



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I686403 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：104106145

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 26 日

(51)Int. Cl. : C07K14/62 (2006.01)

A61K38/28 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

(30)優先權：2014/02/28

歐洲專利局

14157215.6

(71)申請人：丹麥商諾佛 儂迪克股份有限公司 (丹麥) NOVO NORDISK A/S (DK)

丹麥

(72)發明人：麥德森 彼得 MADSEN, PETER (DK)；胡斯特普 蘇珊娜 HOSTRUP, SUSANNE

(DK)；慕薩爾 馬丁 MUENZEL, MARTIN (DK)；克杰德森 托馬斯 博格龍

KJELDSSEN, THOMAS BOERGLUM (DK)；傑瑞賈德 克勞蒂亞 烏里奇

HJOERRINGGAARD, CLAUDIA ULRICH (DK)；佛樂多里歐斯 克里斯堤恩

FLEDELIUS, CHRISTIAN (DK)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

US 5382574A

WO 2009/022005A1

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：21 共 131 頁

(54)名稱

新穎胰島素衍生物及其醫療用途

(57)摘要

本發明屬於與糖尿病相關之醫學病狀之藥物的治療領域。更特定言之，本發明係關於人類胰島素類似物之新穎醯化衍生物。本發明亦提供包含此類胰島素衍生物之醫藥組成物，且係關於此類衍生物用於治療或預防與糖尿病相關之醫學病狀的用途。

The present invention is in the therapeutic fields of drugs for medical conditions relating to diabetes. More specifically the invention relates to novel acylated derivatives of human insulin analogues. The invention also provides pharmaceutical compositions comprising such insulin derivatives, and relates to the use of such derivatives for the treatment or prevention of medical conditions relating to diabetes.

指定代表圖：

PK 平均值SEM

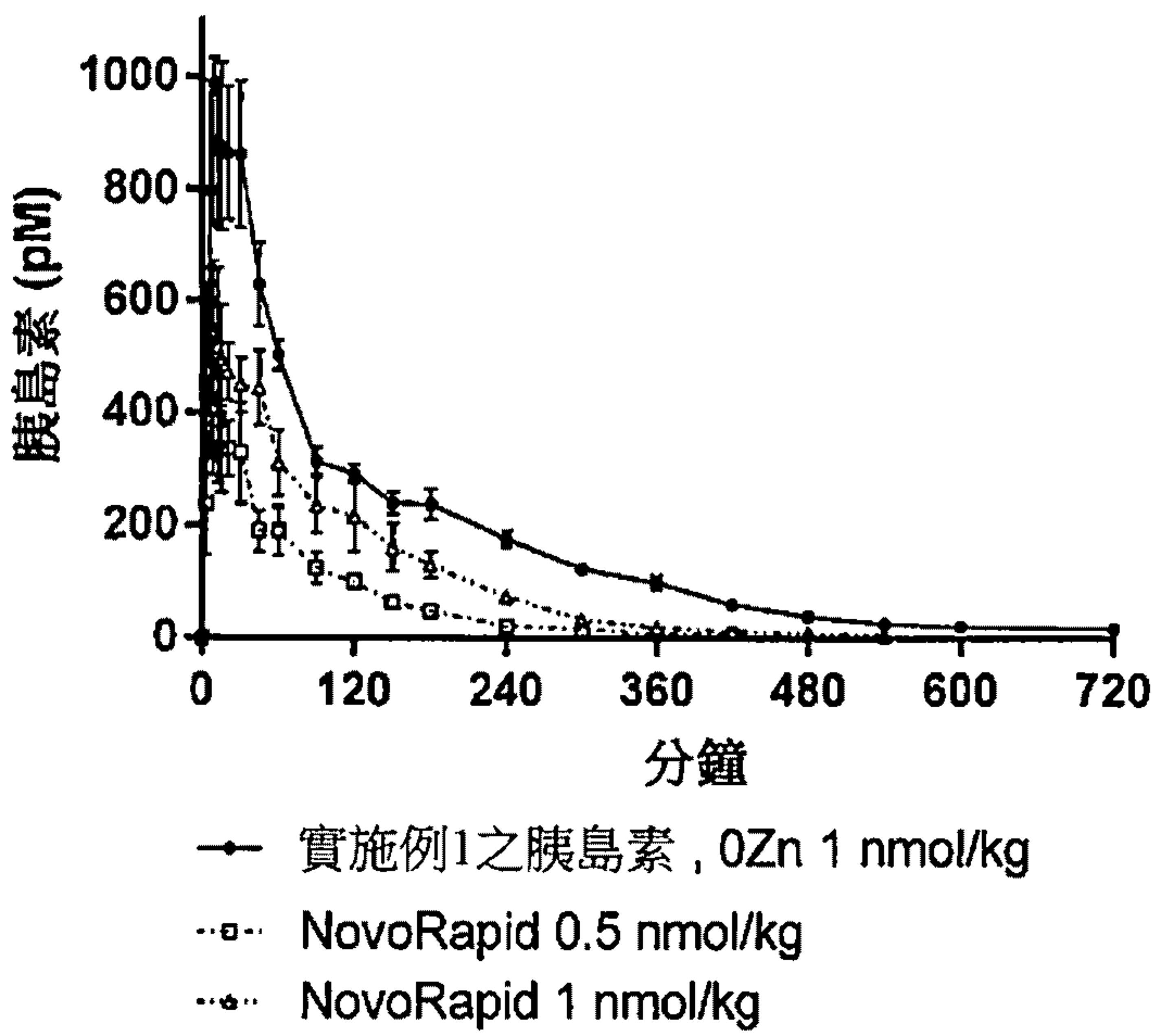


圖1

I686403

發明摘要

※ 申請案號：104106145

※ 申請日：104年2月26日

※IPC 分類：
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

新穎胰島素衍生物及其醫療用途

NOVEL INSULIN DERIVATIVES AND THE MEDICAL USES HEREOF

【中文】

本發明屬於與糖尿病相關之醫學病狀之藥物的治療領域。更特定言之，本發明係關於人類胰島素類似物之新穎醯化衍生物。本發明亦提供包含此類胰島素衍生物之醫藥組成物，且係關於此類衍生物用於治療或預防與糖尿病相關之醫學病狀的用途。

