200817432

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：96124846　　C07K 14/62 (2006.01)

※ 申請日期：96 7 9　　※IPC 分類：A61K 38/28 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

經醯胺化之甘精胰島素(insulin glargine)

AMIDATED INSULIN GLARGINE

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

賽諾菲阿凡提斯德意志有限公司

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

□ 指定　　為應受送達人

代表人：（中文/英文）（簽章）

1.魏麥可/WEIN, ELMAR-MICHAEL

2.魯　波/RUPP

住居所或營業所地址：（中文/英文）

德國法蘭克福城 D-65926

D-65926 Frankfurt am Main, Germany

國　籍：（中文/英文）

德國/GERMANY

三、發明人：（共 2 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 哈柏曼/HABERMANN, PAUL

2. 卓希爾/ZOCHER, FRANK

國　籍：（中文/英文）

1.-2.均為德國/GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

德國；西元 2006 年 7 月 11 日；10 2006 031 962.1

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

敘述

本發明是關於甘精胰島素經醯胺化修飾，特別是在Gly(A21)，Arg(B31)，Arg-醯胺(B32)人類胰島素(甘精胰島素醯胺)。

【先前技術】

世界上大約有 1.77 億名糖尿病患者，其中一億七千萬人是屬於第一類型糖尿病，取代其所缺乏之胰島素分泌是目前唯一可行的治療方法，那些患者需要依賴通常一天要好幾次的胰島素注射，終其一生。不同於第一型糖尿病，第二型糖尿病並非總是缺乏胰島素，但是在大部分的案例中，尤其是在後期階段，用胰島素和口服抗糖尿病藥結合的治療被認為是最有力的治療類型。

在健康的人之中，胰臟貝他細胞(beta cell)所釋放的胰島素與血液中葡萄糖濃度有著嚴謹的關聯。血糖濃度提升，例如用餐後發生的狀況，會快速的被對等量提升分泌的胰島素所補償(compensated)。在饑餓的階段，血漿中的胰島素會降低到一個基本值，以確保持續供給葡萄糖至胰島素敏感之器官與組織，以及在夜間維持肝臟中葡萄糖於低產量。通常由外來皮下注射的胰島素取代內生性的胰島素分泌，多半無法與上述血液中葡萄糖生理調控的品質密切契合，一旦糖尿病患者錯誤地調節各別的情況，血液中

葡萄糖含量升降的擾動便會顯得頻繁，然而，除此之外，血中葡萄糖含量長年升高，既使沒有初始徵兆，也代表健康上相當大的危機。在美國大規模的糖尿病控制及併發症臨床研究計畫(DCCT) (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N. Engl. J. Med. 329, 977-986)清楚地證實，慢性血糖含量的提升與後期糖尿病併發症有實質上的關聯。微血管或大血管病變屬於晚期糖尿病併發症，在一些情形中會造成如視網膜病變(retinopathy)、腎病變(naphropathy)、神經病變(neuropathy)，會導致失明、腎衰竭、失去四肢，此外也與增加心血管疾病的風險相關。因此，可以推斷一個改進的糖尿病治療法必須主要針對於盡可能保持血糖在生理的範圍之內。改進的胰島素治療策略試圖藉由一天注射許多次速效與緩效型胰島素調劑已達成此目的。速效型的配方是在用餐時間給予，以求補償用餐過後提升的血糖。緩效型基本胰島素則是用於確保基本量胰島素的供應，特別是在夜間，避免造成低血糖。

胰島素是由一段 51 個胺基酸所分成之兩段胺基酸鏈所構成之多肽鏈：A 鏈具有 21 個胺基酸，而 B 鏈具有 30 個胺基酸，兩條鏈由二個雙硫鍵相連結。為了糖尿病的治療，胰島素製備已被使用了好幾年，此外，不只是使用天然之胰島素，還包括近年來許多胰島素的衍生物或類似物。

胰島素類似物是天然胰島素，亦即人類胰島素或動物

胰島素的類似物，差別在於以其他胺基酸取代至少一個天然的胺基酸，或是增加/刪除至少一個胺基酸在相對應的位置，否則就完全相同的天然胰島素上。例如美國專利第5656722 號是描述甘精胰島素 (Arg(B31)，Arg(B32)，Gly(A21)人類胰島素)，那些添加或取代的胺基酸可能也不是自然發生者。

