

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/62

A61K 38/28



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98114950.2

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1195777C

[22] 申请日 1998.6.19 [21] 申请号 98114950.2

[30] 优先权

[32] 1997.6.20 [33] DE [31] 19726167.1

[71] 专利权人 阿文蒂斯药物德国有限公司

地址 联邦德国法兰克福

[72] 发明人 J·厄特尔 P·哈伯曼 K·盖森

G·塞普克

审查员 贾叔瑾

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 黄泽雄

权利要求书 9 页 说明书 31 页

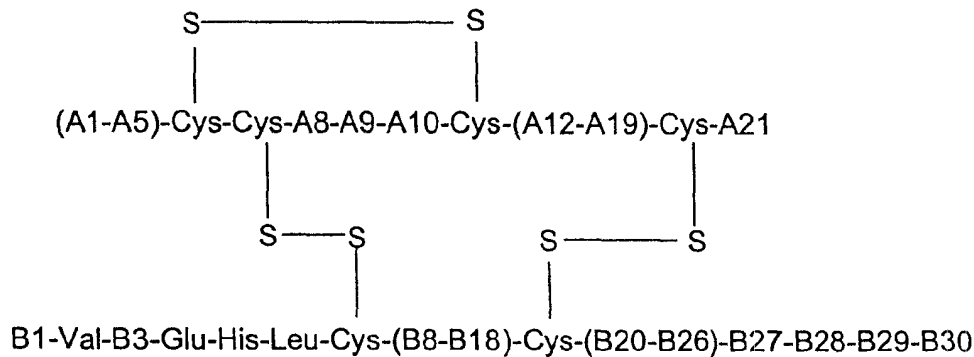
[54] 发明名称 新的速效胰岛素衍生物

[57] 摘要

本发明涉及胰岛素衍生物，与人类的胰岛素相比，它们具有快速作用效果，还涉及其制备方法和应用，尤其是在制备治疗糖尿病的药剂中的应用。特别地，本发明涉及胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链的 B3 位天冬酰胺(Asn)被一个天然产生的碱性氨基酸残基所交换，以及于 B-链的 B27、B28 或 B29 位的至少一个氨基酸残基被另外一种天然产生的中性或酸性氨基酸残基所交换，为此任选地天冬酰胺(Asn)在 A-链 A21 位可以被天冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)或丙氨酸(Ala)交换，且苯丙氨酸(Phe)在 B-链的 B1 位和 B-链 B30 位的氨基酸残基缺如。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 下式的胰岛素衍生物或其生理耐受盐,



其中

(A1-A5)为人类胰岛素 A-链中 A1 至 A5 位上的氨基酸残基,

(A12-A19)为人类胰岛素的 A-链中 A12 至 A19 位上的氨基酸残基,

A21 为天冬酰胺,

(B8-B18)为人类胰岛素 B-链中 B8 至 B18 位上的氨基酸残基,

(B20-B26)为人类胰岛素 B-链中 B20 至 B26 位上的氨基酸残基,

A8, A9, A10 为人类胰岛素或动物性胰岛素的 A-链中 A8、A9 和 A10 位上的氨基酸残基,

B30 为-OH 或人类胰岛素或动物性胰岛素的 B-链中 B30 位上的氨基酸残基,

B1 一个苯丙氨酸(Phe)残基或一个氢原子,

B3 一个天然产生的碱性氨基酸残基,

B27, B28 和 B29 为人类胰岛素或动物性胰岛素的 B-链中 **B27、B28 和 B29** 位上的氨基酸残基, 或者分别为另外一个天然产生的氨基酸残基, 其中于 B-链的 **B27、B28 和 B29** 位上的至少一个氨基酸残基被另外一个天然产生的氨基酸残基所交换, 后者选自中性或酸性氨基酸。

2. 按照权利要求 1 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中,

A8 为丙氨酸(Ala),

A9 为丝氨酸(Ser),

A10 为缬氨酸(Val)和

B30 为丙氨酸(Ala)。

3. 按照权利要求 2 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中,

A8 为苏氨酸(Thr),

A9 为丝氨酸(Ser), 和

A10 为异亮氨酸(Ile)。

4. 按照权利要求 3 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中,

B30 为丙氨酸(Ala)。

5. 按照权利要求 3 胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中,

B30 为苏氨酸(Thr)。

6. 按照权利要求 1-5 任一项的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中,

B-链的 **B1** 位上的氨基酸残基为苯丙氨酸(Phe)残基。

7. 按照权利要求 1 至 5 中任一项的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链的 B3 位上的氨基酸残基为组氨酸-(His)、赖氨酸-(Lys)或精氨酸(Arg)残基。

8. 按照权利要求 7 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链 B3 位上的氨基酸残基为组氨酸(His)残基。

9. 按照权利要求 7 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链 B3 位上的氨基酸残基为精氨酸(Arg)残基。

10. 按照权利要求 7 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链 B3 位上的氨基酸残基为赖氨酸(Lys)残基。

11. 按照权利要求 1 至 5 中任一项的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一个氨基酸残基是天然产生的氨基酸残基, 后者选自异亮氨酸(Ile)、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)。

12. 按照权利要求 1 至 5 中任一项的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一个氨基酸残基是天然产生的氨基酸残基, 后者选自酸性氨基酸。

13. 按照权利要求 12 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一个氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基。

14. 按照权利要求 12 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一个氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基。

15. 按照权利要求 1 至 5 中任一项的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其中 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一个氨基酸残基被天然产生的氨基酸

残基所取代，后者选自中性氨基酸。

16.按照权利要求 15 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一个氨基酸残基为异亮氨酸(Ile)残基。

17.按照权利要求 13 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链 B27 位的氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基。

18.按照权利要求 13 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链 B28 位的氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基。

19.按照权利要求 13 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链 B29 位的氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基。

20.按照权利要求 14 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链 B27 位的氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基。

21.按照权利要求 14 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链 B28 位的氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基。

22.按照权利要求 14 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链 B29 位的氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基。

23.按照权利要求 16 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链 B28 位的氨基酸残基为异亮氨酸(Ile)残基。

24.按照权利要求 22 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其中 B-链具有序列：

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
(SEQU ID NO 3).

25.按照权利要求 15 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐,其中 B-链 B27 位的氨基酸残基为异亮氨酸(Ile)残基。

26.按照权利要求 25 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐,其中 B-链具有序列:

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr

(SEQU ID NO 5).

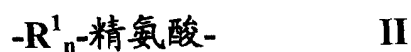
27.按照权利要求 23 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐,其中 B-链的序列为

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

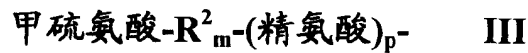
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

(SEQU ID NO 4).