【英文】

The present invention is in the therapeutic fields of drugs for medical conditions relating to diabetes. More specifically the invention relates to novel acylated derivatives of human insulin analogues. The invention also provides pharmaceutical compositions comprising such insulin derivatives, and relates to the use of such derivatives for the treatment or prevention of medical conditions relating to diabetes.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

新穎胰島素衍生物及其醫療用途

NOVEL INSULIN DERIVATIVES AND THE MEDICAL USES HEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明屬於與糖尿病相關之醫學病狀之藥物的治療領域。更特定言之，本發明係關於人類胰島素類似物之新穎鹽化衍生物。本發明亦提供包含此類衍生之胰島素類似物之醫藥組成物，且係關於此類衍生物用於治療或預防與糖尿病相關之醫學病狀的用途。

【先前技術】

【0002】 用於治療糖尿病之胰島素療法已使用了數十年。胰島素療法通常涉及每天投予若干胰島素注射劑。此類療法通常涉及每天一次或兩次投予長期作用基礎注射劑，及進餐時投予快速作用胰島素注射劑（亦即膳食性用途）。胰島素療法中之一個關鍵改良為引入快速作用胰島素類似物。然而，即使在快速作用胰島素類似物之情況下，直到注射之後 50 至 70 分鐘峰值胰島素含量典型地仍不會出現。

【0003】 因而，胰島素注射劑並不能複製胰島素之天然時間-作用特徵。詳言之，在未患糖尿病之個人中第一階段胰島素釋放的天然迅速增加使得血液胰島素含量在葡萄糖從膳食進入血液若干分鐘內就上升。相比之下，注射的胰島素僅緩慢進入血液，並且峰值胰島素含量在注射常規人類胰島素之後 80 至 100 分鐘內出現。

【0004】 因為快速作用胰島素類似物並不能充分模擬第一階段胰島

素釋放，所以使用胰島素療法之糖尿病患者持續在開始用餐時存在胰島素含量不充分並且在用餐之間存在胰島素過多。此胰島素遞送滯後可能在用餐開始後不久導致高血糖症。

【0005】 胰島素具有自締合特性，並且其濃度表示自締合之主要因素。在高濃度下，尤其在醫藥調配物中，胰島素將自締合成二聚體、六聚體、十二聚體及晶體。然而，生理學活性形式之胰島素為單體，其與胰島素受體結合且觸發生物反應。

【0006】 胰島素作用之快速性視胰島素自皮下組織吸收多快而定。當皮下注射常規人類胰島素時，調配物主要由含有兩個鋅離子之六聚體構成。由於其尺寸，故六聚胰島素具有較低擴散速率，且因此，吸收速率比較小物質慢。

【0007】 位於六聚體內的為兩個鋅原子，其使分子對於化學及物理降解穩定。注射後，在皮下組織中出現濃度驅動之動態平衡，致使六聚體分解成二聚體，且接著分解成單體。歷史上，此等常規人類胰島素調配物需要約 120 分鐘來到達最大血漿濃度水準。與常規人類胰島素相比吸收更快之鋅-胰島素製劑已經商品化，例如門冬胰島素及離脯胰島素。

【0008】 無鋅胰島素調配物將能夠更快地皮下吸收，但一般對於胰島素，無鋅調配物之化學及物理穩定性為一個難題。

【0009】 已提出多種胰島素衍生物用於不同用途。

【0010】 WO 1998 042749 描述用於經肺投予之無鋅胰島素結晶。

【0011】 US 6960561 描述具有改良穩定性之無鋅及低鋅胰島素製劑。

【0012】 WO 2007/096431 描述某些人類胰島素衍生物，其包括在位置

A22 處擁有醯化離胺酸殘基、在位置 B29 中擁有精胺酸殘基及為 desB30 之類似物 i.a.，該等衍生物在生理 pH 值下可溶且具有延長之作用特徵，且意欲用作長期作用胰島素。

【0013】 WO 2009/022013 描述某些醯化胰島素類似物，其包括在位置 A22 處擁有醯化離胺酸殘基、在位置 B29 中擁有精胺酸殘基及為 desB30 之類似物 i.a.，其具有較高胰島素受體結合親和力，且意欲用作長期作用胰島素。

【0014】 WO 2009/112583 描述某些胰島素類似物，其包括在位置 A22 處擁有離胺酸殘基、在位置 B29 中擁有精胺酸殘基及為 desB30 之類似物，其展示改良之蛋白酶穩定性。

【0015】 WO 2011/161124 描述穩定性改良之某些含有額外二硫鍵之醯化胰島素類似物，其包括在位置 A22 處擁有離胺酸殘基、在位置 B29 中擁有精胺酸殘基及為 desB30 之類似物 i.a.。