胰島素衍生物是天然胰島素或類胰島素的衍生物，其一個或多個胺基酸或 A 鏈與 B 鏈的 N 端或 C 端被其他官能基所取代，而官能基是由下列基團所選出，其包括醯胺基、胺基、羧基、烷基、醇基以及烷氧基。

一種有效率的胰島素療法使用所謂的基本胰島素(basal insulin)，此模式使緩慢而持續釋放外加調控胰島素成為可能。如此一來，糖尿病患者體內的基本胰島素濃度可達到對生理有利的情況很長一段時間。理想上，胰島素影響的起始點可以延後，時間與影響力的關係曲線可以儘可能平緩，如此一來，短期血糖缺乏的危險可以明顯降低，並可在先前未進食的情況下進行調控。

重組類胰島素 Arg(B31)，Arg(B32)，Gly(A21)人類胰島素(甘精胰島素；US5656722)是與許多每 24 小時，也就是每天只有一次需要供給的病人相聯結，為了達到基本的影響，對血糖的控制有所改善，例如導致醣化血色素(Hba1c)含量的減少。

如今，一個驚人的發現顯示甘精胰島素 B32 位置之精胺酸受醯胺化所產生所謂甘精胰島素醯胺(insulin

glargine amide)，其所顯示之時間/效應關係曲線明顯較甘精胰島素本身更平緩且更有利。在初始時，血糖濃度的降低沒有標定的最低點(nadir)，此顯示經醯胺化之甘精胰島素在藥理上的敏感度具有驚人的優異品質。在低血糖調控上的危險因此減少。投予蘭德仕醯胺(Lantus amide)建立一正常血糖值為 70-110 毫克/百毫升葡萄糖。此外，經醯胺化之甘精胰島素相較甘精胰島素具有更驚人長效的影響力，本發明因此與經醯胺化之甘精胰島素有關。

熟悉該項技藝的工作者因此對經醯胺化之甘精胰島素與醫藥配方的關係很清楚。這意指一個醫藥混合物在調控後以最好的方式，最佳的展現經醯胺化之甘精胰島素的影響力。以水溶液作為此聯結的基礎，其餘組成份必須是適合溶混的。製備中不包含任何成分是來自動物性來源，此乃一大利處，病毒污染的危險因而減少，加入防腐劑是對阻止微生物污染更有益的方式，可能可以透過添加等滲劑以補償調節位置組織細胞之生理狀態的負面影響，添加魚精蛋白(protamine)可能具有穩定的效果，因此可以規劃魚精蛋白的添加以製備無鹽胰島素，添加酚類組成物可導致類胰島素中六聚體結構的穩定，因此有利於對作用起始的遲延，經醯胺化之甘精胰島素的供給可與速效型胰島素並行，例如 Apidra®、NovoRapid®, Humalog®或胰島素衍生物，以相同的時間/活動量表曲線經歷發展與規劃。為此，熟悉該項技藝的工作者能清楚認知適當地製備個別胰島素組成分子之混合物也可被用在此目的，醯胺可以更佳地

被使用如 Exubera®等吸入式胰島素的人所取得，經醯胺化之甘精胰島素可進一步用於醫藥上的製備，包含一段被描述為活性可與 GLP-1(似胰高血糖激素-1)相比擬的多肽鏈，此多肽鏈可例示於 GLP-1(7-37)，Exenatide (Byetta®)，或是製備法被描述於 WO 2006/058620、WO 2001/04156 與 WO 2004/005342 等專利申請案之胜肽。

與本案同日申請之標題為"製備具有二元 B 鏈端的胰島素類似物之方法"之專利申請案主要是描述經醯胺化之甘精胰島素之製備方法，利用胰蛋白酶催化接合精胺醯胺(argininamide)到 Gly (A21)，Arg (B31)人類胰島素，可以獲得很高的產量。在這個例子中，可能可以控制反應，以得到胰島素類似物 Gly(A21)，Arg(B31)，Arg (B32)-醯胺等較佳的產物，在文獻中有些描述特別提到，保護後的精胺酸衍生物在許多溶劑內常常都不穩定，對產率有正面幫助的方法可能可以藉由改變保護基或醯胺基等方式改變反應條件，這些對技術人員是很熟悉的，亦與本發明有關。US 5,656,722 是描述表現以微小前胰島素(miniproinsulin)為組成分子之融合蛋白質的 pB40 與 pINT91d 等質體，將胰島素 A 鏈之 21 號位置天門冬胺酸以甘胺酸取代，使得 Arg(B31)，Gly (A21)迷你胰島素前驅物直接由融合蛋白質中製備出來，而其可藉由胰蛋白酶消化直接轉變為經醯胺化之甘精胰島素的前驅物。相對應的融合蛋白質不需要細胞中製備，熟練的技術人員能清楚，胰島素前驅物之相似物可藉由細菌表現及隨後分泌至

