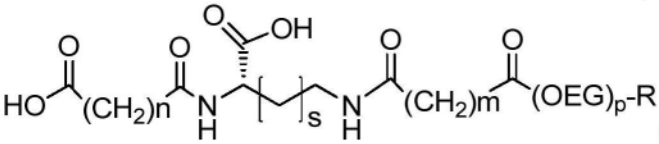
R为离去基团，优选为活化酯基团；

W、X、Y和Z之间的连接基为酰胺肽键或肽键。

3.根据权利要求1所述的化合物，其具有如下结构式：

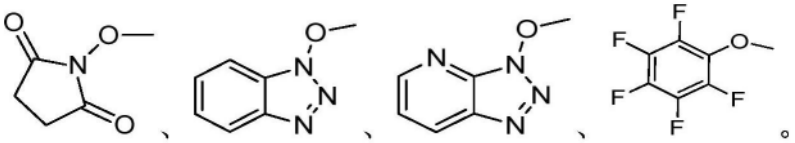

(b1)或


(b2)或

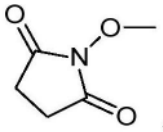

(b3)

其中,n为14-20的整数,s为2-4的整数,m为1-4的整数,p为2,

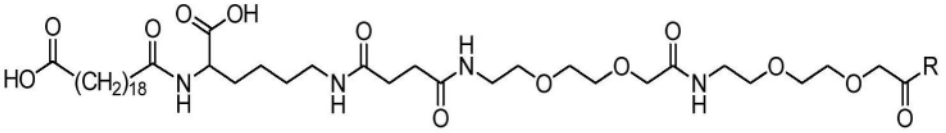
R选自以下基团:

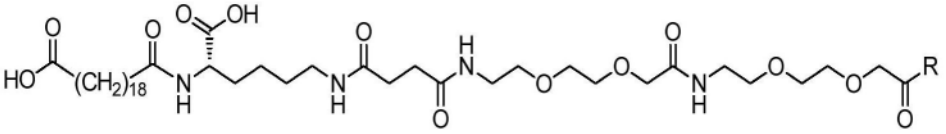


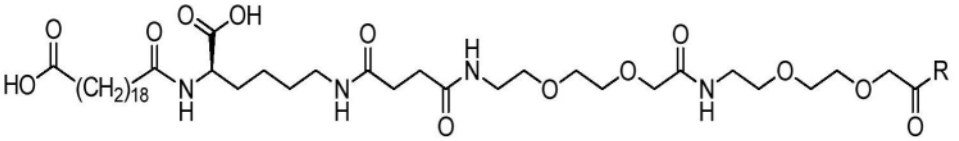
优选地,n为16-18的整数,s为2-4的整数,m为2,p为2,

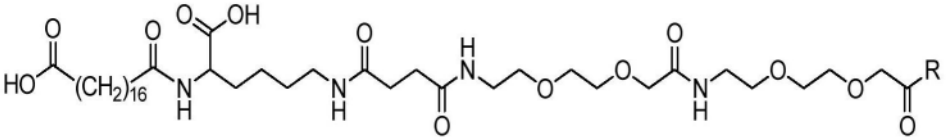
优选地,R是基团:。

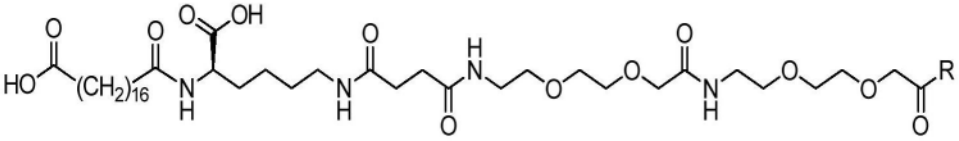
4.根据权利要求1-3任一所述的化合物,其可选自下述化合物中的任一种:

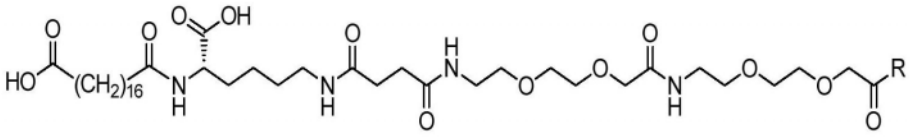

(1)、

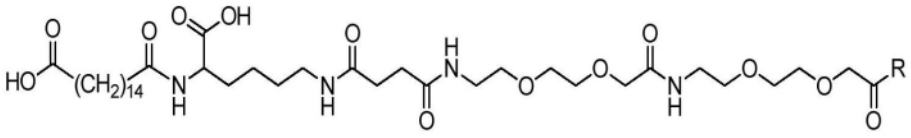

(2)、

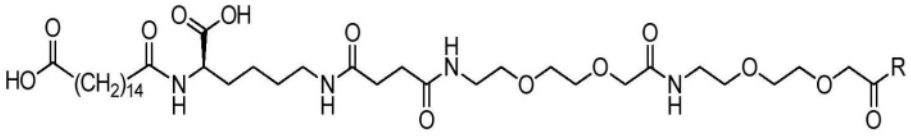

(3)、

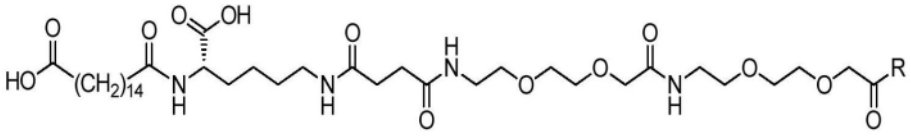

(4)、

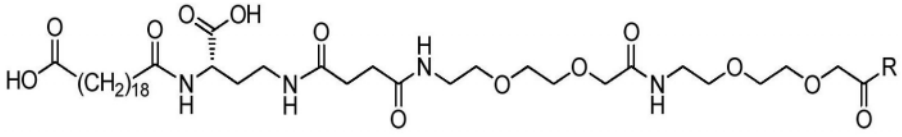

(5)、

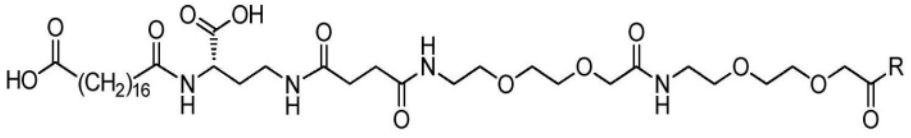

（6）、

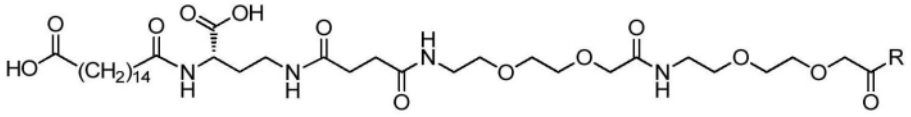

（7）、

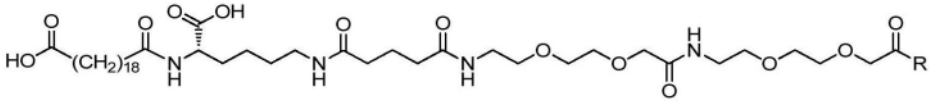

（8）、

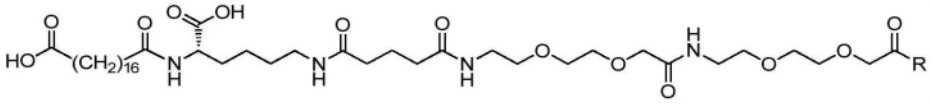

（9）、

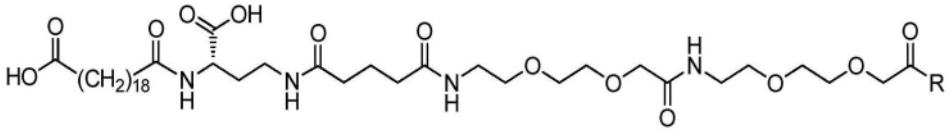

（10）、

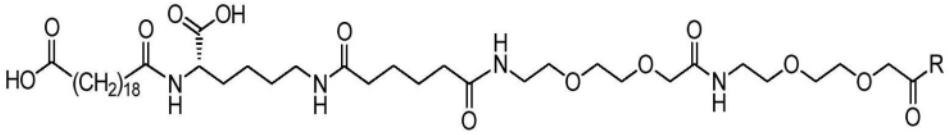

（11）、

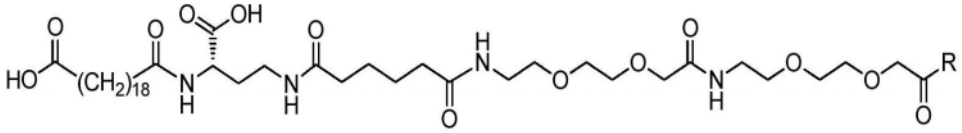

（12）、

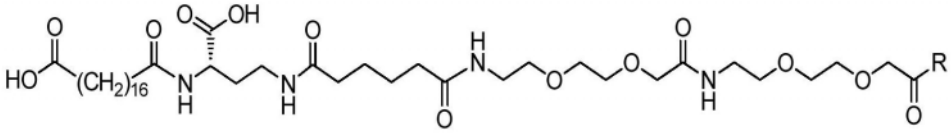

（13）、

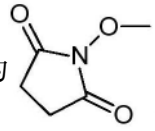

（14）、


（15）、

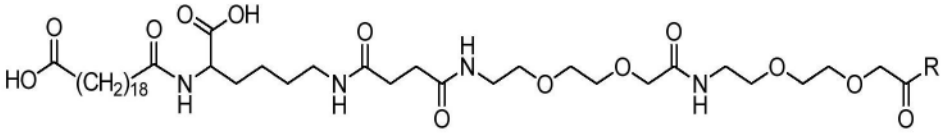

（16）、

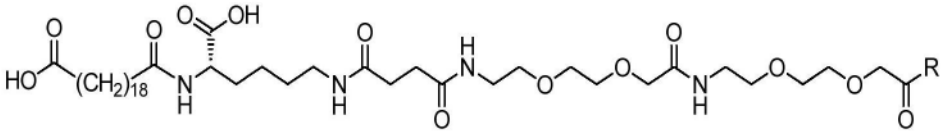

（17）、

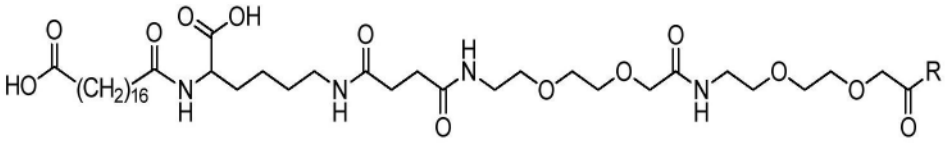

（18）、

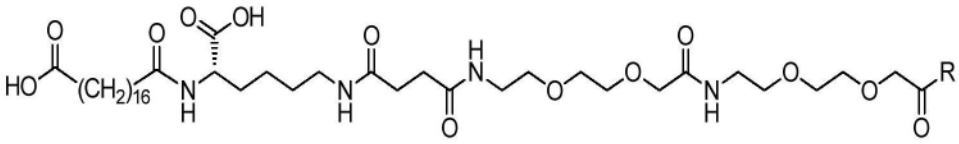
其中,R基为  ;

优选地,所述化合物具有如下结构式:

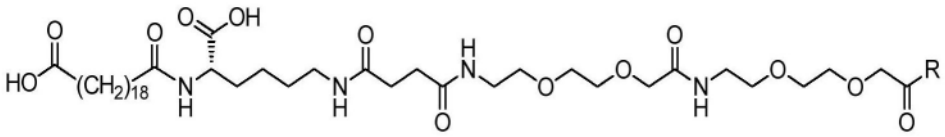
 (1)、

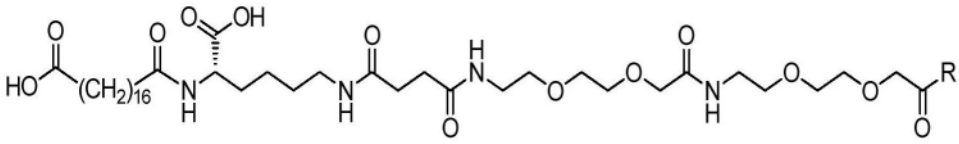
 (2)、

 (4)、

 (6);

更优选地,所述化合物具有如下结构式:

 (2)、

 (6)。

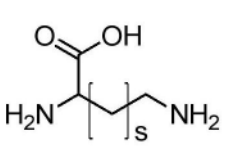
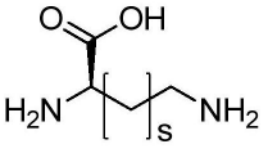
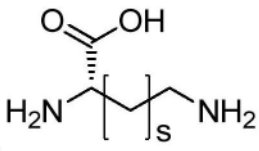
5.一种新型的酰化胰岛素类似物,其特征在于,由权利要求1-5中任一所述的侧链化合物与人胰岛素类似物经过酰化反应而得到,结构如式(II)所示:

W-X-Y-Z-M　(II)

其中:

W为具有10-20个碳原子的脂肪酸或脂肪二酸,结构为-CO(CH$_2$)$_n$COOH的,n为10-20之间整数;

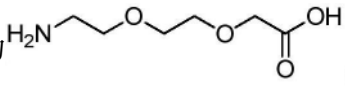
X为含羧酸基团的二氨基化合物,其中连接羧酸基团上的碳原子可为手性碳或为非手性碳,具有式(a1)、(a2)和(a3)所示的结构

 (a1)或  (a2)或  (a3)

其中s为2-20的整数,优选为2-10,更优选为2-8,X以其氨基之一与W中的一个酰基连接

形成酰胺键；

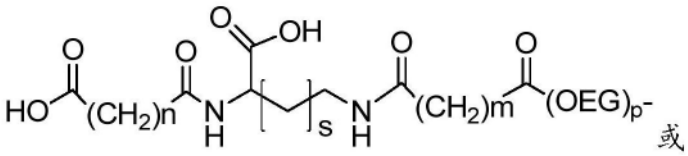
Y为-A$(CH_2)_m$B-，其中m为1-10的整数，优选为1-6的整数，A和B不存在或为-CO-；

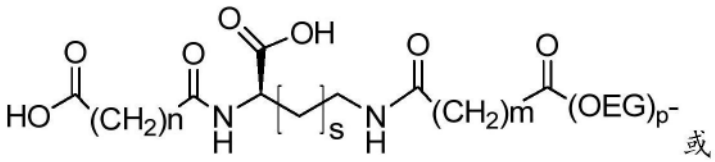
Z为-$(OEG)_p$，p为1-3的整数，优选为2，所述的OEG结构为；

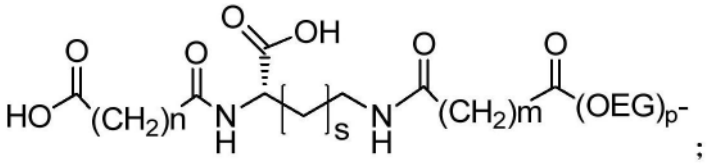
W、X、Y和Z之间的连接基为酰胺键或肽键；

M为人胰岛素类似物。

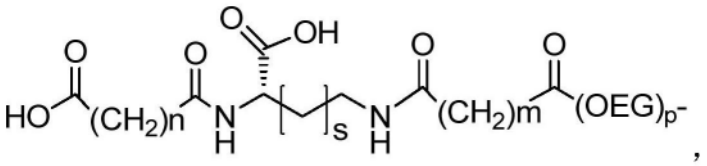
6.根据权利要求5所述的酰化胰岛素类似物，其特征在于，所述的侧链化合物具有如下结构：