【0016】 WO 2012/171994 描述包含兩個或兩個以上取代之某些胰島素衍生物，其包括在位置 A22 處擁有醯化離胺酸殘基、在位置 B29 中擁有精胺酸殘基及為 desB30 之類似物 i.a.，其活體內活性延長。

【0017】 WO 2013 063572 描述視情況不含鋅之超濃縮快速作用胰島素類似物調配物。

【0018】 此外，具有白蛋白結合部之肽及蛋白質之分醯化已用以延長肽及蛋白質作用之持續時間。

【0019】 然而，尚未報導本發明之胰島素衍生物，且從未提出其作為膳食性用途之快速作用胰島素衍生物之用途。

【發明內容】

【0020】 本發明之一目標為提供在皮下投予之後具有膳食性特徵之胰島素類似物。

【0021】 本發明之另一目標為提供在調配物中化學上穩定之胰島素類似物。

【0022】 A 本發明之第三目標為提供在無添加鋅之調配物中化學上穩定之胰島素類似物。

【0023】 本發明之第四目標為提供在調配物中化學上穩定之胰島素類似物。

【0024】 本發明之第五目標為提供在無添加鋅之調配物中物理上穩定之胰島素類似物。

【0025】 本發明之第六目標為提供在調配物中化學及物理上穩定之胰島素類似物。

【0026】 本發明之第七目標為提供在無添加鋅之調配物中化學及物理上穩定之胰島素類似物。

【0027】 本發明之第八目標為提供皮下投予之後相對於目前市售之膳食性胰島素有肝臟優勢之胰島素類似物。

【0028】 本發明之第九目標為提供皮下投予之後相對於目前市售之膳食性胰島素有肝臟選擇性之胰島素類似物。

【0029】 本發明之第十目標為提供膳食性皮下投予之後相對於目前市售之膳食性胰島素較不易於誘發低血糖症之胰島素類似物。

【0030】 本發明之第十一目標為提供膳食性皮下投予之後相對於目

前市售之膳食性胰島素較不易於誘發體重增加之胰島素類似物。

【0031】 本發明之第十二目標為提供膳食性皮下投予之後相對於目前市售之膳食性胰島素較不易於誘發低血糖症及體重增加之胰島素類似物。

【0032】 本發明之其他目標為描繪上述目標中的一或多個之組合，且尤其提供皮下投予之後展示膳食性特徵，同時在調配物中，且尤其在無添加鋅之調配物中化學上穩定之胰島素類似物。

本發明之概述

【0033】 吾人已發現本發明之 A22K 醯化胰島素衍生物相對於先前技術之類似胰島素衍生物具有明顯改良之特性。吾人尤其已發現在不含有添加鋅離子之調配物中及當與先前技術之類似衍生物相比時，本發明之胰島素衍生物與較小尺寸之分子聚集體有關。已知較小物質比較大物質更快速擴散，且因此預期會更快地吸收。此等分子聚集體之尺寸可例如如本文所述藉由小角 X 射線散射（SAXS）及藉由進行如實施例部分中所述之一系列 SEC-HPLC（尺寸排阻 HPLC）稀釋來量測。

【0034】 吾人亦已發現在不含有添加鋅離子之調配物中，相對於先前技術之類似衍生物，本發明之胰島素衍生物在皮下投予豬之後會更快速地吸收，由此表明作為胰島素用於膳食性用途之潛在臨床效用。吾人已發現在不含添加鋅離子之調配物中，相對於先前技術之類似衍生物，本發明之胰島素衍生物在皮下投予豬之後與較小「拖尾」有關。較小拖尾意謂與先前技術之類似物相比，所注射之胰島素之皮下藥物儲槽吸收更快速，使得與先前技術之類似醯化衍生物相比時，本發明之胰島素衍生物在皮下投予

後之平均滯留時間（MRT）更短。

【0035】 無鋅調配物能夠更快地皮下吸收，但一般對於胰島素，無鋅調配物之化學及物理穩定性為一個難題，且迄今為止僅在離麩胰島素（Apidra®；B3K、B29E 人類胰島素）之情況下及僅當分配於小瓶中時在表面活性劑存在下展示出可能性。

【0036】 吾人目前已發現在無添加鋅離子且無添加界面活性劑之調配物中，一小類在位置 B3 發生取代之本發明之 A22K 醯化胰島素衍生物極出乎意料且前所未有地為化學與物理上穩定的。

【0037】 使用醯化胰島素衍生物作為膳食性胰島素療法之益處為獲得高於用非醯化膳食性胰島素（如門冬胰島素、離脯胰島素或離麩胰島素）治療所獲得之血漿胰島素濃度。

【0038】 本發明之 A22K 醯化胰島素衍生物在皮下投予之後具有膳食樣時間-作用特徵。

【0039】 已展示本發明之具有十四烷二酸、十五烷二酸或十六烷二酸類白蛋白黏合劑之 A22K 醯化胰島素衍生物使得具有極高胰島素受體結合親和力，在 1.5% 人類血清白蛋白（human serum albumin，HSA）存在下親和力會降低。

【0040】 本發明之 A22K 醯化胰島素衍生物在生理鹽濃度下並未降低可溶性。

【0041】 因此，在其第一態樣中，本發明提供新穎胰島素衍生物，該等胰島素衍生物為人類胰島素類似物之醯化衍生物，該等類似物相對於人類胰島素為[A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物藉由用式 II