28.制备按照权利要求 1 至 27 中任一项的胰岛素衍生物或其生理耐受盐的方法,其包括构造可复制的表达载体,于宿主细胞中表达,并用化学和/或酶的方法使胰岛素从其前体中释放,所述载体含有编码胰岛素衍生物前体的 DNA-序列,其中 A-链 A1 位的氨基酸残基与 B-链 B30 位的氨基酸残基通过式 II 的肽链联结,



其中， R^1_n 为有 n 个氨基酸残基的肽链，且 n 为 0 至 34 的整数，且 B-链于 B1 位由式 III 的肽链延长，



其中， R^2_m 为有 m 个氨基酸残基的肽链， m 为 0 至 40 的整数， p 为 0、1 或 2。

29.按照权利要求 28 的方法，其中宿主细胞为一种细菌。

30.按照权利要求 29 的方法，其中细菌为大肠杆菌。

31.按照权利要求 28 的方法，其中宿主细胞为酵母菌。

32.按照权利要求 31 的方法，其中酵母菌为啤酒糖酵母。

33.按照权利要求 28 至 32 之任一项的方法，用以制备按照权利要求 24 的一种胰岛素衍生物，其中该胰岛素的前体具有序列

```

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
| Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

```

(SEQ ID NO.: 6).

34.按照权利要求 28 至 32 之任一项的方法，用以制备按照权利要求 26 的一种胰岛素衍生物，其中该胰岛素的前体具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(SEQ ID NO.: 8).

35.按照权利要求 28 至 32 之任一项的方法，用以制备按照权利要求 27 的一种胰岛素衍生物，其中该胰岛素的前体具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(SEQ ID NO.: 7).

36.按照权利要求 33 所述的胰岛素衍生物的前体。

37.按照权利要求 34 所述的胰岛素衍生物的前体。

- 38.按照权利要求 35 所述的胰岛素衍生物的前体。
- 39.编码按照权利要求 36 的胰岛素衍生物前体的 DNA-序列。
- 40.编码按照权利要求 37 的胰岛素衍生物前体的 DNA-序列。
- 41.编码按照权利要求 38 的胰岛素衍生物前体的 DNA-序列。
- 42.含有按照权利要求 39 的 DNA-序列的表达载体。
- 43.含有按照权利要求 40 的 DNA-序列的表达载体。
- 44.含有按照权利要求 41 的 DNA-序列的表达载体。
- 45.用按照权利要求 42 至 44 任一项的表达载体转化的宿主细胞。
- 46.药物制剂,其含有至少一种按照权利要求 1 至 27 中任一项的胰岛素衍生物和/或其生理耐受盐。
- 47.按照权利要求 46 的药物制剂,其含有溶解的、非晶型的和/或结晶形式的胰岛素衍生物和/或其生理耐受盐。
- 48.按照权利要求 47 的药物制剂,其还含有长效佐剂。
- 49.按照权利要求 48 的药物制剂,其中长效佐剂为精蛋白硫酸盐,其中胰岛素衍生物和/或其生理耐受盐与精蛋白硫酸盐以共结晶的形式存在。

50. 具有胰岛素活性的可注射的溶液，其含有溶解形式的、按照权利要求 46 至 49 之任一项的药物制剂。

51. 按照权利要求 1 至 27 中任一项的胰岛素衍生物和/或其生理耐受盐的应用，用于制备速效的具有胰岛素活性的药物制剂。

新的速效胰岛素衍生物

本发明涉及胰岛素衍生物，它与人类胰岛素相比能够较迅速生效，涉及其制备方法以及其尤其是在药物制剂中的应用以治疗糖尿病。

全世界大约1亿2千万人患有糖尿病。其中约1千2百万人为I型-糖尿病患者，目前对该型患者的唯一治疗方法是应用胰岛素。按照医嘱患者应终身、一般是每天多次地注射胰岛素。虽然约1亿II型-糖尿病患者所伴有的胰岛素缺乏并非主要原因，但大多数病例仍采用胰岛素治疗，据认为这是最佳的或者唯一可能的治疗方式。随着病程的进展，许多病人患有所谓的糖尿病晚期并发症。主要与微小血管-和大血管的损伤有关，按照其方式和范围的不同，其结果可能是肾功能衰竭、失明、肢体损伤或心脏循环系统疾病的危险性增加。

发病的首要原因是长期慢性的血糖水平升高，因为即使在胰岛素治疗的悉心调节下，也不能达到与生理性调节相当的正常血糖水平(Ward, J. D. (1989年), 大不列颠医学公报 45期, 111-126页; Drury, P. L.等(1989年), 大不列颠医学公报 45期, 127-147页; Kohner, E. M. (1989年), 大不列颠医学公报 45期, 148-173页)。

对正常人而言，胰岛素的分泌与血液中葡萄糖的浓度密切相关。升高的葡萄糖水平，如餐后所出现的情况，通过增加释放胰岛素而迅速得以代偿。在空腹状态下，血浆胰岛素水平降低至基础值，它足以保障胰岛素敏感的器官和组织得到持续的葡萄糖供应。现今所谓强化胰岛素治疗的最佳目的在于尽量减小血糖浓度的波动，特别是向上偏离(Bolli, G. B. (1989年), 糖尿病研究临床实践, 6期, 25-32页)。这样能够明显减少糖尿病晚期损害的出现和发展(糖尿病控制和并发症试验研究组(1993年), 新英国医学杂志, 329期, 977-986页)。

由胰岛素分泌的生理学可以推断：为了改进的强化胰岛素治疗，需要应用二种不同药物动力学的胰岛素制剂作皮下用药。为了代偿餐后血糖升高，必须能有胰岛素迅速流入血循环，并且允许它作用仅仅几个小时。为

了保障基础供应，尤其是夜晚，应该有一种制剂既能长时间地起作用、却又没有明显的高峰，而只是非常缓慢地流入血循环。

以人类胰岛素和动物性胰岛素为基础的制剂对于满足强化胰岛素治疗的要求有其局限性。速效胰岛素类(旧-胰岛素类)在皮下用药后进入血液和到达作用部位的时间太慢、并且作用持续时间太长。其结果是，餐后血糖水平太高和餐后几个小时血糖波动太大(Kang, S.(1991 年), 糖尿病调养(Diabetes Care)14 期, 142-148 页; Home, P. J.等(1989 年), 大不列颠医学公报 45 期, 92-110 页; Bolli, G. B. (1989 年), 糖尿病研究临床实践, 6 期, 3-16 页)。可应用的基础胰岛素，尤其是 NPH-胰岛素，其作用时间太短并且高峰太强。

除可以通过盖伦氏原则影响作用方式以外，现今另一种选择是借助于基因技术研制出胰岛素衍生物，它们仅仅通过其结构上的特性即可获得某些特性如作用生效和持续时间。因此，通过应用合适的胰岛素衍生物，可以达到明显改善的、非常接近于自然状态的血糖调节。