或

或

；

优选地，所述的侧链化合物具有如下结构：

，

其中，n为14-20的整数，s为2-8的整数，m为1-6的整数，p为1-3的整数。

7.根据权利要求5所述的酰化胰岛素类似物，其中，所述的人胰岛素类似物M具有A链和B链，A链氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示，B链氨基酸序列如SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3所示；

优选地，人胰岛素类似物通过B29位赖氨酸残基的ε氮与侧链化合物以酰胺键连接。

8.根据权利要求4所述的酰化胰岛素类似物，其具有如下结构式：

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_n$CO-NHC(COOH)$(CH2)_S$$CH_2$NH-CO$(CH_2)_m$CO-$(OEG)_p$),desB30人胰岛素类似物，或，

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_n$CO-NHC(COOH)$(CH2)_S$$CH_2$NH-CO$(CH_2)_m$CO-$(OEG)_p$),desB30人胰岛素类似物；

其中，n为14-20的整数，s为2-8的整数，m为1-6的整数，p为2。

9.根据权利要求4所述的酰化胰岛素类似物，其具有如下结构式：

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_n$CO-NHC(COOH)$(CH2)_S$$CH_2$NH-CO$(CH_2)_m$CO-$(OEG)_p$),desB30人胰岛素类似物，或，

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_n$CO-NHC(COOH)$(CH2)_S$$CH_2$NH-CO$(CH_2)_m$CO-

$(OEG)_p$),desB30人胰岛素类似物;

其中,n为14-18的整数,s为3-4的整数,m为2-4的整数,p为2。

10.根据权利要求6所述的酰化胰岛素类似物,其选自下述化合物中的任一种:

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH2)_{18}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH2)$_{18}$CO-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-D-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-D-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{14}$CO-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{14}$CO-D-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{14}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Dab-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Dab-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{14}$CO-L-Dab-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_3$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_3$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Dab-CO(CH$_2$)$_3$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_4$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Dab-CO(CH$_2$)$_4$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Dab-CO(CH$_2$)$_4$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物;

优选地,所述的酰化胰岛素类似物选自下述化合物中的任一种:

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物;

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物;

更优选地,所述的酰化胰岛素类似物选自下述化合物中的任一种:

A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物,

A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物。

11.一种药物组合物,包含权利要求1-4所述的化合物和权利要求5-10所述的酰化胰岛素类似物。

12.权利要求1-4所述的侧链化合物、权利要求5-10所述的酰化胰岛素类似物和权利要求11所述的药物组合物在制备用于治疗或预防糖尿病的药物中的用途;

所述的糖尿病是指I型和II型糖尿病。

13.权利要求12中的用途,其中所述化合物、酰化胰岛素类似物和药物组合物以每周两次、每周一次或更低频率给予。

14.一种制备权利要求5中式(II)所示的新型的酰化胰岛素类似物的方法,所述方法包括采用权利要求1中式(I)所示的侧链化合物与人胰岛素类似物进行酰化反应制得;其中,所述的人胰岛素类似物具有A链和B链,A链氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,B链氨基酸序列如SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3所示。

一种新型的酰化胰岛素类似物

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药领域，具体地，本发明涉及一种新型的酰化胰岛素类似物，更具体地，本发明涉及一种可以用于制备酰化胰岛素类似物的侧链化合物、酰化胰岛素类似物及其药物组合物、制药用途、给药方法和制备方法。

背景技术

[0002] 糖尿病，包括1型糖尿病和2型糖尿病的治疗越来越依赖于所谓的强力胰岛素治疗。按照该方案，患者每天要接受多次胰岛素注射治疗，包括每天使用长效胰岛素注射一次或两次，以覆盖基本胰岛素需求，并补充以大量浓注快速起效的胰岛素以覆盖与膳食相关的胰岛素需求。

[0003] 许多糖尿病患者每天需要接受2-4次胰岛素的注射，每周、每月和每年如此，患者依从性差，而且长期的皮下注射对皮肤造成一定损伤，而大量每日注射的不适可通过使用更加长效的胰岛素类似物来减少，因此需要一种至少能一周注射一次的胰岛素类似物的出现。

[0004] CN105636979公开了一种胰岛素类似物的新衍生物，但其作用时间仍不是很理想，每周一次甚至跟更低频率给予的基础胰岛素制剂目前仍是急需。

发明内容

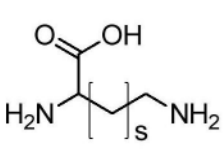
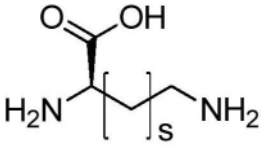
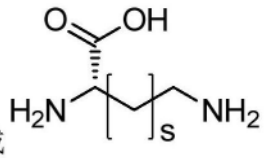
[0005] 本发明的目标是克服或改善现有技术的至少一个缺点，或提供有用的替代品。

[0006] 在本发明的的第一方面，本发明提出了一种新型的侧链化合物，具有式(I)所示的结构：

[0007] W-X-Y-Z-R(I)

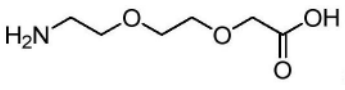
[0008] W为具有10-20个碳原子的脂肪酸或脂肪二酸，结构为-CO$(CH_2)_n$COOH的，n为10-20之间整数；

[0009] X为含羧酸基团的二氨基化合物，其中连接羧酸基团上的碳原子可为手性碳或为非手性碳，具有式(a1)、(a2)和(a3)所示的结构，

[0010] （a1）或（a2）或（a3）

[0011] 其中s为2-20的整数，在一些实施例中s为2-10，在另一些实施例中s为2-8，在又一些实施例中s为4，X以其氨基之一与W中的一个酰基连接形成酰胺键；

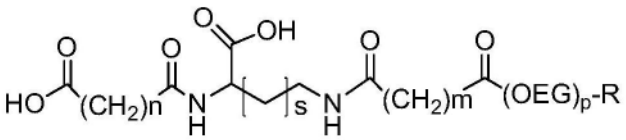
[0012] Y为-A$(CH_2)_m$B-，其中m为1-10的整数，在一些实施例中m为1-6的整数，在一些实施例中m为2，A和B不存在或-CO-。

[0013] Z为-(OEG)$_p$，p为1-3的整数，在一些实施例中p为2，所述的OEG结构为；或者，n也可以为4-30之间的整数。R为离去基团，在一些实施例中

R为活化酯基团；

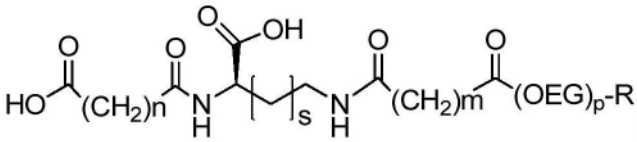
[0014] W、X、Y和Z之间的连接基为酰胺肽键或肽键。

[0015] 进一步地，本发明所述的侧链化合物可具有如下结构式：

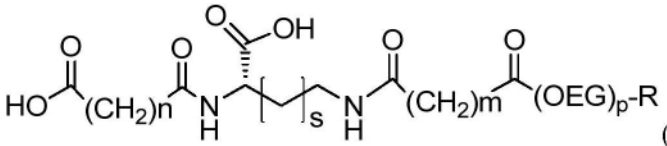


（b1）或

[0016]



(b2) 或

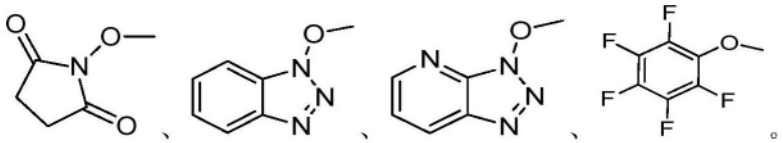


(b3)

[0017] 其中，n为14-20的整数，s为2-4的整数，m为1-4的整数，p为2，

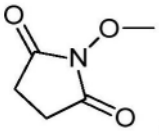
[0018] R选自以下基团：

[0019]

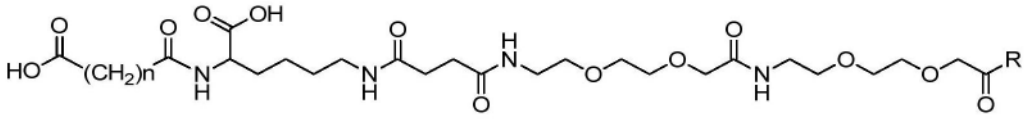


[0020] 在本发明的一些实施例中，n为14-20的整数，s为2-4的整数，m为2，p为2，

[0021] R是基团：

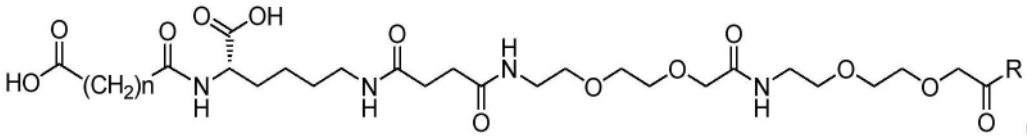


[0022] 在本发明的一些实施例中，所述的侧链化合物，其具有如下结构式：



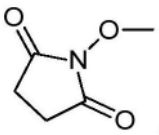
(c1)、

[0023]

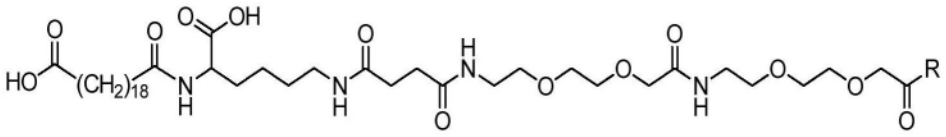


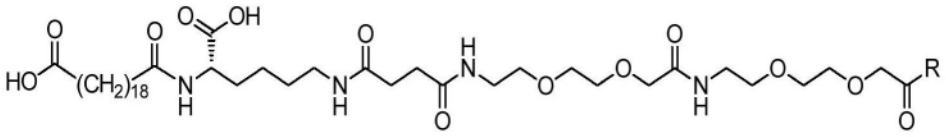
(c2)，

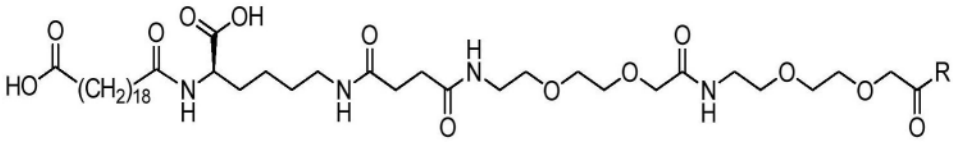
[0024] 其中，n为16-18的整数，R是基团：

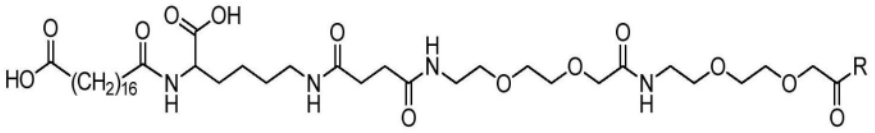


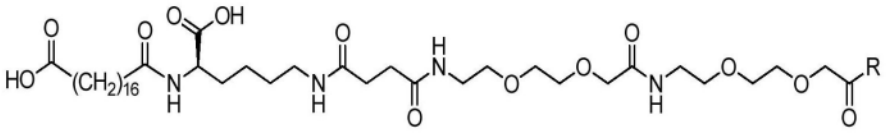
[0025] 在本发明的一些实施例中，本发明所述的侧链化合物选自下述化合物中的任一种：

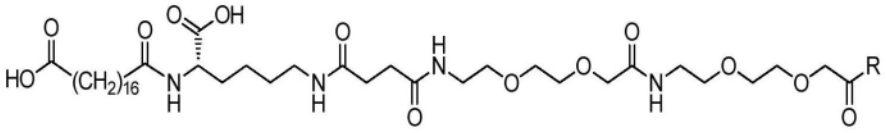

（1）、

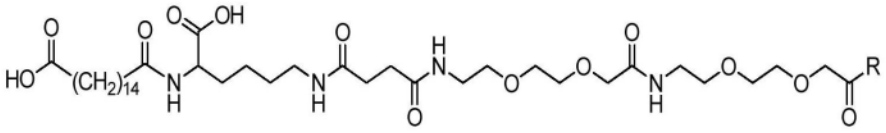

（2）、

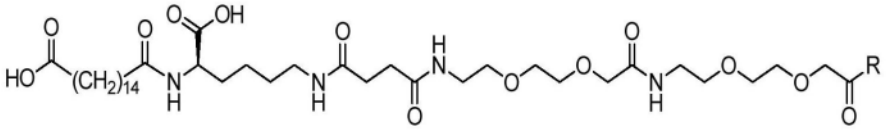

（3）、

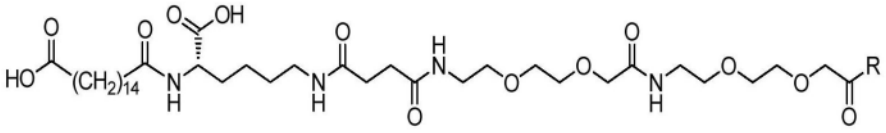

(4)、


(5)、

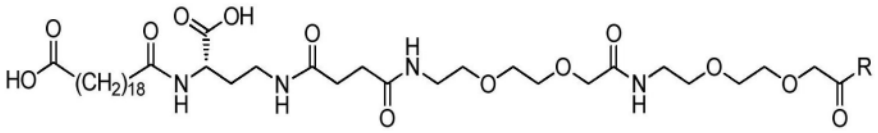

(6)、

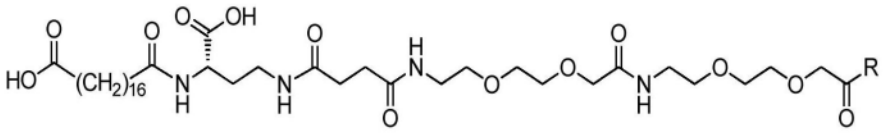

(7)、

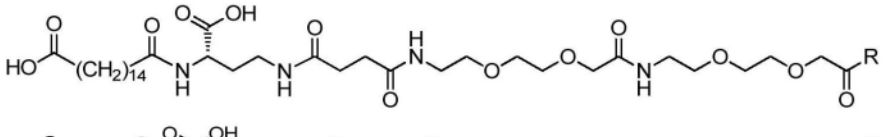

(8)、

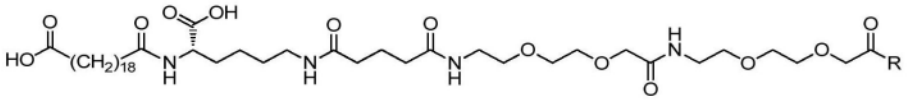

(9)、

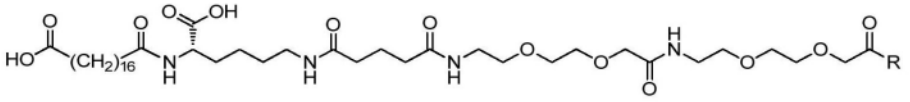
[0026]