之基團醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基來衍生

[醯基]-[連接子]-

其中連接子基團為由 1 至 10 個選自-gGlu-及-OEG-之胺基酸殘基構成之胺基酸鏈；其中 gGlu 表示 γ 羧胺酸殘基；OEG 表示 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸二氧雜辛酸之殘基（亦即，式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-之基團）；該等胺基酸殘基可以任何順序存在；且該胺基酸鏈包括至少一個 gGlu 殘基；且

其中醯基為選自 1,14-十四烷二酸；1,15-十五烷二酸；及 1,16-十六烷二酸之 α, ω -二羧酸之殘基；

該醯化類似物可另外包含 A14E 及/或 B3E 或 B3Q 取代。

【0042】 在另一第一態樣中，本發明提供包含本發明之胰島素衍生物及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑之醫藥組成物。

【0043】 在另一態樣中，本發明係關於本發明之胰島素衍生物作為醫藥品之用途。

【0044】 在另一態樣中，本發明提供治療、預防或緩解與以下相關之疾病、病症或病狀之方法：糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病、葡萄糖耐受性異常、高血糖症、血脂異常、肥胖、代謝症候群（代謝症候群 X、胰島素抗性症候群）、高血壓、認知障礙、動脈粥樣硬化、心肌梗塞、中風、心臟血管病、冠心病、發炎性腸症候群、消化不良或胃潰瘍，該方法包含向有需要之個體投予治療有效量之本發明之胰島素衍生物。

【0045】 本發明之其他目標對於熟習此項技術者而言將自以下實施方式及實施例而變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0046】 藉由參考隨附圖式來進一步說明本發明。

圖 1 展示相較於 NovoRapid®/NovoLog®（門冬胰島素，市售調配物，每 6 個胰島素分子 3 個鋅）（0.5 及 1 nmol/kg）之藥物動力學（pharmacokinetic, PK）特徵，以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之實施例 1 之胰島素衍生物（1 nmol/kg）之特徵（胰島素濃度對時間）；

圖 2 展示與圖 1 中相同之資料，但僅展示前 2 小時；

圖 3a 展示與圖 1 中相同之資料，但僅展示相較於 NovoRapid®/NovoLog®（門冬胰島素，市售調配物，每 6 個胰島素分子 3 個鋅）（1 nmol/kg）之特徵，以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之實施例 1 之胰島素衍生物（1 nmol/kg）之資料；

圖 3b 展示源自圖 3a 中之胰島素特徵之所得血漿葡萄糖變化；

圖 4a 及 4b 展示相較於 NovoRapid®/NovoLog®（門冬胰島素，市售調配物，每 6 個胰島素分子 3 個鋅）（0.5 及 1 nmol/kg）之 PK（藥物動力學）特徵，以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之實施例 2 之胰島素（1 nmol/kg）之特徵（胰島素濃度對時間）；

圖 5a 及 5b 展示與圖 4a 及 4b 中相同之資料，但僅分別展示相較於 NovoRapid®/NovoLog®（門冬胰島素，市售調配物，每 6 個胰島素分子 3 個鋅）（1 nmol/kg）之特徵，以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之實施例 2 之胰島素（1 nmol/kg）之資料，及所得血漿葡萄糖變化；

圖 6 及 7 分別展示以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之實施例 11 之胰島素（1 nmol/kg）之 PK（藥物動力學）特徵（胰島素濃度對時間），及所得血漿葡萄糖變化；

圖 8 及 9 分別展示以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之實施例 44 之胰島素（1 nmol/kg）之 PK（藥物動力學）特徵（胰島素濃度對時間），及所得血漿葡萄糖變化（1 nmol/kg）；

圖 10 及 11 分別展示以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之先前技術 A22K(N(e)s)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素（WO 2009/022013，實施例 45）之胰島素（1 nmol/kg）之 PK（藥物動力學）特徵（胰島素濃度對時間），及所得血漿葡萄糖變化（1 nmol/kg）；

圖 12 及 13 分別展示以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之先前技術（WO 2009/022013，實施例 45，圖 10 及 11 中所示）所表示之十四烷二酸類似物（72 nmol/kg）之 PK（藥物動力學）特徵（胰島素濃度對時間），及所得血漿葡萄糖變化；

圖 14A、14B 及 14C 展示螢光對時間曲線，可由此將滯後時間估計為滯後區域與原纖維化區域之線性接近之間的交切；

圖 15 展示實施例 2 之胰島素衍生物在不存在/存在 170 mM 菸鹼醯胺之情況下在肥胖 Zucker 大鼠中皮下注射後之 PK/PD 特徵；

圖 16 至 17 展示實施例 7 之胰島素衍生物在不存在/存在 170 mM 菸鹼醯胺之情況下在肥胖 Zucker 大鼠中皮下注射後之 PK/PD 特徵；

圖 18 至 19 展示實施例 7 之胰島素衍生物在不存在/存在 170 mM 菸鹼醯胺之情況下在肥胖 Zucker 大鼠中皮下注射後之 PK/PD 特徵；且

圖 20 至 21 展示實施例 4 之胰島素衍生物在不存在/存在 170 mM 菸鹼醯胺之情況下在肥胖 Zucker 大鼠中皮下注射後之 PK/PD 特徵；

【實施方式】

胰島素衍生物

【0047】 在第一態樣中，本發明提供新穎胰島素衍生物，該胰島素衍生物為人類胰島素之醯化類似物。

【0048】 本發明之胰島素衍生物尤其可表徵為人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A22K、desB27、B29R、desB30]；