EP 0 214 826、EP 0 375 437 和 EP 0 678 522 中说明了速效胰岛素衍生物。EP 0 214 826 涉及 B27 和 B28 的取代作用，但无 B3 的取代作用。EP 0 678 522 说明了一些胰岛素衍生物，其 B29 位为各种氨基酸，优选为脯氨酸，但不为谷氨酸。EP 0 375 437 叙述了 B28 位上为赖氨酸或精氨酸的胰岛素衍生物，它们还能任意在 B3 位和/或 A21 位改性。

EP 0 419 504 中公开了胰岛素衍生物，其天冬酰胺在 B3 位和至少另外一种氨基酸在 A5、A15、A18 或 A21 位被改变，由此使它们避免了化学改性。于 B27、B28 或 B29 位组合改性未见说明。尚无依据说明这些化合物具有药物动力学改变和因此具有较快的药物作用。

WO 92/00321 说明了胰岛素衍生物，其至少一种氨基酸在 B1-B6 位被赖氨酸或精氨酸所取代。按照 WO 92/00321，这些胰岛素类具有较长时间的作用。但未予以说明有 B27、28、29 位的组合改性。

本发明的目的是，制备胰岛素衍生物，它们在用药后，尤其是在皮下用药后，与人类胰岛素相比它具有速效作用。

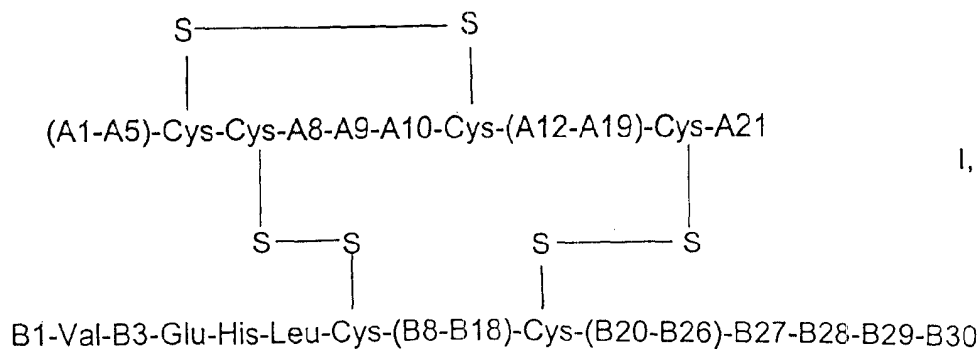
胰岛素衍生物为天然来源的胰岛素、即人类胰岛素(见 SEQ ID NO 1=人类胰岛素的 A-链；见 SEQ ID NO 2=人类胰岛素的 B-链，序列表)或动物

性胰岛素的衍生物，通过至少一种天然来源的氨基酸残基被取代，和/或通过至少一种氨基酸残基和/或有机残基被加成，使它们与相应的、否则相同的天然来源的胰岛素相区别。

此外本发明的另外目的还有，提供具有上述特性的胰岛素衍生物的制备方法、相应的中间产物以及其前体。

达到本目的的途径是通过胰岛素衍生物或其生理耐受盐、其中天冬酰胺(Asn)的 B-链 B3 位被一个天然产生的碱性氨基酸所交换，以及至少一个氨基酸残基于 B-链的 B27、B28 或 B29 位被另外一种天然产生的氨基酸残基所交换，其中天冬酰胺(Asn)的 A-链 A21 位可有选择地被天冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)或丙氨酸(Ala)所交换，以及苯丙氨酸(Phe)的 B-链的 B1 位和 B-链 B30 位的氨基酸残基缺如。

优选的胰岛素衍生物或者其生理耐受盐可以用式 I 表征：



其中

(A1-A5)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 1)或动物性胰岛素的 A-链 A1 至 A5 位上的氨基酸残基，

(A12-A19)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 1)或动物性胰岛素的 A-链 A12 至 A19 位上的氨基酸残基，

(B8-B18)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 2)或动物性胰岛素的 B-链 B8 至 B18 位上的氨基酸残基，

(B20-B26)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 2)或动物性胰岛素的 B-链
B20 至 B26 位上的氨基酸残基,

A8, A9, A10 为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 1)或动物性胰岛素的 A-链
A8、A9 和 A10 位上的氨基酸残基,

A21 为 天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或丙氨酸,

B30 为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 2)或动物性胰岛素的 B-链
B30 位上的-OH 或氨基酸残基,

B1 一个苯丙氨酸(Phe)或一个氢原子,

B3 一个天然产生的碱性氨基酸残基,

B27, B28 和 B29 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 2)或动物性胰岛素的 B-链
B27、B28 和 B29 位上的氨基酸残基, 或者分别为另外一个天然产生的氨基酸残基, 其中至少一个氨基酸残基于 B-链 B27、B28 和 B29 位上被另外一个天然产生的氨基酸残基所交换。

在 20 种天然产生的可遗传学编码的氨基酸中, 甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和脯氨酸(Pro)被称为中性氨基酸, 精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)和组氨酸(His)被称为碱性氨基酸, 以及天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)被称为酸性氨基酸。

按照本发明, 优选的胰岛素衍生物或其生理耐受盐为牛胰岛素、猪胰岛素或人类胰岛素的衍生物, 也即一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其特征为,

A8 为 丙氨酸(Ala),
A9 为 丝氨酸(Ser),
A10 为 缬氨酸(Val)和
B30 为 丙氨酸(Ala) (牛胰岛素的 A8 至 A10 和 B30 的氨基酸残基),

A8 为 苏氨酸(Thr),
A9 为 丝氨酸(Ser)和
A10 为 异亮氨酸(Ile) (人类或猪胰岛素的 A8 至 A10 的氨基酸残基),
其中

B30 为 丙氨酸(Ala) (猪胰岛素的 B30 氨基酸残基)或
B30 为 苏氨酸(Thr) (人类胰岛素的 B30 氨基酸残基, 见 SEQ ID NO 2)。

特别优选的是一种式 I 胰岛素衍生物或者其生理耐受盐, 它带有人类胰岛素的 A8 至 A10 和 B30 位的氨基酸残基, 其特征还在于,

(A1-A5)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 1)的 A-链
A1 至 A5 位上的氨基酸残基,
(A12-A19)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 1)的 A-链
A12 至 A19 位上的氨基酸残基,
(B8-B18)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 2)的 B-链
B8 至 B18 位上的氨基酸残基和
(B20-B26)为 人类胰岛素(见 SEQ ID NO 2)的 B-链
B20 至 B26 位上的氨基酸残基。

本发明的另一些优选实施形式是一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其特征为, B-链的 B1 位的氨基酸残基为苯丙氨酸(Phe)残基, 或者

一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐, 其特征为, B-链的 B3 位的

氨基酸残基为组氨酸-(His)、赖氨酸-(Lys)或精氨酸(Arg)残基。

本发明的另一些优选实施形式是一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一种氨基酸残基被天然产生的氨基酸残基所替代，后者选自于中性或酸性氨基酸组，