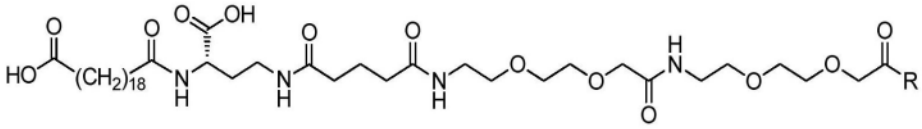

(10)、

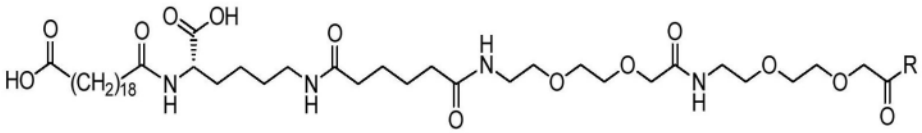

(11)、

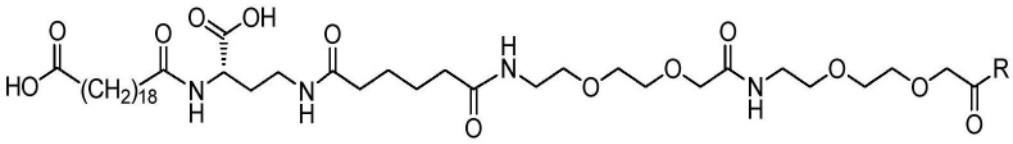

(12)、

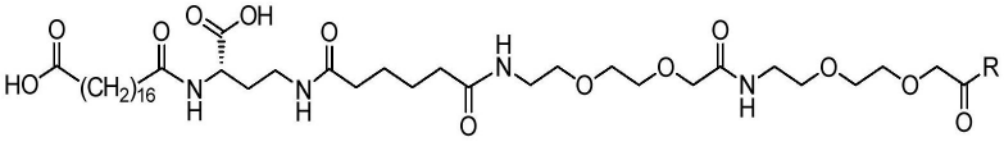

(13)、

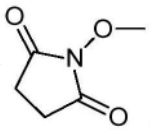

(14)、


(15)、

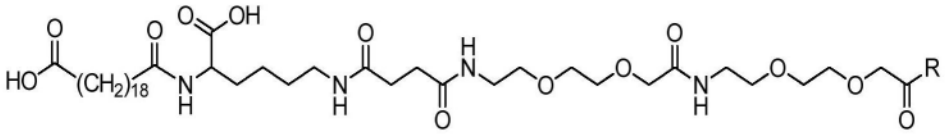

(16)、

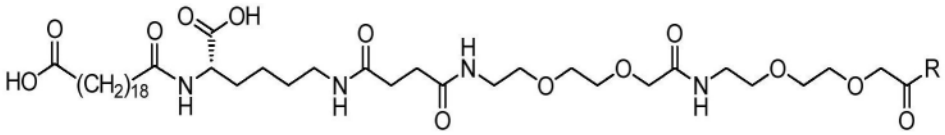
[0027] （17）、

（18），

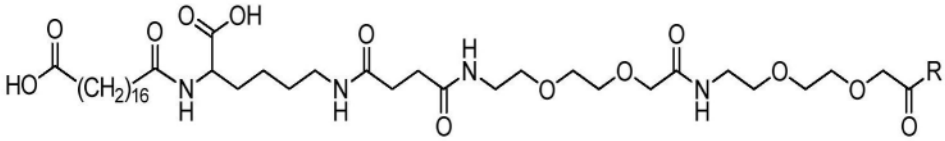
[0028] 其中，R基为。

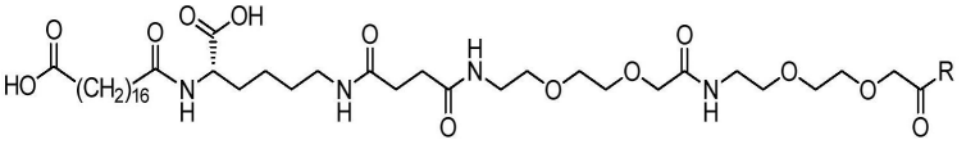
[0029] 在本发明的又一些实施例中，所述的侧链化合物，具有如下结构式：

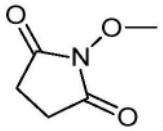
（1）、

（2）、

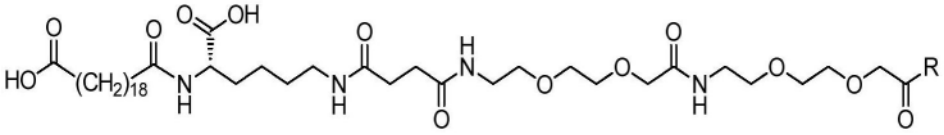
[0030]

（4）、

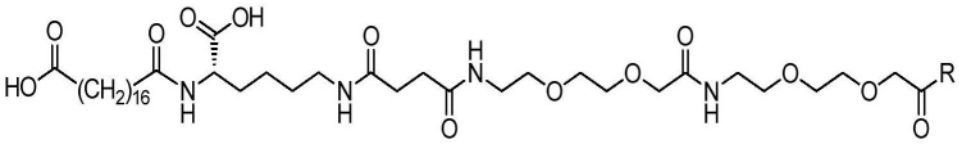
（6）；

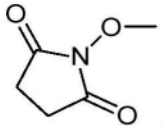
[0031] 其中R基为：。

[0032] 在本发明的又一些实施例中，所述的侧链化合物，具有如下结构式：

（2）、

[0033]

（6）；

[0034] 其中R基为：。

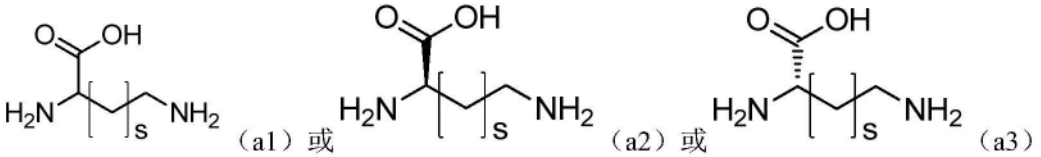
[0035] 本发明的第二方面，提出了一种新型的酰化胰岛素类似物，由本发明所述的侧链化合物与人胰岛素类似物经过酰化反应而得到，结构如式(II)所示：

[0036] W-X-Y-Z-M(II)

[0037] 其中：

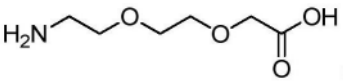
[0038] W为具有10-20个碳原子的脂肪酸或脂肪二酸，结构为-CO$(CH_2)_n$COOH的，n为10-20之间整数；

[0039] X为含羧酸基团的二胺基化合物，其中连接羧酸基团上的碳原子可为手性碳或为非手性碳，具有式(a1)、(a2)和(a3)所示的结构

[0040] 

[0041] 其中s为2-20的整数，在本发明的一些实施例中，s为2-10，在本发明的又一些实施例中，s为2-8，X以其氨基之一与W中的一个酰基连接形成酰胺键；

[0042] Y为-A$(CH_2)_m$B-，其中m为1-10的整数，在本发明的一些实施例中，m为1-6的整数，A和B不存在或为-CO-；

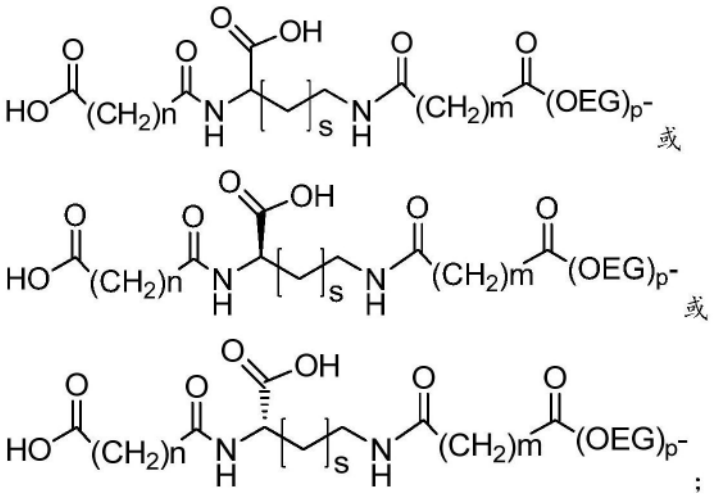
[0043] Z为-$(OEG)_p$，p为1-3的整数，在本发明的一些实施例中，p为2，所述的OEG结构为 

；在本发明的又一些实施例中，p可以为4-30的整数。

[0044] W、X、Y和Z之间的连接基为酰胺(肽)键；

[0045] M为人胰岛素类似物。

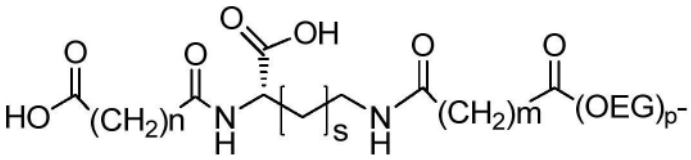
[0046] 在本发明的一些实施例中，本发明所述的酰化胰岛素类似物具有如下结构的侧链化合物：

[0047] 

；

[0048] 其中，n为14-20的整数，s为2-8的整数，m为1-6的整数，p为1-3的整数。

[0049] 在本发明的一些实施例中，本发明所述的酰化胰岛素类似物具有如下结构的侧链化合物：

[0050] 

[0051] 其中，n为14-20的整数，s为2-8的整数，m为1-6的整数，p为1-3的整数。

[0052] 本发明所述的酰化胰岛素类似物，由本发明所述的侧链化合物与人胰岛素类似物经过酰化反应而得到，其中，所述的人胰岛素类似物具有A链和B链，A链氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示，B链氨基酸序列如SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3所示，且人胰岛素类似物通过B29位赖氨酸残基的ε氮与侧链化合物以酰胺键连接。

[0053] A链:GIVEQCCTSICSLEQLENYCN(SEQ ID NO.1)

[0054] B链:FVNQHLCGSHLVEALELVCGERGFHYTPK(SEQ ID NO.2)

[0055] B链:FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK(SEQ ID NO.3)

[0056] 在本发明的一些实施例中，本发明所述的酰化胰岛素类似物，其具有如下结构式：

[0057] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_n$CO-NHC(COOH)$(CH_2)_S$$CH_2$NH-CO$(CH_2)_m$CO-$(OEG)_p$),desB30人胰岛素类似物，或，

[0058] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_n$CO-NHC(COOH)$(CH_2)_S$$CH_2$NH-CO$(CH_2)_m$CO-$(OEG)_p$),desB30人胰岛素类似物；

[0059] 其中，n为14-20的整数，s为2-8的整数，m为1-6的整数，p为2；需要说明的是-NHC(COOH)$(CH_2)_S$$CH_2$NH-中连接羧基的C原子可以为D型、L型或者消旋形式。

[0060] 在本发明的一些实施例中，n为14-18的整数，s为3-4的整数，m为2-4的整数，p为2。

[0061] 进一步地，本发明所述的酰化胰岛素类似物，其选自下述化合物中的任一种：

[0062] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH2)$_{18}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0063] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0064] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0065] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0066] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0067] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0068] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0069] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0070] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0071] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0072] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0073] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0074] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0075] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0076] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0077] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0078] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0079] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0080] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH2)_{18}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0081] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0082] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0083] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0084] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0085] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0086] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0087] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-D-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0088] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0089] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0090] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30

人胰岛素类似物，

[0091] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{14}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0092] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0093] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0094] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_3$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0095] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0096] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0097] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Dab-CO$(CH_2)_4$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物；

[0098] “-Lys-”指通过非手性赖氨酸进行连接，“-L-Lys-”通过L手性赖氨酸进行连接，“-D-Lys-”指通过D手性赖氨酸进行连接；

[0099] “Dab”是指2,4-二氨基丁酸。“-L-Dab-”是通过L手性Dab进行连接，“-D-Dab-”是通过D手性赖氨酸进行连接。

[0100] 在本发明的一些实施例中，所述的酰化胰岛素类似物选自下述化合物中的任一种：

[0101] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0102] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

[0103] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物；

[0104] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物。

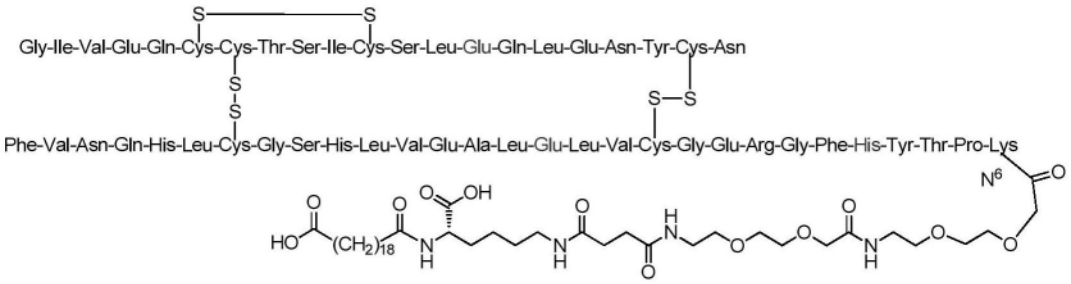
[0105] 在本发明的又一些实施例中，所述的酰化胰岛素类似物可选自下述化合物中的任一种：

[0106] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物，

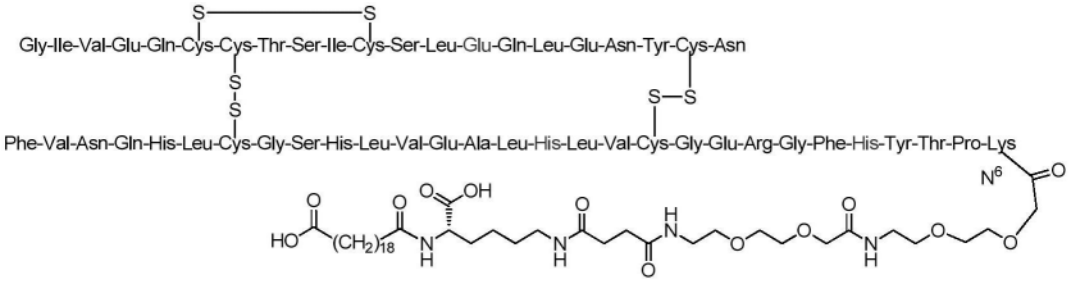
[0107] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物。

[0108] 其中，A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素

[0109] 类似物具有如下式所示结构：

[0110] 

[0111] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物具有如下式所示结构：

[0112] 

[0113] 本发明的第三方面，提出了一种药物组合物，包含本发明所述的侧链化合物和本发明所述的酰化胰岛素类似物。

[0114] 本发明的第四方面，提出了本发明所述的侧链化合物、酰化胰岛素类似物和药物组合物在制备用于治疗或预防糖尿病的药物中的用途；

[0115] 所述的糖尿病是指I型和II型糖尿病。

[0116] 本发明的第五方面，提出了本发明所述的侧链化合物、酰化胰岛素类似物和药物组合物的给药方法，其中所述化合物、酰化胰岛素类似物和药物组合物以每周两次、每周一次或更低频率给予。

[0117] 本发明的第六方面，提出了一种制备式(II)所示的新型的酰化胰岛素类似物的方法，所述方法包括采用式(I)所示的侧链化合物与人胰岛素类似物进行酰化反应制得。