膜周圍及培養上清液中，以歐洲專利申請案 EP-A 1 364 029 為例子來描述此方法。此發明同時也與人類胰島素前驅物 Arg(B31)，Gly (A21)人類胰島素前驅物的使用有關，其可直接透過此頡細菌方法表現來產生。

胰島素類似物的醯胺化可普遍發生在許多方面。C 端羧基受醯胺化之甘精胰島素稱為甘精胰島素醯胺。

更讓熟練的技術人員熟悉的是，經由此例所描述的表現系統僅代表宿主/載體系統為製備嵌合蛋白質的小片段，宿主/載體系統允許製備目標多肽鏈因此也成為這個發明的一個部分。

【發明內容】

本發明因此是關於經醯胺化之甘精胰島素，特別是經醯胺化之甘精胰島素 Gly(A21)，Arg (B31)，Arg(B32)-NH_2 人類胰島素的型式(甘精胰島素醯胺)。

本發明更進一步與經醯胺化之甘精胰島素製備之方法有關，特別是甘精胰島素醯胺，經醯胺化之甘精胰島素的前驅物為形式 Gly(A21)，Arg (B31)的人類胰島素被重組製備，在具有胰蛋白酶活性的酵素存在下，與精胺醯胺(argininamide)的偶合發生，隨後甘精胰島素醯胺便得以被純化出來。

本發明進一步關於甘精胰島素醯胺於製造用於治療糖尿病，特別是第一型或第二型糖尿病之醫藥品之用途。

本發明又進一步關於一包含甘精胰島素醯胺之藥

物，特別是水性調配物或粉末。

此藥物是一醫藥製劑，其較佳以溶液或懸浮物型態存在，有助於注射的目的；其特徵在於至少有一種醯胺化之甘精胰島素，特別是甘精胰島素醯胺，及/或是至少一種在溶解狀態、非結晶狀態，及/或是結晶狀態-較佳的型態為溶解狀態之生理上可耐受性的鹽類。

此製劑較佳的 pH 值介於約 2.5 至 8.5，特別是介於約 4.0 到 8.5 之間，

包含一個合適的強化劑(tonicity agent)，

適合的防腐劑

和適當緩衝液，

較佳也使用某一鋅離子濃度，

整個自然地在無菌水溶液中。除活性成分外，製劑的載體形成一個整體的製劑成分。

適合的強化劑為例如甘油、葡萄糖、甘露醇、氯化鈉、鈣或鎂化合物如氯化鈣等。

經醯胺化之甘精胰島素或其生理上可耐受性的鹽類之溶解度受在弱酸性 pH 值的強化劑和/或防腐劑的選擇之影響。

合適的防腐劑為，例如酚，間-甲苯酚，苄醇和/或對-羥基苯甲酸酯。

緩衝物質，可以使用特別設置 pH 值介於約 4.0 和 8.5 之間者，例如醋酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉等，否則，接受生理可接受稀釋酸(典型為鹽酸)或鹼(典型為氫氧化鈉)，

也適合用於設立 pH 值。

如果製劑含有鋅，其含量為從 1 微克/毫升至 2 毫克/毫升間，尤其是從 5 微克到 200 微克鋅/毫升較佳。

為本發明製劑之不同活性成分，它也可能是混合了未修飾之胰島素，較佳是牛、豬或人胰島素，特別是人胰島素或胰島素類似物與其衍生物，它同樣可能混合一個或多個 exendin-4 衍生物或胜肽，其特點在於其相較於 GLP-1(類胰高血糖激素-1)之活性，本發明同樣涉及到這種藥物(製劑)。