一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一种氨基酸残基为一个天然产生的氨基酸残基，后者选自酸性异亮氨酸(Ile)、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)，优选其特征为，于 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一种氨基酸残基被天然产生的氨基酸残基所替代，后者选自于中性氨基酸组，或者特别优选地，于 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一种氨基酸残基为异亮氨酸(Ile)残基，或者

一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一种氨基酸残基为一种天然产生的氨基酸残基，后者选自于酸性氨基酸组，优选其特征为，于 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一种氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基，优选其特征为，于 B-链的 B27 或 B28 位的氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基，或者其特征为，于 B-链的 B27、B28 和 B29 位的至少一种氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基。

本发明另一个优选实施形式是一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B29 位的氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基。

另一些优选的实施形式为：一种式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B27 位的氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基，

式 I 的一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B28 位的氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基，或者

式 I 的一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的

B29 位的氨基酸残基为谷氨酸(Glu)残基。

特别优选的是一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征为， B-链的顺序为

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr

(SEQU ID NO 3)，例如赖氨酸(B3),谷氨酸(B29)-人类胰岛素，或者

一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B27 位的氨基酸残基为异亮氨酸(Ile)残基，优选一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征为， B-链的顺序为

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr

(SEQU ID NO 5)，例如赖氨酸(B3),异亮氨酸(B27)-人类胰岛素，或者

式 I 的一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征为，于 B-链的 B28 位的氨基酸残基为异亮氨酸(Ile)残基，优选一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征为， B-链的顺序为

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

(SEQU ID NO 4)，例如赖氨酸(B3),异亮氨酸(B28)-人类胰岛素。

特别优选的还有式 I 的一种胰岛素衍生物或一种其生理耐受盐，其特征

为，B-链 B28 位的氨基酸残基为异亮氨酸(Ile)残基和 A21 位氨基酸残基为天冬氨酸(Asp)残基，优选其特征为，B-链的顺序为

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Tyr Gln Leu Glu
Asn Tyr Cys Asp (SEQ ID NO.: 9)

和 B-链的顺序为

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr (SEQ ID NO.: 10)

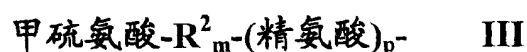
(赖氨酸(B3),异亮氨酸(B28),天冬氨酸(A21)-人类胰岛素)。

式 I 胰岛素衍生物优选基因技术制备。

此外还有一种制备式 I 的胰岛素衍生物或其生理耐受盐的方法可以达到本文开头所提出的目的，包括构造一种可复制的表达载体 (Expressionsvehikel)，它含有 DNA-序列，为胰岛素衍生物的前体编码，其中 A-链 A1 位的氨基酸残基与 B-链 B30 位的氨基酸残基通过式 II 的肽链联接，



其中， R_n^1 为一个带有 n 个氨基酸残基的肽链， n 为一个 0 至 34 的整数，B-链于 B1 位用式 III 的肽链延长，



其中， R_m^2 为一个带有 m 个氨基酸残基的肽链， m 为一个 0 至 40 的整数，优选为 0 至 9， p 为 0、1 或 2，其中 $p=0$ 时优选肽链 R_m^2 以赖氨酸结尾，

还包括于宿主细胞中的表达，以及采用化学和/或酶学的方法由其前体释放胰岛素衍生物。

优选的是这样的方法，其特征为，宿主细胞为一种细菌，尤其优选的特征是，细菌为嗜红大肠杆菌(E.coli)。

优选的是这样的方法，其特征为，宿主细胞为酵母菌，尤其优选的特征是，酵母菌为药用酵母。

为了制备具有氨基酸序列 SEQ ID NO.: 9 (A-链)和 SEQ ID NO.: 10 (B-链)的胰岛素衍生物，该胰岛素衍生物的前体优选具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys
Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asp (SEQ ID
NO.: 11),

一种赖氨酸 (B3),异亮氨酸 (B28),天冬氨酸 (A21)-胰岛素前体。

为了制备具有氨基酸序列 SEQ ID NO.3 的胰岛素衍生物，该胰岛素衍生物的前体优选具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
Ser Leu Gln Lys Arg

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(Lys(B3),Glu(B29)–胰岛素前体)

(SEQ ID NO.: 6)。

为了制备具有氨基酸序列 SEQ ID NO.5 的胰岛素衍生物,该胰岛素衍生物的前体优选具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly

Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly

Ser Leu Gln Lys Arg

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(Lys(B3),Ile(B27)–胰岛素前体)

(SEQ ID NO.: 8)。

为了制备具有氨基酸序列 SEQ ID NO. 4 的胰岛素衍生物,该胰岛素衍生物的前体优选具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly

Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly

Ser Leu Gln Lys Arg

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
(Lys(B3), Ile(B28)-胰岛素前体)

(SEQ ID NO.: 7).

因此本发明还涉及所列举的优选胰岛素衍生生物的前体，即具有序列号 SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7 和 SEQ ID NO. 8 的肽类，涉及为所列举的前体编码的 DNA-序列，涉及含有这些 DNA-序列的表达载体，以及随这些表达载体转化的宿主细胞。

式 I 胰岛素衍生生物的制备主要按照标准方法、采用基因技术学原位直接诱变引起突变(site-directed mutagenesis)的方法制备。

为此，构造一个为所希望的式 I 胰岛素衍生生物编码的基因结构，并且使它在宿主细胞中—优选在细菌如曙红大肠杆菌或在酵母菌中、尤其优选在药用酵母中—表达，以及—如果基因结构为融合蛋白编码—由融合蛋白释放该式 I 胰岛素衍生生物；EP-A-0 211 299、EP-A-0 277 938、EP-A-0 299 998、EP-A-0 286 956 和 DE-专利申请 P38 21 159 中说明了类似的方法。

融合蛋白成份的分裂也可以在细胞分裂后采用卤化氰(见 EP-A-0 180 920)按照化学方式进行。

在采用按照 US 5, 358,857 借助融合蛋白成份(前序列)的胰岛素前体进行制备时，在较迟的阶段同时进行融合蛋白成份的分裂和 C-肽的分裂。

按照例如 R. C. Marshall 和 A. S. Inglis 于“实用蛋白化学—手册”中(出版商：A. Darbre)1986 年，49-53 页所说明的方法，对胰岛素前体进行氧化性亚硫酸化(oxidativen Sulfitolyse)，接着例如按照 G. H. Dixon 和 A. C. Wardlow 于 自然(1960 年)，721-724 页中所说明的方法，在存在硫醇的情

况下，通过形成正确的双硫桥使之回复原状。

也可以对胰岛素衍生物直接进行折叠(EP-A-0 600 372; EP-A-0 668 292)。

应用典型的分裂方法去除 C-肽，例如按照 Kemmler 等 J.B.C.(1971 年), 6786-6791 页的方法，以及按照现有技术如色谱层析，例如见 EP-A-0 305 760 和结晶方法，将式 I 胰岛素衍生物提纯。