[0118] 本发明相比现有技术的有益效果：

[0119] 本发明提供一种新型的酰化人胰岛素类似物，可用于治疗糖尿病，与当下日制剂(德谷胰岛素)相比具有更长的控糖药效时间，具有作为周制剂或更长效的胰岛素制剂的作用，可一周一次或更低的频率给予皮下治疗，将为糖尿病患者对基础胰岛素治疗的需要产生令人满意的治疗效果，提高患者的顺应性。

[0120] 在对本发明描述的过程中，对于本文中有关的术语进行了解释和说明，这些解释和说明仅仅是为了方便对于方案的理解，并不能看做是对本发明保护方案的限制。

[0121] 本文中所使用的“胰岛素类似物”指的是一种多肽，其具有在形式上可以通过缺失和/或交换天然存在的胰岛素中存在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而衍生自天然存在的胰岛素

[0122] 例如人胰岛素结构的分子结构。

[0123] “desB30胰岛素”、“desB30人胰岛素”指的是缺少B30氨基酸残基的天然胰岛素或其类似物。

[0124] 术语“糖尿病”包括1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病(在妊娠期间)和引起高血糖症的其它状态。该术语用于代谢紊乱，其中胰腺产生不足量的胰岛素，或其中身体的细胞

不能适当地响应胰岛素，从而阻止细胞吸收葡萄糖。结果，葡萄糖在血液中聚集。1型糖尿病，亦称为胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)和青少年型糖尿病，由B-细胞破坏引起，通常导致绝对胰岛素缺乏。2型糖尿病，亦称为非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)和成年型糖尿病，与主要的胰岛素抵抗和由此相对胰岛素缺乏和/或具有胰岛素抵抗的主要胰岛素分泌缺陷有关。

[0125] “A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-二十烷二酰基-L-Lys-丁二酸-2xOEG),desB30人胰岛素”，表示人胰岛素中位置A14的氨基酸Y已被突变为E，人胰岛素中位置B16的氨基酸Y已被突变为E，人胰岛素中位置B25的氨基酸F已被突变为H，人胰岛素中位置B29的氨基酸K已通过在B29的赖氨酸残基的ε氮(称为N^{ε})上被残基二十烷二酰基-L-Lys-丁二酸-2xOEG酰化而修饰，和人胰岛素中位置B30的氨基酸T已被缺失。

[0126] “OEG”是[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙基羰基；2xOEG或者$(OEG)_2$均是指有2个OEG。

[0127] “Su”是琥珀酰亚胺基-1-基＝2,5-二氧代-吡咯烷-1-基。

[0128] “OSu”是指琥珀酰亚胺基-1-基氧基＝2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基。

附图说明

[0129] 图1 C57小鼠单次皮下给药血糖变化情况；

[0130] 图2 SD大鼠体内I.V.PK中时间与药物浓度数据图；

[0131] 图3重复给药对T1DM小鼠随机血糖变化曲线图；

[0132] 图4重复给药对T1DM小鼠随机血糖变化曲线图；

[0133] 图5 SD大鼠SC.PK中时间与药物浓度曲线图；

[0134] 图6 C57BL6小鼠S.C.PK时间与药物浓度曲线图；

[0135] 图7比格犬I.V.PK时间与药物浓度曲线图；

具体实施方式

[0136] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的组件或具有相同或类似功能的组件。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。

[0137] 实施例1

[0138] 胰岛素突变体类似物(A14E,B16E,B25H,B29K,desB30人胰岛素类似物)的制备

[0139] 胰岛素类似物的载体的构建、酵母表达、处理和纯化可使用本领域技术人员容易识别的标准技术进行。制备胰岛素类似物的一个非限制性的实例之前有所描述(Glendorf T,Sorensen AR,Nishimura E,Pettersson I,&Kjeldsen T:Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B chainα-Helix for Receptor Binding: Biochemistry.2008;47(16):4743-51)。简而言之，采用酵母表达系统，通过人工设计的C肽连接长效胰岛素的A、B单链，并添加spacer肽增加前体蛋白稳定性并可提高目的蛋白表达量。通过酶切及后续纯化，spacer肽和C肽均在下游的纯化过程中被切除，可获得长效胰岛素类似物。完全转化成双链DesB30类似物通过MALDI-TOF MS验证，其纯度通过在酸性和中

性下RP-HPLC进行测试。该基因转染宿主菌经筛选获得的工程菌株可高密度发酵，表达水平高，发酵成本低。所设计的基因有利于开发简单高效的纯化工艺。

[0140] 1)重组表达载体的构建

[0141] 委托通用生物系统(安徽)有限公司进行目的基因全合成，利用限制性内切酶BamHI和EcoRI(TAKARA)消化处理目的基因序列和载体pPIC9K，采用Gel Extraction Kit试剂盒按厂商说明书纯化回收消化产物。利用DNA Ligation Kit Ver2.1(TAKARA)按厂商说明书进行载体连接，转化至感受态细胞DH5a。随机挑取平板上的单菌落，委托广州艾基生物技术有限公司进行目的基因测序验证正确后，采用Omega质粒提取试剂盒提取验证正确的表达载体。用限制性内酶SalI(TAKARA)进行线性化后，用Gel Extraction Kit试剂盒按厂商说明书纯化回收，-20℃保藏备用。

[0142] 2)重组工程菌株构建及蛋白发酵表达

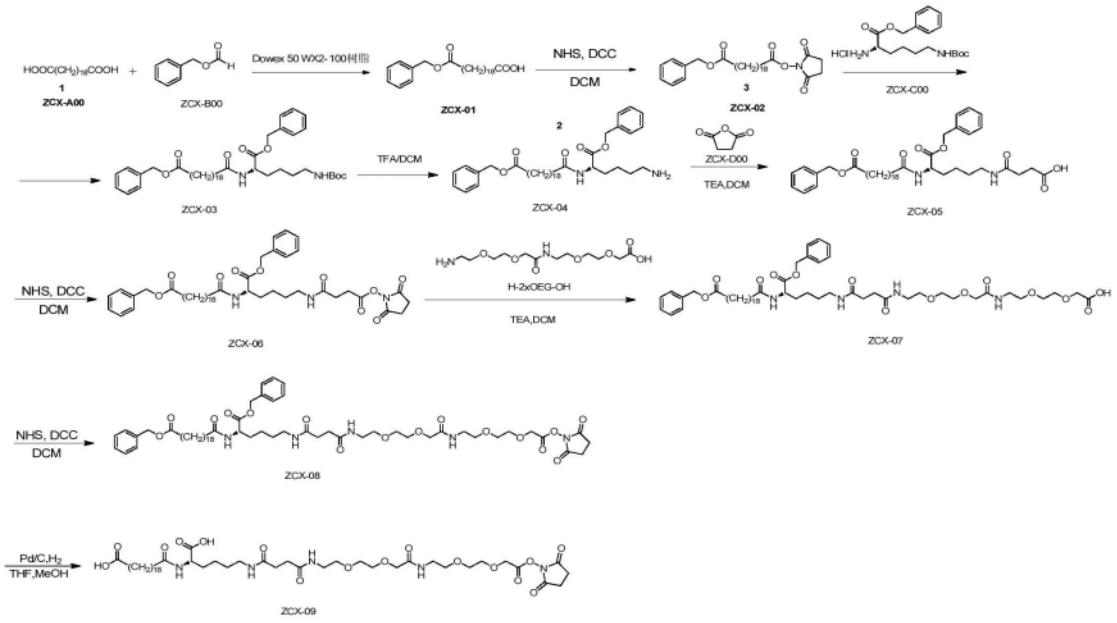
[0143] 将上述线性化重组表达质粒，加入毕赤酵母GS115感受态细胞(Invitrogen)，通过电击法转化，采用MicroPulser(Bio-Rad,165-2100)设备进行电击。电击后加入1mL预冷的1mol/L山梨醇，将菌悬液转移已灭菌离心管中，30℃，220rpm摇床中复苏培养2h后，涂布MD培养基平板后于30℃培养箱中倒置培养。将平板上长出的转化子用遗传霉素G418筛选高拷贝重组子。

[0144] 将上述筛选的重组子采用摇瓶培养发酵，挑取单菌落接种至YPD培养基中培养，于220rpm的摇床中30℃振荡培养约2天，把培养得到的种子液按接种比例1:100接种至BMGY培养基(Buffered Glycerol-complex Medium)中，于220rpm的摇床中30℃振荡培养约24h，按发酵培养基体积1％加入无水甲醇诱导表达蛋白，每12小时补加一次，诱导120h小时后结束发酵。收集发酵液于6000rpm离心6min，收集上清。上清料液进行阳离子层析、酶切、聚合物层析、超滤、冻干，冻干样品HPLC检测纯度90％，进行MALDI-TOF MS检测分子量。A14E,B16E,B25H,Des(B30)人胰岛素类似物分子量检测值为5628.41Da，理论值为5628.39Da，与理论值相符；A14E,B16H,B25H,Des(B30)人胰岛素类似物分子量检测值为5637.06Da，理论值为5636.31Da，与理论值相符。

[0145] 实施例2长效胰岛素的制备

[0146] 2.1A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$)，desB30人胰岛素类似物的制备

[0147] (1)COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO(CH2)$_2$CO-$(OEG)_2$-OSu侧链化合物的制备过程

[0148] 

[0149] a)将ZCX-A00(40g,58.39mmol)、ZCX-B00(31.80g,233.56mmol)、和Dowex50 WX2-100酸性阳离子树脂(60g)和360mL正辛烷加入三口圆底烧瓶中,温度升至110℃下搅拌反应保持回流72h,关闭加热电源保持搅拌恢复至室温,抽滤弃滤液得滤渣,滤渣中加入360mL二氯甲烷并于室温搅拌2h,抽滤弃滤渣,所得滤液真空浓缩至干得到固体粗品,加入60mL异丙醇进行重结晶,得到16.19g产品ZCX-01。

[0150] ESI-MS m/z:433.33$[M+H]^+$,与理论值符合

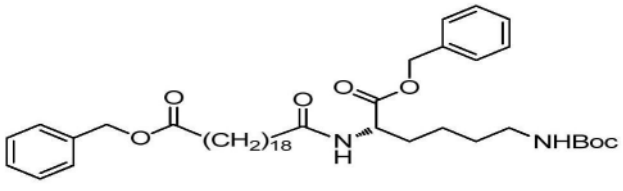
[0151] b)将ZCX-01(10.0g,23.11mmol)和130mL二氯甲烷加入250mL单口烧瓶中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(2.93g,25.42mmol)和二环己基碳二亚胺(5.72g,27.73mmol),30℃反应24h,过滤除掉沉淀,蒸馏浓缩至干得到固体粗品,加入60mL异丙醇和60mL正庚烷重结晶,得到10.15g产品ZCX-02产品。

[0152] ESI-MS m/z:530.32$[M+H]^+$,与理论值符合

[0153] c)将ZCX-02(10.6g,20mmol)、ZCX-C00(赖氨酸衍生物,8.2g,22mmol)和150mL二氯甲烷加入250mL单口圆底烧瓶中,室温搅拌,加入5.5mL三乙胺,加入用2N的盐酸溶液并调整体系pH=1-2,保持搅拌30min,分液弃去水相,有机相真空浓缩至干,管柱层析纯化,得到产物Nα-(长脂肪链二酸)-L-Lys-1-苄酯-6-Boc。

[0154] ESI-MS m/z:752.52$[M+H]^+$,与理论值符合。

[0155] d)ZCX-03氢谱核磁数据可知,所得结构为ZCX-03目标产物。

[0156] 

[0157] 1H-NMR(400MHz,CDCl3)δ7.37(s,10H),6.08(d,J=7.2Hz,1H),5.19(dd,J=26.8,13.8Hz,4H),4.66(dd,J=12.5,7.4Hz,1H),4.54(s,1H),3.07(d,J=6.0Hz,2H),2.37(t,J=7.5Hz,2H),2.29-2.17(m,2H),1.87(d,J=34.8Hz,1H),1.73(d,J=14.2Hz,1H),1.68-1.58(m,4H),1.46(s,11H),1.28(d,J=12.9Hz,30H).

[0158] 将ZCX-03(11.5g,15mmol)、55mL三氟乙酸和55mL二氯甲烷加入单口圆底烧瓶中，置于0℃低温槽中搅拌反应1h,TLC检测基本反应完全,将反应体系真空浓缩至干得到粘稠液体,加入200mL二氯甲烷溶清,加入饱和$NaHCO_3$溶液洗涤,分液取有机相,用饱和食盐水洗涤2次,分液取有机相真空浓缩至干,无水乙醇重结晶,得到8.35g产品ZCX-C04。

[0159] ESI-MS m/z 651.56$[M+H]^+$,与理论值符合。

[0160] e)将ZCX-C04(8.00g,12.31mmol)、150mL二氯甲烷和3mL三乙胺加入单口圆底烧瓶中,室温搅拌溶清,加入丁二酸酐(2.46g,24.62mmol),加毕至于30℃中搅拌反应24h,TLC检测反应基本完全,加入10mL 2N HCl溶液,将体系pH调整为1-2,搅拌30min并分液弃水相,有机相用饱和食盐水洗涤一次,分液取有机相,无水Na_2SO_4干燥,过滤,滤液真空浓缩至干得固体粗品,无水乙醇重结晶,得到8.9g产品ZCX-C05。

[0161] ESI-MS m/z 751.03$[M+H]^+$,与理论值符合。

[0162] ZCX-05氢谱核磁数据可知,所得结构为ZCX-05目标产物。

[0163] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.38(d,J＝3.7Hz,10H),6.39-6.26(m,2H),5.19(q,J＝12.2Hz,2H),5.13(s,2H),4.66(td,J＝8.4,4.6Hz,1H),3.24(d,J＝59.8Hz,2H),2.74-2.65(m,2H),2.51(dd,J＝10.4,5.6Hz,2H),2.37(t,J＝7.5Hz,2H),2.30-2.23(m,2H),1.85(d,J＝34.4Hz,1H),1.65(d,J＝24.7Hz,5H),1.52(d,J＝36.5Hz,2H),1.38-1.22(m,30H).

[0164] f)将ZCX-05(8.5g,11.32mmol)和130mL二氯甲烷加入250mL单口烧瓶中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(1.95g,16.98mmol)和二环己基碳二亚胺(3.50g,16.98mmol),30℃继续反应24小时,过滤除掉沉淀,蒸馏浓缩至干得到ZCX-06固体粗品,不进行提纯,直接进行下一步使用。

[0165] 往上步得到ZCX-06固体粗品中,加入[2-(2-{2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基}乙氧基)乙氧基]乙酸(替代名称为H-2xOEG-OH)(3.73g,11.32mmol)和130mL二氯甲烷,室温搅拌10min,加入2.4mL三乙胺,加毕置于30℃中搅拌反应24h,TLC检测反应完全,加入10mL 2N HCl溶液,搅拌30min,分液弃去水相,有机相用饱和食盐水洗涤2次,分液弃水相,使用无水Na_2SO_4干燥有机相,过滤得滤液,真空浓缩至干得固体粗品,管柱层析纯化,得到5.50g产品ZCX-07。

[0166] ESI-MS m/z 1042.59$[M+H]^+$,与理论值符合。

[0167] g)将ZCX-07(5.00g,4.80mmol)和130mL二氯甲烷加入250mL单口烧瓶中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.83g,7.2mmol)和二环己基碳二亚胺(1.49g,7.2mmol),30℃继续反应24小时,过滤除掉沉淀,蒸馏浓缩至干得到固体粗品,加入50mL异丙醇和50mL正庚烷重结晶,得到4.30g产品ZCX-08。

[0168] ESI-MS m/z 1139.10$[M+H]^+$,与理论值符合。

[0169] ZCX-08氢谱核磁数据可知,所得结构为ZCX-08目标产物。

[0170] 1H NMR(400MHz,CDCl3)δ7.36(s,10H),7.27-7.22(m,1H),6.63(s,1H),6.29(dd,J＝11.9,6.7Hz,2H),5.18(t,J＝9.8Hz,2H),5.12(s,2H),4.61(td,J＝7.9,5.1Hz,1H),4.51(s,2H),4.02(s,2H),3.83-3.76(m,2H),3.70-3.66(m,4H),3.61(dd,J＝8.7,4.0Hz,4H),3.56-3.48(m,4H),3.47-3.40(m,2H),3.23-3.12(m,2H),2.87(s,4H),2.52(d,J＝5.2Hz,2H),2.47(d,J＝5.4Hz,2H),2.36(t,J＝7.5Hz,2H),2.23(t,J＝7.6Hz,2H),1.80(s,1H),1.64(dd,J＝14.5,7.3Hz,5H),1.53-1.44(m,2H).

