



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106459171 B

(45) 授权公告日 2020.12.15

(21) 申请号 201580010746.3 A61K 38/28 (2006.01)

(22) 申请日 2015.02.26 A61P 3/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号 A61P 3/06 (2006.01)

申请公布号 CN 106459171 A A61P 3/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.02.22 A61P 9/12 (2006.01)

(30) 优先权数据 A61P 3/00 (2006.01)

14157215.6 2014.02.28 EP A61P 9/10 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 A61P 9/00 (2006.01)

2016.08.26 A61P 25/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据 A61P 1/00 (2006.01)

PCT/EP2015/053989 2015.02.26 A61P 1/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据 (56) 对比文件

W02015/128403 EN 2015.09.03 WO 2009022005 A1,2009.02.19

(73) 专利权人 诺和诺德股份有限公司 US 5382574 A,1995.01.17

地址 丹麦鲍斯韦 US 6703017 B1,2004.03.09

(72) 发明人 P. 马德森 S. 霍斯特鲁普 Steensgaard D B等.Ligand-Controlled
M. 梅恩泽 T.B. 克杰德森 Assembly of Hexamers, Dihexamers, and
C.U. 赫乔林格加亚尔德 Linear Multihexamer Structures by the
C. 弗雷德利斯 Engineered Acylated Insulin Degludec.
《Biochemistry》.2013,第52卷(第2期),第295-
309页.

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 审查员 陈晋

司 72001

代理人 罗文锋 黄希贵

(51) Int. Cl. 权利要求书4页 说明书65页

C07K 14/62 (2006.01) 序列表3页 附图13页

(54) 发明名称

A22K,desB27,B29R,desB30,在赖氨酸22的
ε 位置处被酰化的人胰岛素类似物

(57) 摘要

本发明属于与糖尿病有关的医学状况的药物治疗领域。更具体地,本发明涉及人胰岛素类似物的新型酰化衍生物。本发明还提供了包含这样的胰岛素衍生物的药物组合物,并且涉及这样的衍生物在治疗或预防与糖尿病有关的医学状况中的用途。

CN 106459171 B

1. 一种胰岛素衍生物,该胰岛素衍生物是酰化的人胰岛素类似物,该类似物是:
相对于人胰岛素的[A22K, desB27, B29R, desB30];
并且该胰岛素类似物是通过用以下式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而衍生的:

[酰基]-[连接体]- (式II)

其中所述连接体基团是由1到10个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链;
其中

gGlu代表 γ 谷氨酸残基;

OEG代表8-氨基-3,6-二氧杂辛酸残基(式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-的基团);

该氨基酸残基可以以任意顺序存在;并且

该氨基酸链包含至少一个gGlu残基;并且

其中所述酰基是选自以下的 α, ω -二羧酸残基:

1,14-十四烷二酸;

1,15-十五烷二酸;和

1,16-十六烷二酸。

2. 一种胰岛素衍生物,该胰岛素衍生物是酰化的人胰岛素类似物,该类似物是:
相对于人胰岛素的[A22K, desB27, B29R, desB30];
并且该胰岛素类似物是通过用以下式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而衍生的:

[酰基]-[连接体]- (式II)

其中所述连接体基团是由1到10个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链;
其中

gGlu代表 γ 谷氨酸残基;

OEG代表8-氨基-3,6-二氧杂辛酸残基(式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-的基团);

该氨基酸残基可以以任意顺序存在;并且

该氨基酸链包含至少一个gGlu残基;并且

其中所述酰基是选自以下的 α, ω -二羧酸残基:

1,14-十四烷二酸;

1,15-十五烷二酸;和

1,16-十六烷二酸;

该酰化的类似物另外包含A14E和/或B3E,或B3Q置换。

3. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,该酰化的类似物另外包含B3E或B3Q置换。

4. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,该酰化的类似物另外包含A14E置换。

5. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,该酰化的类似物另外包含A14E和B3E置换。

6. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,该酰化的类似物另外包含B3E置换。

7. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,该酰化的类似物另外包含B3Q置换。

8. 根据权利要求2所述的胰岛素衍生物,所述类似物是相对于人胰岛素的[A14E, A22K, B3E, desB27, B29R, desB30];[A14E, A22K, desB27, B29R, desB30];[A22K, B3E, desB27, B29R, desB30];或[A22K, B3Q, desB27, B29R, desB30];并且所述胰岛素

类似物在A22位置的赖氨酸残基的ε氨基处被酰化。

9. 根据权利要求8所述的胰岛素衍生物,所述类似物是相对于人胰岛素的[A14E, A22K, desB27, B29R, desB30];[A22K, B3E, desB27, B29R, desB30];或[A22K, B3Q, desB27, B29R, desB30];并且所述胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的ε氨基处被酰化。

10. 根据权利要求8所述的胰岛素衍生物,所述类似物是相对于人胰岛素的[A22K, B3E, desB27, B29R, desB30];并且所述胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的ε氨基处被酰化。

11. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,其中所述连接体基团选自-gGlu-、-2xgGlu-、-3xgGlu-、-4xgGlu-、-gGlu-2xOEG-、-gGlu-3x(OEG-gGlu)-、-4xgGlu-2xOEG-、-2xOEG-和-2xOEG-gGlu-。

12. 根据权利要求11所述的胰岛素衍生物,其中所述连接体基团选自-gGlu-、-2xgGlu-、-4xgGlu-、-gGlu-2xOEG-、-gGlu-3x(OEG-gGlu)-、-2xOEG-和-2xOEG-gGlu-。

13. 根据权利要求11所述的胰岛素衍生物,其中所述连接体基团为-4xgGlu-。

14. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,其中所述酰基是衍生自1,14-十四烷二酸、1,15-十五烷二酸或1,16-十六烷二酸的二酸基团。

15. 根据权利要求14所述的胰岛素衍生物,其中所述酰基是衍生自1,14-十四烷二酸的二酸基团。

16. 根据权利要求1或2所述的胰岛素衍生物,其中所述 [酰基]-[连接体]-是十四烷二酰基-gGlu-、十四烷二酰基-2xgGlu-、十四烷二酰基-3xgGlu-、十四烷二酰基-4xgGlu-、十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-、十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG-、十四烷二酰基-2xOEG-、十五烷二酰基-4xgGlu-、十六烷二酰基-4xgGlu-、十六烷二酰基-gGlu-2xOEG-或十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu-。

17. 根据权利要求16所述的胰岛素衍生物,其中所述 [酰基]-[连接体]-是十四烷二酰基-4xgGlu-。

18. 根据权利要求1所述的胰岛素衍生物,其为:

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-2xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-2xOEG), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), desB27, B29R, desB30人胰岛素。

19. 根据权利要求2所述的胰岛素衍生物,其为:

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A14E, A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG)-gGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG)-gGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十五烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A14E, A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A14E, A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-2xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;或
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-3xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素。

20. 根据权利要求2所述的胰岛素衍生物, 其为:

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素。

21. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1-20中任一项所述的胰岛素衍生物以及一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

22. 根据权利要求21所述的药物组合物, 其为不添加锌离子的低锌组合物。

23. 根据权利要求21所述的药物组合物, 其为不添加锌离子的低锌组合物, 并且包含选自以下的酰化的人胰岛素类似物:

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG)-gGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十五烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG)-gGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A14E, A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A14E, A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

A22K (N(eps)-十四烷二酰基-2xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;以及
A22K (N(eps)-十四烷二酰基-3xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素。

24. 根据权利要求22-23中任一项所述的药物组合物,其被配制为低锌组合物,每6个胰岛素分子包含少于0.2个 Zn^{2+} 离子。

25. 根据权利要求22-23中任一项所述的药物组合物,其中未添加表面活性剂。

26. 根据权利要求22-23中任一项所述的药物组合物,其包含烟碱化合物。

27. 根据权利要求26所述的药物组合物,其中所述的烟碱化合物是烟酰胺。

28. 根据权利要求1-20中任一项所述的胰岛素衍生物在制备用于治疗或预防糖尿病、肥胖症、代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征、动脉粥样硬化、心血管疾病、炎性肠综合征或胃溃疡的药物中的用途。

29. 根据权利要求28的用途,其中所述的糖尿病为1型糖尿病或2型糖尿病。

30. 根据权利要求28的用途,其中所述的心血管疾病为高血压、心肌梗死、中风或冠心病。

A22K, desB27, B29R, desB30, 在赖氨酸22的 ϵ 位置处被酰化的人胰岛素类似物

技术领域

[0001] 本发明属于与糖尿病有关的医学状况的药物治疗领域。更具体地,本发明涉及人胰岛素类似物的新型酰化衍生物。本发明还提供了包含这样的衍生的胰岛素类似物的药物组合物,并且涉及这样的衍生物在治疗或预防与糖尿病有关的医学状况中的用途。

背景技术

[0002] 用于治疗糖尿病的胰岛素疗法已经使用了数十年。胰岛素疗法通常包括每天施用若干次胰岛素注射。这样的疗法通常包括每天施用一次或两次长效基础注射,以及在就餐时注射速效胰岛素(即餐时使用)。胰岛素疗法的一个关键改善是速效胰岛素类似物的引入。然而,即使采用速效胰岛素类似物,峰值胰岛素水平通常也不会注射后50至70分钟之前出现。

[0003] 因此,胰岛素注射没有复制胰岛素的天然时间-作用谱(profile)。特别是,在没有糖尿病的人中,第一阶段胰岛素释放的天然陡增(spike)导致血液胰岛素水平在葡萄糖从饮食进入血液的数分钟内上升。相反,注射的胰岛素仅缓慢地进入血液,其峰值胰岛素水平在常规人胰岛素注射后80至100分钟内出现。

[0004] 因为速效胰岛素类似物没有充分模拟第一阶段胰岛素释放,所以采用胰岛素疗法的糖尿病患者进食开始时存在的胰岛素水平仍然不足,并且在两餐之间存在过多的胰岛素。胰岛素递送的这种滞后可能导致餐后早期高血糖的发作。

[0005] 胰岛素具有自缔合性质,并且其浓度代表自缔合的主要因素。在高浓度时,特别是在药物制剂中时,胰岛素将自缔合成二聚体、六聚体、十二聚体和晶体。然而,胰岛素的生理学活性形式为单体,该单体与胰岛素受体结合并触发生物反应。

[0006] 胰岛素作用的速度(rapidity)取决于胰岛素从皮下组织被吸收得有多快。当皮下注射常规人胰岛素时,该制剂主要由含有两个锌离子的六聚体组成。由于其大小,该六聚体胰岛素具有较低的扩增速率,因此其吸收速率比较小的物质慢。

[0007] 两个锌原子位于六聚体内,其使分子对化学和物理降解稳定。注射后,在皮下组织中发生浓度驱使的动态平衡,导致该六聚体解离成二聚体,并随后成为单体。过去,这些常规人胰岛素制剂达到最大血浆浓度水平需要约120分钟。比常规人胰岛素更快吸收的锌-胰岛素制剂已经商品化,例如门冬胰岛素和赖脯胰岛素。

[0008] 无锌胰岛素制剂将能够实现更快的皮下吸收,但一般对于胰岛素而言,无锌制剂的化学和物理稳定性是个挑战。

[0009] 各种胰岛素衍生物已被建议用于不同的用途。

[0010] WO 1998 042749描述了用于肺部给药的无锌胰岛素晶体。

[0011] US 6960561描述了具有改善的稳定性的无锌和低锌胰岛素制剂。

[0012] WO 2007/096431描述了某些人胰岛素衍生物,包括在A22位置具有酰化的赖氨酸残基、在B29位置具有精氨酸残基并且为desB30的类似物,这些衍生物在生理pH值下可溶并

且具有延长的作用谱,并且旨在用作长效胰岛素。

[0013] WO 2009/022013描述了某些酰化的胰岛素类似物,包括在A22位置具有酰化的赖氨酸残基、在B29位置具有精氨酸残基并且为desB30的类似物,其具有较高的胰岛素受体结合亲和力,并且旨在用作长效胰岛素。

[0014] WO 2009/112583描述了某些胰岛素类似物,包括在A22位置具有赖氨酸残基、在B29位置具有精氨酸残基并且为desB30的类似物,其表现出改善的蛋白酶稳定性。

[0015] WO 2011/161124描述了含有额外的二硫键以改善稳定性的某些酰化的胰岛素类似物,包括在A22位置具有赖氨酸残基、在B29位置具有精氨酸残基并且为desB30的类似物。

[0016] WO 2012/171994描述了包含两个或更多个置换的某些胰岛素衍生物,包括在A22位置具有酰化的赖氨酸残基、在B29位置具有精氨酸残基并且为desB30的类似物,其具有延长的体内活性。

[0017] WO 2013 063572描述了任选地缺乏锌的超浓缩速效胰岛素类似物制剂。

[0018] 而且,具有白蛋白结合部分的肽和蛋白质的酰化已用于延长该肽和蛋白质的作用持续时间。

[0019] 然而,根据本发明的胰岛素衍生物尚未有报道,并且从未提出其作为速效胰岛素衍生物用于餐时使用的用途。

[0020] 发明目的

[0021] 本发明的一个目的是提供在皮下施用后具有餐时分布(prandial profile)的胰岛素类似物。

[0022] 本发明的另一个目的是提供在制剂中化学稳定的胰岛素类似物。

[0023] 本发明的第三个目的是提供在未添加锌的制剂中化学稳定的胰岛素类似物。

[0024] 本发明的第四个目的是提供在制剂中物理稳定的胰岛素类似物。

[0025] 本发明的第五个目的是提供在未添加锌的制剂中物理稳定的胰岛素类似物。

[0026] 本发明的第六个目的是提供在制剂中化学和物理稳定的胰岛素类似物。

[0027] 本发明的第七个目的是提供在未添加锌的制剂中化学和物理稳定的胰岛素类似物。

[0028] 本发明的第八个目的是提供在皮下施用后,相对于当前市售的餐时胰岛素具有肝偏好性(hepatopreferential)的胰岛素类似物。

[0029] 本发明的第九个目的是提供在皮下施用后,相对于当前市售的餐时胰岛素具有肝选择性的胰岛素类似物。

[0030] 本发明的第十个目的是提供在餐时皮下施用后,相对于当前市售的餐时胰岛素不容易引起低血糖的胰岛素类似物。

[0031] 本发明的第十一个目的是提供在餐时皮下施用后,相对于当前市售的餐时胰岛素不容易引起体重增加的胰岛素类似物。

[0032] 本发明的第十二个目的是提供在餐时皮下施用后,相对于当前市售的餐时胰岛素不容易引起低血糖和体重增加的胰岛素类似物。

[0033] 本发明的进一步的目的在于以上提到的一个或多个目的的组合,具体为提供在皮下施用后显示出餐时分布,同时在制剂中,特别是在未添加锌的制剂中化学稳定的胰岛素类似物。

发明内容

[0034] 我们已发现,相对于现有技术的相似胰岛素衍生物,本发明的A22K酰化的胰岛素衍生物具有显著改善的性质。我们特别发现,与现有技术的相似衍生物相比,在未添加锌离子的制剂中的本发明胰岛素衍生物与分子聚集体的较小大小相关。已知较小的物质比较大的物质扩散更快,因此预期将被更快地吸收。例如,可以如本文所述通过小角度X射线散射(SAXS)以及通过用实施例部分描述的SEC-HPLC(大小排阻HPLC)进行系列稀释来测量这些分子聚集体的大小。

[0035] 我们还发现,相对于现有技术的相似衍生物,在未添加锌离子的制剂中的本发明胰岛素衍生物在皮下施用至猪后被更快地吸收,由此证明了胰岛素用于餐时使用的潜在临床实用性。我们已发现,相对于现有技术的相似衍生物,在皮下施用至猪后,在未添加锌离子的制剂中的本发明胰岛素衍生物与较少的“拖尾(tailing)”相关。所谓较少的拖尾是指,所注射的胰岛素的皮下储留物(depot)比现有技术的相似类似物更快地被吸收,使得与现有技术的相似酰化衍生物相比,本发明胰岛素衍生物的皮下施用后平均停留时间(MRT)更短。

[0036] 无锌制剂能够实现更快的皮下吸收,但一般对于胰岛素而言,无锌制剂的化学和物理稳定性是个挑战,并且迄今为止只有赖谷胰岛素(Apidra®;B3K,B29E人胰岛素)被证明是可行的,而且只有在表面活性剂的存在下分散于小瓶中时才是可行的。

[0037] 现在我们发现,在B3位置处具有置换的本发明A22K酰化胰岛素衍生物的亚组非常意外地且前所未有地在未添加锌离子和表面活性剂的制剂中同时化学和物理稳定。

[0038] 使用酰化的胰岛素衍生物作为餐时胰岛素疗法的优势是,获得了比通过用未酰化的餐时胰岛素如门冬胰岛素、赖脯胰岛素或赖谷胰岛素治疗所达到的血浆胰岛素浓度更高的血浆胰岛素浓度。

[0039] 根据本发明的A22K酰化胰岛素衍生物在皮下施用后具有与餐时类似的时间-作用谱。

[0040] 根据本发明具有基于十四烷二酸、十五烷二酸或十六烷二酸的白蛋白结合体的A22K酰化胰岛素衍生物已显示赋予极高的胰岛素受体结合亲和力,该亲和力在1.5%人血清白蛋白(HSA)的存在下降低。

[0041] 根据本发明的A22K酰化胰岛素衍生物在生理盐浓度下溶解度不会降低。

[0042] 因此,在本发明的第一方面,本发明提供了新型胰岛素衍生物,该胰岛素衍生物是人胰岛素类似物的酰化衍生物,该类似物是相对于人胰岛素的[A22K,desB27,B29R,desB30];并且该胰岛素类似物是通过用以下式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的ε氨基进行酰化而衍生的:

[0043] [酰基]-[连接体]-

[0044] 其中该连接体基团是由1到10个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链;其中gGlu代表γ谷氨酸残基;OEG代表8-氨基-3,6-二氧杂辛酸残基(即,式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-的基团);该氨基酸残基可以以任意顺序存在;并且该氨基酸链包含至少一个gGlu残基;并且

[0045] 其中该酰基是选自1,14-十四烷二酸、1,15-十五烷二酸和1,16-十六烷二酸的α,ω-二羧酸残基;

[0046] 该酰化的类似物可以另外包含A14E,和/或B3E或B3Q置换。

[0047] 在另一个第一方面,本发明提供了包含本发明的胰岛素衍生物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0048] 在进一步的方面,本发明涉及本发明的胰岛素衍生物作为药物的用途。

[0049] 在更进一步的方面,本发明提供了用于治疗、预防或减轻与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症、代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)、高血压、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、心血管疾病、冠心病、炎症肠综合征、消化不良或胃溃疡有关的疾病、病症或状况的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的胰岛素衍生物。

[0050] 基于以下详述和实施例,本发明的其他目的对本领域技术人员将会变得显而易见。

具体实施方式

[0051] 胰岛素衍生物

[0052] 在本发明的第一方面,本发明提供了新型胰岛素衍生物,该胰岛素衍生物是酰化的人胰岛素类似物。

[0053] 本发明的胰岛素衍生物可具体被表征为一种酰化的人胰岛素类似物,该类似物是相对于人胰岛素的[A22K,desB27,B29R,desB30];

[0054] 并且该胰岛素类似物是通过用以下式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而衍生的:

[0055] [酰基]-[连接体]-

[0056] 其中该连接体基团是由1到10个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链;其中gGlu代表 γ 谷氨酸残基;OEG代表8-氨基-3,6-二氧杂辛酸残基(即,式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-的基团);该氨基酸残基可以以任意顺序存在;并且该氨基酸链包含至少一个gGlu残基;并且

[0057] 其中该酰基是选自1,14-十四烷二酸、1,15-十五烷二酸和1,16-十六烷二酸的 α , ω -二羧酸残基。

[0058] 本发明的胰岛素衍生物可以另外包含A14E,和/或B3E或B3Q置换。

[0059] 在一个实施方案中,所述人胰岛素类似物是相对于人胰岛素的[A14E,A22K,B3E,desB27,B29R,desB30]、[A14E,A22K,desB27,B29R,desB30];[A22K,B3E,desB27,B29R,desB30]、[A22K,B3Q,desB27,B29R,desB30]或[A22K,desB27,B29R,desB30];并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0060] 在另一个实施方案中,所述人胰岛素类似物是相对于人胰岛素的[A22K,desB27,B29R,desB30];并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0061] 在第三个实施方案中,所述人胰岛素类似物是相对于人胰岛素的[A22K,B3E,desB27,B29R,desB30];并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0062] 在第四个实施方案中,所述人胰岛素类似物是相对于人胰岛素的[A22K,B3Q,desB27,B29R,desB30];并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0063] 在第五个实施方案中,所述人胰岛素类似物是相对于人胰岛素的[A14E,A22K,

desB27, B29R, desB30]; 并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0064] 在第六个实施方案中, 所述人胰岛素类似物是相对于人胰岛素的[A14E, A22K, B3E, desB27, B29R, desB30]; 并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0065] 如上所述, 所述胰岛素类似物是通过用如上所述的式II的基团(即, 具有与连接基团结合的酰基的取代基)对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而衍生的。

[0066] 在本发明的上下文中, 根据式II的连接基团是由1到10个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链。

[0067] 在一个实施方案中, 根据式II的连接基团是由1到7个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链, 包含1到4个gGlu残基和0到3个OEG残基。

[0068] 在另一个实施方案中, 根据式II的连接基团选自-gGlu-、-2xgGlu-、-3xgGlu-、-4xgGlu-、-gGlu-2xOEG-、-gGlu-3x(OEG-gGlu)-、-4xgGlu-2xOEG-、-2xOEG-和-2xOEG-gGlu-。

[0069] 在第三个实施方案中, 根据式II的连接基团是-gGlu-。

[0070] 在第四个实施方案中, 根据式II的连接基团是-2xgGlu-。

[0071] 在第五个实施方案中, 根据式II的连接基团是-3xgGlu-。

[0072] 在第六个实施方案中, 根据式II的连接基团是-4xgGlu-。

[0073] 在第七个实施方案中, 根据式II的连接基团是-gGlu-2xOEG-。

[0074] 在第八个实施方案中, 根据式II的连接基团是-gGlu-3x(OEG-gGlu)-。

[0075] 在第九个实施方案中, 根据式II的连接基团是-4xgGlu-2xOEG-。

[0076] 在第十个实施方案中, 根据式II的连接基团是-2xOEG-。

[0077] 在第十一个实施方案中, 根据式II的连接基团是-2xOEG-gGlu-。

[0078] 在本发明的上下文中, 根据式II的酰基衍生自1,14-十四烷二酸、1,15-十五烷二酸或1,16-十六烷二酸。

[0079] 在一个实施方案中, 根据式II的酰基衍生自1,14-十四烷二酸(即, 1,14-十四烷二酰基)。

[0080] 在另一个实施方案中, 根据式II的酰基衍生自1,15-十五烷二酸(即, 1,15-十五烷二酰基)。

[0081] 在第三个实施方案中, 根据式II的酰基衍生自1,16-十六烷二酸(即, 1,16-十六烷二酰基)。

[0082] 在进一步的实施方案中, 如上所述的式II的基团是十四烷二酰基-gGlu-、十四烷二酰基-2xgGlu-、十四烷二酰基-3xgGlu-、十四烷二酰基-4xgGlu-、十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-、十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG-、十四烷二酰基-2xOEG-、十五烷二酰基-4xgGlu-、十六烷二酰基-4xgGlu-、十六烷二酰基-gGlu-2xOEG-或十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu-。

[0083] 在另一个实施方案中, 式II的基团是十四烷二酰基-gGlu-。

[0084] 在第三个实施方案中, 式II的基团是十四烷二酰基-2xgGlu-。

[0085] 在第四个实施方案中, 式II的基团是十四烷二酰基-3xgGlu-。

[0086] 在第五个实施方案中, 式II的基团是十四烷二酰基-4xgGlu-。

[0087] 在第六个实施方案中, 式II的基团是十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-。

- [0088] 在第七个实施方案中,式II的基团是十四烷二酰基-2xOEG-。
- [0089] 在第八个实施方案中,式II的基团是十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG-。
- [0090] 在第九个实施方案中,式II的基团是十五烷二酰基-4xgGlu-。
- [0091] 在第十个实施方案中,式II的基团是十六烷二酰基-4xgGlu-。
- [0092] 在第十一个实施方案中,式II的基团是十六烷二酰基-gGlu-2xOEG-。
- [0093] 在第十二个实施方案中,式II的基团是十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG) -gGlu-。
- [0094] 本发明的胰岛素衍生物可具体为选自下组中的一个:
- [0095] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0096] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0097] A14E,A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0098] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-4xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0099] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0100] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG) -gGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0101] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0102] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0103] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG) -gGlu) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0104] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-2xgGlu) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0105] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-4xgGlu) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0106] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0107] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG) -gGlu) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0108] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0109] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0110] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0111] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-2xOEG) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0112] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-4xgGlu) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0113] A22K (N (eps) -十五烷二酰基-4xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0114] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG) ,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0115] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0116] A14E,A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0117] A14E,A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0118] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-2xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0119] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;以及
- [0120] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-3xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素。
- [0121] 本发明化合物的优选特征

[0122] 可以参考以下特征中的一个或多个进一步表征本发明：

[0123] 1. 一种酰化的人胰岛素类似物，该类似物为[A22K,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物任选地具有A14E,和/或B3E或B3Q置换；并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0124] 2. 根据第1项所述的酰化的人胰岛素类似物，该类似物为相对于人胰岛素的[A22K,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物具有B3E或B3Q置换；并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0125] 3. 根据第1项所述的酰化的人胰岛素类似物，该类似物为相对于人胰岛素的[A22K,B3E,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0126] 4. 根据第1项所述的酰化的人胰岛素类似物，该类似物为相对于人胰岛素的[A22K,B3Q,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0127] 5. 根据第1项所述的酰化的人胰岛素类似物，该类似物为相对于人胰岛素的[A14E,A22K,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0128] 6. 根据第1项所述的酰化的人胰岛素类似物，该类似物为相对于人胰岛素的[A14E,A22K,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物具有B3E或B3Q置换；并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0129] 7. 根据第1项所述的酰化的人胰岛素类似物，该类似物为相对于人胰岛素的[A14E,A22K,B3E,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物在A22位置的赖氨酸残基的 ϵ 氨基处被酰化。

[0130] 8. 根据第1项所述的酰化的人胰岛素类似物，该类似物为相对于人胰岛素的[A22K,desB27,B29R,desB30]；并且该胰岛素类似物是通过用以下式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而衍生的：

[0131] [酰基]-[连接体]-

[0132] 其中该连接体基团是由1到10个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链；其中

[0133] gGlu代表 γ 谷氨酸残基；并且

[0134] OEG代表8-氨基-3,6-二氧杂辛酸残基(即,式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-的基团)；

[0135] 该氨基酸残基可以以任意顺序存在；并且

[0136] 该氨基酸链包含至少一个gGlu残基；并且

[0137] 其中该酰基是选自以下的 α,ω -二羧酸残基：

[0138] 1,14-十四烷二酸；

[0139] 1,15-十五烷二酸；和

[0140] 1,16-十六烷二酸；

[0141] 该酰化的类似物可以另外包含A14E,和/或B3E或B3Q置换。

[0142] 9. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物，其中所述酰基是衍生自1,14-十四烷