如果式 II 中 n 为 0，则典型的分裂作用可使 A 和 B-链之间的肽键分离。

在这一方法中，B-链在 C-末端以精氨酸或二个精氨酸残基终止。可以通过羧肽酶 B 的酶作用将它们去除。

本发明胰岛素衍生物具有充分的生物学活性。这一点可以通过给家兔静脉给药和由此所引起的血糖降低结果来显示(实施例 5 和 6)。

皮下用药后较快的药效可以用在空腹狗身上所进行的血糖正常的夹板技术来显示(实施例 7)。用药量为 0.3 IE/kg。对照药剂为人类胰岛素。应用夹板技术的过程中，注射胰岛素后，在较短的时间间隔里测量血糖值，所注射的胰岛素剂量应该正好能代偿血糖降低。这种方法的优点是，在动物身上不会出现对抗性调节，正如在应用胰岛素后血糖明显降低所出现的情况那样。所注射葡萄糖的剂量和时间分布曲线能表明胰岛素的作用特征。赖氨酸(B3),甘氨酸(B29)-(SEQ ID NO 3)和赖氨酸(B3),异亮氨酸(B28)-(SEQ ID NO 4)胰岛素的作用生效比人类胰岛素明显加快。用人类胰岛素在 100 分钟后达到最大作用(葡萄糖输注率)，相比之下，用赖氨酸(B3)、甘氨酸(B29) -胰岛素(SEQ ID NO 3)在 80 分钟后达到最大作用，而用赖氨酸(B3)、异亮氨酸(B28) -胰岛素(SEQ ID NO 4)在 60 分钟后即已达到最大作用。因此如果在餐前的短暂时间内注射这些类似物，比人类胰岛素应能更好地代偿餐后血糖升高。

所说明的胰岛素衍生物既适合于治疗 I 型糖尿病,又适合于治疗 II 型糖尿病,优选合并应用基础胰岛素。

因此,本发明还涉及胰岛素衍生物和/或其生理耐受盐的应用,用以制备具有胰岛素活性的快速生效的药物制剂。

作为生理学上毫无疑虑的和能够与胰岛素衍生物耐受的载体物质,合适的有一种无菌的水溶性溶剂,以通常的方式、例如通过甘油、食盐、葡萄糖使之与血液等渗,此外它还含有常用的贮藏剂,例如酚、间-甲酚或对-羟基苯甲酸酯。载体物质也可以含有缓冲物质,例如醋酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠。应用稀释酸(典型代表为 HCl)和碱液(典型代表为 NaOH)以调节 pH。此外制剂还可以含有锌离子。

胰岛素-衍生物还可以以其生理耐受盐的形式、作为碱盐或铵盐、应用于药物制剂中。一种或多种式 I 胰岛素-衍生物的任一成份、或者一种式 I 胰岛素-衍生物可以在与这类其它胰岛素-衍生物的混合物中相互独立地分别以溶解的、非晶型的和/或晶状的形式存在。

有时较为合适的是,向本发明的制剂中添加合适剂量的合适稳定剂,以防止在温度-机械的负荷下与各种材料接触时的蛋白沉淀。例如由 EP-A-18609、DE-A 32 40 177 或由 WO-83/00288 已知这样一些稳定剂。

本发明此外还涉及一种药物制剂,其特征为,它含有至少一种式 I 胰岛素衍生物和/或一种其生理耐受盐,优选以溶解的、非晶型的和/或晶状的形式。

本发明的胰岛素衍生物具有作用生效快的特征。在实际胰岛素治疗中,可能比较常见的是,将速效胰岛素与含有长效佐剂(例如 NPH-胰岛素)的制剂相混合。按照组成成份的不同而由此产生不同的制剂,倘若单个成份在

混合物中稳定并且不会相互影响，则其作用方式相当于叠加的单个作用方式。当胰岛素衍生物与人类 NPH-胰岛素混合时应考虑到，尤其是通过长期贮存，在溶解的衍生物和晶状的 NPH-胰岛素之间会出现交换。长效胰岛素和溶解的速效胰岛素的药物动力学都会因此以事先未能预见的方式发生改变。为了避免之，行之有效的方法是，应用长效佐剂如 NPH-胰岛素制备速效衍生物。这种长效形式的胰岛素衍生物能够与溶解的速效形式任意地混合，而一种或另外一种形式的组成不至于随着贮存时间的长短由于交换而发生改变。

虽然本发明的重点涉及速效胰岛素衍生物，但也包括了制备能够适于以长效形式混合的类似衍生物，在此，优选的长效佐剂为精蛋白硫酸盐，且胰岛素衍生物和/或其生理耐受盐与精蛋白硫酸盐以共晶状体的形式存在。

本发明此外还涉及一种可注射的药液，它含有以上说明的溶解形式的药物制剂。

实施例

实施例 1： 赖氨酸(B3)-前胰岛素的构造，作为相应于实施例 2-4 的、与本发明有关的质体的起始物

US 5,358,857 中说明了媒介物 pINT 90d 和 PCR 引物 Tir 以及 Insu 11。这些成份作为起始物用于质体 pINT 125d 的构造，后者可以为所希望的赖氨酸(B3)-前胰岛素编码。

此外还合成了其序列为

5'TTT GTG AAG CAG CAC CTG 3'

的引物 Insu 35，以及序列为

5' CAG GTG CTG CTT CAC AAA 3'

的引物 Insu 36。

用引物 Tir 和 Insu 36 进行 PCR-反应，用引物 Insu 11 和 Insu 35 进行第二个反应。pINT 90d DNA 作为其模板剂。

二个 PCR 反应的产物部分互补，因此如果它们在第三个 PCR 反应中与引物 Tir 和 Insu 11 整合，则可以产生一个片断，它能够为在 B-链的位置 3 含有的赖氨酸前胰岛素变异体编码。为了提纯将这个 PCR-片断，置于乙醇中沉淀、干燥和接着按照生产厂家的说明用限制酶 Nco 1 和 Sal 1 消化。将反应混合物电泳分离和将所希望的 Nco 1/Sal 1-片断分离出来。

在所引用的专利申请书中说明了质体 pINT 91d，它是一种微小-前胰岛素编码。如果用 Nco 1 和 Sal 1 将为微小-前胰岛素编码的序列分裂出来并分离残余质体-DNA，则可以将这个残余质体-DNA 与所叙述的 Nco 1/Sal 1-片断在 T 4-连接酶反应中反应，生成质体 pINT 125d。将它按照 E.coli K12 进行转化、繁殖和再分离。通过 DNA-序列-和限制分析进行质体结构物的核突作用后，用 pINT 125d-DNA 作为模板剂-DNA，使在这些前胰岛素变异体中发生其它的突变。