[0171] h)将ZCX-08(1.40g,1.22mmol)、10%Pd/C(0.12g)、0.1mL三氟乙酸和30mL THF和10mL甲醇加入单口圆底烧瓶中,氢气置换3次,氢气球封口并置于30℃中搅拌反应进行氢化脱苄反应6h,TLC检测反应完全,过滤除掉10%Pd/C,有机滤液中滴加120mL正庚烷并保持搅拌,滴加过程析出固体,滴毕于室温搅拌0.5h,过滤,得到0.83g产品ZCX-09,即为COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO(CH2)$_2$CO-$(OEG)_2$-OSu脂肪侧链。

[0172] ESI-MS m/z 959.45$[M+H]^+$,与理论值符合。

[0173] ZCX-09氢谱核磁数据可知,所得结构为ZCX-09目标产物。

[0174] 1H NMR(400MHz,DMSO)δ4.63(d,J=25.1Hz,2H),3.88(s,2H),3.28(dd,J=11.5,5.7Hz,2H),3.19(dd,J=11.3,5.6Hz,2H),2.83(s,3H),2.22-2.14(m,2H),2.10(t,J=7.3Hz,2H),1.60-1.42(m,4H),1.26(d,J=24.8Hz,26H).

[0175] (2)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物的制备

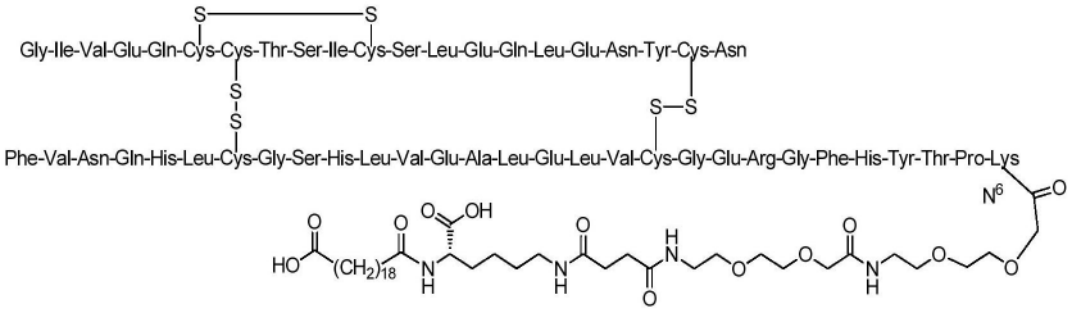
[0176] 取A14E,B16E,B25H,Des(B30)人胰岛素(60mg,0.01mmol)溶于5mL纯水和2mL DMF中,置于10℃低温反应浴中,滴加100ul三乙胺将反应体系pH调整为11.50。将COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$-OSu侧链化合物(14.37mg,0.015mmol)溶解于3mL DMF中形成侧链混合溶液,在搅拌作用下,将侧链混合溶液快速加入上述反应体系中,使用1N的NaOH溶液保持反应体系pH恒定在11.00-11.50中,加入后开始计时,反应1.0h后,用1N的HCl溶液将溶液pH调节为7.0-7.5,终止反应,获得反应蛋白酰化反应粗品溶液,反应过程采用RP-HPLC对反应过程进行中控。

[0177] (3)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物的纯化

[0178] 将上述蛋白酰化粗制品溶液加入水稀释至使有机相含量约为15%(v:v),用0.45μm滤膜过滤后采用RP-HPLC对其进行纯化制备得到纯化液。

[0179] (4)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物超滤及冻干

[0180] 将上述纯化溶液用超滤膜包系统将样品置换为注射化用水后,进行冻干获得冻干产物23mg,所得人胰岛素类似物分子结构如下:

[0181] 

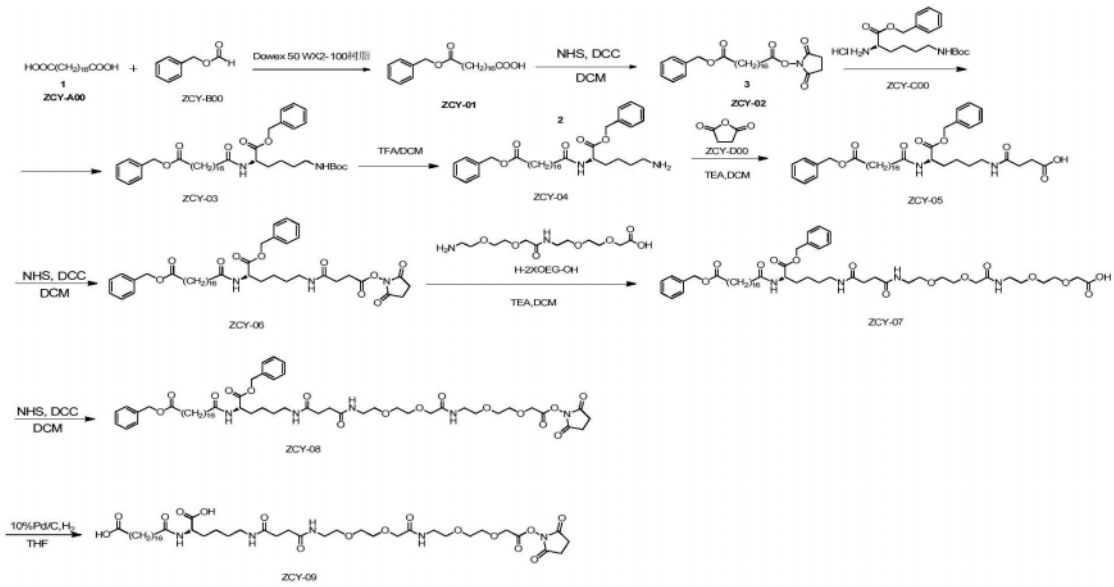
[0182] (5)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物的结构确证

[0183] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素类似物实测质谱为6471.42Da,与理论分子量6471.64Da一致,由此可知成功制备A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$),desB30人胰岛素

类似物目的产品，可简称为Insulin-a3。

[0184] 2.2 A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$)，desB30人胰岛素类似物的制备

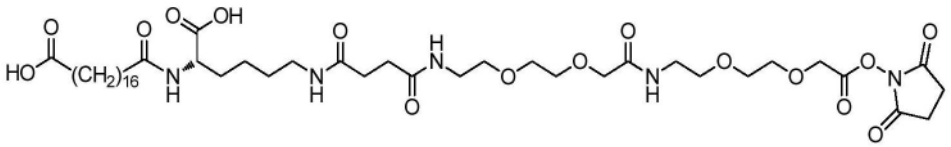
[0185] (1)COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$-OSu侧链化合物的制备过程



[0186] 制备COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$-OSu侧链(简称为ZCY-09)的方法与实施例2.1中COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO(CH2)$_2$CO-$(OEG)_2$-OSu侧链化合物的制备方法类似，所制备目的产品结构和MS测试如下所示。

[0187] ESI-MS m/z 931.40$[M+H]^+$，与理论值符合。

[0188] ZCY-09氢谱核磁数据可知，所得结构为ZCY-09目标产物。

[0189] 

[0190] 1H NMR(400MHz,DMSO)δ4.60(s,2H),3.85(d,J＝26.1Hz,2H),2.83(d,J＝4.1Hz,5H),2.28(p,J＝7.9Hz,4H),2.18(t,J＝7.3Hz,2H),2.10(t,J＝7.3Hz,2H).

[0191] (2)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$)，desB30人胰岛素类似物的制备

[0192] 取A14E,B16E,B25H,Des(B30)人胰岛素(60mg,0.01mmol)溶于5mL纯水和2mL DMF中，置于10℃低温反应浴中，滴加100ul三乙胺将反应体系pH调整为11.50。将COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$-OSu侧链(13.95mg,0.015mmol)溶解于3mL DMF中形成侧链混合溶液，在搅拌作用下，将侧链混合溶液快速加入上述反应体系中，使用1N的NaOH溶液保持反应体系pH恒定在11.00-11.50中，加入后开始计时，反应1.0h后，用1N的HCl溶液将溶液pH调节为7.0-7.5，终止反应，获得反应蛋白酰化反应粗品溶液，反应过程采用RP-HPLC对反应过程进行中控。

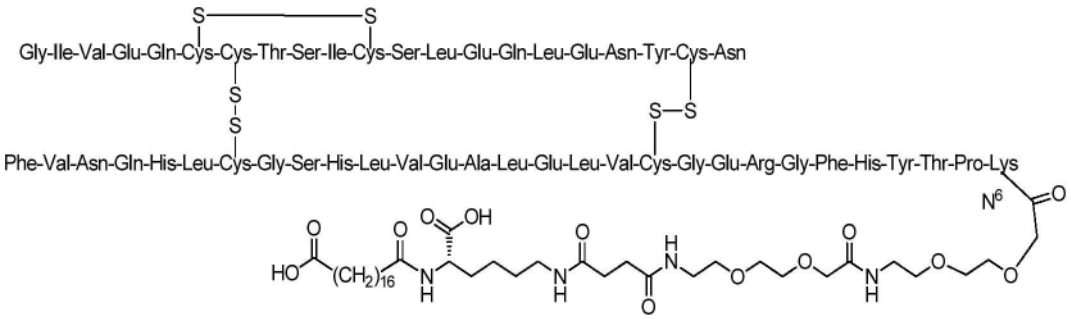
[0193] (3)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{16}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$)，desB30人胰岛素类似物的纯化

[0194] 将上述蛋白酰化粗制品溶液加入水稀释至使有机相含量约为15％(v:v)，用

0.45um滤膜过滤后采用RP-HPLC对其进行纯化制备得到纯化液。

[0195] (4)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物的超滤及冻干

[0196] 将上述纯化溶液用超滤膜包系统将样品置换为注射化用水后,进行冻干获得冻干产物18mg,所得人胰岛素类似物分子结构如下:

[0197] 

[0198] (5)A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物的结构确证

[0199] A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物实测质谱为6443.40Da,与理论分子量6443.41Da一致,由此可知成功制备A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物目的产品,可简称为Insulin-a2。

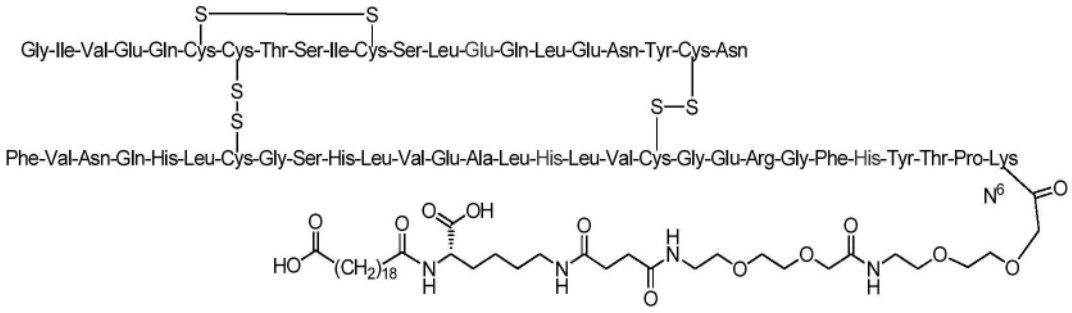
[0200] 2.3 A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物的制备

[0201] COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$-OSu侧链的制备方法与实施例2.1中COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH2)$_2$CO-(OEG)$_2$-OSu侧链化合物的制备方法相同。

[0202] 取A14E,B16H,B25H,Des(B30)人胰岛素(60mg,0.01mmol)溶于5mL纯水和2ml DMF中,置于10℃低温反应浴中,滴加100μL三乙胺将反应体系pH调整为11.50。将Nα-(二十烷二酸)-Nε-(OCCH$_2$CH$_2$CO-(2xOEG-OSu)-L-Lys侧链(14.37mg,0.015mmol)溶解于3mL DMF中形成侧链混合溶液,在搅拌作用下,将侧链混合溶液快速加入上述反应体系中,使用1N的NaOH溶液保持反应体系pH恒定在11.00-11.50中,加入后开始计时,反应1.0h后,用1N的HCl溶液将溶液pH调节为7.0-7.5,终止反应,获得反应蛋白酰化反应粗品溶液,反应过程采用RP-HPLC对反应过程进行中控。

[0203] 将上述蛋白酰化粗制品溶液加入水稀释至使有机相含量约为15%(v:v),用0.45μm滤膜过滤后采用RP-HPLC对其进行纯化制备得到纯化液。

[0204] 将上述纯化溶液用超滤膜包系统将样品置换为注射化用水后,进行冻干获得冻干产物16mg,所得人胰岛素类似物分子结构如下:

[0205] 

[0206] A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物实测质谱为6480.10Da,与理论分子量6480.10Da一致,由此可知成功制备A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物目的产品,可简称为Insulin-a10。

[0207] 2.4 A14E,B16E,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物的制备

[0208] (1)19-((S)-1-叔丁氧基羰基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十九烷酸叔丁基酯的制备:

[0209] (替代名称为^{t}Bu-二十烷二酰基-gGlu)(O^{t}Bu)-2xOEG-Osu)

[0210] 向含19-((S)-1-叔丁氧基羰基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十九烷酸叔丁基酯(3.0g,外购于上海特伯化学科技有限公司)的乙腈(60mL)溶液中加入TSTU(1.50g)和DIPEA(0.91mL),室温下搅拌过夜,然后真空浓缩。向残余物中加入含水0.1N HCl(100mL)和乙酸乙酯(200mL),分液取有机相,水相用乙酸乙酯(50mL)萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤1次,无水硫酸镁干燥和真空浓缩,得到油状液体3.21g。

[0211] ESI-MS m/z 972.30[M+H]$^{+}$,与理论值符合。

[0212] (2)19-((S)-1-羧基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十九烷酸:

[0213] (替代名称:二十烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu)

[0214] 将^{t}Bu-二十烷二酰基-gGlu)(O^{t}Bu)-2xOEG-Osu(3.0g)加入三氟乙酸(66mL)中于室温搅拌45min,TLC检测反应完全,然后真空浓缩得到油状液体,使用甲苯共浓缩3次,得到固体,用异丙醇重结晶和过滤,得到白色固体2.35g。