二酸、1,15-十五烷二酸或1,16-十六烷二酸的二酸基团。

[0143] 10. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述酰基是衍生自1,14-十四烷二酸或1,16-十六烷二酸的二酸基团。

[0144] 11. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述酰基是衍生自1,14-十四烷二酸的二酸基团。

[0145] 12. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述酰基是衍生自1,16-十六烷二酸的二酸基团。

[0146] 13. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述酰基是衍生自1,15-十五烷二酸的二酸基团。

[0147] 14. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-10个gGlu残基。

[0148] 15. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-8个gGlu残基。

[0149] 16. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-6个gGlu残基。

[0150] 17. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-4个gGlu残基。

[0151] 18. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-3个gGlu残基。

[0152] 19. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-2个gGlu残基。

[0153] 20. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1个gGlu残基。

[0154] 21. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含2个gGlu残基。

[0155] 22. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含3个gGlu残基。

[0156] 23. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含4个gGlu残基。

[0157] 24. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-6个OEG残基。

[0158] 25. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-4个OEG残基。

[0159] 26. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1-3个OEG残基。

[0160] 27. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含1个OEG残基。

[0161] 28. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含2个OEG残基。

[0162] 29. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团包含3个OEG残基。

[0163] 30. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团不包含OEG残基。

[0164] 31. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团选自-gGlu-、-2xgGlu-、-3xgGlu-、-gGlu-3x(OEG-Glu)-、-4xgGlu-、-2xOEG-、-4xgGlu-2xOEG-、-2xOEG-gGlu-和-gGlu-2xOEG-。

[0165] 32. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团选自-gGlu-、-gGlu-3x(OEG-gGlu)-和-gGlu-2xOEG-。

[0166] 33. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中所述连接基团选自-gGlu-、-2xgGlu-和-4xgGlu-。

[0167] 34. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中式II[酰基]-[连接体]-的基团是十四烷二酰基-gGlu-、十四烷二酰基-2xgGlu-、十四烷二酰基-3xgGlu-、十四烷二酰基-4xgGlu-、十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-、十四烷二酰基-2xOEG-、十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG-、十六烷二酰基-4xgGlu-、十六烷二酰基-gGlu-2xOEG-或十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu-。

[0168] 35. 根据第7项所述的酰化的人胰岛素类似物,其中式II[酰基]-[连接体]-的基团是十四烷二酰基-gGlu-、十四烷二酰基-2xgGlu-、十四烷二酰基-4xgGlu-、十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-、或十四烷二酰基-2xOEG-、十六烷二酰基-4xgGlu-、十六烷二酰基-gGlu-2xOEG-或十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu-。

[0169] 定义

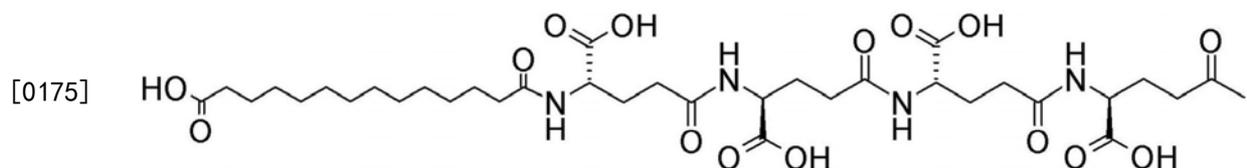
[0170] 命名法

[0171] 本文中,胰岛素的命名根据以下原则进行:

[0172] 术语“类似物”频繁地用于在经历进一步的化学修饰(衍生)、特别是酰化之前的所讨论的胰岛素蛋白质或肽。由这样的化学修饰(衍生)所产生的产物通常被称为“衍生物”或“酰化的类似物”。然而,在本申请的上下文中,术语“类似物”表示人胰岛素的类似物以及这类人胰岛素类似物的(酰化的)衍生物。

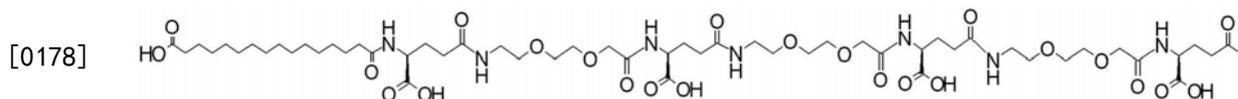
[0173] 名称作为相对于人胰岛素的类似物、衍生物和修饰(酰化)而给出。对于酰基部分(即,式II的[酰基]-[连接体]-基团)的命名,在一些情况下根据IUPAC命名法进行命名,而在其他情况下按照肽命名法进行命名。

[0174] 作为一个示例,以下结构(化学式1)的酰基部分:



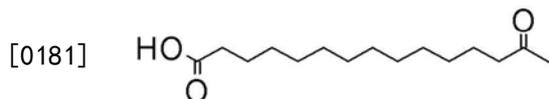
[0176] 可以被命名为“十四烷二酰基-4xgGlu”、“十四烷二酰基-4x γ Glu”或“1,14-十四烷二酰基-4xgGlu”等,其中 γ Glu(和gGlu)是L构型的氨基酸 γ 谷氨酸的简写符号,并且“4x”是指后接的残基重复4次。

[0177] 类似地,以下结构(化学式2)的酰基部分:



[0179] 可以被命名为例如“十六烷二酰基-(gGlu-OEG)₃-gGlu”、“十六烷二酰基-(gGlu-OEG)₃-gGlu”、“十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu”、“1,16-十六烷二酰基-(gGlu-OEG)₃-gGlu”、“1,16-十六烷二酰基-(gGlu-OEG)₃-gGlu”、“1,16-十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu”、“十六烷二酰基-(γGlu-OEG)₃-γGlu”、“十六烷二酰基-(γGlu-OEG)₃-γGlu”或“十六烷二酰基-3x(γGlu-OEG)-γGlu”；

[0180] 其中以下结构(化学式3)的部分：



[0182] 可以被命名为例如十四烷二酰基、1,14-十四烷二酰基或(简写符号)C14二酸。类似的符号适用于具有15和16个碳原子的类似残基，十五烷二酰基和十六烷二酰基分别对应C15二酸和C16二酸。

[0183] γGlu(和gGlu)是L构型的氨基酸γ谷氨酸的简写符号。

[0184] OEG是氨基酸残基8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即NH₂(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₂CO₂H的简写符号。

[0185] “2x”和“3x”分别指后接的残基重复2次、3次。

[0186] 例如,实施例1的胰岛素衍生物被命名为“A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素”,以表示含有人胰岛素中的21个氨基酸残基的A链已被延伸了1个氨基酸(A22位置)——赖氨酸(K),该A链进一步通过用十四烷二酰基-4xgGlu部分对A22的赖氨酸残基中的ε氮(表示为N^ε(或N(eps)))进行酰化而被修饰;在B27位置的氨基酸-人胰岛素中的T已被删除;在B29位置的氨基酸-人胰岛素中的K已被精氨酸R置换;在B30位置的氨基酸-人胰岛素中的苏氨酸T已被删除。下式中的星号表示,与人胰岛素相比,所讨论的残基是不同的(即,被置换)。

[0187] 在整个申请中,同时给出了本发明的优选胰岛素的通式和名称。

[0188] 此外,还根据IUPAC命名法(OpenEye, IUPAC样式)命名了本发明的胰岛素。根据该命名法,实施例1的胰岛素衍生物被指定以下的名称:N{α}([ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε}[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys, (B)-肽。

[0189] 应注意,通式可以这样书写,其中赖氨酸残基(通过酰化而修饰)以展开的赖氨酸残基的方式绘出(如例如实施例23中所示)或以收缩的赖氨酸残基的方式绘出(如例如实施例1中所示)。在所有情况下,酰基均与赖氨酸残基的ε氮连接。

[0190] 为了完整起见,可以提到,在B27位置的残基的缺失(desB27)导致(在形式上)剩余的氨基酸残基向N末端移动一个残基。因此,由于在B28位置的残基是脯氨酸而在B29位置的残基是精氨酸(参见,例如,实施例1的化合物),因此这样的类似物还可以被命名为B27P, B28R, desB29-30。这是因为通过删除B27,序列中的下一个氨基酸随后移动位置,因此在B28位置的氨基酸(脯氨酸)移至B27位置。

[0191] 物理稳定性

[0192] 如本文所用的术语胰岛素制剂的“物理稳定性”是指由于蛋白质暴露于热机械应力和/或与去稳定化的界面及表面(如疏水性表面和界面)相互作用,导致蛋白质形成无生物活性和/或不可溶的蛋白质聚集体的倾向。在将装在合适容器(例如,筒匣或小瓶)中的制剂在不同温度下暴露于机械/物理应力(例如,搅拌)不同的时间段后,通过目测和/或浊度测量来评估水性蛋白质制剂的物理稳定性。在暗背景下采用锐聚焦的光进行制剂的目测。当制剂在日光下显示出目视可见的混浊时,将该制剂分类为就蛋白质聚集而言物理不稳定的。或者,可以通过技术人员公知的简单浊度测量来评估制剂的浊度。还可以通过采用蛋白质构象状态的光谱分析剂或探针来评估水性蛋白质制剂的物理稳定性。该探针优选为优先与蛋白质的非天然构象异构体结合的小分子。蛋白质结构的小分子光谱探针的一个实例是硫代黄素T。硫代黄素T是已广泛用于检测淀粉样原纤维的荧光染料。在原纤维以及可能的其他蛋白质构型的存在下,当硫代黄素T与原纤维蛋白质形式结合时,硫代黄素T产生了在约450nm处的新的最大激发以及在约482nm处的增强发射。未结合的硫代黄素T在这些波长下基本没有荧光。

[0193] 化学稳定性

[0194] 如本文所用的术语蛋白质制剂的“化学稳定性”是指共价蛋白质结构的变化,其导致与天然蛋白质结构相比具有可能更小的生物效力和/或可能增加的免疫原性性质的化学降解产物的形成。根据天然蛋白质的类型和性质以及该蛋白质所暴露的环境,可以形成各种化学降解产物。在蛋白质制剂的储存和使用过程中,常常观察到逐渐增大的化学降解产物量。大多数蛋白质容易脱酰胺,在脱酰胺过程中,谷氨酰胺酰基或天冬酰胺酰基残基中的侧链酰胺基团水解形成游离的羧酸或天冬酰胺酰基残基,以形成异Asp衍生物。其他降解途径包括高分子量产物的形成,其中两个或更多个蛋白质分子通过转酰胺基作用和/或二硫键相互作用彼此共价结合,从而导致共价结合的二聚体、寡聚物和聚合物降解产物的形成(Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern TJ&Manning MG, Plenum Press, New York 1992)。(例如,甲硫氨酸残基的)氧化可以作为化学降解的另一种变型而被提及。可以通过测量暴露于不同环境条件后不同时间点的化学降解产物的量来评估蛋白质制剂的化学稳定性(通常可以通过例如提高温度来加速降解产物的形成)。通常通过采用各种色谱分析技术(例如,SEC-HPLC和/或RP-HPLC)根据分子大小、疏水性和/或电荷分离降解产物来确定每种单独的降解产物的量。由于HMWP产物可能是免疫原性的且无生物活性的,因此低水平的HMWP是有利的。

[0195] 合成方法

[0196] 本发明的胰岛素衍生物可以通过用于制备胰岛素、胰岛素类似物和胰岛素衍生物的常规方法,特别是工作实施例中描述的方法而获得。

[0197] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物通过用式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而获得,该式II的基团是十四烷二酰基-4xgGlu。

[0198] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物通过在高pH下,特别是在9.5至13范围内的pH下,用式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而获得,该式II的基团是十四烷二酰基-4xgGlu。

[0199] 更具体地,本发明的胰岛素衍生物通过用化合物(S)-2-((S)-4-羧基-4-((S)-4-

羧基-4-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三碳酰基氨基)-丁酰基氨基]-丁酰基氨基)-戊二酸5-(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)酯(或可替代地,指定的十四烷二酰基-4xgGlu-OSu)(化学式4)对A22位置处的赖氨酸残基的ε氨基进行酰化而获得。

[0200] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素衍生物通过用化合物14-[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)氧基-2-氧代乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-2-氧代乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-4-氧代丁基]氨基]-14-氧代十四烷酸(或可替代地,指定的十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu)(化学式5)对A22位置处的赖氨酸残基的ε氨基进行酰化而获得。

[0201] 本发明化合物的合成的优选特征

[0202] 可以参考以下特征中的一个或多个进一步表征本发明:

[0203] 1. 化合物(S)-2-((S)-4-羧基-4-{(S)-4-羧基-4-[(S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三碳酰基氨基)-丁酰基氨基]-丁酰基氨基)-戊二酸5-(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)酯(或可替代地,指定的十四烷二酰基-4xgGlu-OSu)(化学式4),其在酰化过程中用作本发明胰岛素衍生物的合成中的中间体。

[0204] 2. 化合物14-[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)氧基-2-氧代乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-2-氧代乙氧基]乙氧基]乙基氨基]-4-氧代丁基]氨基]-14-氧代十四烷酸(或可替代地,指定的十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu)(化学式5),其在酰化过程中用作本发明胰岛素衍生物的合成中的中间体。

[0205] 3. 根据第1-2项中任一项所述的化合物,其用作胰岛素衍生物合成中的中间体化合物,该胰岛素衍生物是酰化的人胰岛素类似物,该类似物相对于人胰岛素具有突变A22K,并且第1-2项中任一项的化合物在该位置处被酰化。

[0206] 4. 根据第1-2项中任一项所述的化合物,其用作胰岛素衍生物合成中的中间体化合物,该胰岛素衍生物是酰化的人胰岛素类似物,该类似物是相对于人胰岛素的[A22K, desB27, B29R, desB30],并且该类似物在A22K位置处被第1-2项中任一项的化合物酰化。

[0207] 5. 根据第1-2项中任一项所述的化合物,其用作胰岛素衍生物合成中的中间体化合物,该胰岛素衍生物是酰化的人胰岛素类似物,该类似物是相对于人胰岛素的[A22K, desB27, B29R, desB30],并且该酰化的类似物可以另外包含A14E,和/或B3E或B3Q置换,并且该类似物在A22K位置处被第1-2项中任一项的化合物酰化。

[0208] 6. 根据第1项所述的化合物,其用作以下物质的合成中的中间体化合物:

[0209] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0210] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0211] A14E, A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0212] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0213] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0214] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;或

[0215] A14E, A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素。

[0216] 生物活性

[0217] 在另一方面,本发明提供了用作药物或用于制备药物或药物组合物的新型胰岛素

衍生物。

[0218] 发现本发明的胰岛素衍生物是被认为非常适合餐时使用的短效和速效胰岛素衍生物。

[0219] 本发明的胰岛素衍生物均具有足以激活胰岛素受体的胰岛素受体亲和力,以便产生需要的血糖响应,即,能够降低动物和人类的血糖。

[0220] 发现本发明的胰岛素衍生物具有平衡的胰岛素受体 (IR) 与胰岛素样生长因子1受体 (IGF-1R) 亲和力比 (IR/IGF-1R)。

[0221] 在一个方面,本发明的A22K酰化胰岛素具有高于0.3、高于0.4、高于0.5、高于0.6、高于0.7、高于0.8、高于0.9、高于1、高于1.5或高于2的IR/IGF-1R比。

[0222] 在另一个方面,该A22K酰化胰岛素类似物是本发明的化合物,其中式II的酰基衍生自1,14-十四烷二酸,并且在向猪皮下注射600 μ M(近似值)本发明的酰化胰岛素类似物的制剂(含有1.6% (w/vol, 近似值) 甘油和30mM苯酚/间甲酚, pH 7.4)后,该酰化胰岛素类似物具有短于250分钟、短于200分钟、短于175分钟、短于150分钟、短于125分钟的平均停留时间 (MRT)。

[0223] 在另一个实施方案中,该A22K酰化胰岛素类似物是本发明的化合物,其中式II的酰基衍生自1,16-十六烷二酸,并且在向猪皮下注射600 μ M(近似值)本发明的酰化胰岛素类似物的制剂(含有1.6% (w/vol, 近似值) 甘油和30mM苯酚/间甲酚, pH 7.4)后,该酰化胰岛素类似物具有短于700分钟、短于600分钟、短于500分钟、短于400分钟、短于300分钟的平均停留时间 (MRT)。

[0224] 在进一步的方面,本发明涉及本发明的酰化胰岛素类似物的医学用途,特别是这样的胰岛素衍生物用于治疗、预防或减轻与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症、代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)、高血压、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、心血管疾病、冠心病、炎性肠综合征、消化不良或胃溃疡有关的疾病、病症或状况的用途,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的胰岛素衍生物。

[0225] 在另一个实施方案中,本发明涉及这样的胰岛素衍生物用于治疗、预防或减轻与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病或葡萄糖耐量减低有关的疾病、病症或状况的用途,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的胰岛素衍生物。

[0226] 在第三个实施方案中,本发明涉及这样的胰岛素衍生物用于治疗、预防或减轻与糖尿病,特别是与1型糖尿病或2型糖尿病有关的疾病、病症或状况的用途。

[0227] 药物组合物

[0228] 本发明涉及可用作药物的酰化胰岛素类似物。

[0229] 因此,在另一个方面,本发明提供了包含治疗有效量的根据本发明的胰岛素衍生物的新型药物组合物。

[0230] 根据本发明的药物组合物任选地包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0231] 本发明的药物组合物可以进一步包含在药物组合物中常用的其他赋形剂,例如,防腐剂、螯合剂、张度剂、吸收促进剂、稳定剂、抗氧化剂、聚合物、表面活性剂、金属离子、油性载体和蛋白质(例如,人血清白蛋白、明胶或蛋白质)。

[0232] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物组合物是水性制剂,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案中,该药物组合物是水溶液。

[0233] 术语“水性制剂”被定义为包含至少50%w/w的水的制剂。同样地,术语“水溶液”被定义为包含至少50%w/w的水的溶液,并且术语“水性悬浮液”被定义为包含至少50%w/w的水的悬浮液。水性悬浮液可以含有与适合于制备水性悬浮液的赋形剂混合的活性化合物。

[0234] 在本发明的一个实施方案中,所述胰岛素制剂包含本发明的胰岛素衍生物的水溶液,其中所述胰岛素化合物以约0.1mM至约20.0mM的浓度,更具体地以约0.2mM至约4.0mM、约0.3mM至约2.5mM、约0.5mM至约2.5mM、约0.6mM至约2.0mM或约0.6mM至约1.2mM的浓度存在。

[0235] 在本发明的另一个实施方案中,所述胰岛素制剂包含本发明的胰岛素衍生物的水溶液,其中所述胰岛素化合物以约0.1mM、约0.3mM、约0.4mM、约0.6mM、约0.9mM、约1.2mM、约1.5mM或约1.8mM的浓度存在。

[0236] 本发明的药物组合物可以进一步包含缓冲液体系。该缓冲液可以选自但不限于乙酸钠、碳酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、N,N-二羟乙基甘氨酸(bicine)、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)、苹果酸、甘氨酸-甘氨酸、乙二胺、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些具体缓冲液中的每一种均构成本发明的替代实施方案。

[0237] 在一个实施方案中,所述缓冲液是磷酸盐缓冲液。在另一个实施方案中,所述磷酸盐缓冲液的浓度在约0.1mM至20mM的范围内。在又一个实施方案中,所述磷酸盐缓冲液的浓度在0.1mM至约10mM,或约0.1mM至约8mM,约1mM至约8mM,或约2mM至约8mM,或6mM至8mM的范围内。

[0238] 本发明的可注射药物组合物的pH在3至8.5的范围内。优选地,根据本发明的可注射药物组合物具有在约6.8至约7.8范围内的pH。

[0239] 在一个实施方案中,pH在约7.0至约7.8或7.2至7.6的范围内。

[0240] 本发明的胰岛素制剂可以进一步包含张度剂。该张度剂可以选自盐(例如,氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如,L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、醛醇(例如,甘油(丙三醇)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如,PEG400)或其混合物。可以使用任何糖,如单糖、二糖或多糖,或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、右旋糖苷、支链淀粉、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。在一个实施方案中,糖添加剂是蔗糖。糖醇包括例如甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在一个实施方案中,糖醇添加剂是甘露糖醇。以上提及的糖或糖醇可以单独或组合使用。这些具体张度剂中的每一种或其混合物均构成本发明的替代实施方案。

[0241] 在本发明的一个实施方案中,甘油和/或甘露糖醇和/或氯化钠可以以对应于0至250mM、0至200mM或0至100mM浓度的量存在。

[0242] 本发明的胰岛素制剂可以进一步包含药学上可接受的防腐剂。该防腐剂可以以足以获得防腐效果的量存在。本发明的药物组合物中的防腐剂的量可以从例如本领域的文献和/或例如商业产品中的已知防腐剂量来确定。这些具体防腐剂中的每一种或其混合物均

构成本发明的替代实施方案。防腐剂在药物制剂中的使用在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995中进行了描述。

[0243] 在一个实施方案中, 可注射药物组合物包含至少一种酚类化合物作为防腐剂。

[0244] 在另一个实施方案中, 根据本发明使用的酚类化合物可以以最终可注射药物组合物的最多约6mg/mL, 特别是最终可注射药物组合物的最多约4mg/mL的量存在。

[0245] 在另一个实施方案中, 根据本发明使用的酚类化合物可以以最终可注射药物组合物的最多约4.0mg/mL, 特别是约0.5mg/mL至约4.0mg/mL, 或约0.6mg/mL至约4.0mg/mL的量存在。

[0246] 在另一个实施方案中, 所述防腐剂是苯酚。

[0247] 在另一个实施方案中, 所述可注射药物组合物包含苯酚与间甲酚的混合物作为防腐剂。

[0248] 在另一个实施方案中, 所述可注射药物组合物包含约16mM苯酚(1.5mg/mL)和约16mM间甲酚(1.72mg/mL)。

[0249] 本发明的药物组合物可以进一步包含螯合剂。螯合剂在药物制剂中的使用是技术人员公知的。为方便起见, 参考Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995。

[0250] 本发明的药物组合物可以进一步包含吸收促进剂。吸收促进剂的组可以包括但不限于烟碱化合物。术语烟碱化合物包括烟酰胺、烟酸、尼克酸、尼克酰胺(niacin amide)和维生素B3和/或其盐和/或其任何组合。

[0251] 在一个实施方案中, 所述烟碱化合物是烟酰胺, 和/或烟酸, 和/或其盐。在另一个实施方案中, 所述烟碱化合物是烟酰胺。根据本发明使用的烟碱化合物尤其可以是N-甲基烟酰胺、N,N-二乙基烟酰胺、N-乙基烟酰胺、N,N-二甲基烟酰胺、N-丙基烟酰胺或N-丁基烟酰胺。

[0252] 在另一个实施方案中, 烟碱化合物以约5mM至约200mM的量; 特别是以约20mM至约200mM的量; 以约100mM至约170mM的量; 或以约130mM至约170mM, 例如约130mM、约140mM、约150mM、约160mM或约170mM的量存在。

[0253] 本发明的药物组合物可以进一步包含稳定剂。如本文所用的术语“稳定剂”是指添加至含有多肽的药物制剂中以便稳定该肽, 即, 延长这类制剂的保质期和/或使用时间的化学品。为方便起见, 参考Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 1995。

[0254] 本发明的药物组合物可以进一步包含一定量的氨基酸碱, 该量足以降低多肽或蛋白质在该组合物储存期间的聚集体形成。术语“氨基酸碱”是指氨基酸或氨基酸的组合, 其中任何给定的氨基酸均以其游离碱形式或其盐形式存在。该氨基酸尤其可以是精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、氨基胍、鸟氨酸或N-单乙基-L-精氨酸、乙硫氨酸或丁硫氨酸, 或S-甲基-L半胱氨酸。在本发明的一个实施方案中, 该氨基酸碱可以以对应于1至100mM、1至50mM或1至30mM浓度的量存在。

[0255] 在一个实施方案中, 本发明的药物组合物可以进一步包含表面活性剂。如本文所用的术语“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。表面活性剂优先在界面处积累, 其亲水性部分朝向水(亲水相)而亲脂性部

分朝向油相或疏水相(即,玻璃、空气、油等)。表面活性剂开始形成胶束时的浓度被称为临界胶束浓度或CMC。而且,表面活性剂降低液体的表面张力。表面活性剂也被称为两亲化合物。表面活性剂在药物制剂中的使用是技术人员公知的。为方便起见,参考Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995。

[0256] 本发明进一步涉及一种用于制备这样的胰岛素制剂的方法。本发明的胰岛素制剂可以通过采用多种公认的方法中的任何方法来制备。例如,该制剂可以通过以下步骤来制备:将赋形剂的水溶液与胰岛素衍生物的水溶液混合,随后将pH调节至所需水平,并用水将该混合物补充至最终体积,随后过滤除菌。

[0257] 无锌药物组合物

[0258] 胰岛素制剂在传统上包含作为例如氯化物或乙酸盐添加的锌,以获得可接受的药物制剂稳定性。然而,令人惊讶地发现,本发明的某些胰岛素衍生物在保持足够的化学和物理稳定性的同时,可以被配制成未添加锌的药物组合物,从而比需要 Zn^{2+} 离子来维持足够的化学和物理稳定性的相当的胰岛素类似物起效更快。无锌制剂被较快地从皮下组织吸收,因此允许餐时使用。

[0259] 在这方面,需要提到的是,无锌胰岛素药物组合物实际上难以获得,因为痕量的锌可能或多或少地存在于常规用于制备药物组合物的赋形剂中,特别是在医学容器使用的橡胶材料中。

[0260] 因此,在一个方面,本发明提供了包含本发明的胰岛素衍生物的药物组合物,其被配制为低锌组合物,即没有向该制剂中单独添加锌。这样的药物组合物通常被称为“无锌组合物”,尽管它们可能实际上被认为是“低锌组合物”。

[0261] 然而,假如可以提供无锌赋形剂,本发明的胰岛素衍生物实际上允许制备无锌药物组合物。因此,在另一个方面,本发明提供了包含本发明的胰岛素衍生物以及一种或多种没有任何锌的药理学上可接受的载体或稀释剂的无锌药物组合物。

[0262] 此外,我们发现,在B3位置处具有置换的本发明A22K酰化胰岛素衍生物的亚组同时提高了在未添加锌离子并且未添加表面活性剂的情况下配制的药物组合物的化学和物理稳定性。因此,在进一步的方面,本发明提供了如上所述的低锌或无锌药物组合物,其包含本发明的胰岛素衍生物(其在B3位置处包含另外的置换(即,B3E或B3Q))以及一种或多种药理学上可接受的载体或稀释剂,然而该药物组合物中未添加表面活性剂。

[0263] 在一个实施方案中,本发明提供了一种被配制为未添加锌离子的低锌组合物的药物组合物,其包含胰岛素衍生物和一种或多种药理学上可接受的载体或稀释剂,其中该胰岛素衍生物是酰化的人胰岛素类似物,该类似物是:

[0264] 相对于人胰岛素的[A22K,B3E或B3Q,desB27,B29R,desB30];