实施例 2： 赖氨酸(B3)谷氨酸(B29)-前胰岛素的构造

为了制备突变蛋白，将序列为

5' TTC TAC CAC CCC GAG ACC CGC GGC ATC G - 3'

的引物 329a 和序列为

5' GCC GCG GGT CTC GGG TGT GTA GAA GAA GC 3'

的引物 329b 合成。

应用 pINT 125d 的和 pINT 91d 的 DNA 作为模板剂。

将引物 329a 与引物 Insu 11 在 pINT91d 模板剂上、且将引物 329b 与 Tir(参见以上实施例)在 pINT125d 模板剂上在一种 PCR-反应中转化。因为二种 PCR-产物部分互补, 所以它们可以在一个直接的 PCR-反应中整合且重新与引物 Tir 和 Insu 11 反应。所形成的 DNA-片断可以为所希望的突变蛋白编码。该片断被限制酶 Nco 1 和 Sal 1 双倍消化, 将所形成的 Nco 1/Sal 1-片断通过 T 4-连接酶反应插入 pINT 91d 残余质体-DNA 中。

所形成的质体 pINT 329 通过限制-和 DNA-序列分析在 E.coli K12 中扩大后根据所希望的结构发生核突。

由质体所编码的前胰岛素衍生物的特征是, 它有二个氨基酸交换和一个由氨基酸精氨酸所形成的 C-连结链。

实施例 3: 赖氨酸(B3)异亮氨酸(B27)-前胰岛素的构造

按照前面的实施例, 用质体对进行构造。

KB3 JB 27A

5' TTC TAC ATC CCC AAG ACC CGC CG 3'

和 Insu 11

以及

K B3 J 27B

5' CTT GGG GAT GTA GAA GAA GCC TCG 3'

和 Tir。

质体 pINT125d 的 DNA 用作为在二个 PCR-反应中的模板剂。二个反应的 PCR-产物，正如实施例 1 中所说明的，在第三个反应中整合，将产物按照该实施例繁殖。

产生质体 pINT332。

实施例 4： 赖氨酸(B3)异亮氨酸(B28)-前胰岛素的构造

按照实施例 3 用质体对进行构造：

KB3 JB 28A

5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'

和 Insu 11

以及

KB J B28B

5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG -3'

和 Tir。

产生质体 pINT333。

构造后的胰岛素衍生物的表达

将质体 pINT 329、332 和 333 例如分别按照 E. coli K12 W3110 转化。含有质体的并对那些变异体编码的重组的细菌按照美国专利号为 5227293 的实施例 4 发酵，这样便产生了所希望的、用于生成相应的胰岛素衍生物的原料。

实施例 5: 赖氨酸(B3)、异亮氨酸(B28)、天冬氨酸(A21)-前胰岛素的构造

按照实施例 3 进行构造。但是代替 pINT125d 的是在实施例 4 中所构造的质体 pINT333 的 DAN 作为模板剂用于 PCR-反应。在此应用了以下质体对:

P-pint365

5'-TTTTTGTGCGACTATTAGTCGCAGTAGTTCTACCAGCTG-3'

和 Tir。

产生质体 pINT365。

实施例 6: 给家兔静脉注射后，赖氨酸(B3)，谷氨酸(B29)-胰岛素的生物活性评价

时间[小时]	人类胰岛素	赖氨酸(B3),谷氨酸(B29)-胰岛素
0	100	100
0.25	89.17	89.47
0.5	67.56	58.32
0.75	73.24	66.59
1	73.13	68.21
1.5	78.12	71.95
2	89.47	80.88
3	107.01	94.2
4	104.55	99.78

给 8 只家兔静脉注射所指定的胰岛素(0.2 IE/kg)。在以后的 4 小时时间里，在所指定的时间点上测定血糖浓度，并且计算出相对于时间点 0 时起始值的百分数。平均值表明，人类胰岛素和赖氨酸(B3),谷氨酸(B29)-胰岛素之间的生物活性没有明显差别。

实施例 7： 给家兔静脉注射后，赖氨酸(B3),异亮氨酸(B27)-和赖氨酸(B3),异亮氨酸(B28)-胰岛素的生物活性评价

给 6 只家兔静脉注射所指定的胰岛素(0.2 IE/kg)。在以后的 4 小时时间里，在所指定的时间点上测定血糖浓度，并且计算出相对于时间点 0 时起始值的百分数。平均值表明，人类胰岛素、赖氨酸(B3)、异亮氨酸(B27)-和赖氨酸(B3)、异亮氨酸(B28)-胰岛素之间的生物活性没有明显差别。

时间[小时]	H-胰岛素	赖氨酸(B3), 异亮氨酸(B27)-胰岛素	赖氨酸(B3), 异亮氨酸(B28)-胰岛素
0	100	100	100
0.33	67.8	62.6	63.3
0.66	54.9	60.6	55.8
1	55.2	66.8	59.3
1.5	63	79.2	66.7
2	77.8	90.9	81.6
3	91.5	96.3	97.2
4	99.5	96	101.6

实施例 8： 给狗皮下用药后，赖氨酸(B3),谷氨酸(B29)-胰岛素和赖氨酸(B3),异亮氨酸(B28)-胰岛素的药物动力学

给 4 条狗分别皮下注射所指定的胰岛素(0.3 IE/kg)。通过持续不断地输注葡萄糖，使血糖维持在 3.7 至 4 毫摩尔/升。下列图表显示 240 分钟内各注射时间点($t = 0$)的平均葡萄糖输注率 $\pm$ SEM。

用迅速作用的胰岛素衍生物在空腹狗进行的葡萄糖-夹实验

葡萄糖输注方式的特征数据

剂量: 1 x 0.3 IU/kg s.c. , 在时间点 t₀ (n = 4)

制剂	增量阶段		t _{max}	减量阶段	
	转折点 (分钟)	转折点的 斜率		转折点 (分钟)	转折点的 斜率
H-胰岛素 Hoechst (公司)	43	0.144	100	156	-0.065
赖氨酸(B3),谷氨酸(B29)-胰岛素	33	0.227	80	127	-0.091
赖氨酸(B3),异亮氨酸(B28)-胰岛素	16	0.267	60	104	-0.102