且該胰島素類似物藉由用式 II 之基團醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基來衍生

[醯基]-[連接子]-

其中連接子基團為由 1 至 10 個選自-gGlu-及-OEG-之胺基酸殘基構成之胺基酸鏈；其中 gGlu 表示 γ 羧胺酸殘基；OEG 表示 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸二氧雜辛酸之殘基（亦即，式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-之基團）；該等胺基酸殘基可以任何順序存在；且該胺基酸鏈包括至少一個 gGlu 殘基；且

其中醯基為選自 1,14-十四烷二酸；1,15-十五烷二酸；及 1,16-十六烷二酸之 α, ω -二羧酸之殘基。

【0049】 本發明之胰島素衍生物可另外包含 A14E 及/或 B3E 或 B3Q 取代。

【0050】 在一個具體實例中，人類胰島素之類似物相對於人類胰島素為[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]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

【0051】 在另一具體實例中，人類胰島素之類似物相對於人類胰島素

為[A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

【0052】 在第三具體實例中，人類胰島素之類似物相對於人類胰島素為[A22K、B3E、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

【0053】 在第四具體實例中，人類胰島素之類似物相對於人類胰島素為[A22K、B3Q、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

【0054】 在第五具體實例中，人類胰島素之類似物相對於人類胰島素為[A14E、A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

【0055】 在第六具體實例中，人類胰島素之類似物相對於人類胰島素為[A14E、A22K、B3E、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

【0056】 如上所述，胰島素類似物藉由用如上所述式 II 之基團（亦即擁有結合至鍵聯基團之醯基的取代基）醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基來衍生。

【0057】 在本發明之情形下，式 II 之鍵聯基團為由 1 至 10 個選自 -gGlu- 及 -OEG- 之胺基酸殘基構成之胺基酸鏈。

【0058】 在一個具體實例中，式 II 鍵聯基團為由 1 至 7 個選自 -gGlu- 及 -OEG- 之胺基酸殘基構成之胺基酸，其包含 1 至 4 個 gGlu 殘基及 0 至 3 個 OEG 殘基。

【0059】 在另一具體實例中，式 II 之鍵聯基團係選自 -gGlu- ； -2xgGlu- ； -3xgGlu- ； -4xgGlu- ； -gGlu-2xOEG- ； -gGlu-3x(OEG-gGlu)- ； -4xgGlu-2xOEG- ； -2xOEG- ； 及 -2xOEG-gGlu- 。

【0060】 在第三具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -gGlu- 。

【0061】 在第四具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -2xgGlu- 。

【0062】 在第五具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -3xgGlu- 。

【0063】 在第六具體實例中，式 II 鍵聯基團為 -4xgGlu- 。

【0064】 在第七具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -gGlu-2xOEG- 。

【0065】 在第八具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -gGlu-3x(OEG-gGlu)- 。

【0066】 在第九具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -4xgGlu-2xOEG- 。

【0067】 在第十具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -2xOEG- 。

【0068】 在第十一具體實例中，式 II 之鍵聯基團為 -2xOEG-gGlu- 。

【0069】 在本發明之情形下，式 II 之醯基衍生自 1,14-十四烷二酸； 1,15-十五烷二酸；或 1,16-十六烷二酸。

【0070】 在一個具體實例中，式 II 之醯基衍生自 1,14-十四烷二酸(亦即 1,14-十四烷二醯基)。

【0071】 在另一具體實例中，式 II 之醯基衍生自 1,15-十五烷二酸(亦即 1,15-十五烷二醯基)。

【0072】 在第三具體實例中，式 II 之醯基衍生自 1,16-十六烷二酸(亦即 1,16-十六烷二醯基)。

【0073】 在另一具體實例中，如上所述式 II 之基團為十四烷二醯基 -gGlu- ； 十四烷二醯基-2xgGlu- ； 十四烷二醯基-3xgGlu- ； 十四烷二醯基

-4xGlu-；十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-；十四烷二醯基-4xGlu-2xOEG-；十四烷二醯基-2xOEG-；十五烷二醯基-4xGlu；十六烷二醯基-4xGlu-；十六烷二醯基-gGlu-2xOEG-；或十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu-。

【0074】 在另一具體實例中，式 II 之基團為十四烷二醯基-gGlu-。

【0075】 在第三具體實例中，式 II 之基團為十四烷二醯基-2xGlu-。

【0076】 在第四具體實例中，式 II 之基團為十四烷二醯基-3xGlu-。

【0077】 在第五具體實例中，式 II 之基團為十四烷二醯基-4xGlu-。

【0078】 在第六具體實例中，式 II 之基團為十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-。

【0079】 在第七具體實例中，式 II 之基團為十四烷二醯基-2xOEG-。

【0080】 在第八具體實例中，式 II 之基團為十四烷二醯基-4xGlu-2xOEG-。

【0081】 在第九具體實例中，式 II 之基團為十五烷二醯基-4xGlu-。

【0082】 在第十具體實例中，式 II 之基團為十六烷二醯基-4xGlu-。

【0083】 在第十一具體實例中，式 II 之基團為十六烷二醯基-gGlu-2xOEG-。

【0084】 在第十二具體實例中，式 II 之基團為十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu-。

【0085】 本發明之胰島素衍生物尤其可為選自由以下組成之群者：

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人

類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3E、desB27、B29R、

desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3Q、desB27、B29R、

desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島

素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島

素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類胰島

素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十五烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人

類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、

desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；及

A22K(Meps)-十四烷二醯基-3xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素。

本發明化合物之較佳特徵

【0086】 本發明可參考以下特徵中之一或多者進一步表徵：

1. 一種人類胰島素之醯化類似物，該類似物為[A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物視情況經 A14E 及/或 B3E 或 B3Q 取代；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處進行醯化。