[0265] 并且该胰岛素类似物是通过用以下式II的基团对A22位置处的赖氨酸残基的 ϵ 氨基进行酰化而衍生的:

[0266] [酰基]-[连接体]-

[0267] 其中该连接体基团是由1到10个选自-gGlu-和-OEG-的氨基酸残基组成的氨基酸链;其中

[0268] gGlu代表 γ 谷氨酸残基;

[0269] OEG代表8-氨基-3,6-二氧杂辛酸残基(即,式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-的基

团)；

[0270] 该氨基酸残基可以以任意顺序存在；并且

[0271] 该氨基酸链包含至少一个gGlu残基；并且

[0272] 其中该酰基是选自以下的 α, ω -二羧酸残基：

[0273] 1,14-十四烷二酸；

[0274] 1,15-十五烷二酸；和

[0275] 1,16-十六烷二酸；

[0276] 该酰化的类似物可以另外包含A14E置换。

[0277] 在另一个实施方案中，在B3位置处的另外的置换是B3E。

[0278] 在第三个实施方案中，在B3位置处的另外的置换是B3Q。

[0279] 在第四个实施方案中，本发明提供了一种被配制成未添加锌离子的低锌组合物的药物组合物，其包含选自以下的酰化的人胰岛素类似物：

[0280] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0281] A22K(N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0282] A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0283] A22K(N(eps)-十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0284] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0285] A22K(N(eps)-十五烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0286] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0287] A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0288] A22K(N(eps)-十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0289] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0290] A22K(N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0291] A14E, A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0292] A14E, A22K(N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0293] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-2xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0294] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-3xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；

[0295] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素；以及

[0296] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-gGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素。

[0297] 在又一个实施方案中，本发明提供了如上所述的低锌药物组合物，其中锌离子可以以对应于每6个胰岛素分子少于0.2个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.15个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.12个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子0.1个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.09个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.08个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.07个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.06个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.05个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.04个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素分子少于0.03个 Zn^{2+} 离子、每6个胰岛素

分子少于0.02个 Zn^{2+} 离子或每6个胰岛素分子少于0.01个 Zn^{2+} 离子的浓度的量存在。

[0298] 在进一步的实施方案中,本发明提供了一种被配制成可注射组合物的如上所述的低锌或无锌药物组合物。本发明的药物组合物可以采用本领域已知的常规方法获得。例如,可以将组分以水溶液的形式混合在一起,随后将pH调节至所需水平,并用水将该混合物补充至最终体积,随后进行过滤除菌。

[0299] 可以通过借助于注射器(任选笔状注射器)皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射进行肠胃外施用。或者,可以借助于输液泵进行肠胃外施用。作为进一步的选择,含有本发明的胰岛素化合物的胰岛素制剂还可以适于通过例如无针注射或从微针贴片(任选离子电渗贴片)经皮施用,或经粘膜例如颊部施用。

[0300] 根据本发明的胰岛素制剂可以在若干部位处施用至需要这种治疗的患者,例如,在局部部位例如皮肤和粘膜部位处,在旁路吸收部位处例如在动脉、静脉、心脏中以及在涉及吸收的部位处施用,例如,在皮肤中、皮肤下、在肌肉或腹部中施用。

[0301] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素制剂非常适合在用于注射胰岛素治疗的笔状装置中应用。

[0302] 本发明的药物组合物可以通过肠胃外施用在糖尿病治疗中使用。

[0303] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素制剂还可以被制备成在常用于胰岛素施用(包括使用泵的连续皮下胰岛素输注治疗)的各种医学设备中使用,和/或用于在基础胰岛素治疗中应用。

[0304] 推荐由医师来选择向患者施用的本发明胰岛素制剂的剂量。目前预期,根据本发明的胰岛素衍生物应以约0.1mM至约20.0mM的量,更具体地以约0.2mM至约4.0mM、约0.3mM至约2.5mM、约0.5mM至约2.5mM、约0.6mM至约2.0mM或约0.6mM至约1.2mM的量存在于最终药物组合物中。

[0305] 本发明的药物组合物的优选特征

[0306] 可以参考以下特征中的一个或多个进一步表征本发明:

[0307] 1. 一种药物组合物,其包含本发明的酰化的人胰岛素类似物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0308] 2. 根据第1项所述的药物组合物,其被配制为未添加锌离子的低锌组合物。

[0309] 3. 根据第1项所述的药物组合物,其被配制为包含在B3位置处具有置换的酰化人胰岛素类似物的未添加锌离子的低锌组合物。

[0310] 4. 根据第1项所述的药物组合物,其被配制为包含具有B3E或B3Q置换的酰化人胰岛素类似物的未添加锌离子的低锌组合物。

[0311] 5. 根据第1项所述的药物组合物,其被配制为包含具有B3E置换的酰化人胰岛素类似物的未添加锌离子的低锌组合物。

[0312] 6. 根据第1项所述的药物组合物,其被配制为包含具有B3Q置换的酰化人胰岛素类似物的未添加锌离子的低锌组合物。

[0313] 7. 根据第1项所述的药物组合物,其被配制为包含选自以下的酰化人胰岛素类似物的未添加锌离子的低锌组合物:

[0314] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0315] A22K(N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

- [0316] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0317] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG) -gGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0318] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0319] A22K (N (eps) -十五烷二酰基-4xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0320] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0321] A14E,A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0322] A14E,A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0323] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-2xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0324] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;以及
- [0325] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-3xgGlu) ,B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素。
- [0326] 8. 根据第1项所述的药物组合物,其被配制为包含选自以下的酰化人胰岛素类似物的未添加锌离子的低锌组合物:
- [0327] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-4xgGlu) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0328] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0329] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-3x (gGlu-OEG) -gGlu) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;
- [0330] A22K (N (eps) -十四烷二酰基-gGlu-2xOEG) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素;以及
- [0331] A22K (N (eps) -十六烷二酰基-4xgGlu) ,B3Q,desB27,B29R,desB30人胰岛素。
- [0332] 9. 根据第7-8项中任一项所述的药物组合物,其中每6个胰岛素分子包含少于0.2个 Zn^{2+} 离子。
- [0333] 10. 根据第7-8项中任一项所述的低锌药物组合物,其中未添加表面活性剂。
- [0334] 11. 根据第7-8项中任一项所述的药物组合物,其包含烟碱化合物。
- [0335] 12. 根据第7-8项中任一项所述的药物组合物,其包含总浓度为约20mM至约170mM的烟碱化合物、苯丙氨酸和/或其盐。
- [0336] 13. 根据第7-8项中任一项所述的药物组合物,其包含总浓度为约130mM至约170mM的烟碱化合物、苯丙氨酸和/或其盐。
- [0337] 14. 根据第7-8项中任一项所述的药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂和/或佐剂。
- [0338] 治疗方法
- [0339] 本发明涉及用于治疗用途的药物。更具体地,本发明涉及本发明的人胰岛素类似物的酰化衍生物用于治疗或预防与糖尿病有关的医学状况的用途。
- [0340] 因此,在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗或减轻活动物体(包括人)的疾病或病症或状况的方法,该疾病、病症或状况可以选自与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症、代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)、高血压、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、心血管疾病、冠心病、炎性肠综合征、消

化不良或胃溃疡有关的疾病、病症或状况,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的酰化人胰岛素类似物的步骤。

[0341] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗或减轻活动物体(包括人)的疾病或病症或状况的方法,该疾病、病症或状况可以选自与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症、代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)、高血压、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗死、中风、心血管疾病、冠心病、炎性肠综合征、消化不良或胃溃疡有关的疾病、病症或状况,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的酰化人胰岛素类似物。

[0342] 在第三个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗或减轻活动物体(包括人)的疾病或病症或状况的方法,该疾病、病症或状况可以选自与糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、葡萄糖耐量减低、高血糖、血脂异常、肥胖症或代谢综合征(代谢综合征X、胰岛素抵抗综合征)有关的疾病、病症或状况。

[0343] 在第四个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗或减轻活动物体(包括人)的疾病或病症或状况的方法,该疾病、病症或状况可以选自与糖尿病,特别是与1型糖尿病或2型糖尿病有关的疾病、病症或状况。

附图说明

[0344] 参考附图进一步阐述本发明,附图中:

[0345] 图1示出了与NovoRapid®/NovoLog®(门冬胰岛素,商用制剂,每6个胰岛素分子3个锌(0.5和1nmol/kg))的谱相比,以每6个胰岛素分子0个锌配制的实施例1的胰岛素衍生物(1nmol/kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间);

[0346] 图2示出了与图1相同的数据,但仅示出了前2小时的数据;

[0347] 图3a示出了与图1相同的数据,但仅示出了与NovoRapid®/NovoLog®(门冬胰岛素,商用制剂,每6个胰岛素分子3个锌(1nmol/kg))的谱相比,以每6个胰岛素分子0个锌配制的实施例1的胰岛素(1nmol/kg)的数据;

[0348] 图3b示出了来源于图3a中的胰岛素谱的所引起的血浆葡萄糖变化。

[0349] 图4a和4b分别示出了与NovoRapid®/NovoLog®(门冬胰岛素,商用制剂,每6个胰岛素分子3个锌(0.5和1nmol/kg))的谱相比,以每6个胰岛素分子0个锌配制的实施例2的胰岛素(1nmol/kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化;

[0350] 图5a和5b分别示出了与图4a和4b相同的数据,但仅示出了与NovoRapid®/NovoLog®(门冬胰岛素,商用制剂,每6个胰岛素分子3个锌(1nmol/kg))的谱相比,以每6个胰岛素分子0个锌配制的实施例2的胰岛素(1nmol/kg)的数据,以及所引起的血浆葡萄糖变化;

[0351] 图6和7分别示出了以每6个胰岛素分子0个锌配制的实施例11的胰岛素(1nmol/kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化;

[0352] 图8和9分别示出了以每6个胰岛素分子0个锌配制的实施例44的胰岛素(1nmol/kg)

kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化(1nmol/kg);

[0353] 图10和11分别示出了以每6个胰岛素分子0个锌配制的现有技术胰岛素A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素(WO 2009/022013,实施例45)(1nmol/kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化(1nmol/kg);

[0354] 图12和13分别示出了以每6个胰岛素分子0个锌配制的、图10和11中所示的、代表现有技术(WO 2009/022013,实施例45)的十四烷二酸类似物(72nmol/动物)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化;

[0355] 图14A、14B和14C示出了荧光相对于时间的曲线图,从中可以将滞后时间估计为滞后区与原纤维形成区的线性近似之间的截距;

[0356] 图15示出了在不存在/存在170mM烟酰胺的情况下,在肥胖Zucker大鼠中皮下注射后,实施例2的胰岛素衍生物的PK/PD谱;

[0357] 图16-17示出了在不存在/存在170mM烟酰胺的情况下,在肥胖Zucker大鼠中皮下注射后,实施例7的胰岛素衍生物的PK/PD谱;

[0358] 图18-19示出了在不存在/存在170mM烟酰胺的情况下,在肥胖Zucker大鼠中皮下注射后,实施例16的胰岛素衍生物的PK/PD谱;以及

[0359] 图20-21示出了在不存在/存在170mM烟酰胺的情况下,在肥胖Zucker大鼠中皮下注射后,实施例4和实施例2的胰岛素衍生物的PK/PD谱。

[0360] 实施例

[0361] 参照以下实施例进一步说明本发明,这些实施例并非意在以任何方式限制所请求保护的本发明的范围。

[0362] 胰岛素类似物表达和纯化

[0363] 胰岛素类似物表达

[0364] 根据本发明使用的胰岛素类似物,即双链非酰化的胰岛素类似物,是通过采用公知的技术(例如,如US 6500645中公开的)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序列而重组产生的。该胰岛素类似物或者直接表达或者表达为可以具有在B链上的N末端延伸和/或在B链与A链之间的连接肽(C-肽)的前体分子。通过合适的蛋白酶,例如水解无色杆菌(*Achromobacter lyticus*)蛋白酶(ALP)或胰蛋白酶,在体外切掉该N末端延伸和C-肽,并将因此分别具有紧挨着B1和A1位置的切割位点。适合根据本发明使用的类型的N-末端延伸和C-肽在例如US 5395922、EP 765395和WO 9828429中公开。

[0365] 编码根据本发明使用的胰岛素类似物前体的多核苷酸序列可以通过确立的方法合成制备,例如由Beaucage等人,(1981) *Tetrahedron Letters* 22 1859-1869描述的亚磷酸酰胺方法,或由Matthes等人,(1984) *EMBO Journal* 3 801-805描述的方法。根据该亚磷酸酰胺方法,在例如自动化DNA合成仪中合成寡核苷酸,纯化,双链化,并连接,以形成合成的DNA构建体。当前优选的制备DNA构建体的方式是通过聚合酶链反应(PCR)。

[0366] 重组方法通常将采用能够在选定的微生物或宿主细胞中复制并携带编码根据本发明使用的胰岛素类似物前体的多核苷酸序列的载体。该重组载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元

件、微型染色体或人工染色体。该载体可以含有用于确保自我复制的任何元件(means)。或者,该载体可以是这样的载体,当其被引入到宿主细胞中时,其被整合到基因组中并与其所整合至的染色体一起复制。此外,可以使用单个载体或质粒,或一起包含待引入至宿主细胞的基因组中的总DNA的两个或更多个载体或质粒,或转座子。该载体可以是线性或闭合环状质粒,并将优选地含有允许该载体稳定整合至宿主细胞基因组中或允许该载体在该细胞中独立于基因组而自主复制的元件。

[0367] 所述重组表达载体可以是能够在酵母中复制的载体。使得载体能够在酵母中复制的序列的实例是酵母质粒2 μ m复制基因REP 1-3和复制起点。

[0368] 所述载体可以含有一个或多个选择性标记,该选择性标记允许容易地选择经转化的细胞。选择性标记是一种基因,其产物提供杀生物剂或病毒抗性、对重金属的抗性、原养型至营养缺陷型等。细菌选择性标记的实例是来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的dal基因,或者赋予抗生素抗性如氨苄青霉素抗性、卡那霉素抗性、氯霉素抗性 or 四环素抗性的标记。用于丝状真菌宿主细胞的选择性标记包括amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、pyrG(乳清苷-5'-磷酸脱羧酶)和trpC(邻氨基苯甲酸合酶)。用于酵母宿主细胞的合适的标记是ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1 和URA3。用于酵母的非常合适的选择性标记是粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)TPI基因(Russell(1985)Gene 40 125-130)。

[0369] 在所述载体中,多核苷酸序列与合适的启动子序列可操作地连接。该启动子可以是在选择的宿主细胞中显示出转录活性的任何核酸序列,包括突变的、截短的和杂合的启动子,并且可以从编码与宿主细胞同源或异源的细胞外或细胞内多肽的基因获得。

[0370] 用于引导在细菌宿主细胞中转录的适当启动子的实例是从大肠杆菌lac操纵子、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)琼脂糖酶基因(dagA)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)麦芽糖淀粉酶基因(amyM)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) α -淀粉酶基因(amyQ)和地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)获得的启动子。用于引导在丝状真菌宿主细胞中转录的适当启动子的实例是从米曲霉(*Aspergillus oryzae*)TAKA淀粉酶、米赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉(*Aspergillus niger*)中性 α -淀粉酶和黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶的基因获得的启动子。在酵母宿主中,有用的启动子是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)Ma1、TPI、ADH、TDH3或PGK启动子。

[0371] 编码根据本发明使用的胰岛素肽骨架的多核苷酸序列通常还将与合适的终止子可操作地连接。在酵母中,合适的终止子为TPI终止子(Alber等人,(1982)J.Mol.Appl.Genet.1 419-434)。

[0372] 用于将编码根据本发明使用的胰岛素类似物的多核苷酸序列分别与启动子和终止子组合,并将它们插入到含有在选定宿主中复制所需的信息的适当载体中的程序是本领域技术人员公知的。将会理解,载体可以如下构建:首先制备含有编码根据本发明使用的胰岛素骨架的完整DNA序列的DNA构建体,随后将该片段插入到合适的表达载体中,或者顺序插入含有单个元件(如信号肽和前肽(B链的N端延伸)、C肽、A链和B链)的遗传信息的DNA片段,随后连接。

[0373] 将包含编码根据本发明使用的胰岛素类似物的多核苷酸序列的载体引入到宿主细胞中,使得该载体保持为染色体组成部分或自我复制的染色体外载体。术语“宿主细胞”包括由于在复制过程中发生的突变而与亲本细胞不相同的亲本细胞的任何后代。该宿主细胞可以是单细胞微生物,例如原核生物,或非单细胞微生物,例如真核生物。有用的单细胞细胞是细菌细胞,如革兰氏阳性细菌,包括但不限于芽孢杆菌(*Bacillus*)细胞、链霉菌(*Streptomyces*)细胞,或革兰氏阴性细菌,如大肠杆菌(*E. coli*)和假单胞菌属的种(*Pseudomonas sp.*)。真核细胞可以是哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。

[0374] 所述宿主细胞尤其可以是酵母细胞。酵母生物体可以是在培养时向培养基中分泌胰岛素肽骨架或其前体的任何合适的酵母生物体。合适的酵母生物体的实例包括选自酿酒酵母、克鲁弗酵母(*Saccharomyces kluyveri*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、克鲁弗毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、假丝酵母属的种(*Candida sp.*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、可可假丝酵母(*Candida cacaoi*)、地霉属的种(*Geotrichum sp.*)和发酵地霉(*Geotrichum fermentans*)的菌株。

[0375] 例如,可以通过原生质体形成,随后采用已知方法转化,来实现酵母细胞的转化。用于培养细胞的培养基可以是适于使酵母生物体生长的任何常规培养基。

[0376] 胰岛素类似物纯化

[0377] 可以通过常规程序从培养基中回收分泌的胰岛素类似物或其前体,这些程序包括通过离心、通过过滤或通过离子交换基质或反相吸附基质上捕获或吸附胰岛素类似物或其前体来从培养基中分离酵母细胞,通过过滤或借助于盐例如硫酸铵使上清液的蛋白质组分沉淀,随后通过多种色谱程序例如离子交换色谱法、亲和色谱法等纯化。

[0378] 本发明的胰岛素肽骨架的纯化和消化如下进行:

[0379] 通过阳离子交换将可能含有B链的N-末端延伸和在B链与A链之间的修饰的C肽的单链胰岛素类似物前体从酵母培养物上清液纯化并浓缩(Kjeldsen等人(1998) *Prot. Expr. Pur.* 14 309-316)。

[0380] 通过用赖氨酸特异性固定化ALP消化(Kristensen等人(1997) *J. Biol. Chem.* 270 12978-12983),或利用胰蛋白酶切掉B链的N-末端延伸(如果存在的话)以及C肽,来使单链胰岛素类似物前体熟化成双链胰岛素肽骨架。

[0381] 胰蛋白酶消化

[0382] 将来自阳离子交换色谱步骤的、含有胰岛素类似物前体的洗脱物用水稀释至乙醇浓度为15-20%。添加甘氨酸至50mM的浓度,并用NaOH将pH调节至9.0-9.5。以1:300(w:w)的比例添加胰蛋白酶,并使消化在4度下进行。每20分钟通过分析监测该消化,直到消化完成。通过以3:100(体积:体积)的比例添加1M柠檬酸来终止消化。

[0383] 在采用C18柱的Waters Acquity超高效液相色谱系统上,通过分析型LC来分析该消化反应,并通过MALDI-TOF MS(Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF)确认分子量。

[0384] 采用乙腈梯度,在C18柱上通过反相HPLC(Waters 600系统)纯化双链胰岛素类似物。通过冻干法回收所需的胰岛素类似物,例如A22K, desB27, B29R, desB30人胰岛素, A22K,

B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素, 或A22K, B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素。

[0385] 在采用C18柱的Waters Acquity超高效液相色谱系统上, 通过分析型LC来确定纯度, 并通过MALDI-TOF MS确定分子量。

[0386] 缩写

[0387] ALP-水解无色杆菌蛋白酶

[0388] C肽-连接肽

[0389] HPLC-高效液相色谱法

[0390] IR-胰岛素受体

[0391] IGF-1R-胰岛素样生长因子1受体

[0392] LC-液相色谱法

[0393] MALDI-TOF-基质辅助激光解吸电离飞行时间

[0394] MS-质谱法

[0395] PCR-聚合酶链反应

[0396] PD-药效学(血液/血浆葡萄糖降低效应)

[0397] PG-血浆葡萄糖

[0398] PK-药代动力学(血液/血浆胰岛素浓度相对于时间的谱图)

[0399] tBu是叔丁基;

[0400] DCM是二氯甲烷;

[0401] DIC是二异丙基碳二亚胺;

[0402] DIPEA=DIEA, 是N,N-二异丙基乙胺;

[0403] DMF是N,N-二甲基甲酰胺;

[0404] DMSO是二甲基亚砷;

[0405] EtOAc是乙酸乙酯;

[0406] Fmoc是9-芴基甲氧羰基;

[0407] γ Glu(gGlu) 是 γ L-谷氨酰基;

[0408] HCl是盐酸;

[0409] HOBT是1-羟基苯并三唑;

[0410] NMP是N-甲基吡咯烷酮;

[0411] MeCN是乙腈;

[0412] OEG是[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙基羰基;

[0413] Su是琥珀酰亚胺-1-基=2,5-二氧代-吡咯烷-1-基;

[0414] OSu是琥珀酰亚胺-1-基氧基=2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基;

[0415] RPC是反相色谱法;

[0416] RT是室温;

[0417] TCTU是O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓四氟硼酸盐;

[0418] TFA是三氟乙酸;

[0419] THF是四氢呋喃;

[0420] TNBS是2,4,6-三硝基苯磺酸;

[0421] TRIS是三(羟甲基)氨基甲烷;并且

[0422] TSTU是O-(N-琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐。

[0423] 一般性说明

[0424] 以下实施例和通用程序涉及在本说明书和合成方案中鉴别的中间体化合物和最终产物。使用以下实施例对本发明化合物的制备进行详细描述,但所描述的化学反应是就其对本发明化合物制备的一般适用性而公开的。

[0425] 偶尔,所述反应可能并不如所述的那样适用于包含在本发明公开范围内的每种化合物。本领域技术人员将容易认识到发生这种情况的化合物。在这些情况下,该反应可以通过本领域技术人员已知的常规改动,即通过干扰基团的适当保护、通过更换成其他常规试剂或通过反应条件的常规修改而成功进行。

[0426] 或者,本文公开的或常规的其他反应将可适用于本发明相应化合物的制备。在所有制备方法中,所有起始材料都是已知的或可以从已知的起始材料容易地制备。所有温度均以摄氏度表示,并且除非另有说明,当提及产量时,所有份数(parts)和百分比都按重量计,而当提及溶剂和洗脱液时,所有份数都按体积计。

[0427] 可以通过采用在本领域内典型的一种或多种以下程序来纯化本发明的化合物。若需要,这些程序可以在梯度、pH、盐、浓度、流动、柱子等方面进行修改。根据诸如杂质分布、所讨论的胰岛素的溶解度等因素,本领域技术人员可以容易地认识到并作出这些修改。

[0428] 在酸性HPLC或脱盐后,通过将纯级分冻干来分离化合物。

[0429] 在中性HPLC或阴离子交换色谱分析后,将该化合物脱盐,在等电pH下沉淀,或通过酸性HPLC纯化。

[0430] 典型的纯化程序

[0431] RP-HPLC系统:

[0432] Gilson系统由以下部分组成:215型液体处理器、322-H2型泵和155型UV检测器(UV 215nm和280nm)。

[0433] 阴离子交换和脱盐系统:

[0434] Äkta Explorer系统由以下部分组成:P-900型泵、UV-900型UV检测器(UV 214、254和280nm)、pH/C-900型pH与电导率检测器、Frac-950型级分收集器。

[0435] 酸性RP-HPLC:

[0436] 柱子:Phenomenex Gemini,5 μ M 5u C18|10Å, 30x250mm

[0437] 流速:20mL/min

[0438] 缓冲液A:在水中的0.1%TFA

[0439] 缓冲液B:在乙腈中的0.1%TFA

[0440] 中性RP-HPLC:

[0441] 柱子:Phenomenex Gemini,5 μ M 5u C18|10Å, 30x250mm

[0442] 流速:20mL/min

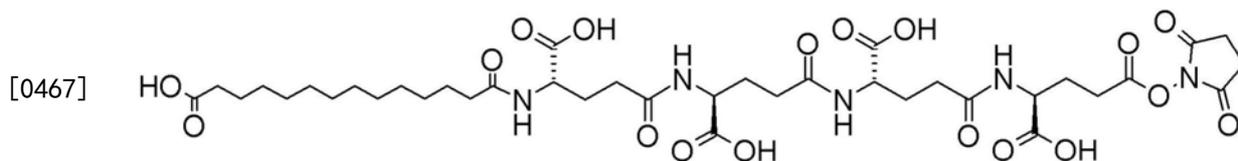
[0443] 缓冲液A:10mM Tris,15mM(NH₄)₂SO₄,pH=7.3,在milliQ中的20%乙腈

[0444] 缓冲液B:在乙腈中的20%milliQ

[0445] 阴离子交换色谱法:

[0446] 柱材料:Poros50HQ或Source30Q

- [0447] 流速:取决于柱子
- [0448] 缓冲液A:15mM Tris,25mM NH₄OAc,50%EtOH,pH=7.5
- [0449] 缓冲液B:15mM Tris,500mM NH₄OAc,50%EtOH,pH=7.5
- [0450] 脱盐:
- [0451] 柱子:HiPrep 26/10
- [0452] 流速:20mL/min
- [0453] 缓冲液A:在水中的0.1%TFA
- [0454] 缓冲液B:在乙腈中的0.1%TFA
- [0455] 酰化试剂在溶液中(见下文)或如例如WO 2009/115469中所述在固相上合成。
- [0456] 用于固相合成通式III的酰化试剂的通用程序
- [0457] [酰基]-[连接体]-Act
- [0458] 其中酰基和连接体基团如上文所定义,而Act是活性酯的离去基团,如N-羟基琥珀酰亚胺(OSu)或1-羟基苯并三唑,并且
- [0459] 其中酰基部分的酰基和连接体部分内的羧酸作为叔丁酯得到保护。
- [0460] 可以采用技术人员已知的固相肽合成领域中的程序在固体支持体上合成通式III的化合物。
- [0461] 一种这样的程序包括Fmoc保护的氨基酸与聚苯乙烯2-氯三苯甲基氯树脂的附接。可以在叔胺如三乙胺或N,N-二异丙基乙胺的存在下采用游离的N-保护的氨基酸实现该附接(参见以下参考文献)。该氨基酸的C末端(附接至该树脂)处于偶联至本发明的母体胰岛素的合成序列的末端处。
- [0462] 在Fmoc氨基酸附接至树脂后,采用例如仲胺如哌啶或二乙胺将Fmoc基团去保护,随后偶联另一种(或相同的)Fmoc保护的氨基酸并去保护。通过偶联单叔丁基保护的脂肪(α , ω)二酸如十六烷二酸单叔丁酯、十五烷二酸单叔丁酯或十四烷二酸单叔丁酯来终止合成序列。
- [0463] 采用稀酸如0.5-5%TFA/DCM(在二氯甲烷中的三氟乙酸)、乙酸(例如,在DCM中的10%乙酸,或HOAc/三氟乙醇/DCM 1:1:8)或在DCM中的六氟异丙醇来实现该化合物从树脂上的切割(参见,例如,F.Z. Dörwald:Organic Synthesis on Solid Phase;Wiley-VCH 2000,ISBN 3-527-29950-5;N.Sewald&H.-D.Jakubke:Peptides:Chemistry and Biology;Wiley-VCH,2002,ISBN 3-527-30405-3;或The Combinatorial Chemistry Catalog,1999,Novabiochem AG,以及其中引用的参考文献)。这确保在该化合物中作为羧酸保护基团存在的叔丁酯没有被去保护。
- [0464] 最后,将C-末端羧基(从该树脂上释放的)活化为例如N-羟基琥珀酰亚胺酯(OSu)。将该活化的酯例如用纯TFA去保护,并直接用作或在纯化(结晶)后用作附接本发明的母体胰岛素的偶联剂。该程序在下文中示出。
- [0465] 说明在固相上合成酰化试剂的通用程序的实施例:
- [0466] 十四烷二酰基-4xGlu-OSu(化学式4)的合成