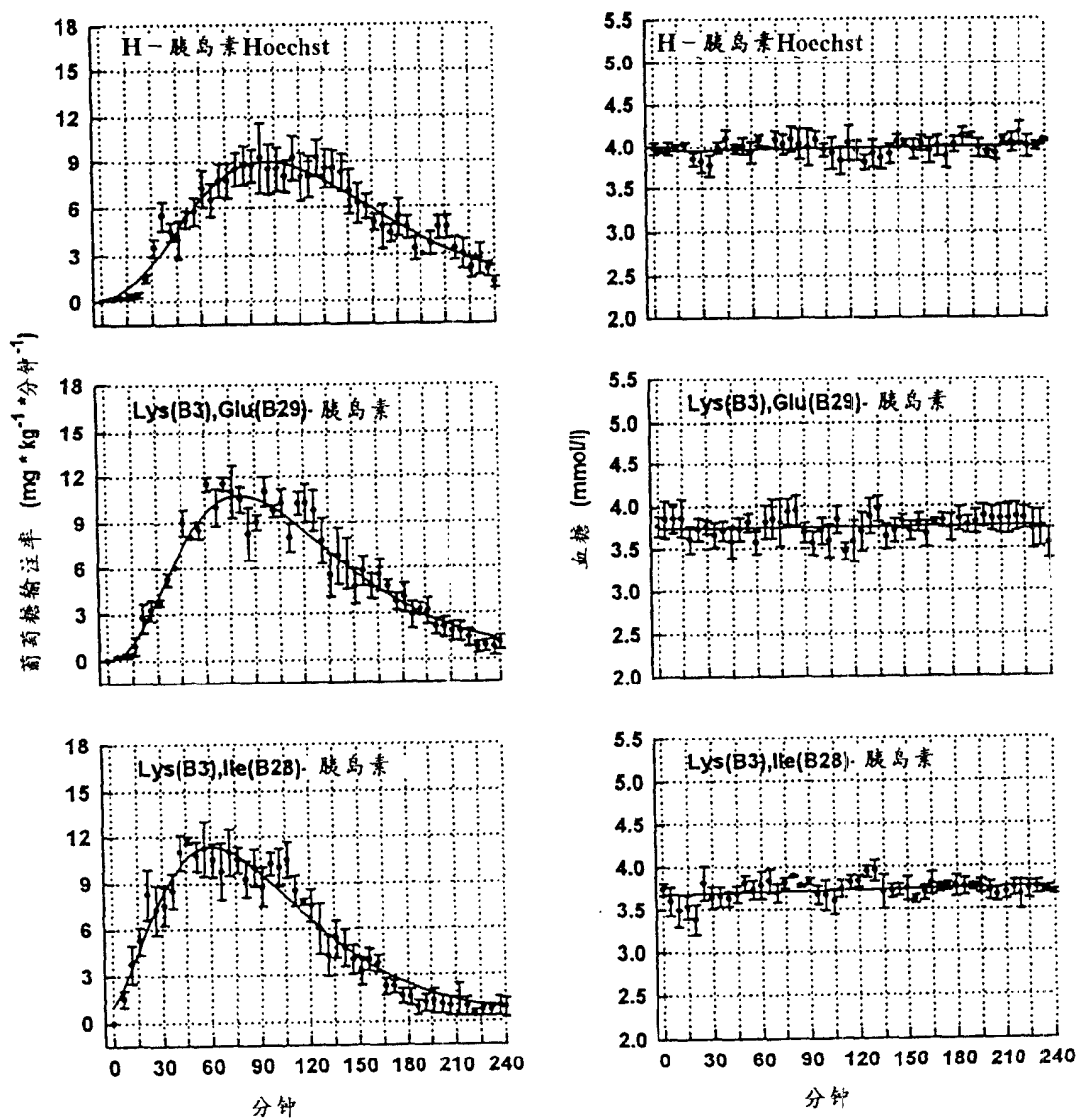
给空腹狗应用速效胰岛素衍生物的葡萄糖, 胰岛素
剂量: $1 \times 0.3 \text{ IU/kg s.c.}$, 于 t_0 时间点 (平均值 $\pm \text{sem}$, $n = 4$)

H-胰岛素Hoechst				Lys(B3)-Glu(B29)-胰岛素				Lys(B3)-Ile(B28)-胰岛素			
时间 分钟	葡萄糖输注率 $\text{mg} \cdot \text{分钟}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$		mmol/l	时间 分钟	葡萄糖输注率 $\text{mg} \cdot \text{分钟}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$		mmol/l	时间 分钟	葡萄糖输注率 $\text{mg} \cdot \text{分钟}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$		mmol/l
	平均值	sem			平均值	sem			平均值	sem	
0	0.00	0.00	3.98	0	0.00	0.00	3.77	0	0.00	0.00	3.74
6	0.14	0.01	3.97	6	0.24	0.08	3.85	6	1.54	0.53	3.60
11	0.23	0.06	3.98	11	0.36	0.18	3.86	11	3.75	1.24	3.49
16	0.35	0.19	3.99	16	0.95	0.60	3.86	16	5.25	1.89	3.53
21	0.44	0.18	4.01	21	2.75	0.96	3.81	21	8.25	1.67	3.36
26	1.50	0.25	3.85	26	3.25	0.65	3.73	26	7.25	1.63	3.81
31	3.50	0.56	3.82	31	3.75	0.22	3.76	31	7.50	1.25	3.64
36	5.50	0.90	3.77	36	5.25	0.41	3.66	36	8.50	1.15	3.65
41	4.50	0.56	3.99	41	6.00	0.00	3.71	41	11.00	1.12	3.63
46	4.00	1.17	4.09	46	9.00	0.87	3.58	46	11.75	0.22	3.58
51	5.25	0.54	3.98	51	8.00	0.00	3.73	51	10.75	0.96	3.81
56	5.75	0.89	4.01	56	8.50	0.56	3.81	56	11.25	1.11	3.73
61	7.25	1.19	3.93	61	11.50	0.43	3.57	61	10.50	1.09	3.78
66	6.50	1.08	4.08	66	11.50	1.22	3.81	66	9.75	1.85	3.83
71	7.75	1.08	3.98	71	11.50	0.43	3.85	71	11.00	1.50	3.69
76	7.75	1.14	4.08	76	11.00	1.70	3.81	76	10.50	0.83	3.81
81	8.50	1.09	4.03	81	10.50	0.83	3.94	81	9.25	1.19	3.89
86	8.75	1.29	4.09	86	8.25	1.75	3.95	86	10.00	1.22	3.78
91	8.75	1.08	4.03	91	9.00	0.50	3.69	91	8.75	1.29	3.83
96	9.25	2.33	3.99	96	11.00	0.94	3.56	96	10.25	0.74	3.67
101	8.50	1.68	4.08	101	9.75	0.41	3.71	101	10.00	1.15	3.66
106	8.50	1.44	3.96	106	10.25	0.89	3.59	106	10.50	1.22	3.59
111	8.00	1.06	3.92	111	8.00	0.94	3.84	111	8.50	1.03	3.74
116	9.25	1.47	3.83	116	10.25	0.74	3.66	116	7.75	0.22	3.81
121	8.00	1.58	4.04	121	10.25	1.24	3.68	121	7.50	1.09	3.83
126	8.00	1.37	3.95	126	9.75	1.34	3.70	126	6.00	1.62	3.94
131	9.25	1.19	3.81	131	7.75	1.52	3.88	131	4.25	1.29	3.95
136	8.50	1.30	3.92	136	5.50	1.44	3.97	136	5.33	1.19	3.70
141	8.50	1.25	3.86	141	6.75	1.85	3.64	141	4.75	1.19	3.71
146	8.25	1.24	3.91	146	6.75	1.67	3.71	146	4.00	0.94	3.73
151	7.00	1.46	4.06	151	4.75	1.14	3.82	151	3.25	0.89	3.74
156	6.25	1.29	4.05	156	5.75	0.96	3.71	156	4.00	0.71	3.62
161	6.00	0.79	3.97	161	4.75	0.82	3.81	161	3.75	0.54	3.69
166	5.00	0.50	4.04	166	5.50	1.03	3.67	166	2.25	0.54	3.80
171	4.75	1.39	3.95	171	4.75	0.41	3.81	171	2.25	0.41	3.75
176	4.33	0.54	4.01	176	3.75	0.54	3.83	176	1.63	0.48	3.77
181	5.33	1.19	3.88	181	4.00	0.94	3.75	181	1.54	0.53	3.77
186	4.67	0.72	4.03	186	2.88	0.87	3.85	186	0.86	0.46	3.76
191	3.33	0.72	4.12	191	3.25	0.41	3.78	191	1.19	0.54	3.76
196	3.00	0.00	4.13	196	3.13	0.84	3.81	196	1.28	0.79	3.76
201	3.67	0.72	3.98	201	2.13	0.51	3.88	201	1.07	0.58	3.71
206	4.67	0.72	3.91	206	2.06	0.66	3.85	206	0.94	0.60	3.66
211	4.67	0.72	3.92	211	1.79	0.62	3.85	211	1.41	1.04	3.69
216	3.33	0.72	4.09	216	1.78	0.63	3.85	216	0.86	0.60	3.74
221	3.00	0.94	4.05	221	1.41	0.58	3.87	221	0.54	0.21	3.66
226	2.17	0.58	4.17	226	0.78	0.36	3.85	226	0.72	0.38	3.72
231	2.67	0.98	4.00	231	0.85	0.37	3.74	231	0.69	0.38	3.75
236	2.00	0.47	4.01	236	0.76	0.51	3.74	236	0.94	0.60	3.71
240	1.17	0.36	4.08	240	1.07	0.47	3.56	240	0.88	0.61	3.69