優選的活性成分的濃度是那些大約相當於 1 - 1500，較佳是約 5 - 1000，特別是約 40 - 400 國際單位/毫升。

【實施方式】

本發明以如下實例加以更詳細的描述，但不因此受到限制。

例子 1：麵包酵母菌之分泌水蛭素 Arg(B31)，Gly(A21)胰島素融合蛋白質的基因序列。

專利申請案 EP-A 1 364 032 建議用水蛭素作為融合夥伴，在酵母菌中表現和分泌醫藥上有興趣的蛋白質。

專利申請案 EP-A 1 364 032 的例子 1 描述了用來製備水蛭素衍生物和微小前胰島素所組成的融合蛋白之宿主-載體系統。此系統可用於製備微小前胰島素，其為所請之甘精胰島素醯胺的前驅物。

表現載體的建構為專利申請案 EP-A 1 364 032 中例子的類似物，將引子 insnco1rev 置換，因而改變其位置 A21 的基因密碼。

以下的引子是合成來製備由微小前胰島素(與 Gly(A21)，Arg(B31)人類胰島素，隨後由微小前胰島素產生)構成之融合蛋白質的基因序列。

ins_gly_a21_rev
TTTTTTCCATGGGTCGACTATCAGCCACAGTAGTTTTC
CAGCTGG (SEQ ID NO.: 1)

引子在這各例子完全覆蓋了胰島素類似物之胺基酸 A15-A21 基因片段密碼，合併此引子與專利申請案 EP-A 1 364 032 例子 1 的引子 SEQ ID NO: 4，並以質體 pADH2Hir_ins 為模板，透過 PCR 來產生 DNA 片段，經過限制酶 KpnI 與 KcoI 的切割作用之後，嵌入相對應地打開的表現載體而組成需要的融合蛋白質。

此載體命名為 pADH2Hir_ins_glyA21，此融合蛋白的表現是根據專利申請案 EP-A 1 364 032 的例子 3 來進行，並根據例 6 進行至 Gly(A21)-微小前胰島素，並使用陽離子交換層析法來進行純化。如本發明例 5，含有微小前胰島素部分的物質是用來製備 Gly(A21)，Arg(B31)，Arg(B32)-NH_2 人類胰島素。

例子 2：以麵包酵母菌直接分泌之 Gly(A21)，Arg(B31)人類胰島素前驅物的基因序列。

描述於 EP-A 1 364 032 之例子 7 的 pADH2Hir_ins_glyA21 質體 DNA，被用來製備直接分泌 Gly(A21)，Arg(B31)人類胰島素之載體。

下述之引子被合成：

alpha_insf1

5'-TTTTTTGGATCCTTTGGAATAAAAGATTTGTTAACC AACACTTGTGTG-3' (SEQ ID NO.: 2)

其涵蓋編碼alpha因子之C端的序列，Lys-Arg以及微小前胰島素序列N端的基因編碼。

ins_gly_rev2

5' – TTTTTTCCAT GGGTCGCTAT CA**GCC**ACAGT AGTTTTCCAG CTGG –3' (SEQ ID NO.: 3)

此引子能與胰島素類似物序列的 3'端雜交，將其選殖入質體 pADH2Hir_ins_glyA21。使用 PCR(標準條件)產生一段 DNA 序列，經過限制酶 KpnI 與 KcoI 的切割作用，嵌入對應解開的表現載體而組成需要的融合蛋白質。在酵母菌株 Y79 之勝任細胞進行轉型作用，轉型物接著由上述專利申請案之例子 7 的描述來表現。

Gly(A21)，Arg(B31)- 微小前胰島素根據 EP-A 0 347 781 的例子 9 進行濃縮，經胰蛋白酶的切割之後，使用陽離子交換樹脂層析純化。如本發明例 5，含有微小前胰島素部分的物質是用於製備 Gly(A21)，Arg(B31)，Arg(B32) 人類胰島素。

例子 3：酵母(pichia pastoris)分泌之水蛭素-Gly(A21)，Arg(B31)人類胰島素融合蛋白的基因序列。

表現載體選殖的發生與專利申請案 EP-A 1 364 032 類似。不是使用序列引子 pichia_H_Irev2，在這個案例中，是由引子 ins_gly_rev2 來建構及以後可利用 PCR 產物來表現 Gly(A21)人類胰島素:

5'-TTTTTGGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCACAGTA GTTTTCCAGCTGG – 3' (SEQ ID NO.:4)