[0468] 将100-200目1.5mmol/g的2-氯三苯甲基树脂(15.79g, 23.69mmol)置于无水二氯甲烷(150mL)中溶胀20分钟。将Fmoc-Glu-OtBu(6.72g, 15.79mmol)和N,N-二异丙基乙胺(10.46mL, 60.01mmol)在无水二氯甲烷(120mL)中的溶液添加至树脂,并将该混合物摇动16hr。将树脂过滤并用N,N-二异丙基乙胺(5.5mL, 31.59mmol)在甲醇/二氯甲烷混合物(9:1, 150mL, 5min)中的溶液处理。然后,用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2x 150mL)洗涤树脂。

[0469] 通过用在N,N-二甲基甲酰胺中的20%哌啶处理(2 x 150mL, 1 x 5min, 1 x 20min)来去除Fmoc基团。用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、2-丙醇(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2x 150mL)洗涤树脂。将Fmoc-Glu-OtBu(10.08g, 23.69mmol)、0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU, 8.42g, 23.69mmol)和N,N-二异丙基乙胺(7.43mL, 42.64mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(120mL)中的溶液添加至树脂,并将混合物摇动16hr。将树脂过滤并用N,N-二异丙基乙胺(5.5mL, 31.59mmol)在甲醇/二氯甲烷混合物(9:1, 150mL, 5min)中的溶液处理。然后,用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)洗涤树脂。

[0470] 通过用在N,N-二甲基甲酰胺中的20%哌啶处理(2 x 150mL, 1 x 5min, 1 x 20min)来去除Fmoc基团。用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、2-丙醇(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)洗涤树脂。将Fmoc-Glu-OtBu(10.08g, 23.69mmol)、0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU, 8.42g, 23.69mmol)和N,N-二异丙基乙胺(7.43mL, 42.64mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(120mL)中的溶液添加至树脂,并将混合物摇动16hr。将树脂过滤并用N,N-二异丙基乙胺(5.5mL, 31.59mmol)在甲醇/二氯甲烷混合物(9:1, 150mL, 5min)中的溶液处理。然后,用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)洗涤树脂。

[0471] 通过用在N,N-二甲基甲酰胺中的20%哌啶处理(2 x 150mL, 1 x 5min, 1 x 20min)来去除Fmoc基团。用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、2-丙醇(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)洗涤树脂。将Fmoc-Glu-OtBu(10.08g, 23.69mmol)、0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU, 8.42g, 23.69mmol)和N,N-二异丙基乙胺(7.43mL, 42.64mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(120mL)中的溶液添加至树脂,并将混合物摇动16hr。将树脂过滤并用N,N-二异丙基乙胺(5.5mL, 31.59mmol)在甲醇/二氯甲烷混合物(9:1, 150mL, 5min)中的溶液处理。然后,用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)洗涤树脂。

[0472] 通过用在N,N-二甲基甲酰胺中的20%哌啶处理(2 x 150mL, 1 x 5min, 1 x 20min)来去除Fmoc基团。用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、2-丙醇(2 x 150mL)、二氯甲烷(2 x 150mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)洗涤树脂。将十四烷二酸单叔丁酯(7.45g, 23.69mmol)、0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU, 8.42g, 23.69mmol)和N,N-二异丙基乙胺(7.43mL, 42.64mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(40mL)与二氯

甲烷(80mL)的混合物中的溶液添加至树脂,并将混合物摇动16hr。将树脂过滤,并用二氯甲烷(2 x 150mL)、N,N-二甲基甲酰胺(2 x 150mL)、甲醇(2 x 150mL)和二氯甲烷(10 x 150mL)洗涤。

[0473] 通过用三氟乙醇(150mL)处理过夜而从树脂上切下产物。将树脂过滤出并用二氯甲烷(3 x 100mL)洗涤。减压去除溶剂。通过硅胶柱色谱法(梯度洗脱,二氯甲烷/甲醇100:0至95:5)纯化残余物,得到呈白色固体的标题化合物。

[0474] 将产物真空干燥,以产生(S)-2-((S)-4-叔丁氧羰基-4-((S)-4-叔丁氧羰基-4-((S)-4-叔丁氧羰基-4-(13-叔丁氧羰基-十三碳酰基氨基)-丁酰基氨基)-丁酰基氨基)-戊二酸1-叔丁酯。

[0475] 产量:14.77g(89%)。

[0476] ^1H NMR谱(300MHz, CDCl_3 , δH): 7.22(d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H); 6.97(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H); 6.72(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H); 6.41(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H); 4.59-4.43(m, 4H); 2.49-2.13(m, 16H); 2.06-1.72(m, 4H); 1.70-1.52(m, 4H); 1.52-1.38(m, 45H); 1.35-1.21(m, 16H)。

[0477] LC-MS纯度:100%(ELSD)。

[0478] LC-MS Rt(Sunfire 4.6mm x 100mm, 乙腈/水50:50至100:0+0.1%FA): 7.39min。

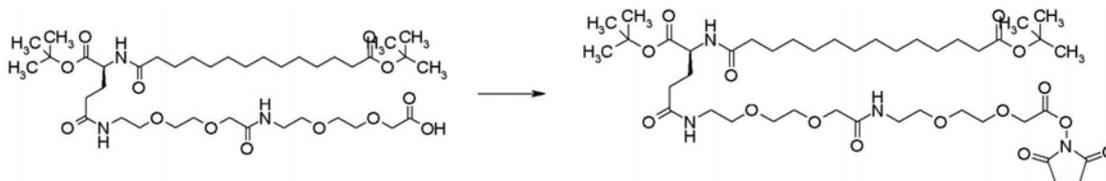
[0479] LC-MS m/z:1055.0(M+H)⁺。

[0480] 将获得的叔丁基保护的十四烷二酰基-4xgGlu-OH((S)-2-((S)-4-叔丁氧羰基-4-((S)-4-叔丁氧羰基-4-((S)-4-叔丁氧羰基-4-(13-叔丁氧羰基-十三碳酰基氨基)-丁酰基氨基)-丁酰基氨基)-戊二酸1-叔丁酯)溶解在四氢呋喃中。添加DIPEA,随后添加溶解在乙腈中的TSTU。将反应混合物搅拌3h,随后真空蒸发,在乙酸乙酯中再溶解,用0.1M HCl(水溶液)洗涤,经 MgSO_4 干燥,过滤,并真空蒸发。LC-MS(电喷雾):m/z=1174.7(M+ Na^+)。计算值:1175.4。

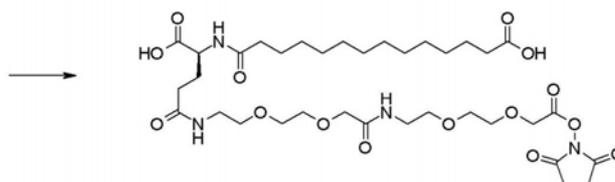
[0481] 将保护的且OSu活化的化合物溶解在10mL TFA中,并在室温下搅拌过夜。添加二乙醚,并过滤出所形成的沉淀物,并真空干燥过夜,以得到(S)-2-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三碳酰基氨基)-丁酰基氨基)-丁酰基氨基)-戊二酸5-(2,5-二氧化-吡咯烷-1-基)酯(十四烷二酰基-4xgGlu-OSu)。LC-MS(电喷雾):m/z=872.2(M+H⁺)。计算值:871.9。

[0482] 说明在固相上合成酰化试剂的通用程序的实施例:

[0483] 十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu(化学式5)的合成



[0484]



[0485] 13-((S)-1-叔丁氧羰基-3-[2-(2-[[2-(2-羧基甲氧基-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]-十三烷酸叔丁酯

[0486] 将100-200目1.7mmol/g的2-氯三苯甲基树脂(79.8g,135.6mmol)置于无水二氯甲烷(450mL)中溶胀20分钟。将{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧羰基氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸(Fmoc-OEG-OH,34.9g,90.4mmol)和N,N-二异丙基乙胺(59.9mL,343.6mmol)在无水二氯甲烷(100mL)中的溶液添加至树脂,并将该混合物摇动4hr。将树脂过滤并用N,N-二异丙基乙胺(31.5mL,180.8mmol)在甲醇/二氯甲烷混合物(4:1,150mL,2 x 5min)中的溶液处理。然后,用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 300mL)、二氯甲烷(2 x 300mL)和N,N-二甲基甲酰胺(3 x 300mL)洗涤树脂。通过用在二甲基甲酰胺中的20%哌啶处理(1 x 5min,1 x 30min,2 x 300mL)来去除Fmoc基团。用N,N-二甲基甲酰胺(3 x 300mL)、2-丙醇(2 x 300mL)和二氯甲烷(350mL,2 x 300mL)洗涤树脂。

[0487] 将{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧羰基氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸(Fmoc-OEG-OH,52.3g,135.6mmol)、0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU,48.2g,135.6mmol)和N,N-二异丙基乙胺(42.5mL,244.1mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(250mL)中的溶液添加至树脂,并将混合物摇动2hr。由于茈三酮试验仍然是阳性,因此将树脂过滤并用相同量的试剂另外处理30分钟。将树脂过滤,并用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 300mL)、二氯甲烷(2 x 300mL)和N,N-二甲基甲酰胺(3 x 300mL)洗涤。通过用在二甲基甲酰胺中的20%哌啶处理(1 x 5min,1 x 30min,2 x 300mL)来去除Fmoc基团。用N,N-二甲基甲酰胺(3 x 300mL)、2-丙醇(2 x 300mL)和二氯甲烷(350mL,2 x 300mL)洗涤树脂。

[0488] 将(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧羰基氨基)-戊二酸1-叔丁酯(Fmoc-LGlu-OtBu,57.7g,135.6mmol)、0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU,48.2g,135.6mmol)和N,N-二异丙基乙胺(42.5mL,244.1mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(250mL)中的溶液添加至树脂,并将混合物摇动1hr。将树脂过滤,并用N,N-二甲基甲酰胺(2 x 300mL)、二氯甲烷(2 x 300mL)和N,N-二甲基甲酰胺(2 x 300mL)洗涤。通过用在二甲基甲酰胺中的20%哌啶处理(1 x 5min,1 x 30min,2 x 300mL)来去除Fmoc基团。用N,N-二甲基甲酰胺(3 x 300mL)、2-丙醇(2 x 300mL)和二氯甲烷(350mL,2 x 300mL)洗涤树脂。

[0489] 将十四烷二酸单叔丁酯(C₁₄(OtBu)-OH,42.7g,135.6mmol)、0-(6-氯-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TCTU,48.2g,135.6mmol)和N,N-二异丙基乙胺(42.5mL,244.1mmol)在二氯甲烷/N,N-二甲基甲酰胺混合物(4:1,300mL)中的溶液添加至树脂,并将混合物摇动1.5hr。将树脂过滤,并用N,N-二甲基甲酰胺(6 x 300mL)、二氯甲烷(4 x 300mL)、甲醇(4 x 300mL)和二氯甲烷(7 x 600mL)洗涤。通过用2,2,2-三氟乙醇(600mL)处理18hr从树脂上切下产物。过滤出树脂,并用二氯甲烷(4 x 300mL)、二氯甲烷/2-丙醇混合物(1:1,4 x 300mL)、2-丙醇(2 x 300mL)和二氯甲烷(6 x 300mL)洗涤。将溶液合并;蒸发溶剂,并通过柱色谱法(硅胶60A,0.060-0.200mm;洗脱液:二氯甲烷/甲醇1:0-9:1)纯化粗产物。

[0490] 将纯13-{(S)-1-叔丁氧羰基-3-[2-(2-{[2-(2-羧基甲氧基-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}-十三烷酸叔丁酯真空干燥,并以橙色油形式获得。

[0491] 产量:55.2g(77%)。

[0492] RF(SiO₂,二氯甲烷/甲醇9:1):0.35。

[0493] ¹H NMR谱 (300MHz, CDCl₃, δH): 7.37 (bs, 1H); 7.02 (bs, 1H); 6.53 (d, J=7.9Hz, 1H); 4.54-4.38 (m, 1H); 4.17 (s, 2H); 4.02 (s, 2H); 3.82-3.40 (m, 16H); 2.37-2.12 (m, 7H); 2.02-1.82 (m, 1H); 1.71-1.51 (m, 4H); 1.47 (s, 9H); 1.43 (s, 9H); 1.25 (bs, 16H)。

[0494] LC-MS纯度:100%。

[0495] LC-MS Rt (Sunfire 4.6mm x 100mm, 乙腈/水70:30至100:0+0.1%FA): 3.93min。

[0496] LC-MS m/z: 791.0 (M+H)⁺。

[0497] 将13-((S)-1-叔丁氧羰基-3-[2-(2-([2-(2-羧基甲氧基-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)-十三烷酸叔丁酯(十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-OH, 8.89g, 11.3mmol) 溶解在100mL乙腈中, 将TSTU(4.07g, 13.5mmol) 和DIPEA(2.35mL, 13.5mmol) 添加至搅拌溶液, 并将该混合物在室温下搅拌1小时。蒸发溶剂, 将残余物溶解在二氯甲烷中并用0.05M HCl洗涤两次。

[0498] 将有机相干燥(MgSO₄) 并真空蒸发。这样得到9.98g(100%) 呈油的13-((S)-1-叔丁氧羰基-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)-十三烷酸叔丁酯。

[0499] 将13-((S)-1-叔丁氧羰基-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)-十三烷酸叔丁酯(4g) 溶解在三氟乙酸(10mL) 中, 并将该混合物在室温下搅拌1小时, 并真空蒸发。将残余物溶解在二氯甲烷(10mL) 中并真空蒸发。添加冷二乙醚(10mL) 导致沉淀出白色油脂状固体。通过倾析分离该沉淀物并将其真空干燥。这样得到3.4g(定量的) 14-[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基) 氧基-2-氧代乙氧基] 乙氧基] 乙基氨基]-2-氧代乙氧基] 乙氧基] 乙基氨基]-4-氧代丁基] 氨基]-14-氧代十四烷酸(十四烷二酰基-gGlu-2xOEG-OSu), 将其在-18℃下储存。

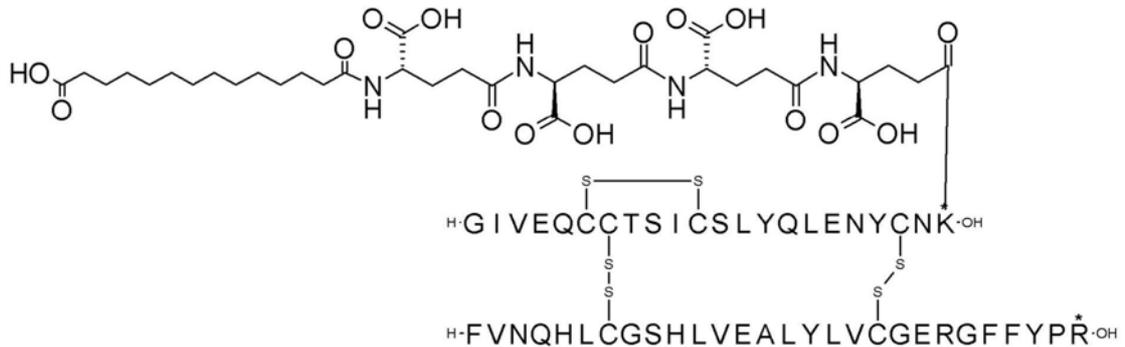
[0500] LC-MS(电喷雾): m/z=775.33; 计算值: 774.8。

[0501] 胰岛素衍生物的酰化和纯化

[0502] 用于本发明胰岛素衍生物的酰化和纯化的通用程序(A) 在以下实施例1中进行了描述。该程序也应用于以下实施例2-25的化合物的合成。还对这些衍生物中的一些进行了采用其他方法(如上所述)的纯化。

[0503] 实施例1: 通用程序(A)

[0504] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素; IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称: N{α} ([ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] Lys, (B)-肽。



[0506] 将A22K,desB27,B29R,desB30人胰岛素(2.0g)溶解在40mL 0.1M Na₂CO₃(水溶液)中,并用1M NaOH(水溶液)将pH调节至11.2。将十四烷二酰基-4xgGlu-OSu(0.454g)溶解在2mL DMF中并逐滴添加至胰岛素溶液中,同时用1M NaOH(水溶液)将pH保持在恒定值11.2。将反应混合物在室温下搅拌30min,然后用0.1M HCl(水溶液)中和至pH=7.5,并用1:1 EtOH/milliQ水稀释。

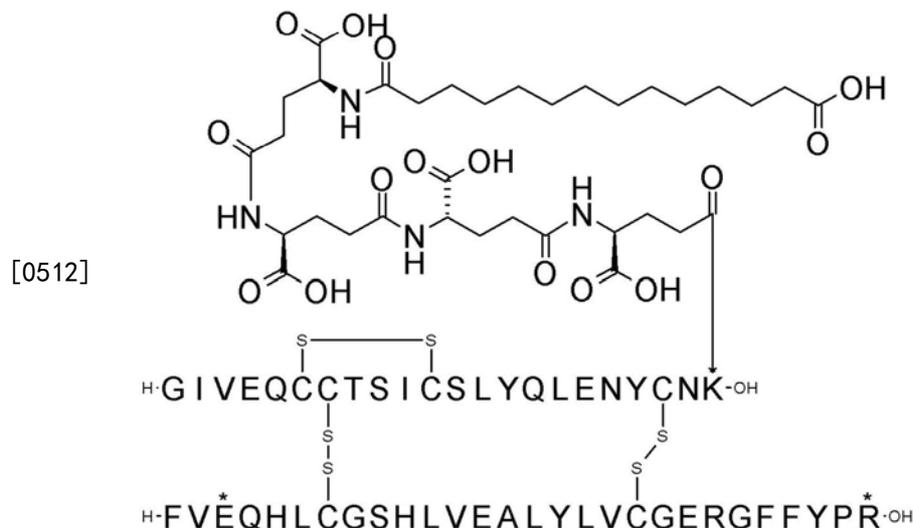
[0507] 将所得胰岛素在Poros50HQ 74mL柱上通过阴离子交换色谱法纯化,用在15mM Tris,50v/v%乙醇,pH 7.5(乙酸)中的25至500mM乙酸铵洗脱。在反向柱上通过采用在含有0.1%三氟乙酸的milliQ水中的乙腈梯度洗脱来进行纯级分的脱盐。将所得的纯胰岛素冻干。LC-MS(电喷雾):m/z=1629.98(M+4)/4。计算值:1630.65。

[0508] 如上所述合成酰化试剂十四烷二酰基-4xgGlu-OSu。

[0509] 实施例2:通用程序(A)

[0510] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu),B3E,desB27,B29R,desB30人胰岛素;

[0511] IUPAC(OpenEye,IUPAC类型)名称:N{α}([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε}[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys,(B)-肽。



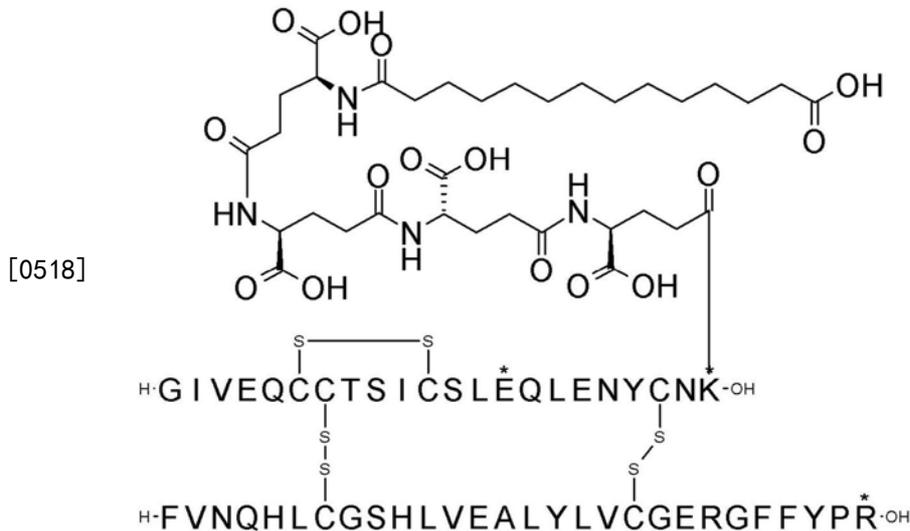
[0513] 根据实施例1中描述的方法制备该类似物。

[0514] LC-MS(电喷雾):m/z=1633.9(M+4H⁺)。计算值:1634.4。

[0515] 实施例3:通用程序(A)

[0516] A14E,A22K(N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu),desB27,B29R,desB30人胰岛素;

[0517] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称:N{α} ([GluA14,ArgB29], des-ThrB27,ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]Lys, (B)-肽。

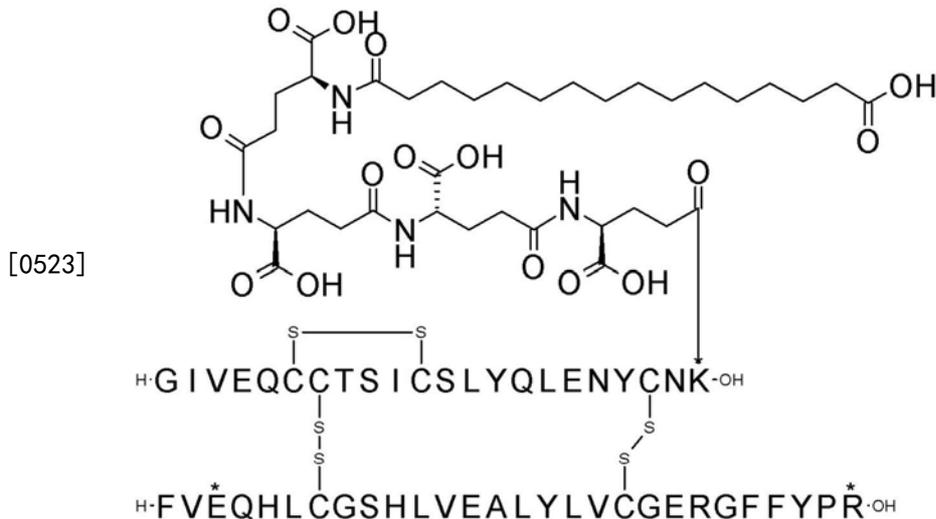


[0519] LC-MS (电喷雾) :m/z=1622.2 (M+4)/4。计算值:1622.1。

[0520] 实施例4:通用程序(A)

[0521] A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0522] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称:N{α} ([GluB3,ArgB29], des-ThrB27,ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五碳酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]Lys, (B)-肽。

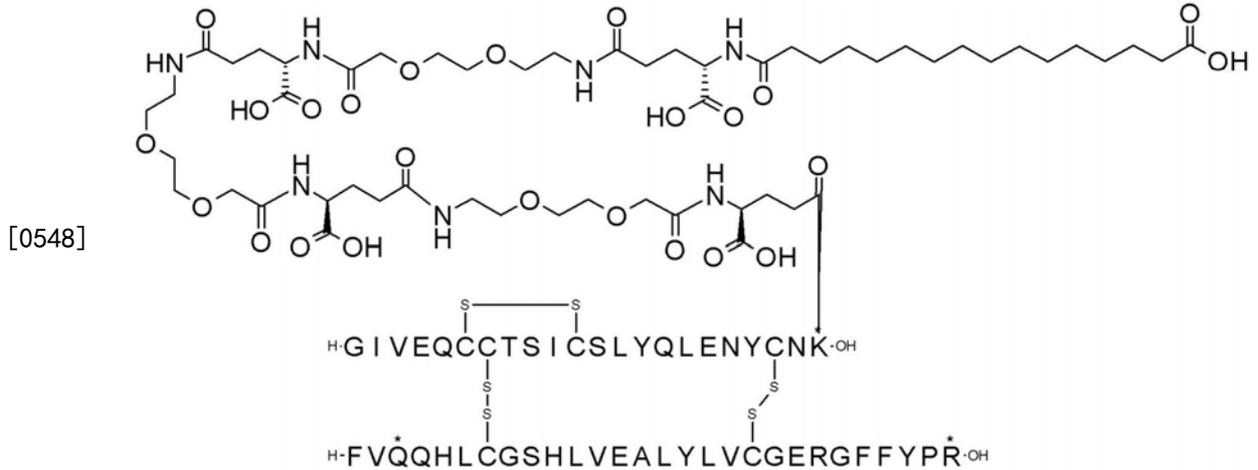


[0524] LC-MS (电喷雾) :m/z=1641.2 (M+4H⁺)。计算值:1641.4。

[0525] 实施例5:通用程序(A)

[0526] A22K (N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0527] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称:N{α} ([GluB3,ArgB29], des-ThrB27,ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五碳酰基

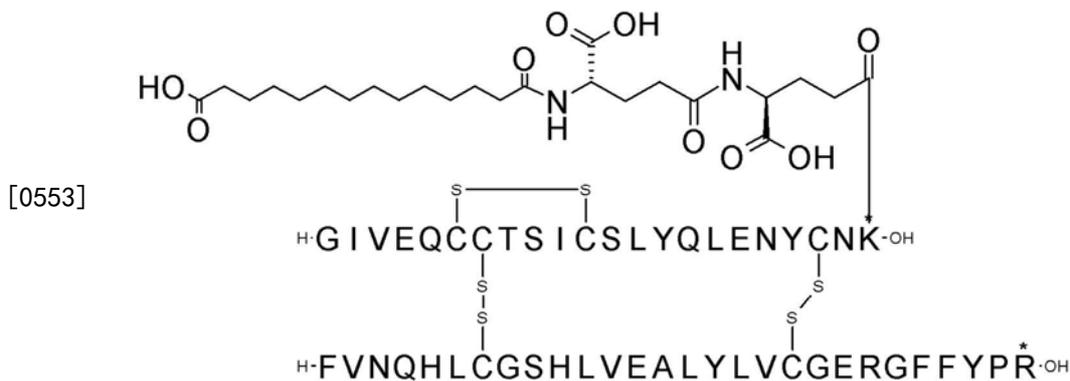


[0549] LC-MS (电喷雾) : $m/z = 1749.8 (M+4) / 4$ 。计算值: 1748.5。

[0550] 实施例10: 通用程序 (A)