给空腹狗应用速效胰岛素的葡萄糖钳制

剂量: $1 \times 0.3 \text{ IU/kg s.c.}$, 在 t_0 时间点

(平均值 $\pm$ sem, $n = 4$)



序列表

(1)一般信息

(i)申请人:

(A)名称: Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH

(B)街道: -

(C)地点: 梅因河边的法兰克福

(D)州: -

(E)国家: 联邦德国

(F)邮政编码: 65926

(G)电话: 069-305-5307

(H)传真: 069-35-7175

(ii)申请名称: 速效的胰岛素衍生物

(iii)序列数量: 8

(iv)计算机可读形式:

(A)数据载体: Floppy 碟

(B)计算机: IBM PC 兼容机

(C)驱动系统: PC-DOS/MS-DOS

(D)软件: Patent In Release # 1.0, #1.25(EPA)版本

(2)关于 SEQ ID NO.1 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)标志:

(A)名称/钥匙: 蛋白质

(B)位置: 1..21

(xi)序列表示: SEQ ID NO.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
                20

```

(2)关于 SEQ ID NO.2 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)标志:

(A)名称/钥匙: 蛋白质

(B)位置: 1..30

(xi)序列表示: SEQ ID NO.2 :

```

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 Thr Pro Lys Thr
                20           25           30

```

(2)关于 SEQ ID NO.3 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)标志:

(A)名称/钥匙: 蛋白质

(B)位置: 1..30

(xi)序列表示: SEQ ID NO.3 :

```

Phe Val Lys 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 Thr Pro Glu Thr
           20           25           30

```

(2)关于 SEQ ID NO.4 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)标志:

(A)名称/钥匙: 蛋白质

(B)位置: 1..30

(xi)序列表示: SEQ ID NO.4:

```

Phe Val Lys 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 Thr Ile Lys Thr
           20           25           30

```

(2)关于 SEQ ID NO.5 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)标志:

(A)名称/钥匙: 蛋白质

(B)位置: 1..30

(xi)序列表示: SEQ ID NO.5:

```

Phe Val Lys 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 Ile Pro Lys Thr
          20           25           30

```

(2)关于 SEQ ID NO.6 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 97 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)标志:

(A)名称/钥匙: 蛋白质

(B)位置: 1..97

(xi)序列表示: SEQ ID NO.6:

```

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His
1           5           10           15
Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
          20           25           30
Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
          35           40           45
Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
          50           55           60
Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
          65           70           75           80
Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
          85           90           95
Asn

```

(2)关于 SEQ ID NO.7 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 97 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式：单链

(D)拓扑形式：线性

(ii)分子类型：蛋白质

(ix)标志：

(A)名称/钥匙：蛋白质

(B)位置： 1..97

(xi)序列表示： SEQ ID NO.7：

```

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His
1           5           10           15

Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
20          25          30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
35          40          45

Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
50          55          60

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
65          70          75          80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
85          90          95

Asn

```

(2)关于 SEQ ID NO.8 的信息：

(i)序列特征：

(A)长度： 97 个氨基酸

(B)种类：氨基酸

(C)链形式：单链

(D)拓扑形式：线性

(ii)分子类型：蛋白质

(ix)标志：

(A)名称/钥匙：蛋白质

(B)位置： 1..97

(xi)序列表示： SEQ ID NO.8：

```

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His
1           5           10           15
Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
20           25           30
Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
35           40           45
Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
50           55           60
Gln Pro Leu Ala Ile Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
65           70           75           80
Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
85           90           95

```

Asn

(2)关于 SEQ ID NO.9 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)标志:

(A)名称/钥匙: 蛋白质

(B)位置: 1..21

(xi)序列表示: SEQ ID NO.9:

```

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1           5           10           15
Glu Asn Tyr Cys Asp
20

```

(2)关于 SEQ ID NO.10 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 个氨基酸

(B)种类: 氨基酸

(C)链形式: 单链

(D)拓扑形式：线性

(ii)分子类型：蛋白质

(ix)标志：

(A)名称/钥匙：蛋白质

(B)位置： 1..30

(xi)序列表示： SEQ ID NO.10：

```

Phe Val Lys 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 Thr Ile Lys Thr
          20           25           30

```

(2)关于 SEQ ID NO.11 的信息：

(i)序列特征：

(A)长度： 97 个氨基酸

(B)种类：氨基酸

(C)链形式：单链

(D)拓扑形式：线性

(ii)分子类型：蛋白质

(ix)标志：

(A)名称/钥匙：蛋白质

(B)位置： 1..97

(xi)序列表示： SEQ ID NO.11：

```

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His
1           5           10           15
Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu
          20           25           30
Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro
          35           40           45
Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu
          50           55           60

```

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
65 70 75 80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
85 90 95

Asp