2. 如條項第 1 項之人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物經 B3E 或 B3Q 取代；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處進行醯化。

3. 如條項第 1 項之人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A22K、B3E、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

4. 如條項第 1 項之人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A22K、B3Q、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

5. 如條項第 1 項之人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A14E、A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

6. 如條項第 1 項之人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰

島素為[A14E、A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物經 B3E 或 B3Q 取代；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處進行醯化。

7. 如條項第 1 項之人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A14E、A22K、B3E、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處發生醯化。

8. 如條項第 1 項之人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A22K、desB27、B29R、desB30]；且該胰島素類似物藉由用式 II 之基團醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基來衍生

[醯基]-[連接子]-

其中該連接子基團為由 1 至 10 個選自-gGlu-及-OEG-之胺基酸殘基構成之胺基酸鏈；其中

gGlu 表示 γ 羧胺酸殘基；且

OEG 表示 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸之殘基（亦即式 -NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-之基團）；

該等胺基酸殘基可以任何順序存在；且

該胺基酸鏈包含至少一個 gGlu 殘基；且

其中該醯基為選自以下之 α,ω -二羧酸之殘基：

1,14-十四烷二酸；

1,15-十五烷二酸；及

1,16-十六烷二酸；

該醯化類似物可另外包含 A14E 及/或 B3E 或 B3Q 取代。

9. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該醯基為衍生自 1,14-十四烷二酸；1,15-十五烷二酸；或 1,16-十六烷二酸之二酸基。

10. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該醯基為衍生自 1,14-十四烷二酸或 1,16-十六烷二酸之二酸基。

11. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該醯基為衍生自 1,14-十四烷二酸之二酸基。

12. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該醯基為衍生自 1,16-十六烷二酸之二酸基。

13. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該醯基為衍生自 1,15-十五烷二酸之二酸基。

14. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 10 個 gGlu 殘基。

15. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 8 個 gGlu 殘基。

16. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 6 個 gGlu 殘基。

17. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 4 個 gGlu 殘基。

18. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 3 個 gGlu 殘基。

19. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 2 個 gGlu 殘基。

20. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含一個 gGlu 殘基。

21. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含兩個 gGlu 殘基。

22. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含三個 gGlu 殘基。

23. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含四個 gGlu 殘基。

24. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 6 個 OEG 殘基。

25. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 4 個 OEG 殘基。

26. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含 1 至 3 個 OEG 殘基。

27. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含一個 OEG 殘基。

28. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含兩個 OEG 殘基。

29. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團包含三個 OEG 殘基。

30. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團不包含 OEG 殘基。

31. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團係選自 -gGlu- ； -2xgGlu- ； -3xgGlu- ； -gGlu-3x(OEG-Glu)- ； -4xgGlu- ； -2xOEG- ； -4xgGlu-2xOEG- ； -2xOEG-gGlu- ； 及 -gGlu-2xOEG- 。

32. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團係選自 -gGlu ； -gGlu-3x(OEG-gGlu)- ； 及 -gGlu-2xOEG- 。

33. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該鍵聯基團係選自 -gGlu- ； -2xgGlu- ； 及 -4xgGlu- 。

34. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該式 II [醯基]-[連接子]-之基團為十四烷二醯基-gGlu- ； 十四烷二醯基-2xgGlu- ； 十四烷二醯基-3xgGlu- ； 十四烷二醯基-4xgGlu- ； 十四烷二醯基-gGlu-2xOEG- ； 十四烷二醯基-2xOEG- ； 十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG- ； 十六烷二醯基-4xgGlu- ； 十六烷二醯基-gGlu-2xOEG- ； 或十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu- 。

35. 如條項第 7 項之人類胰島素之醯化類似物，其中該式 II [醯基]-[連接子]-之基團為十四烷二醯基-gGlu- ； 十四烷二醯基-2xgGlu- ； 十四烷二醯基-4xgGlu- ； 十四烷二醯基-gGlu-2xOEG- ； 或十四烷二醯基-2xOEG- ； 十六烷二醯基-4xgGlu- ； 十六烷二醯基-gGlu-2xOEG- ； 或十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu- 。

定義

術語

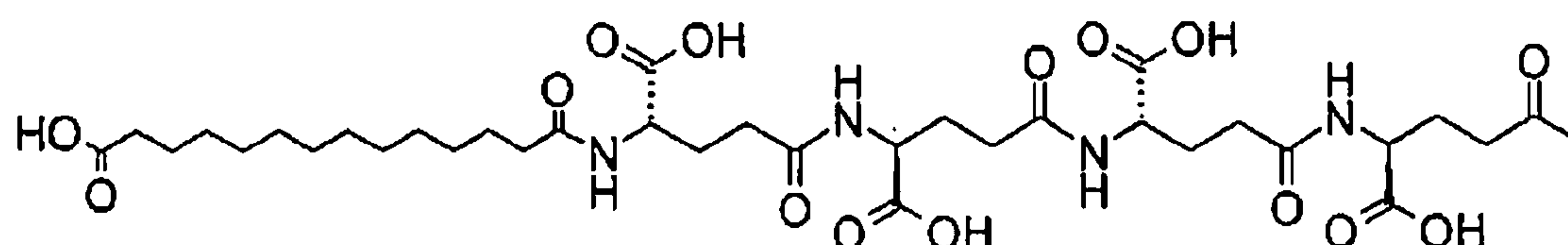
【0087】 在本文中，胰島素之命名根據以下原理進行：

【0088】 術語「類似物 (analogue)」經常在所討論之胰島素蛋白質或肽經歷進一步化學修飾（衍生）且尤其經歷醯化之前用於其。由此類化學

修飾（衍生）所產生之產物通常稱為「衍生物（derivative）」或「醯化類似物（acylated analogue）」。然而，在本申請案之情形下，術語「類似物」表示人類胰島素之類似物以及此類人類胰島素類似物之（醯化）衍生物。