[0551] A22K (N(eps)-十四烷二酰基-2xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0552] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称: N{α} ([ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]Lys, (B)-肽。

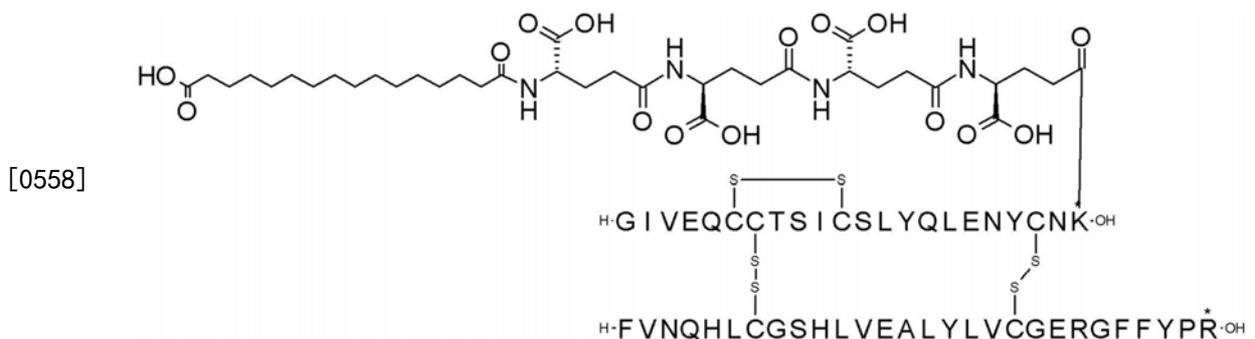


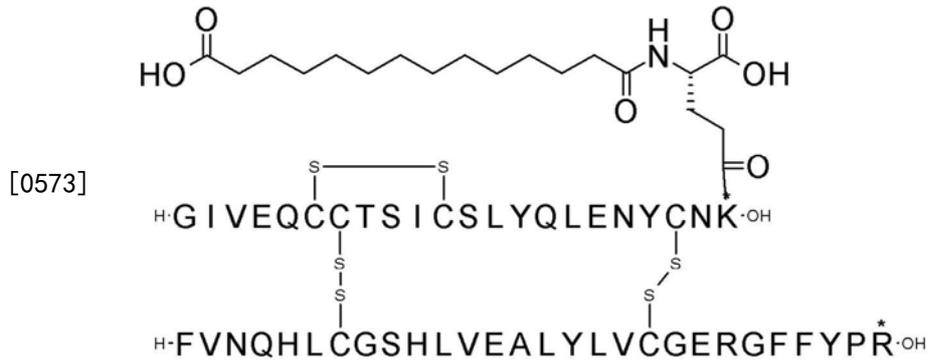
[0554] LC-MS (电喷雾) : $m/z = 1565.6 (M+4) / 4$ 。计算值: 1566.1。

[0555] 实施例11: 通用程序 (A)

[0556] A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0557] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称: N{α} ([ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五碳酰基氨基) 丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys, (B)-肽。



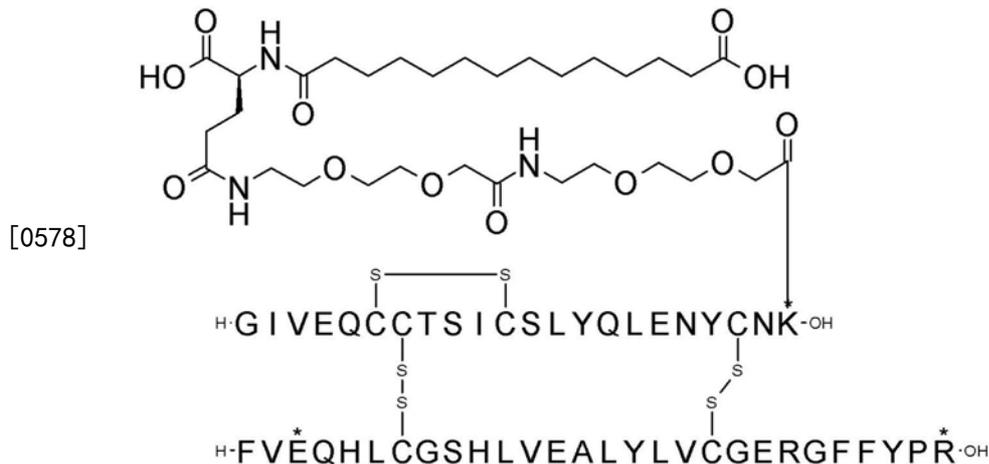


[0574] LC-MS (电喷雾) : $m/z = 1533.2 (M+4) / 4$ 。计算值: 1533.8。

[0575] 实施例15: 通用程序 (A)

[0576] A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0577] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称: N{α} ([GluB3, ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]Lys, (B)-肽。

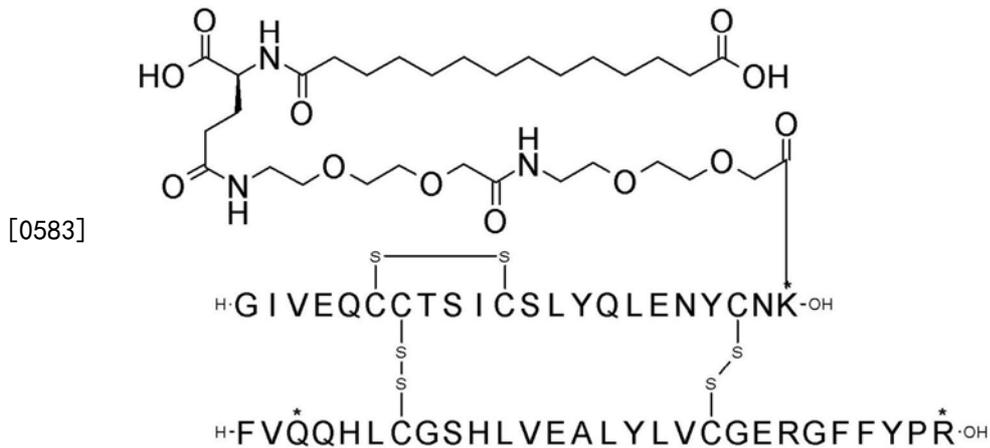


[0579] LC-MS (电喷雾) : $m/z = 1610.7 (M+4) / 4$ 。计算值: 1610.1。

[0580] 实施例16: 通用程序 (A)

[0581] A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0582] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称: N{α} ([GlnB3, ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]Lys, (B)-肽。

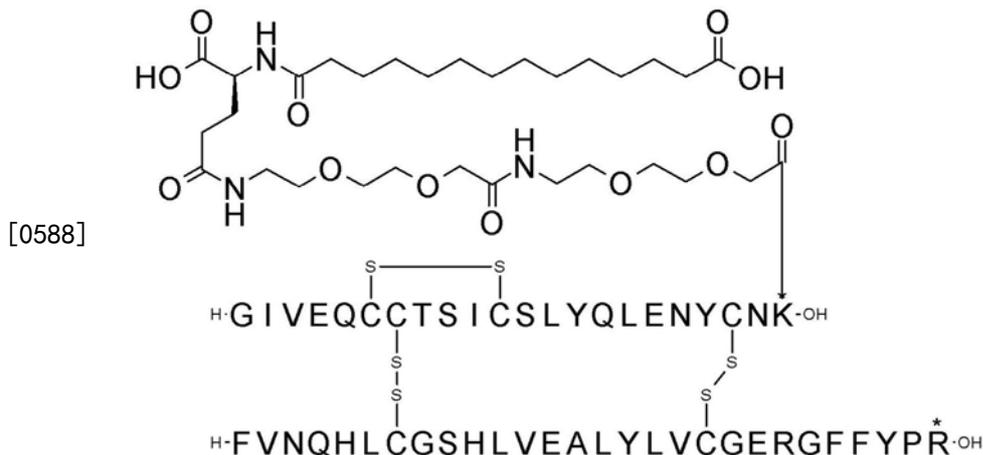


[0584] LC-MS (电喷雾) : $m/z = 1609.7 (M+4) / 4$ 。计算值: 1609.9。

[0585] 实施例17:通用程序(A)

[0586] A22K (N(eps)-十四烷二酰基-2xOEG), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0587] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称: N{ α } ([ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ ϵ } [2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基]Lys, (B)-肽。

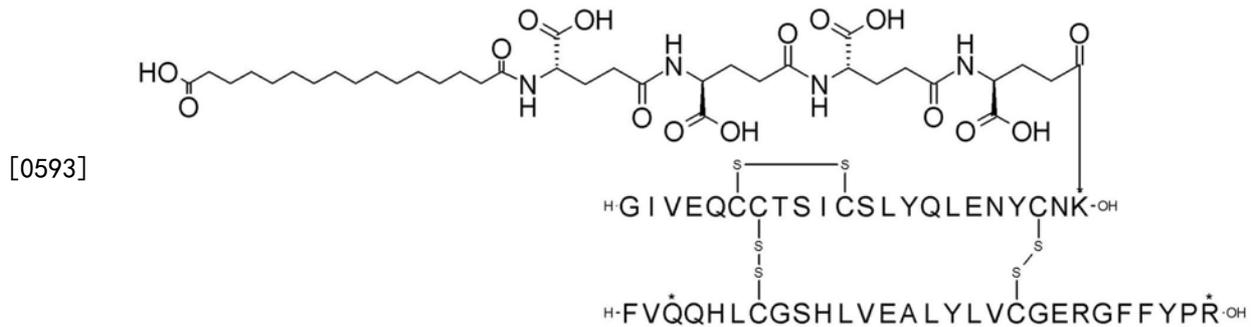


[0589] LC-MS (电喷雾) : $m/z = 1606.3 (M+4) / 4$ 。计算值: 1606.4。

[0590] 实施例18:通用程序(A)

[0591] A22K (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu), B3Q, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0592] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称: N{ α } ([GlnB3, ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ ϵ } [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五碳酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys, (B)-肽。

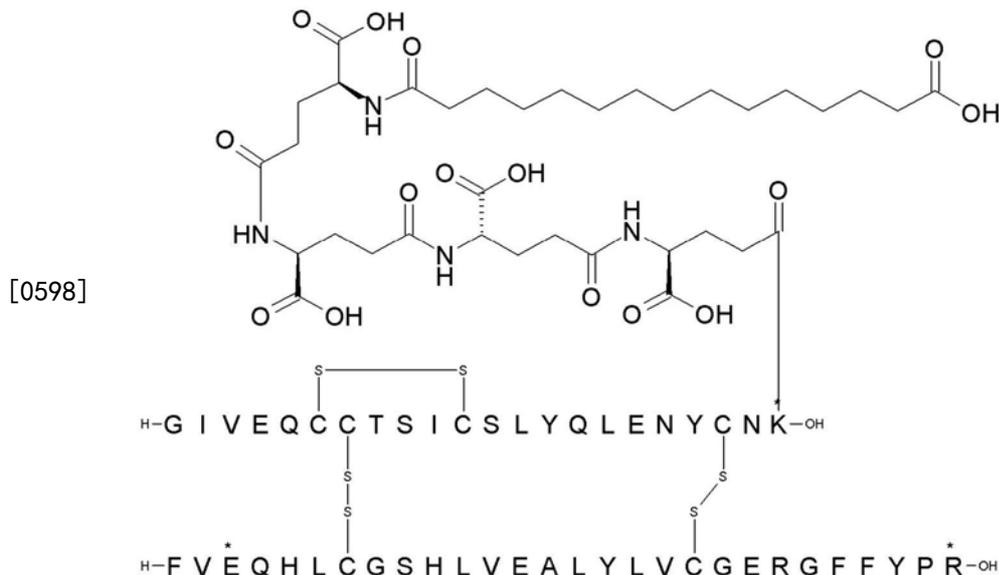


[0594] LC-MS (电喷雾) : $m/z=1640.9 (M+4) / 4$ 。计算值:1641.1。

[0595] 实施例19:通用程序(A)

[0596] A22K (N(eps)-十五烷二酰基-4xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0597] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称:N{α} ([GluB3, ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(14-羧基十四碳酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 丁酰基] Lys, (B)-肽。

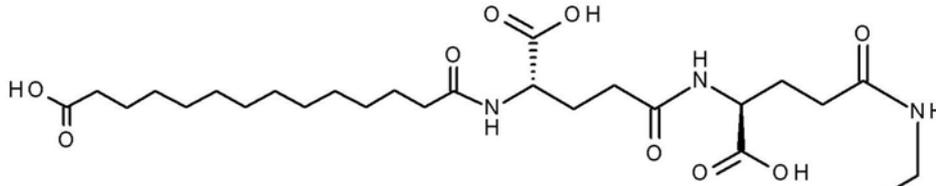


[0599] LC-MS (电喷雾) : $m/z=1637.63 (M+4) / 4$ 。计算值:1636.76

[0600] 实施例20:通用程序(A)

[0601] A22K (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu-2xOEG), desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0602] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称:N{α} ([ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基) 丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基]-丁酰基] 氨基] 丁酰基] 氨基] 乙氧基] 乙氧基] 乙酰基] 氨基] 乙氧基]-乙氧基] 乙酰基] Lys, (B)-肽。



[0623]

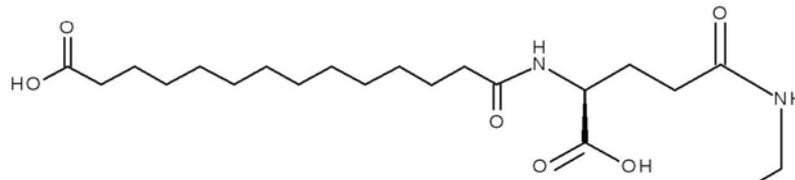


[0624] LC-MS (电喷雾) :m/z=1537.7 (M+4) /4。计算值:1537.5

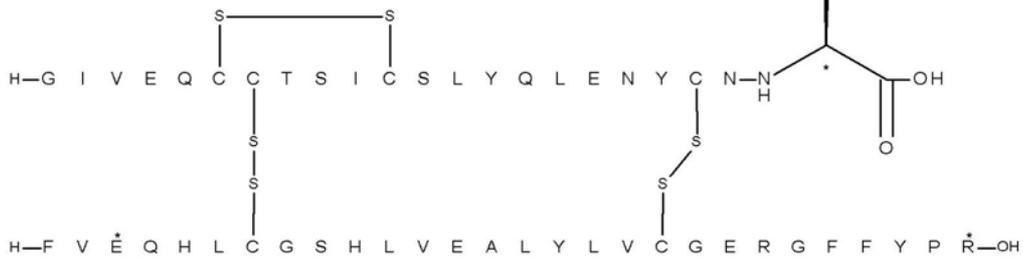
[0625] 实施例25:通用程序(A)

[0626] A22K (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0627] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称:N{α} ([GluB3, ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]Lys, (B)-肽。



[0628]



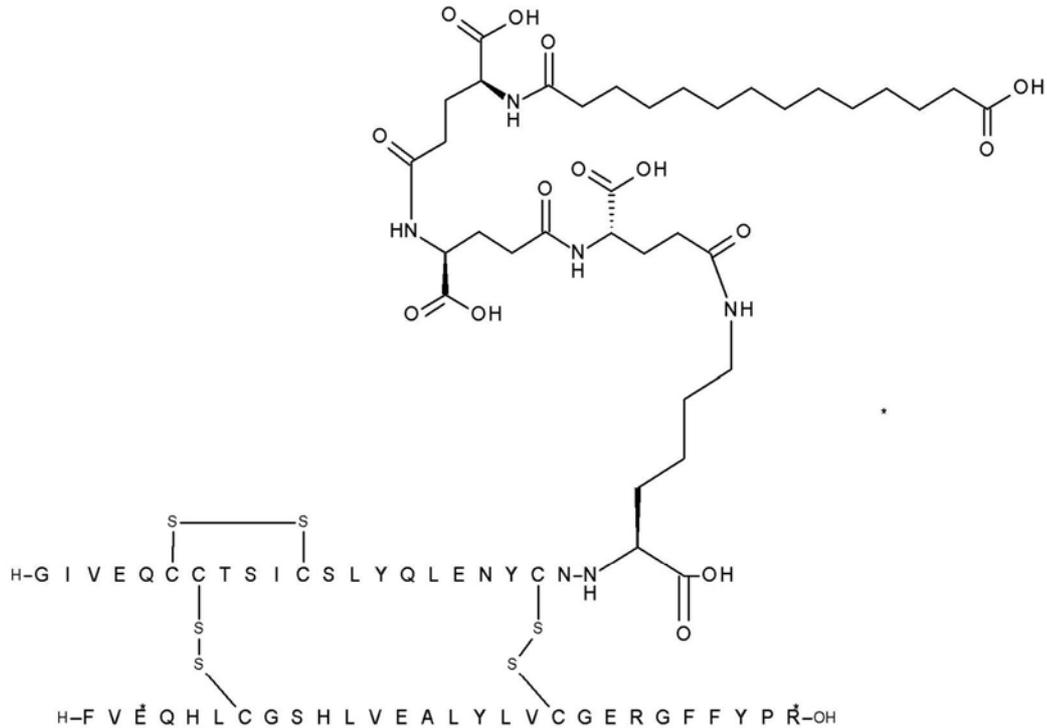
[0629] LC-MS (电喷雾) :m/z=1537.7 (M+4) /4。计算值:1537.5

[0630] 实施例26:通用程序(A)

[0631] A22K (N(eps)-十四烷二酰基-3xgGlu), B3E, desB27, B29R, desB30人胰岛素;

[0632] IUPAC (OpenEye, IUPAC类型) 名称:N{α} ([GluB3, ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-胰岛素(人)-(A)-肽基)-N{ε} [(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三碳酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]氨基]丁酰基]Lys, (B)-肽。

[0633]



[0634] 可以根据实施例1中描述的方法制备该类似物。

[0635] 实施例27:在溶解的受体上测量的、选定的本发明胰岛素衍生物的胰岛素受体亲和力

[0636] 本发明的胰岛素类似物对人胰岛素受体 (IR) 的相对结合亲和力通过闪烁逼近测定法 (SPA) (根据Glendorf T等人 (2008) *Biochemistry* 47 4743-4751) 中的竞争结合来确定。[0637] 简言之,在96孔Optiplates (Perkin-Elmer Life Sciences) 中进行人胰岛素标准物和待测胰岛素类似物的稀释系列,随后添加 [¹²⁵I-A14Y]-人胰岛素、抗IR小鼠抗体83-7、溶解的人IR-A (通过麦胚凝集素色谱法从过表达该IR-A全受体 (holoreceptor) 的幼仓鼠肾 (BHK) 细胞中半纯化的) 以及在由100mM HEPES (pH 7.8)、100mM NaCl、10mM MgSO₄和0.025% (v/v) 吐温20组成的结合缓冲液中的SPA珠子 (抗小鼠聚乙烯基甲苯SPA珠子, GE Healthcare)。在22°C温和摇动下将板温育22-24h,以2000rpm离心2分钟,并在TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences) 上计数。[0638] 根据四参数logistic模型 (Vølund A (1978) *Biometrics* 34357-365) 分析来自SPA的数据,并且相对于在相同板内测量的人胰岛素标准物的结合亲和力,计算类似物的结合亲和力。

[0639] 还使用了相关的测定法,其中结合缓冲液含有1.5% HSA (w/v) (Sigma A1887), 以便模拟更接近的生理条件。

[0640] 选定的本发明胰岛素类似物的胰岛素受体亲和力以及其他体外数据在以下表1中呈现。

[0641] 实施例28:在膜结合受体上测量的、选定的本发明胰岛素衍生物的胰岛素和胰岛素样生长因子1受体亲和力

[0642] 从用含有人IR-A、IR-B或IGF-1R插入物的pZem219B载体稳定转染的BHK细胞中纯

化膜结合人IR和IGF-IR。在冰冷的缓冲液(25mM HEPES pH 7.4, 25mM CaCl₂和1mM MgCl₂, 250mg/L杆菌肽, 0.1mM Pefablock)中收获并匀浆化BHK细胞。使匀浆物在41% (w/v)蔗糖垫上分层,并在4°C下以95000g离心75分钟。收集质膜,用缓冲液(如上所述)1:5稀释,并在4°C下以40000g再次离心45分钟。将沉淀物重悬于最小体积的缓冲液中,并用针(23号)抽取3次,之后在-80°C下储存直到使用。

[0643] 通过SPA设置(setup)中的竞争结合来确定与膜结合的人IR-A、IR-B或IGF-1R中任一种的相对结合亲和力。在96孔Optiplates (Perkin-Elmer Life Sciences)中一式两份进行IR测定。在25°C温和搅拌下,将膜蛋白与在总体积为200μL的测定缓冲液(50mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM MgSO₄, 0.01% Triton X-100, 0.1% (w/v) HSA (Sigma A1887), Complete的无EDTA (Complete EDTA-free) 蛋白酶抑制剂)中的50pM [¹²⁵I-A14Y]-人胰岛素、50μg麦胚凝集素(WGA)涂覆的PVT微球(GE Healthcare)以及浓度逐渐增加的配体一起温育150分钟。通过将板以2000rpm离心2分钟来终止测定,并通过在TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences)上计数来定量结合放射性。

[0644] 除了采用膜结合的IGF-1R和50pM [¹²⁵I-Tyr31]-人IGF-1外,基本上如IR结合测定一样进行IGF-1R测定。根据四参数logistic模型(Vølund A (1978) Biometrics 34:357-365)分析来自SPA的数据,并相对于在相同板内测量的人胰岛素标准物的结合亲和力,计算待测类似物的结合亲和力。

[0645] 选定的本发明胰岛素类似物的IR (A同种型)和IGF-1R结合数据在以下表1中给出。

[0646] 表1

[0647] 选定的本发明胰岛素类似物的IR (A同种型)和IGF-1受体结合数据

实施例 编号	相对 IR-A 亲和力 * (在 0% HSA 下) (%)	相对 IR-A 亲和力 * (在 1.5% HSA 下) (%)	相对 IR-A 亲和力 ** (在 0.1% HSA 下) (%)	相对 IGF-1R 亲和力 *** (在 0.1% HSA 下) (%)	IR IGF1 比****
1	218.4	106.2	150.4	233.8	0.64
2	144.0	69.2	131.4	137.0	0.96
3	150.2	95.6	111.0	127.8	0.87
4	176.8	10.9	37.8	66.4	0.57
5	178.5	17.0	39.0	184.2	0.21
6	128.0	17.7	54.6	126.5	0.43
7	193.8	111.6	126.3	194.7	0.65
8	169.2	27.6	33.6	197.4	0.17
9	209.0	29.9	19.3	130.9	0.15

[0648]

实施例 编号	相对 IR-A 亲和力 * (在 0% HSA 下) (%)	相对 IR-A 亲和力 * (在 1.5% HSA 下) (%)	相对 IR-A 亲和力 ** (在 0.1% HSA 下) (%)	相对 IGF-1R 亲和力 *** (在 0.1% HSA 下) (%)	IR IGF1 比****
10	166.8	91.4	237.6	241.3	0.98
11	277.4	15.8	39.3	108.8	0.36
12	167.6	35.5	46.4	309.7	0.15
13	291.3	29.2	79.9	208.9	0.38
14	211.9	76.7	173.9	325.9	0.59
15	203.0	89.4	98.4	228.5	0.43
[0649] 16	223.5	92.5	107.3	415.7	0.26
17	241.7	117.9	117.3	546.4	0.21
18	166.2	17.8	36.8	89.8	0.41
19	166.9	52.8	75.8	118.0	0.64
20	184.4	127.8	130.5	260.1	0.50
21	99.0	132.6	74.9	151.7	0.49
22	64.9	54.5	43.6	143.3	0.30
23	84.4	44.3	38.9	90.9	0.43
24	183.5	76.6	84.3	184.3	0.46
25	188.7	68.8	65.2	225.7	0.29

[0650] *) 溶解的克隆人胰岛素受体A同种型,数据以相对于人胰岛素的百分比表示,方案在实施例27中给出。

[0651] **) 膜结合的克隆人胰岛素受体A同种型受体,数据以相对于人胰岛素的百分比表示,方案在实施例28中给出。

[0652] ***) 膜结合的克隆人胰岛素样生长因子1受体,数据以相对于人胰岛素的百分比表示,方案在实施例28中给出。

[0653] ****) 来自膜结合受体的IR-A与IGF-1R亲和力的比例,方案来自实施例28。

[0654] 实施例29:通过SEC-HPLC稀释分析的单体-二聚体平衡

[0655] 进行采用SEC-HPLC(大小排阻HPLC)的一系列稀释,以评价无锌胰岛素的单体-二聚体平衡。通过注射不同体积(2.5-80 μ L)的有待在Superose 12 10/300 GL柱上测试的0.6mM胰岛素类似物,并用140mM NaCl、10mM Tris pH 7.7以0.8mL/min的流速洗脱,该样品几乎与注射体积成比例地被稀释。基于作为稀释度的函数的保留时间的改变,计算两个参数:分子量的增加(M_w增加)和R斜率。

[0656] R斜率被推导为保留时间相对于log(注射体积)图线的斜率,而Mw增加通过一组参考样品被计算为最低与最高注射体积之间的表观分子量的增加。这两个参数均反映了胰岛素类似物响应于稀释而解离的趋势,并因此反映了在皮下注射后快速解离为单体的可能性。

[0657] 这些测定的结果以及现有技术胰岛素类似物的结果在以下表2-4中呈现。

[0658] 表2

[0659] 分子量增加 (Mw增加)

[0660] 本发明的化合物

[0661]

实施例的化合物	R 斜率(min/ μ L)	Mw 增加(%)
1	-0.05	3.18
2	-0.06	4.29
3	-0.06	5.18
4	-0.02	1.69
7	-0.03	2.55

[0662]

10	-0.08	6.01
11	-0.13	10.71

[0663] 表3

[0664] 分子量增加 (Mw增加)

[0665] 现有技术(WO 2009/022013_{A1})的化合物

现有技术 实施例 \ddagger	R 斜率 (min/ μ L)	MW 增加 (%)
门冬胰岛素	-0.04	3.00
人胰岛素	-0.65	56.0
1	-0.78	83.2
4	-0.66	68.2
5	-0.52	53.3
42	-0.74	75.8
44	-0.75	75.5
45	-0.73	71.6

[0666] 给定实施例编号是已知的和现有技术(例如,WO 2009/022013)中描述的没有B27Thr残基缺失(desB27)的A22K酰化的类似物。

[0668] 表4

[0669] 分子量增加(Mw增加)

[0670] 现有技术(WO 2007/096431 \ddagger)的化合物

现有技术 实施例编号 \ddagger	R 斜率 (min/ μ L)	MW 增加 (%)
11	*	*
12	-0.66	74.4

[0672] *) 由于胰岛素类似物在pH7.4下的溶解性较差,不能获得数据。

[0673] 给定实施例编号是已知的和现有技术(例如,WO 2007/096431)中描述的没有B27Thr残基缺失(desB27)的A22K酰化的类似物。

[0674] 结论

[0675] 可以得出以下结论:与现有技术的相似的A22K酰化类似物(没有B27Thr残基缺失)相比,作为desB27类似物的本发明A22K酰化胰岛素更易响应于稀释而解离,并因此更加可用于餐时团注施用。可以进一步得出以下结论:在该试验中,本发明的胰岛素比人胰岛素(也用作餐时胰岛素,但具有比门冬胰岛素更慢的作用谱)更像门冬胰岛素(可作为NovoRapid®或NovoLog® (Novo Nordisk A/S) 商购获得,用作餐时胰岛素),从而突出了本发明的衍生物相对于现有技术的改善的性质。