[0215] ESI-MS m/z 860.60[M+H]$^{+}$,与理论值符合。

[0216] (3)(A14E,B16E,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物制备

[0217] 取A14E,B16E,B25H,Des(B30)人胰岛素(60mg,0.01mmol)溶于5mL纯水和2mL DMF中,置于10℃低温反应浴中,滴加100ul三乙胺将反应体系pH调整为11.50。将二十烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu脂肪侧链(15.00mg,0.017mmol)溶解于3mL DMF中形成侧链混合溶液,在搅拌作用下,将侧链混合溶液快速加入上述反应体系中,使用1N的NaOH溶液保持反应体系pH恒定在11.00-11.50中,加入后开始计时,反应1.0h后,用1N的HCl溶液将溶液pH调节为

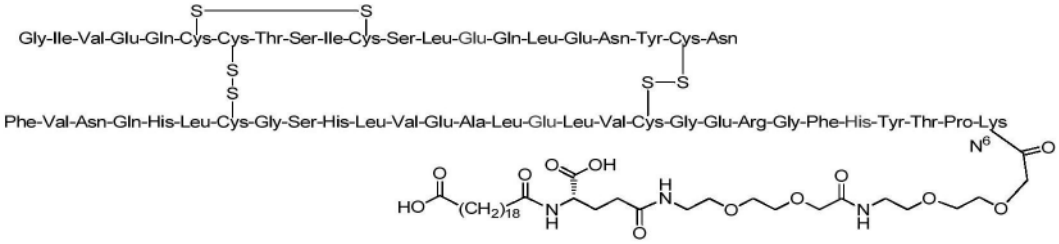
7.0-7.5,终止反应,获得反应蛋白酰化反应粗品溶液,反应过程采用RP-HPLC对反应过程进行中控。

[0218] (4)A14E,B16E,B25H,B29K(Nε-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物的纯化

[0219] 将上述蛋白酰化粗制品溶液加入水稀释至使有机相含量约为15%(v:v),用0.45um滤膜过滤后采用RP-HPLC对其进行纯化制备得到纯化液。

[0220] (5)A14E,B16E,B25H,B29K(Nε-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物的超滤及冻干

[0221] 将上述纯化溶液用超滤膜包系统将样品置换为注射化用水后,进行冻干获得冻干产物9.3mg,所得人胰岛素类似物分子结构如下:

[0222] 

[0223] (6)A14E,B16E,B25H,B29K(Nε-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物的结构确证

[0224] A14E,B16E,B25H,B29K(Nε-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物实测质谱为6372.28Da,与理论分子量6372.33Da一致,由此可知成功制备A14E,B16E,B25H,B29K(Nε-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物目的产品,可简称为Insulin-a1。

[0225] 2.5 A14E,B16H,B25H,B29K(Nε-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物的制备

[0226] (1)19-((S)-1-叔丁氧基羰基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十九烷酸叔丁基酯的制备:

[0227] (替代名称为tBu-二十烷二酰基-gGlu)(OtBu)-2xOEG-Osu)

[0228] 向含19-((S)-1-叔丁氧基羰基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十九烷酸叔丁基酯(3.0g,外购于上海特伯化学科技有限公司)的乙腈(60mL)溶液中加入TSTU(1.50g)和DIPEA(0.91mL),室温下搅拌过夜,然后真空浓缩。向残余物中加入含水0.1N HCl(100mL)和乙酸乙酯(200mL),分液取有机相,水相用乙酸乙酯(50mL)萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤1次,无水硫酸镁干燥和真空浓缩,得到油状液体3.21g。

[0229] ESI-MS m/z 972.30$[M+H]^+$,与理论值符合。

[0230] (2)19-((S)-1-羧基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨基甲酰基}丙基氨基甲酰基)十九烷酸:

[0231] (替代名称:二十烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu)

[0232] 将tBu-二十烷二酰基-gGlu)(OtBu)-2xOEG-Osu(3.0g)加入三氟乙酸(66mL)中于室

温搅拌45min,TLC检测反应完全,然后真空浓缩得到油状液体,使用甲苯共浓缩3次,得到固体,用异丙醇重结晶和过滤,得到白色固体2.35g。

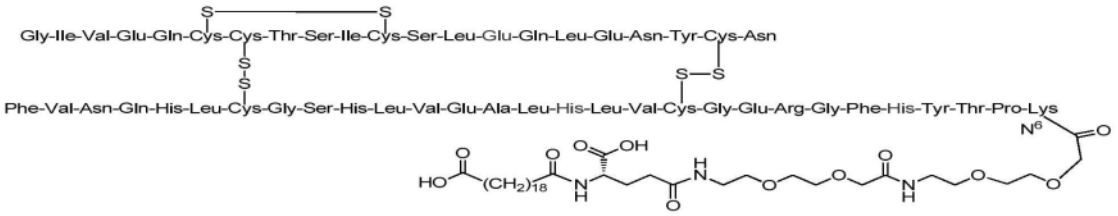
[0233] ESI-MS m/z 860.60[M+H]$^{+}$,与理论值符合。

[0234] (3)(A14E,B16H,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物制备

[0235] 取A14E,B16H,B25H,Des(B30)人胰岛素(60mg,0.01mmol)溶于5mL纯水和2mL DMF中,置于10℃低温反应浴中,滴加100ul三乙胺将反应体系pH调整为11.50。将二十烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu脂肪侧链(15.00mg,0.017mmol)溶解于3mL DMF中形成侧链混合溶液,在搅拌作用下,将侧链混合溶液快速加入上述反应体系中,使用1N的NaOH溶液保持反应体系pH恒定在11.00-11.50中,加入后开始计时,反应1.0h后,用1N的HCl溶液将溶液pH调节为7.0-7.5,终止反应,获得反应蛋白酰化反应粗品溶液,反应过程采用RP-HPLC对反应过程进行中控。

[0236] 将上述蛋白酰化粗制品溶液加入水稀释至使有机相含量约为15%(v:v),用0.45um滤膜过滤后采用。

[0237] 将上述纯化溶液用超滤膜包系统将样品置换为注射用水后,进行冻干获得冻干产物13.21mg,所得人胰岛素类似物分子结构如下:

[0238] 

[0239] A14E,B16H,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物实测质谱为6381.01Da,与理论分子量6381.51Da一致,由此可知成功制备A14E,B16H,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG),DesB30人胰岛素类似物目的产品,可简称为Icodec。

[0240] 实施例3胰岛素体外生物活性测试

[0241] 本发明的酰化胰岛素类似物能激活转染有胰岛素受体B的细胞发生胰岛素受体自磷酸化,也能与人血清白蛋白(HSA)发生可逆性结合,通过Cisbio的Phospho-IR beta(Tyr1150/1151)试剂盒方法检测胰岛素受体B的磷酸化水平,进而评估胰岛素的生物活性。细胞接种至96孔板过夜,去除培养基中的血清后,加入40μl无血清培养基培养约4h。然后用空白溶液(0.6%酪蛋白,0.06mg/mL EDTA,1xDPBS)制备胰岛素衍生物的稀释系列,再与96孔板中的细胞于二氧化碳培养箱中孵育5min(37℃,5%CO_2)。倒掉96孔板的液体,加入裂解液(2%Triton X-100,150mM NaCl,50mM HEPES,pH=7)和抑制剂(试剂盒中的Blocking Reagent)混合液100μL裂解细胞,350rpm振摇30min。通过检测细胞裂解后的上清中胰岛素受体磷酸化水平,结合数据使用非线性回归在Graphpad Prism 5软件拟合曲线,用相对活性(以百分比(%)计)进行评估。还使用相关的测定法,其中空白溶液还包含1.5%HSA以模拟生理条件,检测到本发明的胰岛素激活胰岛素受体磷酸化水平的变化能间接反应其结合白蛋白的活性。

[0242] 表1胰岛素类似物体外活性数据表

[0243]

样品批号	0%HSA		1.5%HSA		
	EC50(nM)	相对 HI 活性	EC50(nM)	相对 HI 活性	相对 0%HSA 活性
human insulin(HI)	1.232	1	2.592	1	48%
德谷胰岛（DEG.）	4.551	27.07%	20.59	12.59%	22.10%
Icodec	77.20	1.60%	1477	0.17%	5.23%
Insulin-a1	230	0.54%	5017	0.05%	4.58%
insulin-a3	213.2	0.58%	4488	0.06%	5.86%
Insulin-a10	85.47	1.44%	1310	0.20%	6.52%

[0244] 备注：(1)A14E,B16E,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG)，DesB30人胰岛素类似物，该化合物简称为Insulin-a1；

[0245] Insulin-a3代表A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$)，desB30人胰岛素类似物；

[0246] Insulin-a10代表A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH$(CH_2)_{18}$CO-L-Lys-CO$(CH_2)_2$CO-$(OEG)_2$)，desB30人胰岛素类似物。

[0247] (2)A14E,B16H,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG)，DesB30人胰岛素类似物，该化合物简称为Icodec。

[0248] 由表1数据可知，新的脂肪侧链酰化制备胰岛素新药insulin-a3、insulin-a10在0%HSA和1.5%HAS条件下，与重组人胰岛素或德谷胰岛素相比，体外活性显著下降，主要是因为其侧链与白蛋白的结合更强，胰岛素前体与受体的结合更弱，因此侧链对体外活性具有一定的作用，也揭示了胰岛素新药与白蛋白的不同结合能力作用。在本次STZ造模的C57BL6小鼠重复给药实验中可知，Insulin-a1对照的有效控糖效果可维持3天/次，Insulin-a3的有效控糖效果可维持4-5天/次，可见，Insulin-a3比对照Insulin-a1具有更长的控糖维持时间，效果较优。因此当胰岛素前体一致时，这种可逆结合力在胰岛素新药中更优一些。

[0249] 实施例4受试药物在正常C57BL/6小鼠上的降血糖作用

[0250] (1)供试品

[0251] 表2

[0252]

名称	供应商	物理状态	储存条件
Degludec		无色液体	4℃

[0253]

Icodec	东莞市东阳光生物药研发有限公司	无色液体	4℃
Insulin-a1		无色液体	4℃
Insulin-a3		无色液体	4℃
Insulin-a4		无色液体	4℃
Insulin-10		无色液体	4℃

[0254] 其中Degludec代表德谷胰岛素，Icodec代表A14E,B16H,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG)，DesB30人胰岛素类似物，Insulin-a1代表CN105636979A公开的周长效胰岛素A14E,B16E,B25H,B29K(N$^{\varepsilon}$-二十烷二酰基-gGlu-2xOEG)，DesB30人胰岛素类似物，

Insulin-a3代表A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物;Insulin-a4代表A14E,B16E,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{16}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物;Insulin-a10代表A14E,B16H,B25H,B29K(N(ε)-COOH(CH$_2$)$_{18}$CO-L-Lys-CO(CH$_2$)$_2$CO-(OEG)$_2$),desB30人胰岛素类似物。

[0255] (2)样品配置

[0256] 用于药理实验的不同胰岛素类似物API均使用PBS缓冲溶液配置成所需浓度。

[0257] (3)实验动物

[0258] 表3

[0259]

种属	C57BL/6小鼠
级别	SPF
订购体重范围	20-24g
性别	雄性
供应商	湖南斯莱克景达实验动物有限公司
供应商地址	中国，湖南
动物识别方法	尾部记号笔标记
动物订购数量	40只
动物使用数量	36只

[0260] (4)实验方法

[0261] SPF级C57BL/6小鼠于屏障环境内饲养于合适的饲养盒中,饲养温度20-26℃,湿度40-70%,昼夜明暗交替时间12h/12h,自由获取标准食物和高压灭菌水。3天检疫期和2天适应期后,检测随机血糖并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分为6组。动物分组及给药情况如表4:

[0262] 表4

[0263]

组别	动物类型	动物数	给药剂量(nmol/Kg)	给药体积(mL/Kg)	给药方式	给药频率
Control	C57BL/6	6	/	10	S.C.	一次
Degludec	C57 BL/6	6	200	10	S.C.	一次
Icodec	C57 BL/6	6	1400	10	S.C.	一次
Insulin-a1	C57 BL/6	6	1400	10	S.C.	一次
Insulin-a3	C57 BL/6	6	1400	10	S.C.	一次
Insulin-a4	C57 BL/6	6	1400	10	S.C.	一次
Insulin-a10	C57BL/6	6	1400	10	S.C.	一次

[0264] 采用单次皮下给药(S.C.)方式给予相应溶媒或药物,对照组用溶媒PBS给药后全程不禁食,动物自由饮食饮水,于给药前及给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24、48、54、72和96小时测定C57小鼠随机血糖值。

[0265] 所有的原始数据被录入到Excel文档中,并以Mean±SEM的方式表示。数据统计分析使用Graphpad Prism 7.0软件,单因素或双因素方差分析比较方法,以$P<0.05$作为显著性差异的判断标准。

[0266] (5)结果

[0267] 与对照组相比，给药后1h，德谷胰岛素、Icodec、Insulin-a1、Insulin-a3、Insulin-a4和Insulin-a10组小鼠血糖均显著性降低；给药后2h，德谷胰岛素组小鼠血糖水平达到最低，随后缓慢上升，而其他5组小鼠血糖则继续保持缓慢下降；给药后10h，德谷胰岛素组血糖已逐渐恢复，Insulin-a4组血糖达到最低并逐渐回升，Icodec、Insulin-a1、Inslulin-a3和Insulin-a10组血糖仍保持缓慢下降的趋势；给药后24h，德谷胰岛素组小鼠血糖已恢复正常，Insunlin-a4组血糖逐渐恢复，Insulin-a1和Insulin-a3组血糖达到最低，且两者没有显著性差异，后续血糖逐步回升，而Icodec和Insulin-a10组血糖仍保持缓慢下降；给药后48h，Insulin-a1和Insulin-a4组血糖恢复正常，Insulin-a3组血糖虽呈上升趋势，但血糖仍处于较低水平，Icodec组血糖达到最低并逐渐回升，而Insulin-a10组血糖仍保持缓慢下降；给药后72h，Insulin-a3组血糖仍维持较低水平，Icodec组血糖逐渐恢复，而Insulin-a10组血糖达到最低，随后逐渐上升；给药后96h，除Insulin-a10组外，其他各组血糖均已恢复至正常水平，而Insulin-a10组血糖虽在逐渐上升，但仍未达正常水平。具体数据如表5和图1所示。

[0268] 表5单次给药对C57小鼠的血糖的影响(Mean±SEM,n=6)

[0269]

组别	时间点（h）												
	0	0.25	0.5	1	2	4	6	8	10	24	48	72	96
Control	7.8±1.1	9.0±1.3	9.3±1.9	9.8±2.3	9.7±2.1	8.0±1.4	8.9±2.2	7.7±0.9	8.4±1.4	7.5±0.9	7.5±0.9	8.0±1.2	7.3±0.6
Degludec	7.8±0.8	6.5±1.1 *	5.0±0.4 **	4.7±1.1 **	4.4±1.3 **	5.4±0.6 **	5.4±1.2 *	5.8±0.8 **	5.7±0.9 *	8.3±0.9	8.0±0.3	8.0±0.8	7.9±0.3
Insulin-a1	7.8±1.1	8.8±1.4	6.6±0.7 **	5.6±0.7 **	4.4±0.7 ***	3.6±0.7 ***	3.8±0.4 ***	3.6±0.7 ***	3.4±0.7 ***	2.9±0.7 ***	4.9±1.5 **	7.3±1.3	7.8±0.6
Insulin-a3	8.0±1.0	8.6±1.0	6.2±0.4 **	4.9±0.8 **	4.5±1.0 ***	3.9±0.7 ***	3.7±0.5 ***	3.8±0.5 ***	3.5±0.7 ***	2.9±1.0 ***	4.2±2.0 **	5.4±2.6	8.8±1.1
Insulin-a4	8.0±1.3	9.0±1.9	6.2±1.6 *	5.0±0.5 **	4.8±0.5 ***	3.9±0.5 ***	3.8±1.1 **	3.2±0.6 ***	3.0±0.6 ***	5.3±1.8 *	8.7±0.9 *	8.0±0.9	7.9±1.1
Insulin-a10	9.1±1.5*	7.9±1.5*		4.4±0.6***	4.4±1.3***	3.7±1.0***	3.5±1.1***	3.1±1.0***	2.8±0.7***	2.1±0.7***	1.7±0.6***	1.8±0.1***	4.0±4.0*