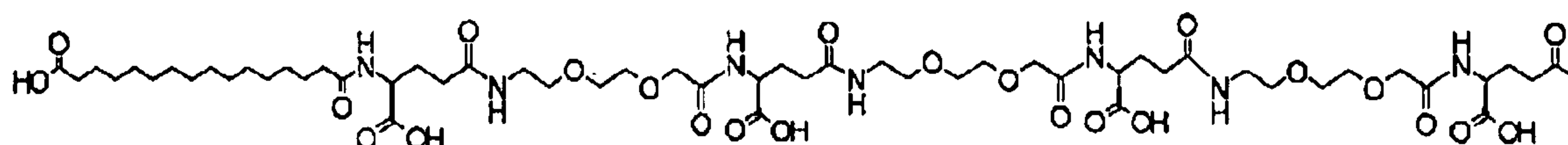
【0089】 該等名稱以相對於人類胰島素之類似物、衍生物及修飾物（醯化物）給出。對於命名醯基部分（亦即式 II 之[醯基]-[連接子]-基團），在一些情況下，根據 IUPAC 命名法進行命名，且在其他情況下以肽命名法進行命名。

【0090】 作為一實例，以下結構之醯基部分（化學製品 1）：



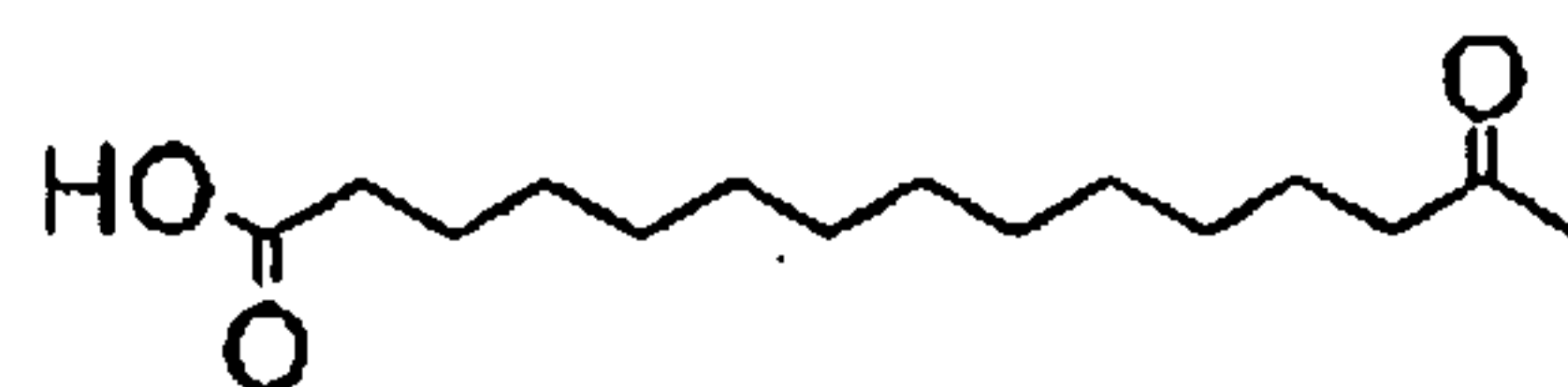
可稱為「十四烷二醯基-4xgGlu」、「十四烷二醯基-4x γ Glu」或「1,14-十四烷二醯基-4xgGlu」或其類似物，其中 γ Glu（及 gGlu）為 L-組態胺基酸 γ 羧胺酸之速記符號，且「4x」意謂之後的殘基重複 4 次。

【0091】 類似地，以下結構之醯基部分（化學製品 2）：



可稱為例如「十六烷二醯基-(gGlu-OEG)₃-gGlu」、「十六烷二醯基-(gGlu-OEG)₃-gGlu」、「十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu」、「1,16-十六烷二醯基-(gGlu-OEG)₃-gGlu」、「1,16-十六烷二醯基-(gGlu-OEG)₃-gGlu」、「1,16-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu」、「十六烷二醯基-(γ Glu-OEG)₃- γ Glu」、「十六烷二醯基-(γ Glu-OEG)₃- γ Glu」或「十六烷二醯基-3x(γ Glu-OEG)- γ Glu」；

其中以下結構之部分（化學製品 3）：



可稱為例如十四烷二醯基、1,14-十四烷二醯基或（速記符號）C14 二酸。類似符號應用於具有 15 及 16 個碳原子之類似殘基，分別為十五烷二醯基，C15 二酸；及十六烷二醯基，C16 二酸。