[0676] 本发明的类似物均具有较小的负R斜率-0.13至-0.02(表2),因此比人胰岛素(R斜率-0.65;见表3)更像门冬胰岛素(R斜率-0.04;见表3)。相反,所有测试的现有技术的相似类似物均具有与人胰岛素相似的R斜率(-0.52至-0.78;表3和表4)。因此,本发明的所有类似物均分别显示出比现有技术的类似物更小的Mw增加(相对于53-83%,最多为10.7%) (参见表2、表3和表4)。

[0677] 这些数据表明,本发明的化合物比现有技术的相似类似物更加单体化。在这方面,本发明的化合物与门冬胰岛素相似,而现有技术的相似类似物与人胰岛素相似。

[0678] 实施例30:通过小角度X射线散射(SAXS)测量的自缔合(self-association)

[0679] 使用SAXS数据来评估待测胰岛素类似物在皮下注射后的自缔合状态。从含有0.6mM待测胰岛素类似物和140mM pH 7.4的NaCl的无Zn制剂收集SAXS数据。对于每种类似物,利用SAXS散射谱具有来自多组分混合物中的所有单独组分的强度贡献这一事实,来评估单体、二聚体和更大物质的相对量。通过采用每个组分的强度(形状因数,form factors),可以评估混合物中每个组分的体积分数贡献。使用非负或无约束最小二乘算法的线性方程的系统用来最小化实验散射曲线与计算的散射曲线之间的差异性。从单体、二聚体、六聚体等的晶体结构来计算形状因数。该体积分数以百分比(%)表示。

[0680] 通过使用具有已知浓度的参考样品并假设分子量的比与零角度下散射强度I(0)的比相同,近似估计平均分子量,将其相对于测量的浓度进行归一化。

[0681] 从本发明衍生物和现有技术衍生物获得的结果在以下表5、表6和表7中示出。

[0682] 表5

[0683] 本发明衍生物的SAXS数据

[0684]

实施例编号	回转半径, Rg (nm)	Dmax** (nm)	单体 (%)	二聚体 (%)	更大的物质 (%)
1	1.8	6.5	80	0	20
2	1.4	4.3	74	24	2

[0685]	4	1.3	4.0	69	30	1
	10	1.8	6.6	78	0	22
	11	1.6	5.7	63	26	11
	7	1.6	5.8	66	27	7
	18	1.6	5.5	56	39	5

[0686] 表6

[0687] 现有技术 (WO 2009/022013[‡]) 衍生物的SAXS数据

实施例编号 [‡]	回转半径, R _g (nm)	D _{max} (nm)	单体 (%)	二聚体 (%)	更大的物质 (%)
5	2.9	10	48	0	52
4	3.2	11.4	0	58	42
[0688] 44	2.3	8.0	0	57	43
6	2.4	7.9	30	22	48
42	2.6	8.9	0	47	53
1	2.8	10.0	0	46	54
45	2.4	8.2	27	17	56

[0689] 表7

[0690] 现有技术 (WO 2007/096431[‡]) 衍生物的SAXS数据

实施例编号‡	回转半径, Rg (nm)	Dmax (nm)	单体 (%)	二聚体 (%)	更大的物质 (%)
[0691] 12	3.1	12.0	48	0	52
11*	*	*	*	*	*

[0692] *) 在测定缓冲液中沉淀的衍生物,表明非常大的物质或聚集体的存在。不能获得数据。

[0693] 从这些研究可以得出以下结论:在模拟注射后皮下组织中的条件的条件下,与现有技术类似物相比,本发明的衍生物更易于解离成单体,并因此将在皮下注射后更快地被吸收。本发明类似物的单体含量在63-83%的范围内(相对于现有技术类似物的0-48%)。可以进一步得出以下结论:对于现有技术类似物,所观察到的最大的分子物质在大小(Rg和Dmax)上都较大,而且以较大的量(42-62%,相对于本发明类似物的1-22%)被发现。这突出了该类似物与现有技术类似物相比用于餐时使用的实用性。

[0694] 实施例31:药物制剂的制备

[0695] 本发明的药物制剂可以被配制成水溶液。例如用氯化钠和/或甘油使该水溶液成为等渗的。此外,该水性介质可以含有缓冲液和防腐剂。将该制剂的pH值调节至期望值,并且根据所讨论的胰岛素类似物的等电点pI,该pH值可以为约3至约8.5,约3至约5,或约6.5,或约7.4,或约7.5。

[0696] 无锌胰岛素制剂的制备

[0697] 将无锌胰岛素类似物溶解在水溶液中,该最终制剂中含有0.6mM胰岛素类似物、16mM间甲酚、16mM苯酚、7mM磷酸二钠、适量的烟酰胺和甘油,并且采用1N盐酸/1 N NaOH将pH调节至7.3-7.5(在室温下测量)。加水至最终体积,并通过0.2μm过滤器将溶液过滤除菌。将该制剂装入2ml小瓶中,并使用卷边盖密封。

[0698] 表8

[0699] 胰岛素制剂的示例性组成

	实施例编号	胰岛素衍生物 (mM)	苯酚 (mM)	间甲酚 (mM)	烟酰胺 (mM)	甘油 (% w/v)	磷酸盐 (mM)	pH	
	A	2	0.6	16	16	-	1.8	7	7.4
	B	2	0.6	16	16	80	1.3	7	7.4
	C	2	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4
[0700]	D	7	0.6	16	16	-	1.8	7	7.4
	E	7	0.6	16	16	80	1.3	7	7.4
	F	7	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4
	G	4	0.6	16	16	-	1.8	7	7.4
	H	4	0.6	16	16	80	1.3	7	7.4
	I	4	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4
	J	180	0.6	16	16	170	0.7	7	7.4

[0701] 实施例32:用于评价蛋白质制剂的物理稳定性的ThT原纤维形成试验

[0702] 肽的低物理稳定性可以导致淀粉样原纤维形成,观察到其在样品中为井然有序的线状大分子结构,最终导致凝胶形成。硫代黄素T(ThT)在与原纤维结合时具有独特的荧光特征[Naiki等人(1989)Anal.Biochem.177 244-249;LeVine(1999)Methods.Enzymol.309 274-284]。

[0703] 肽的部分折叠中间体的形成被认为是原纤维形成的一般引发机制。这些中间体中的少数成核以形成模板,更多的中间体可以组装到该模板上,并且原纤维形成继续进行。滞后时间对应于核的临界质量积聚的时间间隔,而表观速率常数是原纤维自身形成的速率(图1)。

[0704] 样品制备

[0705] 在每次试验前新制备样品。将每种组合物的样品与水性ThT-溶液(0.1mM ThT)以990:10的体积比混合,并转移至96孔微量滴定板(Packard Opti-Plate™-96,白色聚苯乙烯)中。通常,将每种样品的四个或八个复制物(对应于一种测试条件)放置在一列孔中。将板用Scotch 15 Pad(Qiagen)密封。

[0706] 温育和荧光测量

[0707] 在Fluoroskan Ascent FL荧光读板器或Varioskan读板器(Thermo Labsystems)

中完成在给定温度下的温育、摇动以及ThT荧光发射的测量。将温度调节至37℃。在所有呈现的数据中,将定轨摇动调节至960rpm、1mm的振幅。采用通过444nm滤光器的激发以及通过485nm滤光器测量发射来完成荧光测量。通过将板在测定温度下温育10分钟来开始每一次运行。每20分钟对该板进行测量,持续最多45小时。在各次测量之间,如所述地摇动并加热该板。

[0708] 数据处理

[0709] 在Microsoft Excel中生成荧光相对于时间的曲线图,并将滞后时间估计为如图14A、14B和14C(分别是插图1A、1B和1C)中所示的滞后区与原纤维形成区的线性近似之间的截距。滞后时间的增加对应于物理稳定性的增加。数据点通常为4个或8个样品的平均值。

[0710] 针对本发明的A22K酰化类似物以及没有B27Thr残基缺失(desB27)的现有技术的相似A22K酰化类似物获得的结果在以下表8中示出。

[0711] 表8

[0712] 无锌制剂的以ThT滞后时间测量的物理稳定性

实施例编号	制剂	ThT 试验中的滞后时间 (h)	RSD (%)
2	A	26.7	27
2	B	34.9	16
2	C	42	6
4	D	43.5	5
4	E	45	*
[0713] 4	F	45	*
7	G	26.3	20
7	H	20.2	31
7	I	15	15
18	J	14	17
WO 2009/022013 实施例 5	-	15.0	17
[0714] WO 2007/096431 实施例 12	-	4.7	17

[0715] *在ThT试验的时间跨度内没有原纤维形成

[0716] 得出以下结论:与现有技术的相似类似物相比,在添加和未添加烟酰胺的无锌制剂中,本发明的A22K酰化胰岛素类似物表现出更好或相似的对原纤维形成的稳定性(即,具有增加的物理稳定性)。这是非常令人惊讶的,因为SAXS和SEC-HPLC稀释数据表明,本发明的胰岛素类似物在大小上较小(即,由单体和二聚体组成),技术人员预期这将会导致较低的物理稳定性。

[0717] 实施例33:胰岛素化学稳定性的分析

[0718] 大小排阻色谱法

[0719] 使用的制剂:见实施例31

[0720] 在Waters Acquity BEH200 SEC柱(150 x 2.4mm, 部件号186005225)上采用含有55% (v/v) 乙腈、0.05% TFA的洗脱液在流速0.2ml/min以及柱温40°C下进行高分子量蛋白质(HMWP)和单体胰岛素类似物的定量测定。用可调节的吸光度检测器(Waters Acquity TUV)在215nm处进行检测。600µM胰岛素类似物制剂和600µM人胰岛素标准物的注射体积均为1.5µl。每种类似物制剂在2ml小瓶中在5°C、25°C和37°C下温育。在限定的时间测量制剂的HMWP和含量。结果在以下表9中示出。

[0721] 表9

[0722] 在37°C下储存的HMWP含量

在 37°C 下的周 数	实施例编号 2			实施例编号 4			实施例编号 7			实施 例编 号 18	WO 2009/022013 实施例编号 5
	A	B	C	D	E	F	G	H	I		
											-
0	0.5%	0.1%	0.1%	0.5%	0.2%	0.2%	1.9%	0.1%	0.1%	0.5%	3.3%
2	0.6%	0.2%	0.2%	0.7%	0.4%	0.4%	2.5%	0.5%	0.5%	1.1%	4.9%
4	0.8%	0.3%	0.3%	1.0%	0.5%	0.5%	4.1%	0.7%	0.7%	*	13.1%
8	2.3%	*	*	2.2%	*	*	6.8%	*	*	*	29.1%

[0723] *未测定

[0724] 得出以下结论:在37°C下在无锌制剂中储存时,本发明胰岛素衍生物的高分子量蛋白质(HMWP)的形成少得多(实施例2、4和7的本发明胰岛素储存8周后分别形成最多6.8%的HMWP),而现有技术的相似胰岛素衍生物导致29.1%HMWP的形成。进一步得出以下结论:在无锌制剂中以及在烟酰胺的存在下,在37°C下储存时,本发明的胰岛素衍生物形成低水平的HMWP。

[0725] 反相色谱法(UPLC)

[0726] 在采用Phenomenex Kinetex C18柱(大小为2.1x150mm,颗粒大小为1.7µm,且孔隙大小为100 Å)(Phenomenex部件号00F-4475-AN)的UPLC系统上,在50°C下以0.3ml/min的流速以及在215nm处UV检测下进行胰岛素相关杂质的测定。通过如下组成的流动相进行洗脱:A:10% (v/v) 乙腈、0.09M磷酸氢二铵,pH 3.6,以及B:80% (v/v) 乙腈。梯度:0-7min,从15%B线性变化至26%B;7-34min,线性变化至40%B;34-36分钟,线性变化至80%B,以用于柱洗涤,之后回到初始条件,在39min时15%B。杂质的量被确定为测量的吸收面积在防腐剂洗脱后测定的总吸收面积中的百分比。每种类似物制剂在2ml小瓶中在5°C、25°C和37°C下温育。在限定的时间测量制剂的胰岛素相关杂质。结果在以下表10中示出。

[0727] 表10

[0728] 在37°C下储存的纯度

[0730]

在 37°C 下的周 数	实施例编号 2			实施例编号 4			实施例编号 7			实施 例编 号 18	WO 2009/022013 实施例编号 5
	A	B	C	D	E	F	G	H	I		
制剂											-
0	95.2%	98.1%	97.8%	92.0%	95.7%	95.4%	84.1%	98.13%	98.0%	92.9%	88.4%
2	93.8%	96.8%	96.6%	90.5%	94.8%	95.1%	79.7%	95.6%	95.5%	90.0%	36.3%
4	93.2%	94.4%	94.3%	89.3%	92.3%	92.1%	76.4%	93.2%	92.7%	*	16.1%
8	87.5%	*	*	86.5%	*	*	69.1%	*	*	*	4.1%

*未测定

[0731] 得出以下结论：与现有技术的相似A22K酰化类似物相比，本发明的胰岛素衍生物在没有锌的制剂中稳定得多。现有技术的类似物如此不稳定，以至于在37°C下储存8周后，少于5%（对应于84%的纯度损失）的衍生物是完整的。本发明的胰岛素类似物（实施例2、4和7的化合物所代表的）在37°C下储存8周后分别具有小于7.7%、5.5%和15%的纯度损失。进一步得出以下结论：本发明的胰岛素类似物在添加烟酰胺的无锌制剂中是稳定的。

[0732] 实施例34：在LYD猪中的皮下PK/PD谱

[0733] 可以根据该方案，通过向猪的皮下施用，例如，与商用制剂中的门冬胰岛素

(NovoRapid) 进行比较或与现有技术的相似A22K酰化胰岛素类似物进行比较,来测试本发明的胰岛素衍生物。可以测试该衍生物的药代动力学和/或药效学参数。

[0734] 使用的通用方法

[0735] 超声检查和注射区的标记

[0736] 在麻醉以放置永久静脉内导管的过程中,使用型号为“MyLabFive”的 Esaote 超声扫描仪以及“LA435 6-18 MHz”型线性探针通过超声对猪进行检查。找到在右侧或左侧(与导管相对)的、耳朵与肩胛之间的中颈部,即下方没有肌肉(适合皮下注射)的2 x 2cm区域,并用刺青进行标记。

[0737] 喂养时间表

[0738] 猪在实验前禁食(没有早餐)。

[0739] 在整个实验过程中,猪都在其正常的围栏中并且它们没有被麻醉。猪在采集第12小时血液样品之前禁食,但可以自由地获取水。在采集第12小时血液样品后,给猪喂食食物和苹果。

[0740] 给药

[0741] 将 Penfill 安装在 **NovoPen®4** 中。针对每只猪使用新的针。使用针阻挡器(needle stopper),以确保到表皮以下5mm的最大皮下穿透。针对每只猪计算并记录剂量体积(IU体积)。

[0742] 剂量体积(U) = ((体重x剂量nmol/kg) / 浓度nmol/mL) x 100U/mL

[0743] 在猪颈部的右侧或左侧(与导管相对)在皮下组织中侧向给药,并且在注射后将针保持在皮下组织中最少10秒,以确保化合物沉积。

[0744] 低血糖的治疗

[0745] 在皮下给药后,葡萄糖溶液应准备好用于静脉内注射以预防低血糖,即将4-5个注射器(20mL)用无菌的20%葡萄糖填充,备用。低血糖的诊断基于临床症状以及血糖仪(Glucocard X-计)上的血糖测量。

[0746] 治疗由缓慢静脉内注射50-100ml 20%葡萄糖(10-20g葡萄糖)组成。经5-10分钟分份给予葡萄糖,直到起效。

[0747] 血液采样

[0748] 在实验前,用未添加10IU/mL肝素的无菌0.9%NaCl检查颈部导管的通畅性。

[0749] 在给药之前和之后,在以下时间点从中央静脉导管以稳定的形式取得血液样品:

[0750] 给药前(-10、0)、3、6、9、12、15、20、30、45、60、90、120、150、180、240、300、360、420、480、540、600和720分钟。

[0751] 采用3通旋塞阀取得样品。在取样前放出4-5mL的废血并丢弃。

[0752] 将0.8ml的血液样品收集至EDTA涂覆的管中,以用于葡萄糖和胰岛素分析。

[0753] 在取得每个血液样品后,将导管用未添加10IU/mL肝素的5ml无菌0.9%NaCl冲洗。

[0754] 将管轻轻地倾斜至少10次,以确保血液和抗凝剂(EDTA)充分混合,并在一分钟后将其放置在湿冰上。在采样后1小时内,将该管在3000rpm和4°C下旋转10分钟。将样品储存在湿冰上,直到用移液管移取。

[0755] 要求无菌技术,以避免导管中的细菌生长使凝血风险增加。

[0756] 实验后导管的封闭

[0757] 如果没有采用无菌技术进行血液采样,则可以将采用1ml/10kg的Pentrexyl®(溶解在10ml 0.9%NaCl中的1g氨基青霉素)的单次静脉内处理经由已用于血液采样的导管缓慢地静脉内施用。在该处理后,用10ml 0.9%NaCl冲洗导管。

[0758] 用添加有肝素(10IU/mL)的5ml无菌0.9%NaCl冲洗导管。将导管用具有乳胶注射膜的新鲁尔锁(luer-lock)封闭,并通过作为该导管的锁的该膜注射1.0ml的TauroLockHep500。

[0759] 血液样品的分析

[0760] 血浆葡萄糖:将10ul的血浆用移液管移到500ul的缓冲溶液中,以用于在BIOSEN自动分析仪中测定血浆中的葡萄糖浓度。

[0761] 血浆胰岛素:将1 x 50ul的血浆用移液管移到0.65ml Micronic®管(ELISA/LOCI/SPA设置)中,以用于采用ELISA或LC-MS进行分析。

[0762] 将血浆在-20℃下冷冻储存。

[0763] 实施例35:实施例1的胰岛素衍生物在LYD猪中的皮下PK/PD谱

[0764] 在上述通用程序后,获得了实施例1的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0765] 使用的制剂

[0766] 实施例1的胰岛素衍生物,pH=7.4,609μM;1.6% (w/vol) 甘油;30mM苯酚(0个Zn/六聚体)。

[0767] 门冬胰岛素,商用制剂,600μM;1.6% (w/vol) 甘油;7mM磷酸盐;10mM氯化钠;300μM乙酸锌;16mM苯酚;16mM间甲酚。

[0768] 这些测定的结果在附图1-4和以下表11中呈现。

[0769] 表11

[0770] 药代动力学参数(平均值±SD)

[0771]	化合物	T_{max}^a	C_{max}/D pM/	AUC/D pM*min/	%extrap	$T_{1/2}^b$	MRT

		(min)	(nmol/kg)	(pmol/kg)		(min)	(min)	
[0772]	实施例 1 0 个 Zn/六聚体	平均值	11	1212	122	2	116	165
	1 nmol/kg (n=8)	SD		456	25		10	20
[0772]	NovoRapid®	平均值	11	1277	67	2	67	93
	0.5 nmol/kg (n=8)	SD		788	26		16	19
[0772]	NovoRapid®	平均值	14	880	64	2	75	110
	1 nmol/kg (n=8)	SD		335	20		7	11

[0773] aT_{max} 以中值给出

[0774] $bT_{1/2}$ 以调和平均值±伪SD给出

[0775] c 基于静脉内数据(未示出)计算的生物利用度

[0776] 结论

[0777] 得出以下结论:在无锌制剂中的实施例1的胰岛素衍生物具有与门冬胰岛素(NovoRapid®)商用制剂非常相似的PK/PD谱。此外,该胰岛素衍生物的平均保留时间为165分钟。可以得出以下结论:实施例1的胰岛素衍生物作为速效(餐时)胰岛素是有用的。

[0778] 实施例36:实施例2的胰岛素衍生物在LYD猪中的皮下PK/PD谱

[0779] 在上述通用程序后,获得了实施例2的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0780] 使用的制剂

[0781] 实施例2的胰岛素衍生物, pH=7.367, 607 μ M; 1.6% (w/vol) 甘油; 30mM苯酚(0个Zn/六聚体)。

[0782] 门冬胰岛素, 商用制剂, 600 μ M; 1.6% (w/vol) 甘油; 7mM磷酸盐; 10mM氯化钠; 300 μ M乙酸锌; 16mM苯酚; 16mM间甲酚。

[0783] 这些测定的结果在附图4-5和以下表12中呈现。

[0784] 表12

[0785] 药代动力学参数(平均值±SD)

化合物		T_{\max}^a (min)	C_{\max}/D pM/ (nmol/kg)	AUC/D pM*min/ (pmol/kg)	% _{extrap}	$T_{1/2}^b$ (min)	MRT (min)
实施例 2 0 个 Zn/六聚体	平均值	45	762	68	5	64	111
	1 nmol/kg (n=7) SD		342	9		15	21
NovoRapid 0.5 nmol/kg (n=7)	平均值	30	923	60	2	53	92
	SD		510	8		15	10
NovoRapid 1 nmol/kg (n=6)	平均值	25	771	64	1	53	98
	SD		254	16		15	28

[0787] ^a T_{\max} 以中值给出

[0788] ^b $T_{1/2}$ 以调和平均值±伪SD给出

[0789] ^c基于静脉内数据(未示出)计算的生物利用度

[0790] 结论

[0791] 得出以下结论:在无锌制剂中的实施例2的胰岛素衍生物具有与门冬胰岛素非常相似的PK/PD谱。此外,该胰岛素衍生物的平均保留时间为111分钟,与NovoRapid®(门冬胰岛素)没有显著不同。可以得出以下结论:实施例2的胰岛素衍生物作为速效(餐时)胰岛素是有用的。

[0792] 实施例37:实施例11的胰岛素衍生物在LYD猪中的皮下PK/PD谱

[0793] 在上述通用程序后,获得了实施例11的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0794] 使用的制剂

[0795] 实施例11的胰岛素衍生物,pH=7.44,689μM;1.6%(w/vol)甘油;30mM苯酚(0个Zn/六聚体)。

[0796] 这些测定的结果在附图6-7和以下表13中呈现。

[0797] 图6和图7分别示出了以每6个胰岛素分子0个锌配制的实施例11的胰岛素(1nmol/kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化;1nmol/kg;

[0798] 表13

[0799] 药代动力学参数(平均值±SD)

[0800]	化合物		T_{\max}^a	C_{\max}/D	AUC/D	$\%_{\text{extrap}}$	$T_{1/2}^b$	MRT
			(min)	pM / (nmol/kg)	pM*min / (pmol/kg)		(min)	(min)
[0801]	实施例 11	平均值	38	1207	261	12	245	334
	1 nmol/kg (n=4)	SD		330	60		32	46

[0802] $^aT_{\max}$ 以中值给出

[0803] $^bT_{1/2}$ 以调和平均值±伪SD给出

[0804] 得出以下结论:在无锌制剂中的实施例11的胰岛素衍生物具有适合作为餐时胰岛素的PK谱。此外,该胰岛素衍生物的平均保留时间为334分钟,与相似的(同样是)含有1,16-十六烷二酸的现有技术胰岛素衍生物A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素(WO 2009/022013,实施例45,(MRT=1287分钟),见下文)所获得的谱相比显著缩短。可以得出以下结论:实施例11的胰岛素衍生物作为速效(餐时)胰岛素是有用的。

[0805] 实施例38:实施例4的胰岛素衍生物在LYD猪中的皮下PK/PD谱

[0806] 在上述通用程序后,获得了实施例4的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0807] 使用的制剂

[0808] 实施例4的胰岛素衍生物,pH=7.43,621 μ M;1.8% (w/vol) 甘油;16mM苯酚;16mM间甲酚,10mM氯化钠(0个Zn/六聚体)。

[0809] 这些测定的结果在附图8-9和以下表14中呈现。

[0810] 表14

[0811] 药代动力学数据

化合物		T_{max}^a (min)	C_{max}/D pM / (nmol/kg)	AUC/D pM*min / (pmol/kg)	$\%_{extra}$ p	$T_{1/2}^b$ (min)	MRT (min)
[0812] 实施例 4 0 个 zn/六聚体 1 nmol/kg	平均值	45	1272	255	8	160	235
	SD		394	41		26	34

[0813] a) T_{max} 以中值给出

[0814] b) $T_{1/2}$ 以调和平均值±伪SD给出

[0815] 得出以下结论:在无锌制剂中的实施例4的胰岛素衍生物具有适合作为餐时胰岛素的PK谱。此外,该胰岛素衍生物的平均保留时间为160分钟,与相似的含有1,16-十六烷二酸的现有技术胰岛素衍生物A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素(WO 2009/022013,实施例45,(MRT=1287分钟),见下文)所获得的谱相比显著缩短。可以得出以下结论:实施例4的胰岛素衍生物作为速效(餐时)胰岛素是有用的。

[0816] 实施例39:现有技术胰岛素衍生物在LYD猪中的皮下PK/PD谱

[0817] 在上述通用程序后,获得了现有技术胰岛素衍生物A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素(WO 2009/022013,实施例45)的以下PK和PD谱。

[0818] 使用的制剂

[0819] WO 2009/022013实施例45的化合物,588 μ M;1.6% (w/vol) 甘油;30mM苯酚;7mM tris,pH=7.4(0个Zn/六聚体),1nmol/kg。

[0820] 这些测定的结果在附图10和11以及以下表15中呈现。

[0821] 图10和11分别示出了以每6个胰岛素分子0个锌配制的现有技术胰岛素衍生物,即A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素(WO 2009/022013,实施例45)(1nmol/kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化(1nmol/kg)。

[0822] 表15

[0823] 1nmol/kg的WO 2009/022013实施例45的化合物皮下给药后的药代动力学参数

化合物		AUC/D	T_{max}^a	C_{max}/D	MRT	$T_{1/2}^b$
		pM*min/(pmol/kg)	(min)	pM/(nmol/kg)	(min)	(min)
WO 2009/022013 实施例 45 0 个 Zn/六聚体 (n=4) 1 nmol/kg	平均值	422	45	736	1287	987
	SD	51	17	344	86	36

[0825] $^aT_{max}$ 以中值±SD给出

[0826] $^bT_{1/2}$ 以调和平均值±伪SD给出

[0827] 得出以下结论:在无锌制剂中的现有技术(WO 2009/022013,实施例45)胰岛素衍生物与持久的拖尾有关,这可能源自于一部分皮下储留物的延迟吸收。该胰岛素在24小时(1440分钟)时间点时的血浆浓度为98pM。而且,血糖降低效应被延长至持续至少8小时(480分钟)。平均停留时间为1287分钟,差不多1天。这使得该现有技术胰岛素不适合于餐时使用。