所產生的質體被命名為 pPich_Hir_ins-GlyA21，純化 Gly(A21), Arg(B31)-微小前胰島素作為起始物，並根據上述描述來進行。

例子 4：酵母(pichia pastoris)直接分泌之 Gly(A21)，Arg(B31)前驅物的基因序列。

適合的表現載體的建構與專利申請案 EP-A 1 364 032 的例子 7 類似，質體 pPich_Hir_ins-GlyA21 之 DNA

以及兩段引子 pich_insgly_dirf 以及 pich_insgly_dirrev 是被需要的。

pich_insgly_dirf
5'-TTTTTTCTCGAGAAAAGATTTGTTAACCAACACTIGIGTG-3' (SEQ ID NO.: 5)

pich_insgly_dirrev
5'-TTTITT GGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCAC-3' (SEQ ID NO.: 6)

純化 Gly(A21)，Arg(B31)-微小前胰島素作為起始物的方法如上所述。

例子 5：由 Gly(A21)，Arg(B31)人類胰島素前驅物與精胺醯胺偶合來製備 Gly(A21)，Arg(B31)，Arg(B32)-NH_2-人類胰島素。

將例子 1-4 已製備好的 100 毫克的 Gly(A21)，Arg(B31)人類胰島素溶解於 0.95 毫升精胺醯胺溶液(446 克/升)，並加入 0.13 毫升醋酸鈉緩衝液(pH5.8)及 2 毫升二甲基甲醯胺，將反應混合物冷卻至 12℃，並加入 0.094 毫升胰蛋白酶(0.075 毫克，羅氏診斷)開始反應。

經 8 小時後，加入三氟乙酸至 pH 值 2.5 來進行反應的終止，並以 HPLC 來分析。有大於 60%之 Gly(A21)，

Arg(B31)，Arg(B32)人類胰島素形成，加入與 US 5,656,722 相似的胰蛋白酶抑制劑溶液來純化經醯胺化的類似物(甘精胰島素醯胺)。

例6：麵包酵母菌直接分泌之Lys(B31)前驅物的基因序列。

兩條引子被合成並被用來引發出序列 Ala(B30)，Ala(C1)，Lys(C2):

a29_a30_k31f
5'-GTTTCTICTACACTCCAAAGGCGGCTAAAGGTATCG TTGAACAATGTTG-3'(SEQ ID NO.: 7)

以及a29_a30_k31rev
5'-CAACATTGTT CAACGATACC TTTAGCCGCC TTTGGAGTGT AGAAGAAAC -3' (SEQ ID NO.: 8)

引子alpha_insf1
5'-TTITTIGGATCCTTIGGAATAAAAGATTTGTTAACCA ACACTTGIGTG-3' (SEQ ID NO.: 9)

涵蓋 alpha 因子 C 端之序列，Lys-Arg 密碼子，以及微小前胰島素 N 端之序列。專利申請案 WO 02/070722A1 例子 1 中質體 pADH2Hir_ins 之 DNA 作為兩個聚合酶連鎖反應的模板。在反應 1 中，使用引子 a29_a30_k31f 以及

insnco1rev (SEQ ID NO.: 6 來自 WO 02/070722A1)，而反應 2 中，則是使用 a29_a30_k31re 以及 alpha_insf1，執行標準反應並純化產生之 DNA 片段，將兩產物合併後，便成為反應 3 的模板，以 insnco1rev 及 WO 02/070722A1 之 SEQ ID NO.: 6 為引子。所產生之 PCR 產物如例子 8 所描述的方式選殖並表現。產物為 Ala(B31)，Ala(C1)，Lys(C1)-miniproinsulin，乃是以賴胺醯肽鏈內切酶(lysyl endopeptidase)裂解 B(1-29)-A (1-21)胰島素所轉變成，並當作目標蛋白質之中間產物。

例7：以賴胺醯肽鏈內切酶與Thr-Arg(Boc)-Arg(Boc)-NH2進行反應

胰島素前驅物以 DE3844211 描述之方式，以賴胺醯肽鏈內切酶(LEP)及胰蛋白酶進行反應並純化(例 1)。為此目的，將 10 毫克的胰島素前趨物溶解於 Tris 緩衝液(pH8.0)，並加入來自 Lysobacter enzymogenes 的 LEP(0.01 毫升，1 毫克/毫升濃度，溶於水中，Merckbiosciences)。在室溫中培養 2 小時，並以 RP-HPLC (Nucleosil 120-5 管柱)進行純化。Gly (A21) B(1-29)-A(1-20)分裂胰島素前驅物與根據 DE3844211 的 Thr-Arg(Boc)-Arg(Boc)-NH2 進行反應。為此目的，將 10 毫克 desThr-胰島素前驅物溶於 0.25 毫升 10 莫耳濃度醋酸中，加入 0.7 毫升溶於 DMSO/1,3- 丁二醇 (1:1) 之 1.5 莫耳濃度 Thr-Arg(Boc)-Arg(Boc)-NH2，然後是 0.15 毫升 LEP(15 毫