[0270] 注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001vs Control

[0271] 结果可知，在本次正常C57BL/6小鼠单次给药实验中，德谷胰岛素有效血糖控制时间为24h，Insulin-a4有效血糖控制时间为48h，Insulin-a1有效血糖控制时间为72h，Icodec和Insulin-a3的有效控糖时间均为96h，而Insulin-a10的有效血糖控制时间超过96h。与Icodec相比，虽然Insulin-a3对血糖的控制作用稍差，但仍具有与Icodec相同的有效控糖时间，而Insulin-a10对血糖的控制作用与Icodec趋势一致，且可维持更长时间。

[0272] 实施例5：受试药物在STZ诱导I型糖尿病(T1DM)C57BL/6小鼠上的降血糖作用

[0273] (1)供试品

[0274] 表6

[0275]

名称	供应商	物理状态	储存条件
Insulin-a1	东莞市东阳光生物	无色液体	4℃
Insulin-a3	药研发有限公司	无色液体	4℃

[0276] (2)样品配置

[0277] 用于药理实验的不同胰岛素类似物API均使用PBS缓冲溶液配置成所需浓度。

[0278] (3)实验动物

[0279] 表7

[0280]

种属	C57BL/6 小鼠
级别	SPF
订购体重范围	20-24g
性别	雄性
供应商	湖南斯莱克景达实验动物有限公司
供应商地址	中国，湖南
动物识别方法	尾部记号笔标记
动物订购数量	40 只
动物使用数量	40 只

[0281] (4)实验方法

[0282] SPF级C57BL/6小鼠于屏障环境内饲养于合适的饲养盒中，饲养温度20-26℃，湿度40-70％，昼夜明暗交替时间12h/12h，自由获取标准食物和高压灭菌水。3天检疫期和2天适应期后，禁食12h，小鼠按照130mg/kg腹腔注射链脲佐菌霉素溶液(STZ，13mg/mL，于柠檬酸缓冲液)或柠檬酸缓冲液(对照组)。给予链脲佐菌霉素3天和7天后，进行随机血糖和空腹血糖检测，随机血糖值在25mmol/L以上及空腹血糖在11.1mmol/L以上的选为T1DM模型小鼠用于后续实验。于给药前一天，监测随机血糖并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分为4组。

[0283] 动物分组及给药情况如下：

[0284] 表8

[0285]

组别	动物类型	动物数	给药剂量（nmol/Kg）	给药体积（mL/Kg）	给药方式	给药频率
Control	C57BL/6	6	/	10	S.C.	四次
Model	C57 BL/6	7	/	10	S.C.	四次
Insulin-a1	C57 BL/6	7	1400	10	S.C.	四次
Insulin-a3	C57 BL/6	7	1400	10	S.C.	四次

[0286] 采用皮下给药(S.C.)方式给予相应溶媒或药物，4-5天给药一次，共给药4次，实验期间动物自由饮食饮水，评估第一次给药前及给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24、48、72和96小时随机血糖，以及第二、三、四次给药前及给药后1、2、4、6、8、24、48、72、96和120小时随机血糖。

[0287] 所有原始数据被录入到Excel文档中，并以Mean±SEM的方式表示。数据统计分析使用Graphpad Prism 7.0软件，单因素或双因素方差分析比较方法，以$P<0.05$作为显著性差异的判断标准。

[0288] (5)结果

[0289] 具体数据如表9和图2所示。

[0290] 表9

[0291]

组别	时间点（Day）							
	0（1st）	1	4（2nd）	5	9（3rd）	10	14（4th）	18
Control	7.5±0.5	8.8±0.5	8.0±0.4	8.0±0.7	7.9±0.5	12.2±8.3	7.6±0.8	7.5±0.6
Model	31.1±3.8	31.7±2.0	31.4±3.7	30.7±4.5	28.8±6.2	29.0±3.5	30.1±5.2	28.9±5.6
Insulin-a1	33.3±0.1	22.5±9.6*	31.1±2.3	15.6±6.6***	28.4±4.9	12.2±7.9***	28.4±5.9	26.2±5.7
Insulin-a3	31.3±3.1	17.4±6.7***	26.9±8.0	7.1±3.8***	26.2±7.9	8.6±5.7***	24.4±5.7	19.7±6.4*

[0292] 注:*P<0.05,***P<0.001vs Model

[0293] 由结果可知,与模型组相比,Insulin-a1于每次给药24h后血糖均显著降低,达到最低水平,随后缓慢上升,于给药72h后达到正常水平;Insulin-a3于第一、二次给药24h后,血糖显著降低,达到最低水平,随后缓慢上升,于给药96h后达到正常水平,而随着给药次数的增加,Insulin-a3于第三、四次给药后,其有效控糖时间延长,于给药120h后才达到正常水平,且每次给药后,Insulin-a3对血糖的降低作用优于Insulin-a1。

[0294] 综上所述,Insulin-a3的控糖作用及有效控糖时间都明显优于Insulin-a1。

[0295] 实施例6:受试药物在STZ诱导I型糖尿病(T1DM)C57BL/6小鼠上的降血糖作用

[0296] (1)供试品

[0297] 表10

[0298]

名称	供应商	物理状态	储存条件
Icodec	东莞市东阳光生物药研发有限公司	无色液体	4℃
Insulin-a3		无色液体	4℃
Insulin-a10		无色液体	4℃

[0299] (2)样品配置

[0300] 用于药理实验的不同胰岛素类似物API均使用PBS缓冲溶液配置成所需浓度。

[0301] (3)实验动物

[0302] 表11

[0303]

种属	C57BL/6 小鼠
级别	SPF
订购体重范围	20-24g
性别	雄性
供应商	湖南斯莱克景达实验动物有限公司
供应商地址	中国，湖南
动物识别方法	尾部记号笔标记
动物订购数量	350 只
动物使用数量	60 只

[0304] (4)实验方法

[0305] SPF级C57BL/6小鼠于屏障环境内饲养于合适的饲养盒中,饲养温度20-26℃,湿度40-70%,昼夜明暗交替时间12h/12h,自由获取标准食物和高压灭菌水。3天检疫期和2天适

应期后，禁食12h，小鼠按照130mg/kg腹腔注射链脲佐菌霉素溶液(STZ，13mg/mL，于柠檬酸缓冲液)。给予链脲佐菌霉素3天和7天后，进行随机血糖和空腹血糖检测，随机血糖值在25mmol/L以上及空腹血糖在11.1mmol/L以上的选为T1DM模型小鼠用于后续实验。于给药前一天，监测随机血糖并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠分为6组。

[0306] 动物分组及给药情况如表12：

[0307] 表12

[0308]

组别	动物类型	动物数	给药剂量（nmol/Kg）	给药体积（mL/Kg）	给药方式	给药频率
Model	C57 BL/6	7	/	10	S.C.	三次
Icodec-250	C57 BL/6	7	250	10	S.C.	三次
Icodec-500	C57 BL/6	7	500	10	S.C.	三次
Icodec-1000	C57 BL/6	7	1000	10	S.C.	三次
HEC-Insulin-a3	C57 BL/6	7	500	10	S.C.	三次
HEC-Insulin-a10	C57 BL/6	7	500	10	S.C.	三次

[0309]

[0310] 采用皮下给药(S.C.)方式给予相应溶媒或药物，4-5天给药一次，共给药3次，实验期间动物自由饮食饮水，评估第一次给药前及给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24、48、72和96小时随机血糖，以及第二、三次给药前及给药后0.5、1、2、6、24、48、72、96和120小时随机血糖。

[0311] 所有原始数据被录入到Excel文档中，并以Mean±SEM的方式表示。数据统计分析使用Graphpad Prism 7.0软件，单因素或双因素方差分析比较方法，以$P<0.05$作为显著性差异的判断标准。

[0312] (5)结果

[0313] 具体数据如表13及图3所示。

[0314] 表13重复给药对I型糖尿病小鼠随机血糖的影响(Mean±SEM，n＝7)

[0315]

组别	时间点（Day）						
	0 (1st)	1	4 (2nd)	5	9 (3rd)	10	14
Model	32.0±1.7	32.1±1.5	31.0±3.5	28.0±3.5	33.0±0.7	29.8±3.1	31.1±2.9
Icodec-250	32.5±2.2	25.7±4.2 **	31.3±2.6	25.1±3.2	31.8±2.2	17.2±6.8 ***	30.6±4.6
Icodec-500	32.5±1.6	20.3±6.3 ***	30.6±2.6	19.5±5.8 **	27.0±7.1*	15.9±6.0 ***	33.0±0.9
Icodec-1000	30.8±2.9	20.4±4.6 ***	31.6±2.1	12.8±5.4 ***	29.7±3.7*	10.1±6.4 ***	27.7±4.6
Insulin-a3	31.8±3.2	20.7±5.2 ***	29.7±3.7	20.1±5.4 **	27.7±6.2*	16.0±9.4 **	27.4±6.3
Insulin-a10	32.0±1.7	19.7±6.6 ***	27.6±4.4	15.2±8.9 **	26.6±5.7*	11.7±9.4 ***	26.1±6.2#

[0316] 注：*$P<0.05$，**$P<0.01$，***$P<0.00$ 1vs Model与模型组相比，Icodec-250、500及1000nmol/kg三个剂量于每次给药24h后血糖均显著降低，达到最低水平，随后缓慢上升；在整个实验周期中，Icodec对血糖的降低作用及有效控糖时间均呈剂量依赖关系，即剂量越高，降糖作用越强，控糖时间也越长，1000nmol/kg剂量下，有效控糖时间可达96h。

[0317] 与模型组相比，Iinsulin-a3于每次给药24h后，血糖均显著降低，达到最低水平，

随后缓慢上升，第一、二次给药96h后血糖恢复至正常水平，随着给药次数的增加，Insulin-a3于第三次给药后，其有效控糖时间延长，于给药120h后才达到正常水平；同时，Insulin-a10于每次给药24h后，血糖均显著降低，达到最低水平，随后缓慢上升，第一次给药96h后血糖恢复到正常水平，随着给药次数的增加，Insulin-a10于第二、三次给药后，其有效控糖时间延长，于给药120h后才达到正常水平；与Icodec-1000nmol/kg组相比，Insulin-a3的控糖作用稍差，但优于Icodec-500nmol/kg组且其有效控糖时间可维持96-120h；而Insulin-a10的控糖作用与Icodec-1000nmol/kg剂量相当，且其有效控糖时间可维持120h。

[0318] 综上所述，Insulin-a3和Insulin-a10在剂量低于Icodec一倍时，仍能达到相当或更好的降糖效果。

[0319] 实施例7：大鼠体内静脉注射PK试验

[0320] (1)供试品

[0321] 表14

[0322]

名称	供应商	物理状态	储存条件
Insulin-a1	东莞市东阳光生物药研发有限公司	无色液体	4℃
Insulin-a3		无色液体	4℃

[0323] (2)样品配置

[0324] 用于药理实验的不同胰岛素类似物API均使用PBS缓冲溶液配置成所需浓度。

[0325] (3)实验动物

[0326] 表15

[0327]

种属	SD 大鼠
级别	SPF
体重范围	330-370g
性别	雄性
供应商	湖南斯莱克景达实验动物有限公司
供应商地址	中国，湖南
动物识别方法	尾根部记号笔标记
动物使用数量	4 只

[0328] (4)实验方法

[0329] 4只雄性SD大鼠(2只/组)单次静脉(i.v.)给予10nmol/kg剂量的Insulin-a1或Insulin-a3，于给药后0.083、0.25、0.5、1、2、5、7、24h进行采血离心血浆，采用LC-MS/MS方法检测血浆中Insulin-a1或Insulin-a3的浓度。

[0330] (5)实验结果

[0331] 图4和表16结果显示，与Insulin-a1相比，Insulin-a3的AUClast和Cmax稍高，Cmax更高提示可能血浆结合更高。此外，Insulin-a1与Insulin-a3的半衰期分别为15.3±4.8h和11.2±1.9h。综上所述，Insulin-a3与Insulin-a1在大鼠体内PK方面作用相近。

[0332] 表16 SD大鼠体内I.V.PK数据表

[0333]

实验化合物	C_{max}(ng/mL)		AUC_{last}(ng*h/mL)		$T_{1/2}$（h）	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Insulin-a1	1050	83	7550	660	15.3	4.8
Insulin-a3	1230	99	9170	1100	11.2	1.9

[0334] 实施例8:大鼠体内皮下注射PK试验

[0335] (1)供试品

[0336] 表17

[0337]

名称	供应商	物理状态	储存条件
Icodec	东莞市东阳光生物药研发有限公司	无色液体	4℃
Insulin-a1		无色液体	4℃
Insulin-a10		无色液体	4℃

[0338] (2)样品配置

[0339] 用于药理实验的不同胰岛素类似物API均使用PBS缓冲溶液配置成所需浓度。

[0340] (3)实验动物

[0341] 表18

[0342]

种属	SD 大鼠
级别	SPF
体重范围	220-340g
性别	雄性
供应商	湖南斯莱克景达实验动物有限公司
供应商地址	中国，湖南
动物识别方法	尾根部记号笔标记
动物使用数量	9 只

[0343] (4)实验方法

[0344] 9只SD大鼠(3只/组)单次皮下(SC.)给予10nmol/kg剂量的Insulin-a1、Insulin-a10和Icodec,于给药后1h、2h、5h、24h、31h、48h、72h、96h和120h进行采血离心血浆,检测血浆中Insulin-a1、Insulin-a3和Icodec的浓度。

[0345] (5)实验结果

[0346] 图5和表19结果显示,与Icodec相比,Insulin-a1和Insulin-a10的AUClast和Cmax稍高,Cmax更高提示可能血浆结合更高。此外,Insulin-a1与Insulin-a10的皮下给药半衰期分别为21h和17.2h。综上所述,Insulin-a10在小鼠PK方面作用优于对照Icodec。

[0347] 表19 SD大鼠皮下SC.PK数据表

[0348]

实验化合物	C_{max}(ng/mL)		AUC_{last}(ng*h/mL)		MRTINF_obs(h)		$T_{1/2}$（h）	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Icodec	183	34	6560	2500	30.5	4.4	16.7	1.3
Insulin-a1	313	46	10300	1900	34.1	4.6	21	2.8
Insulin-a10	280	14	9350	150	29.2	1.2	17.2	1.0

[0349] 实施例9:C57BL6小鼠皮下注射PK试验

[0350] (1)供试品

[0351] 表20

[0352]