[0828] 实施例40:现有技术胰岛素衍生物的相近类似物在LYD猪中的皮下PK/PD谱

[0829] 在上述通用程序后,获得了如WO 2009/022013(特别参见实施例45(A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素)中描述的代表现有技术的C14二酸类似物A22K(N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素的以下PK和PD谱。

[0830] 使用的制剂

[0831] A22K(N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素(WO 2009/022013实施例45的1,16-十六烷二酰基(C16二酸)类似物的1,14-十四烷二酰基(C14二酸)类似物),588μM;1.6%(w/vol)甘油;30mM苯酚;7mM tris,pH=7.4(0个Zn/六聚体)。

[0832] 这些测定的结果在附图9和以下表16中呈现。

[0833] 图12和13分别示出了以每6个胰岛素分子0个锌配制的代表现有技术的胰岛素衍生物的C14二酸类似物,即A22K(N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG),B29R,desB30人胰岛素(WO 2009/022013,实施例45)(1nmol/kg)的PK(药代动力学)谱(胰岛素浓度相对于时间),以及所引起的血浆葡萄糖变化(72nmol/动物)。

[0834] 表16

[0835] 1nmol/kg WO 2009/0022013实施例45的现有技术化合物的C16二酸类似物的C14二酸类似物皮下给药后的药代动力学参数(72nmol/动物)

动物	剂量	T_{max}	C_{max}/D	AUC/D	%extrap	$T_{1/2}$	MRT
----	----	-----------	-------------	-------	---------	-----------	-----

[0837]

编号	pmol/kg	min	pM/(nmol/kg)	pM*min/(pmol/kg)	%	Min	min
10107	713	50	450	128	6	182	310
10109	1714	20	241	40	9	148	226
10110	720	10	513	104	7	153	261
10111	706	50	363	81	8	158	255
10112	1735	20	344	41	10	219	305
N		5	5	5	5	5	5
平均值			382	79	8		271
SD		19	104	39	1		35
中值		20					
调和平均值						168	
伪 SD						25	

[0838] 结论

[0839] 得出以下结论：在无锌制剂中的现有技术 (WO 2009/022013, 实施例45) 胰岛素衍生物的C14二酸形式与持久的拖尾有关, 这可能源自于一部分皮下储留物的延迟吸收。该胰岛素在10小时 (600分钟) 时间点时的血浆浓度为24pM。发现该现有技术的C14二酸类似物的平均保留时间 (MRT) 为271分钟。采用本发明实施例1和2的C14二酸类似物获得的相应结果分别为165和111分钟。而且, 血糖降低效应被延长至持续至少11小时 (660分钟)。

[0840] 这使得该现有技术胰岛素不适合于餐时使用。

[0841] 实施例41: 实施例2的胰岛素衍生物在肥胖Zucker大鼠中的皮下PK/PD谱, 在制剂中含有和不含170mM烟酰胺的情况下谱的比较

[0842] 在上述通用程序后, 获得了实施例2的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0843] 使用的制剂

[0844] 实施例2的胰岛素衍生物, pH=7.43, 621 μ M; 1.8% (w/vol) 甘油; 16mM苯酚; 16mM间甲酚, 10mM氯化钠 (0个Zn/六聚体), 含有和不含170mM烟酰胺。

[0845] 向大鼠给药40nmol/kg。

[0846] 这些测定的结果在附图15中呈现。

[0847] 得出以下结论：在实施例2的胰岛素无锌制剂中包含170mM烟酰胺（向Zucker大鼠皮下给药）导致更加速效、具有更早 T_{max} 的PK谱。因此表明，在本发明实施例2的胰岛素制剂中包含烟酰胺产生了更加适合于餐时使用的胰岛素制剂。

[0848] 实施例42：实施例7的胰岛素衍生物在肥胖Zucker大鼠中的皮下PK/PD谱，在制剂中含有和不含170mM烟酰胺的情况下谱的比较

[0849] 在上述通用程序后，获得了实施例7的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0850] 使用的制剂：

[0851] 实施例7的胰岛素衍生物，pH=7.39,604 μ M；1.6% (w/vol) 甘油；16mM苯酚；16mM间甲酚；7mM磷酸钠；10mM氯化钠（0个Zn/六聚体）；170mM烟酰胺。

[0852] 实施例7的胰岛素衍生物，pH=7.39,599 μ M；1.6% (w/vol) 甘油；16mM苯酚；16mM间甲酚，7mM磷酸钠；10mM氯化钠（0个Zn/六聚体）。

[0853] 向大鼠给药40nmol/kg。

[0854] 这些测定的结果在附图16-17中呈现。

[0855] 得出以下结论：在实施例7的胰岛素无锌制剂中包含170mM烟酰胺（向Zucker大鼠皮下给药）导致更加速效、具有更早 T_{max} 的PK谱。因此表明，在本发明实施例7的胰岛素制剂中包含烟酰胺产生了更加适合于餐时使用的胰岛素制剂。

[0856] 实施例43：实施例16的胰岛素衍生物在肥胖Zucker大鼠中的皮下PK/PD谱，在制剂中含有和不含170mM烟酰胺的情况下谱的比较

[0857] 在上述的通用程序后，获得了实施例16的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0858] 使用的制剂

[0859] 实施例16的胰岛素衍生物，pH=7.44,599 μ M；1.6% (w/vol) 甘油；16mM苯酚；16mM间甲酚；7mM磷酸钠；10mM氯化钠（0个Zn/六聚体）；170mM烟酰胺。

[0860] 实施例16的胰岛素衍生物，pH=7.40,581 μ M；1.6% (w/vol) 甘油；16mM苯酚；16mM间甲酚；7mM磷酸钠；10mM氯化钠（0个Zn/六聚体）。

[0861] 向大鼠给药40nmol/kg。

[0862] 这些测定的结果在附图18-19中呈现。

[0863] 得出以下结论：在实施例16的胰岛素无锌制剂中包含170mM烟酰胺（向Zucker大鼠皮下给药）导致更加速效、具有更早 T_{max} 的PK谱。因此表明，在本发明实施例16的胰岛素制剂中包含烟酰胺产生了更加适合于餐时使用的胰岛素制剂。

[0864] 实施例44：实施例4的胰岛素衍生物在LYD猪中的皮下PK/PD谱，在制剂中含有和不含170 μ M烟酰胺的情况下谱的比较

[0865] 在上述通用程序后，获得了实施例4的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0866] 使用的制剂

[0867] 实施例4的胰岛素衍生物，pH=7.42,0.604mM胰岛素衍生物；16mM苯酚；16mM间甲酚；2% (w/vol) 甘油；7mM磷酸盐（0个Zn/六聚体）。

[0868] 实施例4的胰岛素衍生物，pH=7.43,0.605mM胰岛素衍生物；170mM烟酰胺；16mM苯酚；16mM间甲酚；0.6% (w/vol) 甘油；7mM磷酸盐

[0869] 向猪给药1nmol/kg。

[0870] 这些测定的结果在附图20中呈现。

[0871] 得出以下结论:在实施例4的胰岛素无锌制剂中包含170 μ M烟酰胺(向猪皮下给药)导致更加速效、具有更早 T_{max} 的PK谱。因此表明,在本发明实施例4的胰岛素制剂中包含烟酰胺产生了更加适合于餐时使用的胰岛素制剂。

[0872] 实施例45:实施例2的胰岛素衍生物在LYD猪中的皮下PK/PD谱,在制剂中含有和不含170 μ M烟酰胺的情况下谱的比较

[0873] 在上述通用程序后,获得了实施例2的胰岛素衍生物的以下PK和PD谱。

[0874] 使用的制剂

[0875] 实施例2的胰岛素衍生物,pH=7.4,608 μ M;2% (w/vol) 甘油;16mM苯酚;16mM间甲酚;7mM磷酸钠(0个Zn/六聚体)。

[0876] 实施例2的胰岛素衍生物,pH=7.4,614 μ M;170 μ M烟酰胺,0.6% (w/vol) 甘油;16mM苯酚;16mM间甲酚;7mM磷酸钠(0个Zn/六聚体)。

[0877] 向猪给药1nmol/kg。

[0878] 这些测定的结果在附图21中呈现。

[0879] 得出以下结论:在实施例2的胰岛素无锌制剂中包含170 μ M烟酰胺(向猪皮下给药)导致更加速效、具有更早 T_{max} 的PK谱。因此表明,在本发明实施例2的胰岛素制剂中包含烟酰胺产生了更加适合于餐时使用的胰岛素制剂。

<110> 诺和诺德股份有限公司
 <120> 新型胰岛素衍生物及其医学用途
 <130> 8702CN01
 <140> PCT/EP2015/053989
 <141> 2015-02-26
 <150> EP 14157215.6
 <151> 2014-02-28
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 [0001] <223> 实施例1-2、4-21和24-26的人胰岛素类似物的链
 <220>
 <221> 链
 <222> (1).. (22)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22).. (22)
 <223> 乙酰化; (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu);
 (N(eps)-十六烷二酰基-4xgGlu);
 (N(eps)-十六烷二酰基-gGlu-2xOEG);
 (N(eps)-十六烷二酰基-3x(gGlu-OEG)-gGlu);
 <400> 1
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn Lys
 20

<210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 实施例3和22-23的人胰岛素类似物的链

<220>
 <221> 链
 <222> (1).. (22)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22).. (22)
 <223> 乙酰化; (N(eps)十四烷二酰基-4xgGlu);
 (N(eps)-十四烷二酰基-4xgGlu);
 (N(eps)-十四烷二酰基-gGlu-2xOEG).

<400> 2

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

[0002]

Glu Asn Tyr Cys Asn Lys
 20

<210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 实施例1、3、10-14、17和20的人胰岛素类似物的B链

<400> 3

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 Phe Phe Tyr Pro Arg
 20 25

<210> 4

<211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 实施例2、4-6、15、19和21-26的人胰岛素类似物的B链

 <400> 4

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

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Pro Arg
 20 25

[0003]

<210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 实施例7-9、16和18的人胰岛素类似物的B链

 <400> 5

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

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Pro Arg
 20 25

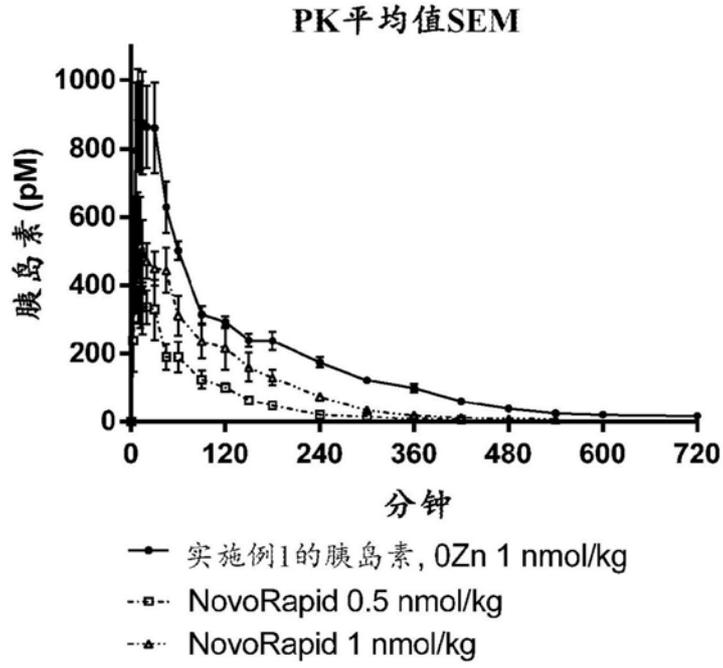


图1

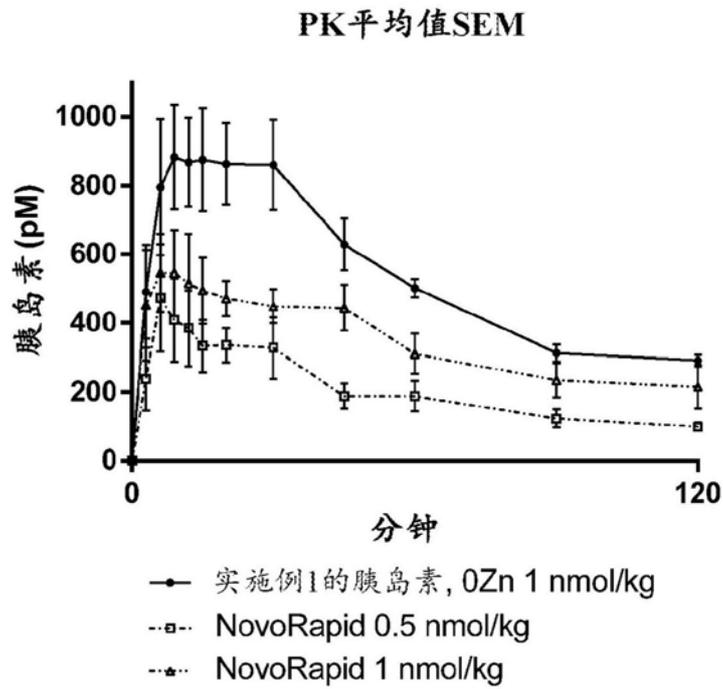


图2

PK平均值SEM

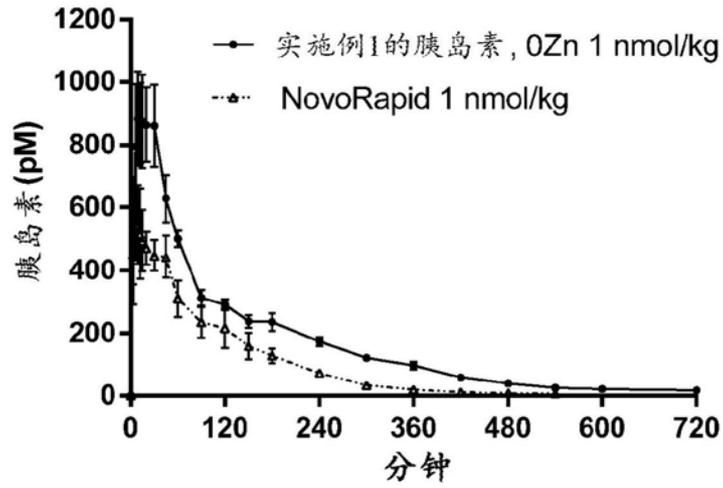


图3a

血浆葡萄糖的变化, 平均值SEM

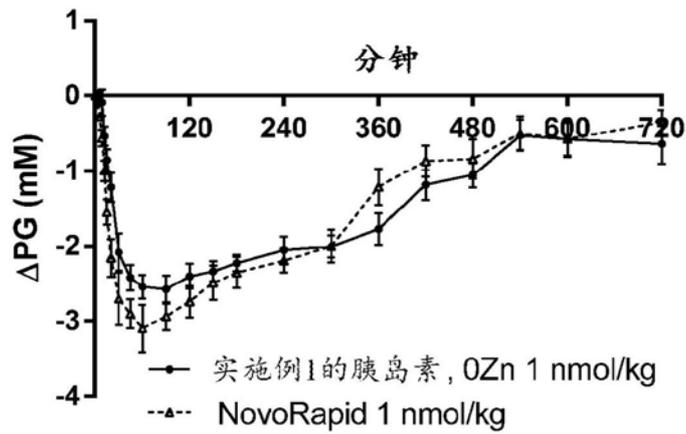


图3b

PK平均值SEM

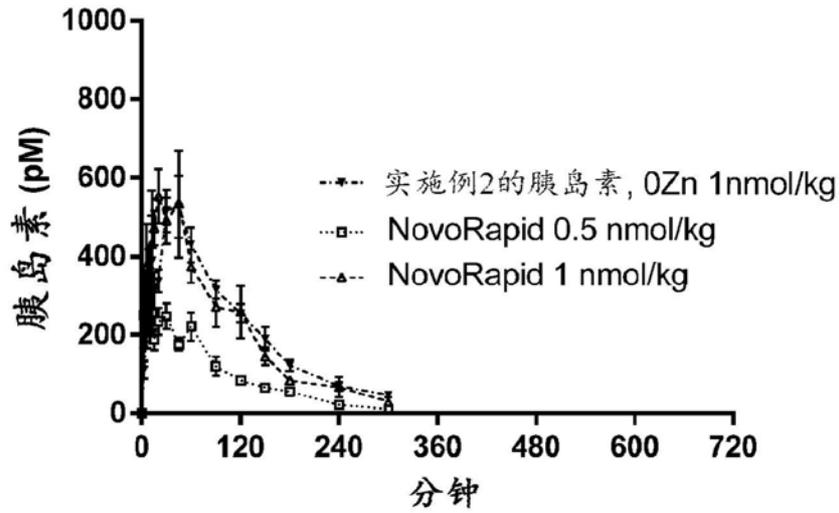


图4a

Δ PG平均值SEM

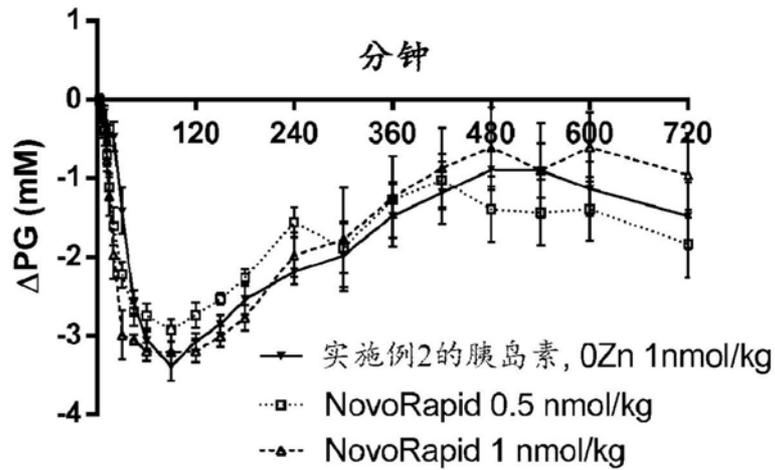


图4b

PK平均值SEM

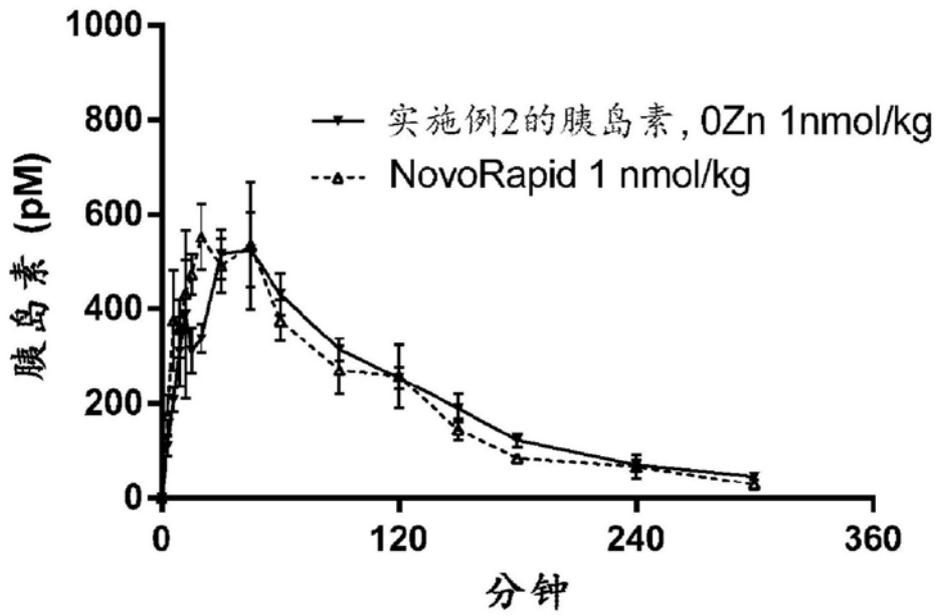


图5a

血浆葡萄糖的变化, 平均值SEM

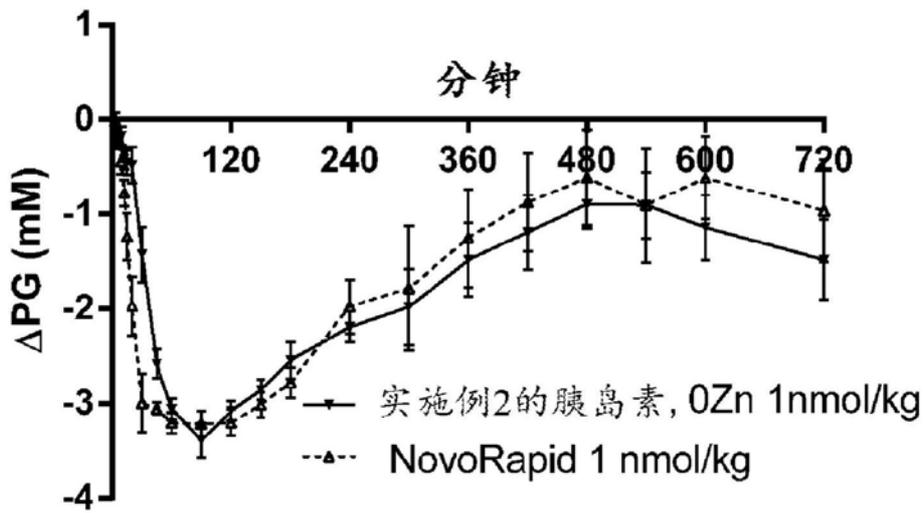


图5b

PK平均值SEM

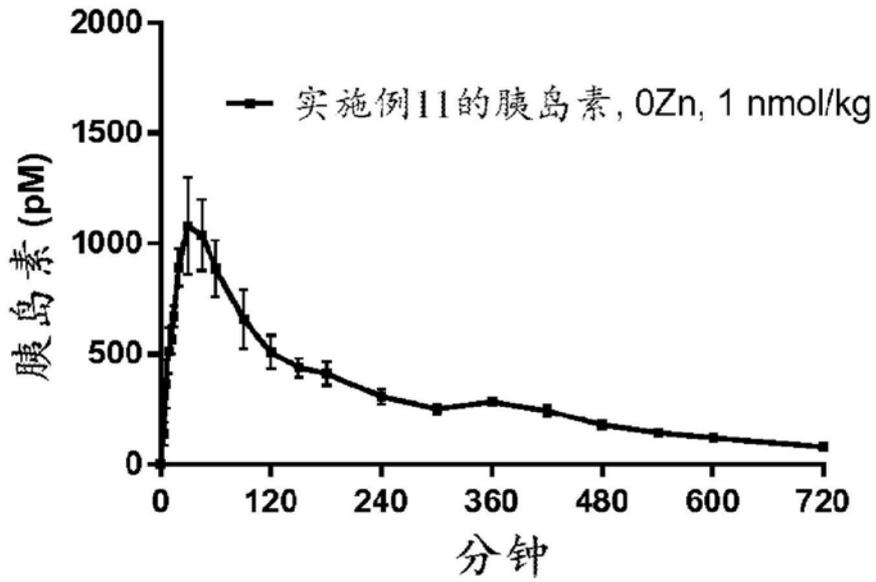


图6

血浆葡萄糖的变化(平均值SEM)

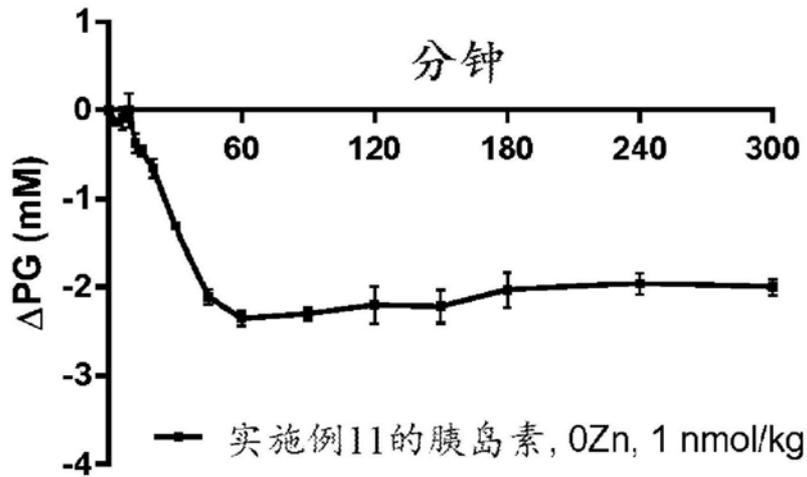


图7

PK平均值SEM

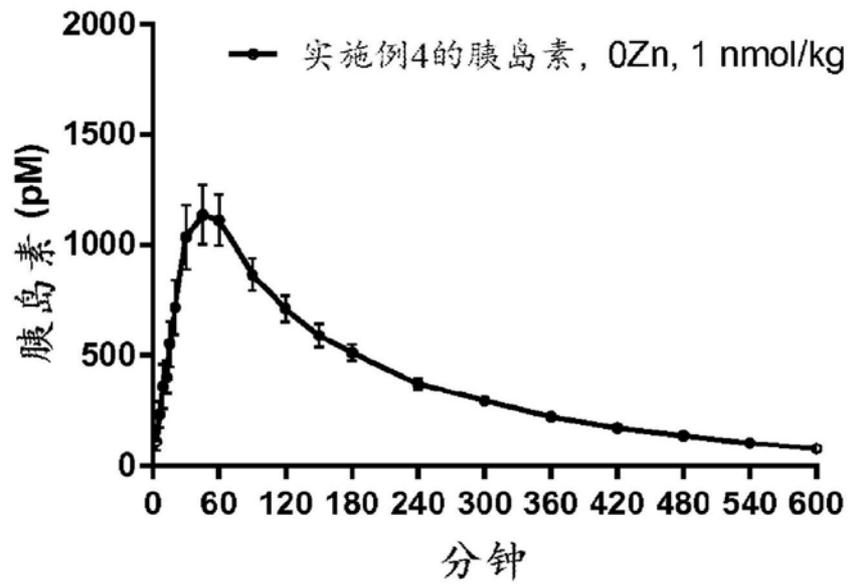


图8

血浆葡萄糖的变化

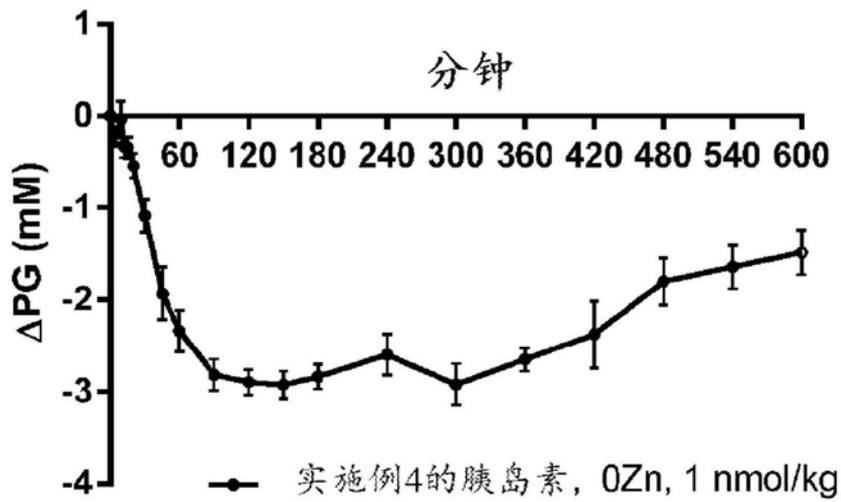


图9

PK平均值SEM

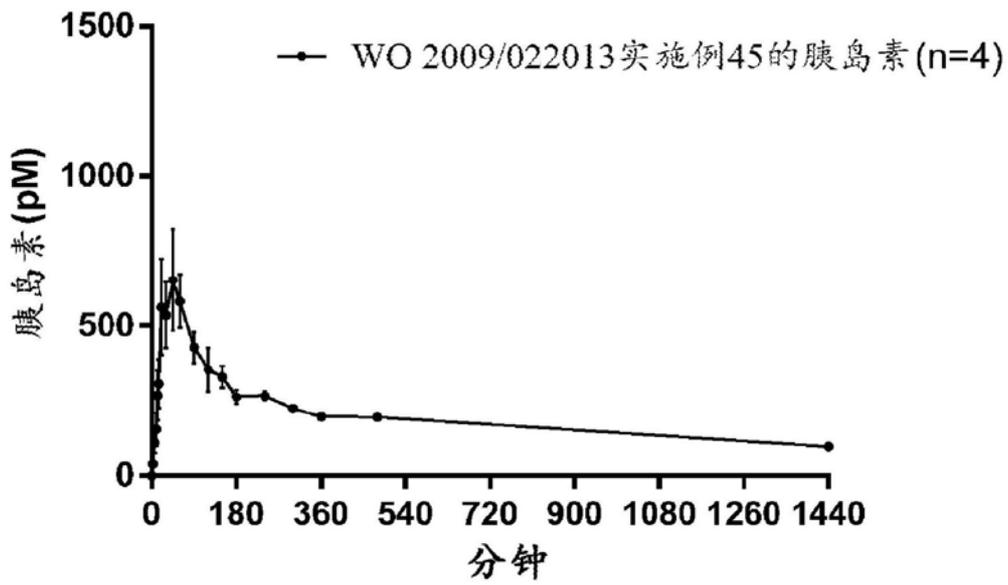


图10

血浆葡萄糖的变化(平均值SEM)