克/毫升，溶於水)，此混合物在室溫培養 2 小時，蛋白質隨後以甲醇/甲基第三丁基醚(v/v = 1:4)沉澱並乾燥，保護基隨後以 1 莫耳濃度鹽酸/醋酸移除及培養於 0℃下。

例8：低血糖對甘精胰島素醯胺的影響

對低血糖的影響以健康雄性小獵犬進行研究，以 0.3 IU/體重(公斤)的劑量進行皮下注射，在控制組中，狗被處理相同劑量的甘精胰島素，而其他組被注射無胰島素之安慰劑，注射後頭兩小時，每半小時，取每隻動物的血進行血糖濃度檢測，而隨後每一小時取一次，持續八小時，此顯示甘精胰島素醯胺與甘精胰島素延遲時間/影響的趨勢曲線，但醯胺之曲線明顯較具優勢，因為在反應起始時，血糖濃度的下降沒有到明顯的低點(最低點)，此結果描述於圖 1 中。

序列列表

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> 經醯胺化之甘精胰島素

<130> DE2006/026

<140> 10 2006 031 962.1

<141> 2006-07-11

<160> 9

<170> 專利版本 3.3

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子 ins_gly_a21_rev

<400> 1

tttttccat gggtcgacta tcagccacag tagttttcca gctgg 45

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213>人工的

<220>

<223>引子 alpha_insf1

<400> 2

ttttttggat cctttggaat aaaagatttg ttaaccaaca cttgtgtg 48

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子 ins_gly_rev2

<400> 3

tttttccat gggtcgctat cagccacagt agttttccag ctgg 44

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子 ins_gly_rev2

<400> 4

ttttggcgc cgaattcact actattagcc acagtagttt tccagctgg 49

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子 pich_insgly_dirf

<400> 5

ttttttctcg agaaaagatt tgttaaccaa cacttgtgtg 40

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子 pich_insgly_dirrev

<400> 6

tttttggcg ccgaattcac tactattagc cac 33

<210> 7

<211> 49

<212> DNA

<213>人工的

<220>

<223> 引子 a29_a30_k3lf

<400> 7

gtttcttcta cactccaaag gcggctaaag gtatcgttga acaatgttg 49

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子 a29_a30_k3lrev

<400> 8

caacattgtt caacgatacc tttagccgcc tttggagtgt agaagaaac 49

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213>人工的

<220>

<223> 引子 alpha_insf1

<400> 9

tttttggat cctttggaat aaaagatttg ttaaccaaca cttgtgtg 48

【圖式簡單說明】

圖 1：各類胰島素類似物對狗的降糖作用，RR-COOH=甘精胰島素；$RR-NH_2$=甘精胰島素醯胺。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明是關於甘精胰島素經醯胺化修飾，特別是在Gly(A21)、Arg(B31)、Arg-醯胺(B32)人類胰島素(甘精胰島素醯胺)。