名称	供应商	物理状态	储存条件
Insulin-a1	东莞市东阳光生物药研发有限公司	无色液体	4℃
Insulin-a3		无色液体	4℃

[0353] (2)样品配置

[0354] 用于药理实验的不同胰岛素类似物API均使用PBS缓冲溶液配置成所需浓度。

[0355] (3)实验动物

[0356] 表21

[0357]

种属	C57BL6 小鼠
级别	SPF

[0358]

体重范围	23-25g
性别	雄性
供应商	湖南斯莱克景达实验动物有限公司
供应商地址	中国，湖南
动物识别方法	尾根部记号笔标记
动物使用数量	6 只

[0359] (4)实验方法

[0360] 6只C57小鼠(每组3只)单次皮下(SC.)给予10nmol/kg剂量的Insulin-a1或Insulin-a3,于给药后1h、2h、5h、24h、31h、55h和72h进行采血离心血浆,检测血浆中Insulin-a1或Insulin-a3的浓度。

[0361] (5)实验结果

[0362] 图6和表22结果显示,与Insulin-a1相比,Insulin-a3的AUC_{last}和C_{max}稍高,C_{max}更高提示可能血浆结合更高,而在添加1.5%HAS的胰岛素受体活性测试中也证明了Insulin-a3具有更好的白蛋白结合作用,体现出更长的药效持续时间。此外,Insulin-a1与Insulin-a3的皮下给药半衰期分别为14.3h和18.6h。综上所述,Insulin-a3在小鼠PK方面作用不劣于对照Insulin-a1。

[0363] 表22 C57BL6小鼠皮下SC.PK数据表

[0364]

实验化合物	C_{max}(ng/mL)		AUC_{last}(ng*h/mL)		$T_{1/2}$（h）	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Insulin-a1	339	73	10000	1500	14.3	3.7
Insulin-a3	385	39	12300	1600	18.6	3.1

[0365] 实施例10:比格犬PK实验

[0366] (1)供试品

[0367] 表23

[0368]

名称	供应商	物理状态	储存条件
Icodec	东莞市东阳光生物药研发有限公司	无色液体	4℃
Insulin-a10		无色液体	4℃

[0369] (2)样品配置

[0370] 用于药理实验的不同胰岛素类似物API均使用PBS缓冲溶液配置成所需浓度。

[0371] (3)实验动物

[0372] 表24

[0373]

种属	比格犬
级别	普通级
体重范围	9~11 kg
性别	雄性
供应商	北京玛斯生物技术有限公司
供应商地址	中国，北京
动物识别方法	耳号
动物使用数量	2 只

[0374] (4)实验方法

[0375] 2只比格犬,每组1只,采用双周期交叉设计,洗脱期1周,每周期单次后肢外侧小隐静脉给予10nmol/kg剂量的Icodec或Insulin-a10,于给药后0.083、0.25、0.5、1、2、6、8、24、30、48、72和96h进行采血离心血浆,检测血浆中Icodec或Insulin-a10的浓度。

[0376] (5)实验结果

[0377] 表25比格犬I.V.PK数据表

[0378]

实验化合物	C_{max}(ng/mL)	AUC_{last}(ng*h/mL)	$T_{1/2}$（h）
Icodec	1240±170	35700±120	35.7±6.7
Insulin-a10	1170±14	28300±3500	46±10.8

[0379] 表25和图7结果显示,与Icodec相比,Insulin-a10的C_{max}相当,AUC_{last}稍低,而Insulin-a10的半衰期为46±10.8h,明显高于Icodec的35.7±6.7h。综上所述,在犬体内Insulin-a10与Icodec相比C_{max}相当,半衰期更长。

[0380] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特

点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0381] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

SEQUENCE LISTING
<110> 广东东阳光药业有限公司
<120> 胰岛素类似物
<130> 2022
<160> 3
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 1
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20
<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 2
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
20 25
<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 3
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
20 25

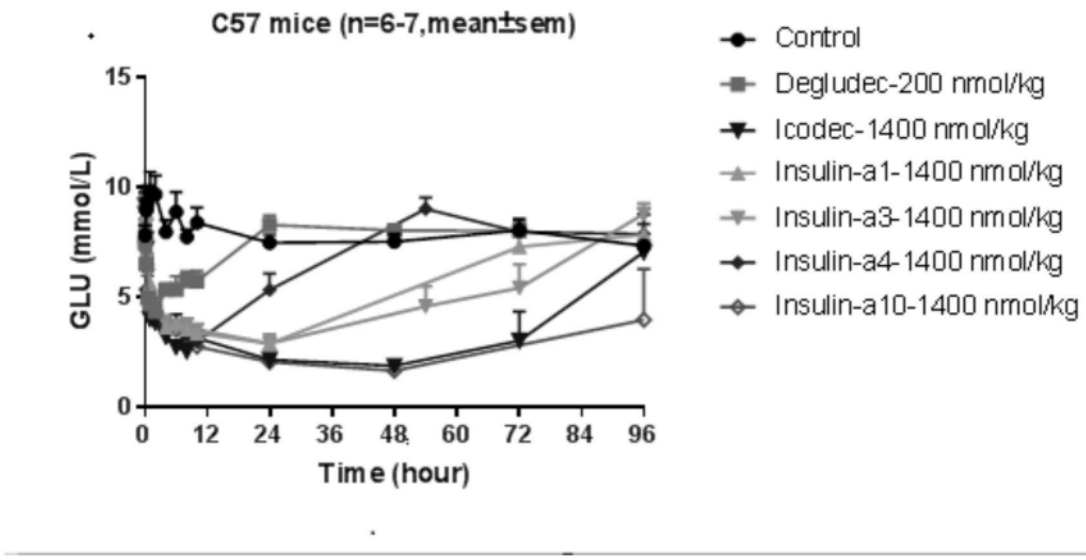

C57 mice (n=6-7,mean±sem)
GLU (mmol/L)
Time (hour)
Control
Degludec-200 nmol/kg
Icodec-1400 nmol/kg
Insulin-a1-1400 nmol/kg
Insulin-a3-1400 nmol/kg
Insulin-a4-1400 nmol/kg
Insulin-a10-1400 nmol/kg

图1

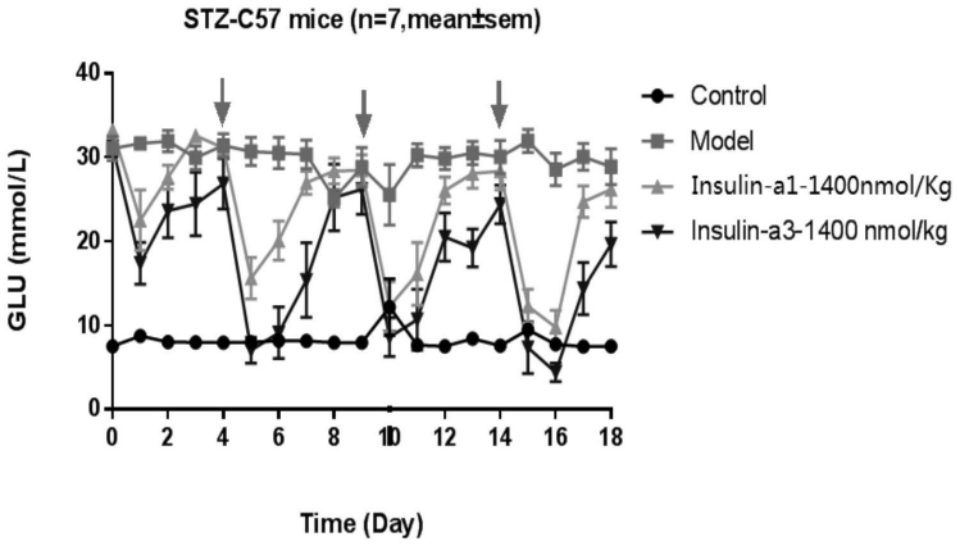

STZ-C57 mice (n=7,mean±sem)
GLU (mmol/L)
Time (Day)
Control
Model
Insulin-a1-1400nmol/Kg
Insulin-a3-1400 nmol/kg

图2

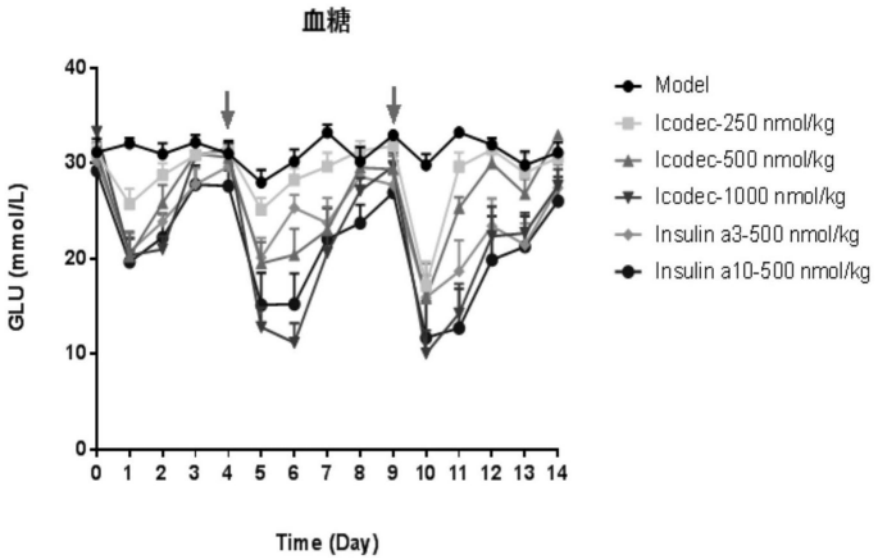

血糖
GLU (mmol/L)
Time (Day)
Model
Icodec-250 nmol/kg
Icodec-500 nmol/kg
Icodec-1000 nmol/kg
Insulin a3-500 nmol/kg
Insulin a10-500 nmol/kg

图3

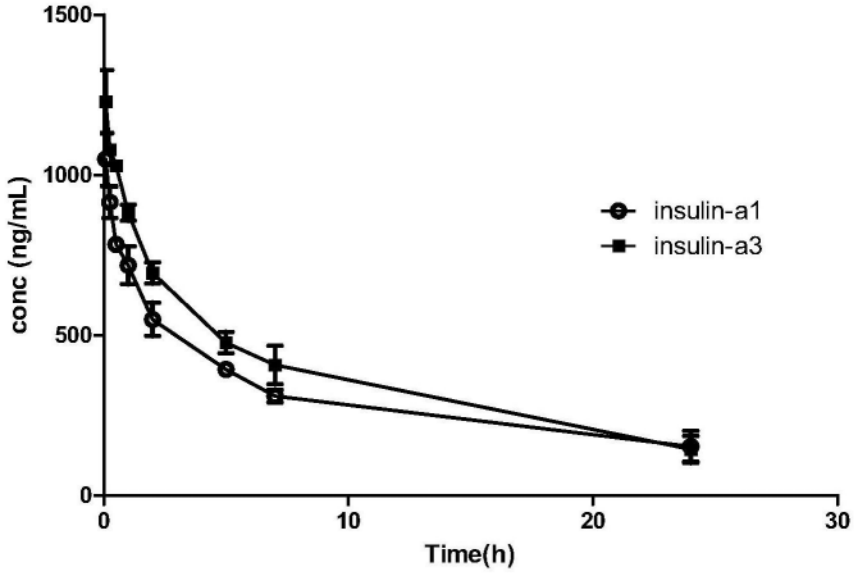

conc (ng/mL)
Time(h)
insulin-a1
insulin-a3

图4

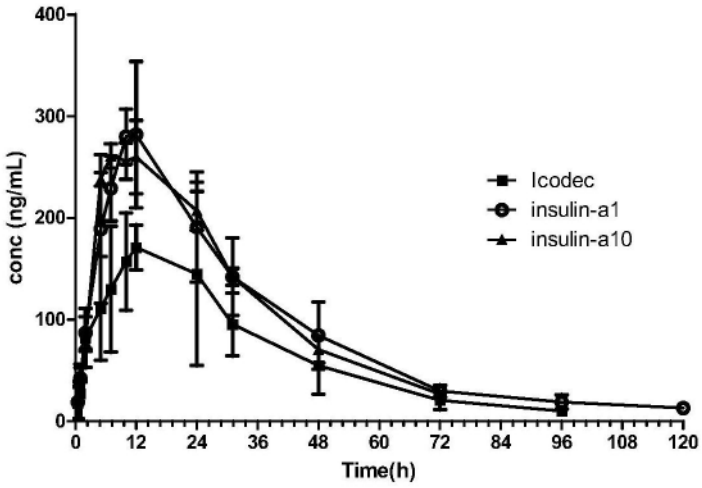

400
300
200
100
0
conc (ng/mL)
0
12
24
36
48
60
72
84
96
108
120
Time(h)
Icodec
insulin-a1
insulin-a10

图5

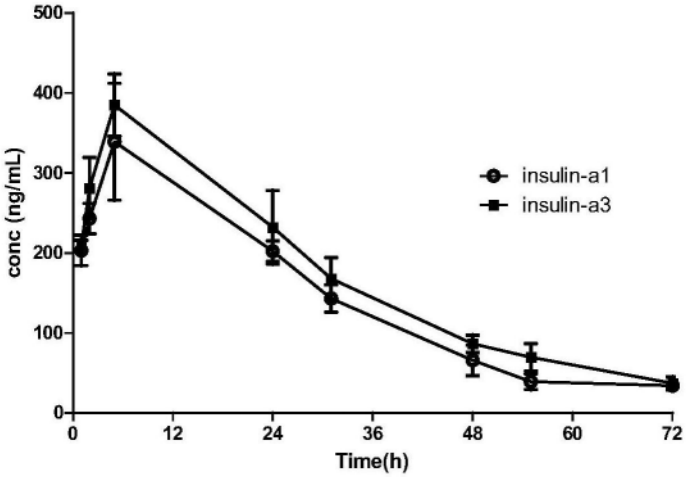

500
400
300
200
100
0
conc (ng/mL)
0
12
24
36
48
60
72
Time(h)
insulin-a1
insulin-a3

图6

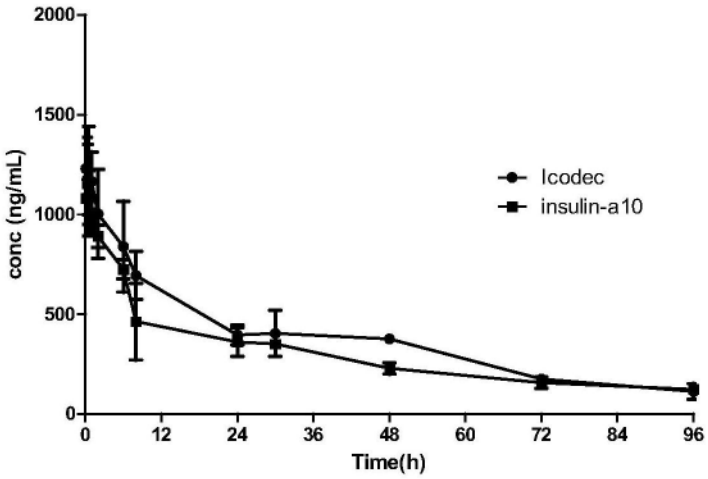

2000
1500
1000
500
0
conc (ng/mL)
0
12
24
36
48
60
72
84
96
Time(h)
Icodec
insulin-a10

图7