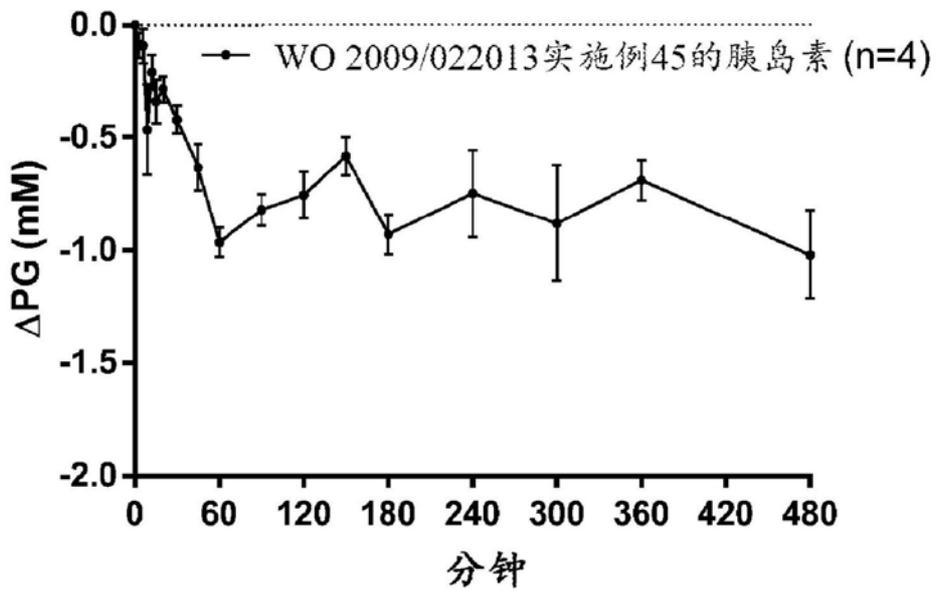


图11

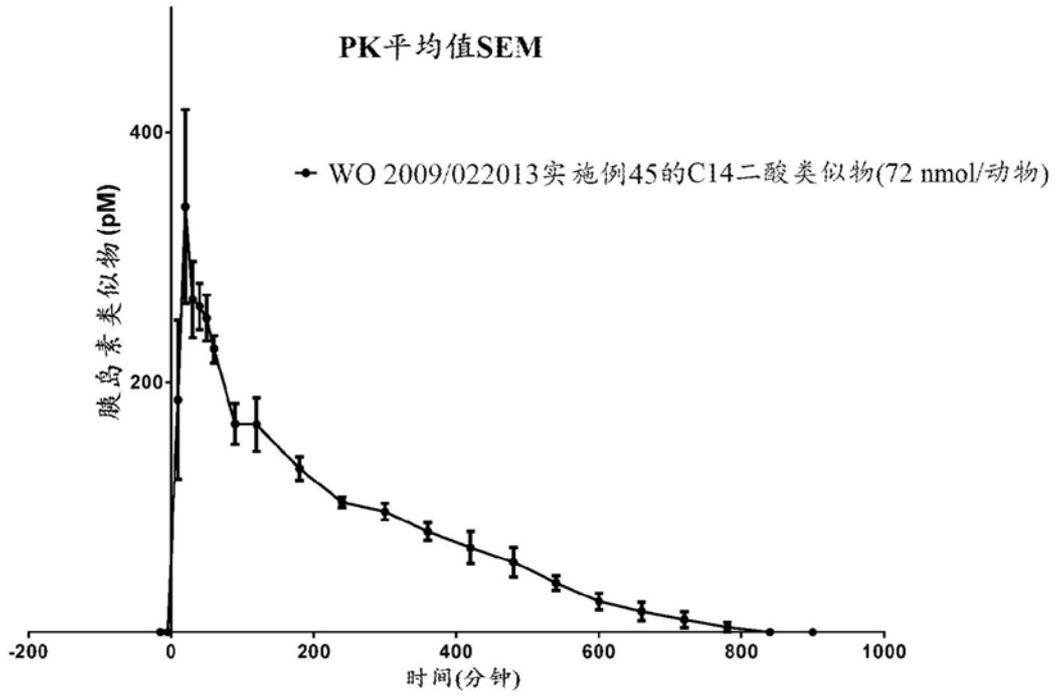


图12

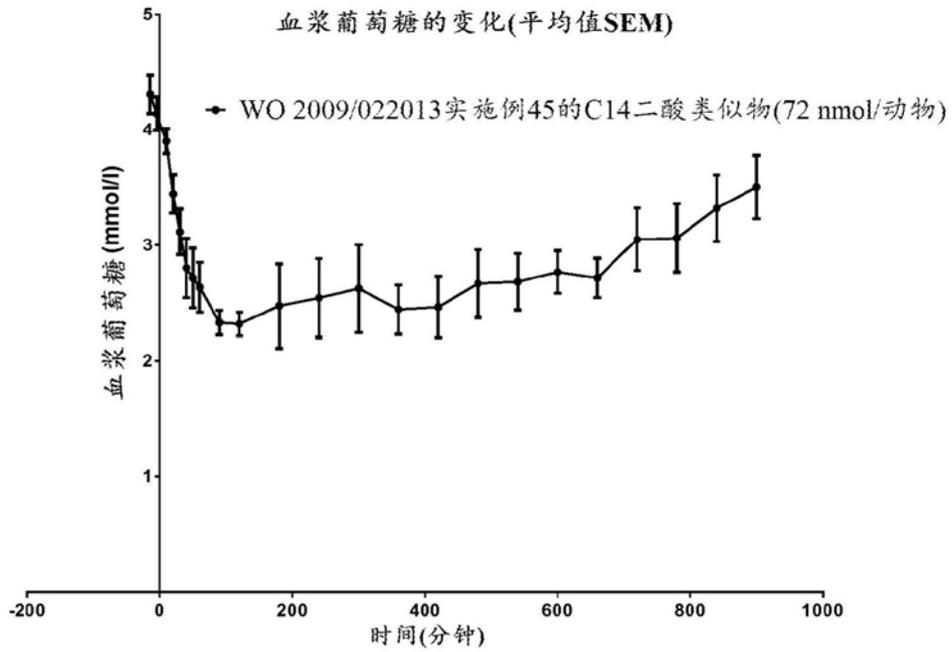


图13

(插图1A)

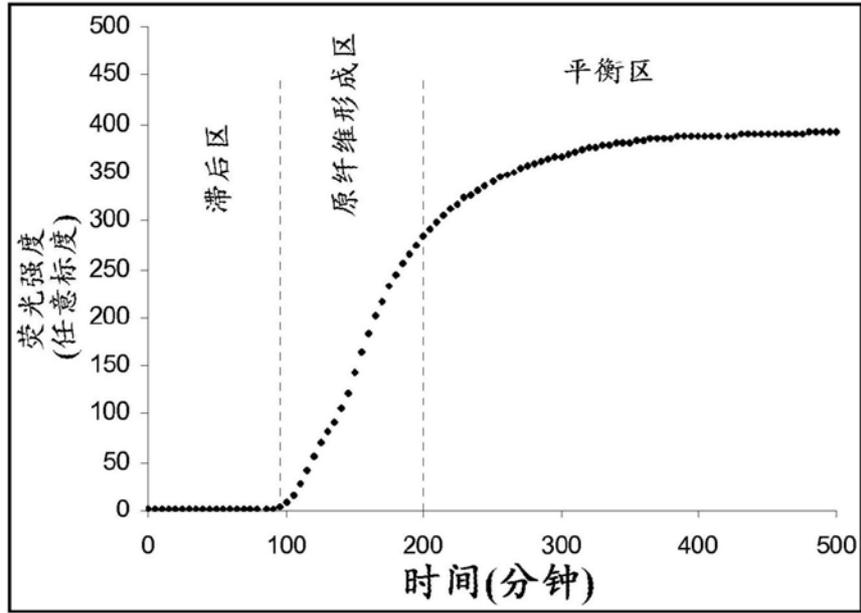


图14A

(插图1B)

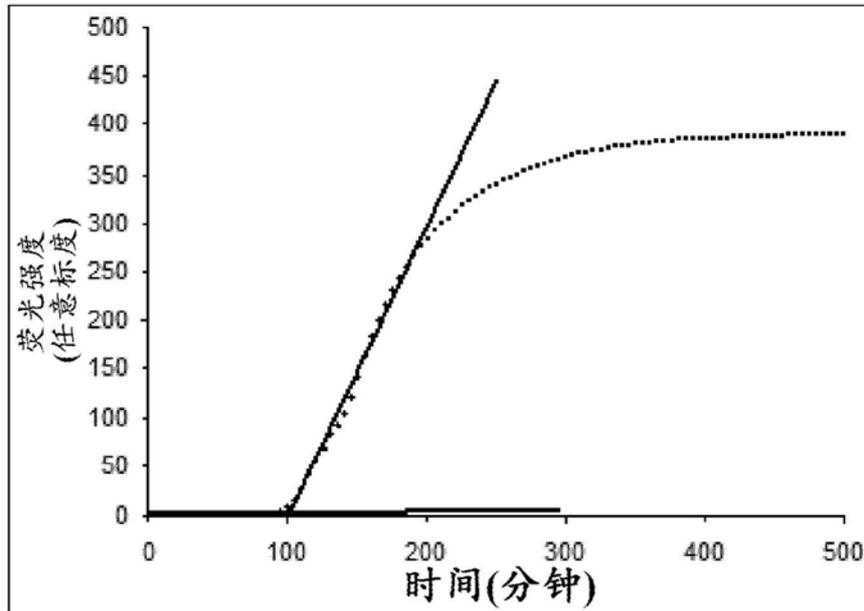


图14B

(插图1C)

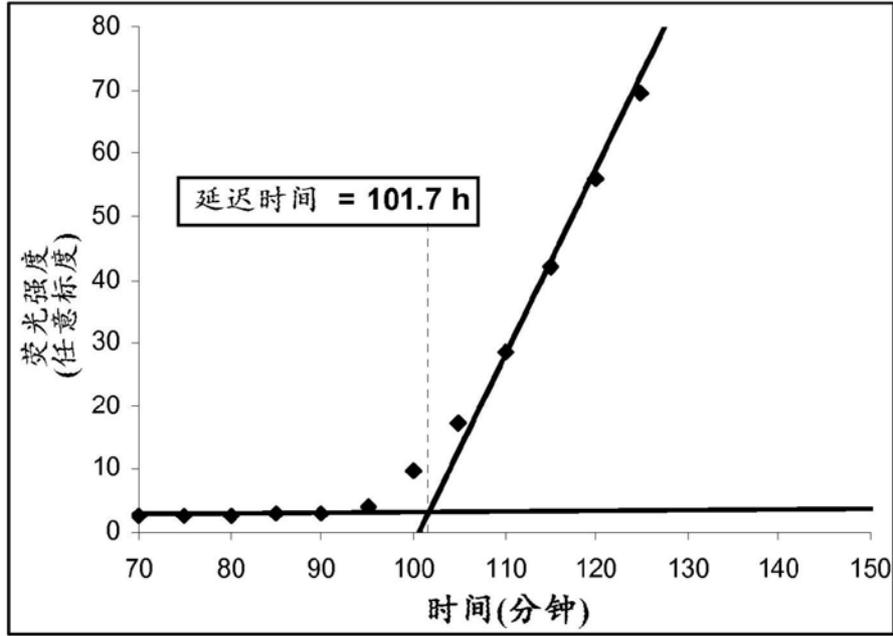


图14C

Zucker大鼠PK-实施例2的胰岛素

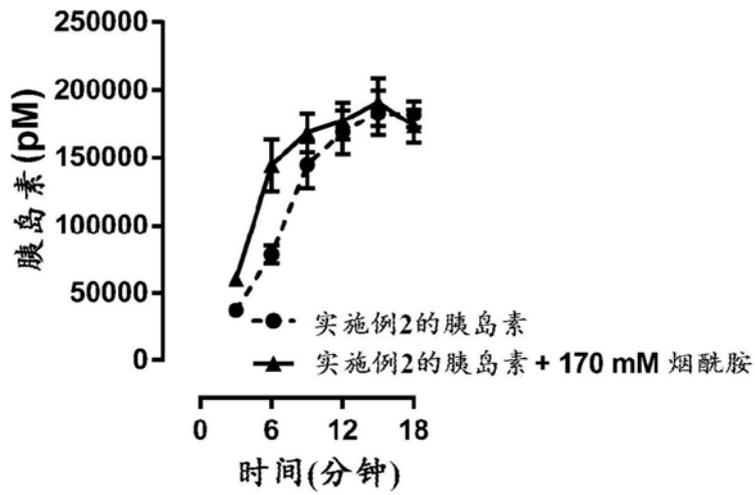


图15

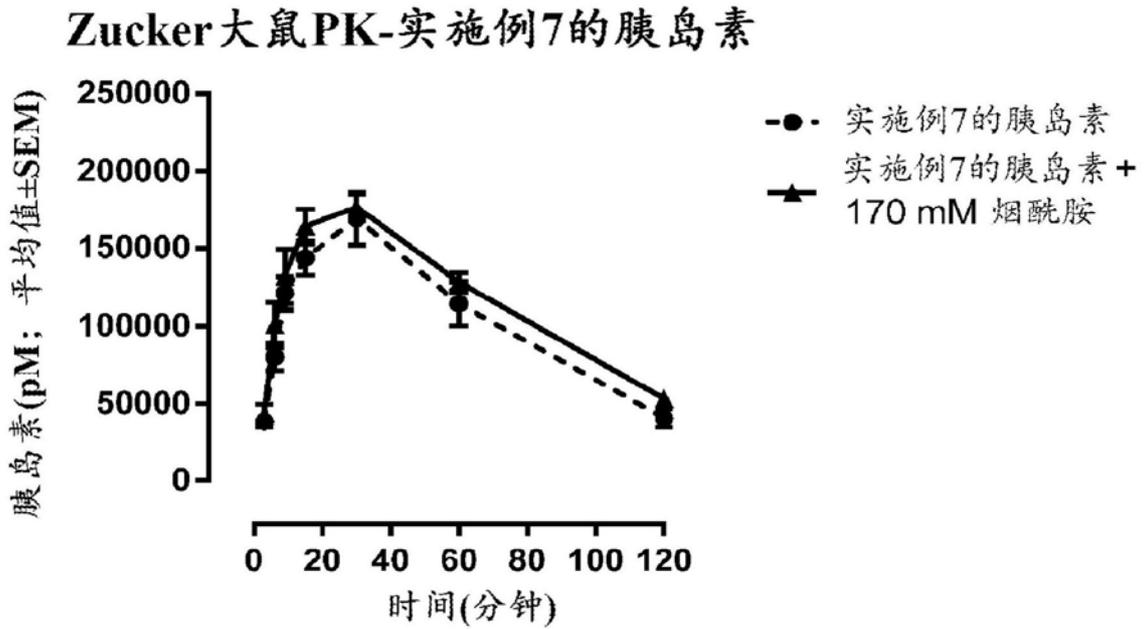


图16

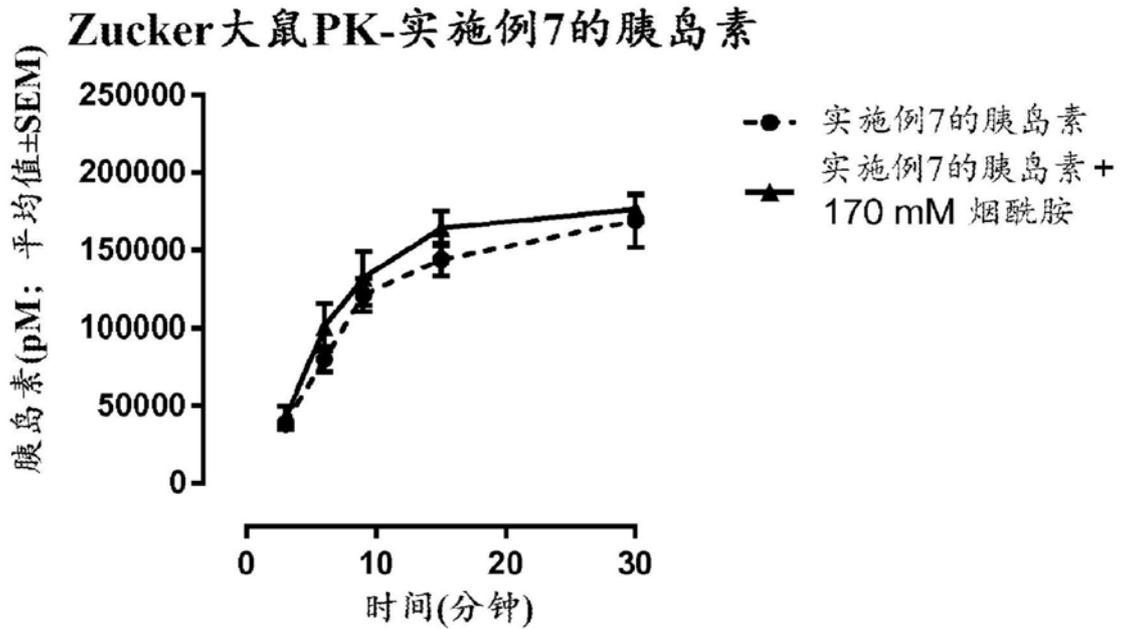


图17

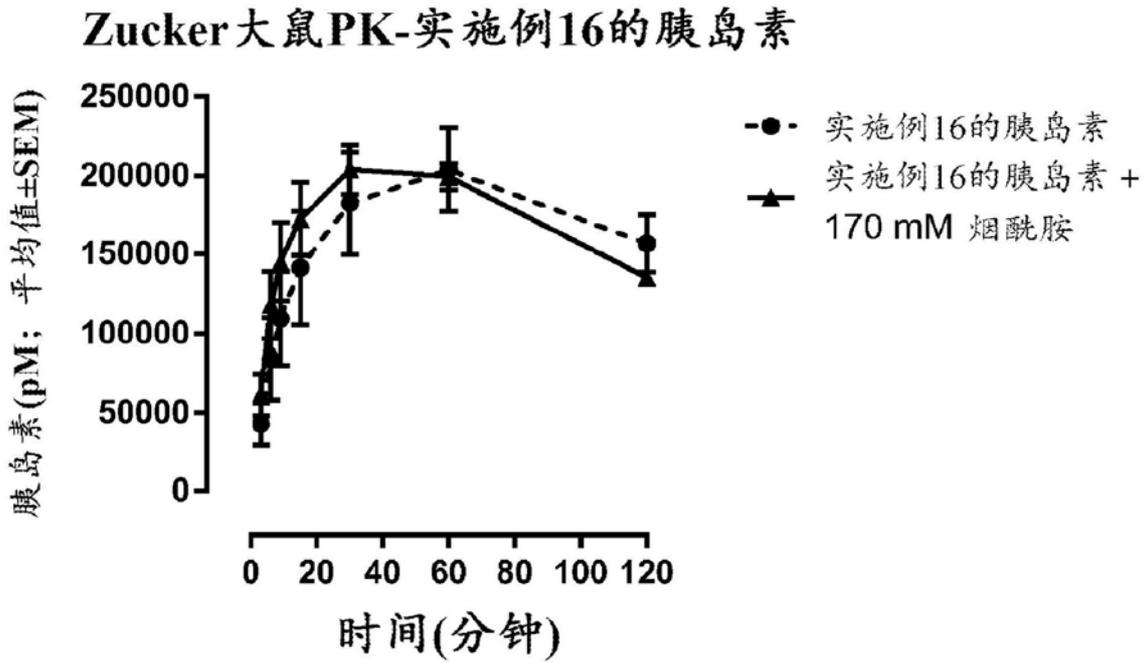


图18

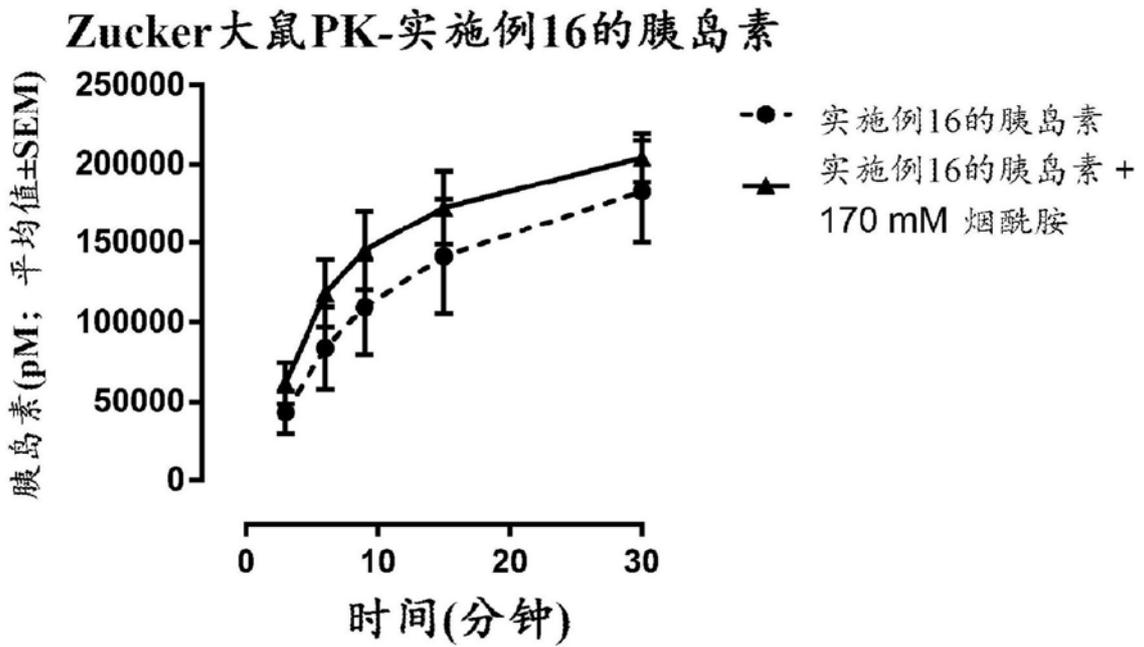


图19

猪PK-实施例4的胰岛素

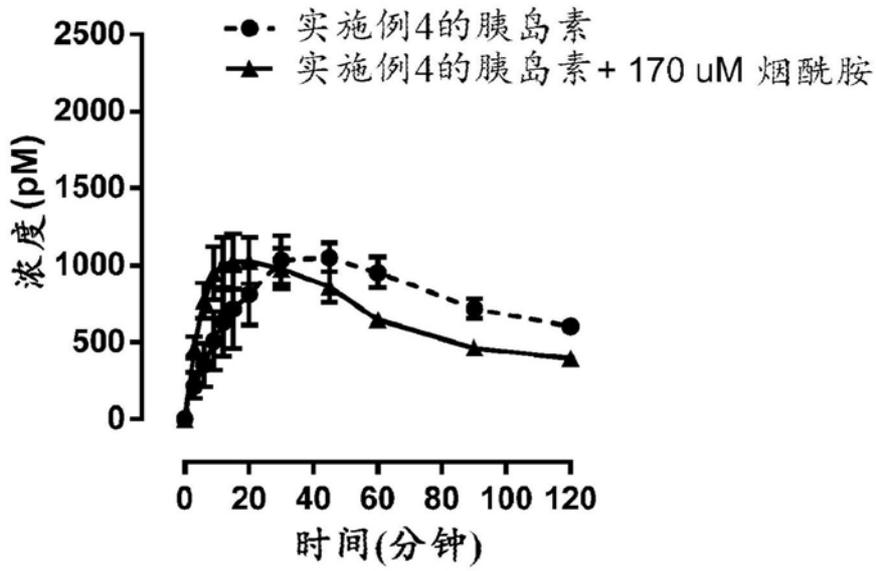


图20

猪PK-实施例2的胰岛素

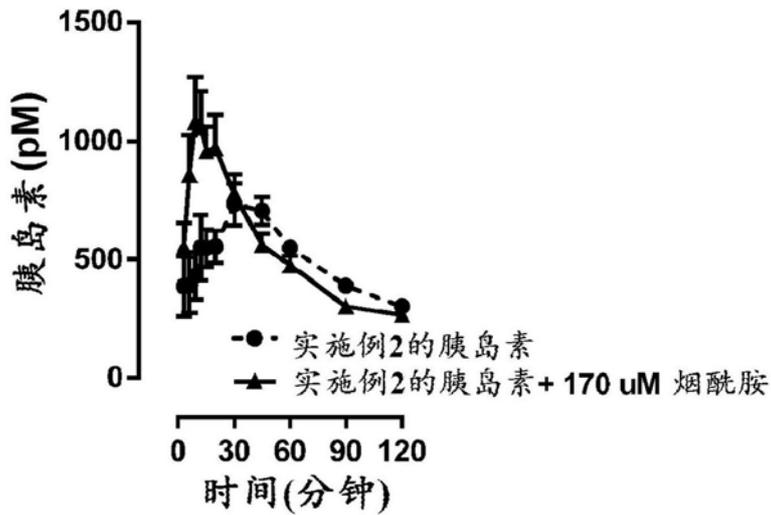


图21