六、英文發明摘要：

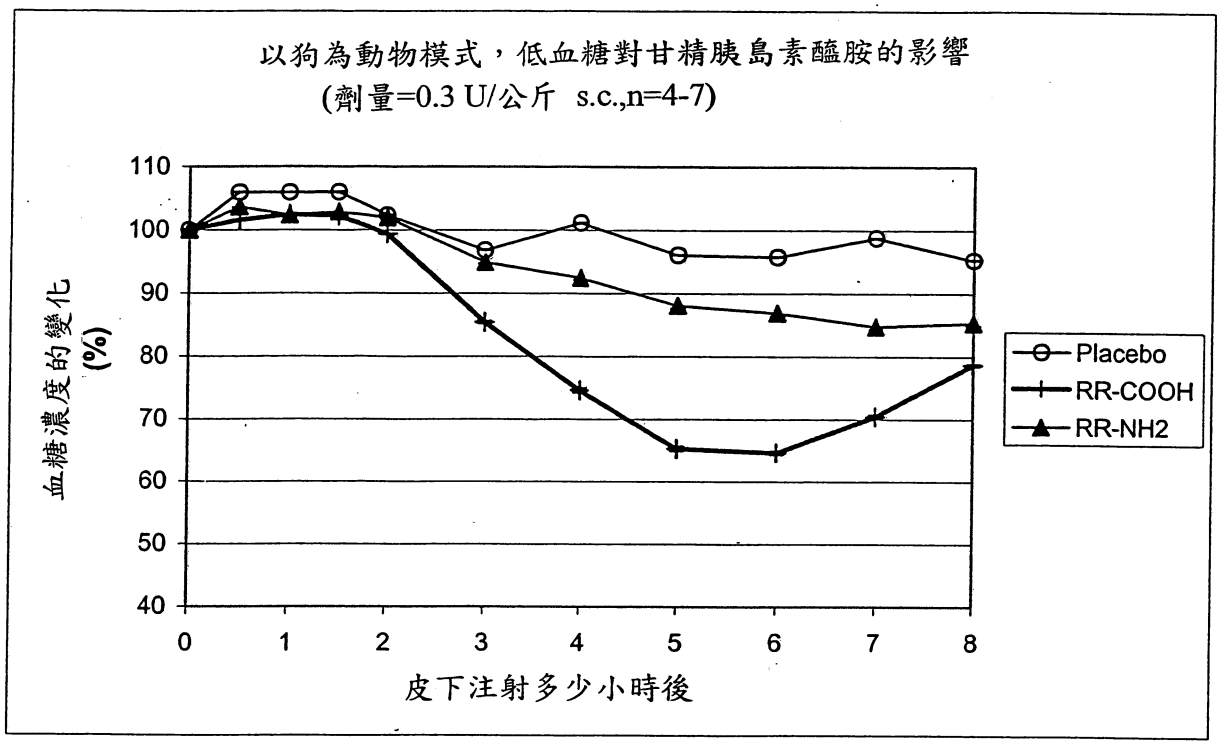
The invention relates to an insulin glargine which has been modified by amidation, in particular Gly(A21), Arg(B31), Arg-amide(B32) human insulin (insulin glargine amide).

十、申請專利範圍：

1. 一種經醯胺化之甘精胰島素。
2. 根據申請專利範圍第 1 項所述之經醯胺化之甘精胰島素，其係以 Gly(A21)，Arg(B31)，Arg-NH_2(B32)人類胰島素(甘精胰島素醯胺)之型式。
3. 一種製備根據申請專利範圍第 1 或 2 項之經醯胺化之甘精胰島素之方法。
4. 根據申請專利範圍第 3 項之製備申請專利範圍第 2 項之甘精胰島素醯胺之方法，其中甘精胰島素醯胺的前驅物 Gly(A21)、Arg (B31)的人類胰島素之形式被重組製備，在具有胰蛋白酶活性的酵素存在下，與精胺醯胺(argininamide)的偶合發生，隨後將甘精胰島素醯胺單離。
5. 一種根據權利要求第 1 項之甘精胰島素醯胺的用途，其係用於製備用以治療糖尿病之醫藥品。
6. 根據申請專利範圍第 5 項之用途，其中甘精胰島素醯胺係用於製備用以治療第 I 型或第 II 型糖尿病之醫藥品。
7. 一種藥物，其包含甘精胰島素醯胺。
8. 根據申請專利範圍第 7 項之藥物，其係以水性調配物呈現。
9. 根據申請專利範圍第 7 項之藥物，其係以粉末呈現。
10. 根據申請專利範圍第 8 項之藥物，其中甘精胰島素醯胺係以溶解狀態，結晶狀態和/或非結晶狀態存在。
11. 根據申請專利範圍第 8 項之藥物，其額外的包含一種或多種 exendin-4 衍生物或胜肽，其特徵在於其相較於 GLP-1(類胰高血糖激素-1)之活性。

十一、圖式：

圖 1


以狗為動物模式，低血糖對甘精胰島素醯胺的影響
(劑量=0.3 U/公斤 s.c.,n=4-7)
血糖濃度的變化 (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
0
1
2
3
4
5
6
7
8
皮下注射多少小時後
Placebo
RR-COOH
RR-NH2

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

5

10

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無