【0092】 γ Glu（及 gGlu）為 L-組態之胺基酸 γ 麩胺酸之速記符號。

【0093】 OEG 為胺基酸殘基 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 之速記符號。

【0094】 「2x」及「3x」意謂之後的殘基分別重複 2 次、3 次。

【0095】 舉例而言，實施例 1 之胰島素衍生物稱為「A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素」，指示含有人類胰島素中之 21 個胺基酸殘基之 A-鏈已藉由 1 個胺基酸（位置 A22）用離胺酸（K）延伸，其藉由對 A22 之離胺酸殘基中之 ϵ 氮醯化來進一步修飾，表示為帶有部分十四烷二醯基-4xgGlu 之 N^ϵ （或 Meps），人類胰島素中之位置 B27 中之胺基酸 T 已缺失，人類胰島素中之位置 B29 中之胺基酸 K 已經精胺酸 R 取代，人類胰島素中之位置 B30 中之胺基酸蘇胺酸 T 已缺失。下式中之星號指示與人類胰島素相比所討論之殘基不同（亦即經取代）。及

【0096】 在整個本申請案中，給出本發明之較佳胰島素之式與名稱。

【0097】 另外，本發明之胰島素亦根據 IUPAC 命名法（OpenEye，IUPAC 型式）命名。根據這一命名法，實施例 1 之胰島素衍生物指定為以

下名稱：N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰島素（人類）-(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-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]-胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。

【0098】 應注意，各式可寫有離胺酸殘基（其藉由醯化來修飾），繪有擴展之離胺酸殘基（如例如實施例 23 中所示）或繪有收縮之離胺酸殘基（如例如實施例 1 中所示）。在所有情況下，醯基連接至離胺酸殘基之 ϵ 氮。

【0099】 為了完整起見，可提及位置 B27 中之殘基缺失（desB27）導致剩餘胺基酸殘基中一個殘基朝向 N 端末端（縮甲醛）移動。因此，此類類似物亦可稱為 B27P、B28R、desB29-30，因為位置 B28 中之殘基為脯胺酸且位置 B29 中之殘基為精胺酸（參見例如實施例 1 之化合物）。此情況係因為缺失 B27，序列中之下一個胺基酸接著會移位，且因此位置 B28 中之胺基酸（脯胺酸）會移位至 B27 位置。

物理穩定性

【0100】 如本文所用，術語胰島素製劑之「物理穩定性（physical stability）」係指蛋白質於蛋白質暴露於熱機械應力及/或與去穩定化之界面及表面（諸如疏水性表面及界面）之相互作用而形成蛋白質之生物惰性及/或不溶性聚集體之傾向性。水性蛋白質製劑之物理穩定性藉助於使填充於合適容器（例如藥筒或小瓶）中之製劑在不同溫度下曝露於機械/物理應力（例如攪拌）持續多個時間段之後目視檢查及/或進行濁度量測來評估。目視檢查製劑可在暗背景下、在銳聚焦光中進行。一種製劑當其在日光下展示可見的混濁時，其就蛋白質聚集而言可歸類為物理學上不穩定的製劑。或者，可藉

由熟習此項技術者熟知之簡單濁度量測來評估製劑之濁度。水性蛋白質製劑之物理穩定性亦可藉由使用蛋白質構象形態之光譜分析劑或探針來評估。探針較佳為優先結合蛋白質之非天然構象異構體之小分子。蛋白質結構之小分子光譜分析探針之一個實例為硫代黃素 T。硫代黃素 T 為已廣泛用於偵測澱粉狀蛋白原纖維之螢光染料。在原纖維以及可能存在之其他蛋白質構型存在下，硫代黃素 T 當結合至原纖維蛋白質形式時在約 450 nm 下產生新穎激發最大值且在約 482 nm 下產生增強之發射。非結合硫代黃素 T 在該等波長下基本上為非螢光。

化學穩定性

【0101】 如本文所用，術語蛋白質製劑之「化學穩定性（chemical stability）」係指共價蛋白質結構變化從而形成化學降解產物，其具有與天然蛋白質結構相比可能較小之生物效力及/或可能增加之免疫原性特性。視天然蛋白質之類型及性質以及蛋白質所暴露之環境而定，可以形成多種化學降解產物。通常在蛋白質製劑存儲及使用期間會看到化學降解產物之量增加。大多數蛋白質易於去醯胺化，亦即一種使麩醯胺醯基或天冬醯胺醯基殘基中之側鏈醯胺基團水解以形成自由羧酸或使天冬醯胺醯基殘基形成 isoAsp 衍生物之方法。其他分解路徑涉及形成高分子量產物，其中兩個或兩個以上蛋白質分子經由轉醯胺作用及/或二硫鍵相互作用彼此共價結合，從而形成共價結合二聚體、寡聚物及聚合物降解產物（Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern TJ & Manning MG, Plenum Press, New York 1992）。氧化（例如甲硫胺酸殘基之氧化）可作為化學降解之另一變化形式提及。可藉由在暴露於不同環境條件之後的多個時間點量測化學降解產物之量來評估

蛋白質製劑之化學穩定性（例如藉由增加溫度通常可加速降解產物形成）。各個別降解產物之量通常藉由視分子尺寸、疏水性及/或電荷而定使用多個層析技術（例如 HPLC 及/或 RP-HPLC）分離降解產物來測定。因為 HMWP 產物可能具有免疫原性且不具有生物活性，所以低含量之 HMWP 為有利的。

合成方法

【0102】 本發明之胰島素衍生物可藉由製備胰島素、胰島素類似物及胰島素衍生物之習知方法及尤其具體實例中所述之方法獲得。

【0103】 在一個具體實例中，本發明之胰島素衍生物藉由用為十四烷二醯基-4xGlu 之式 II 之基團醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基獲得。

【0104】 在另一具體實例中，本發明之胰島素衍生物藉由在高 pH 值下且尤其在 9.5 至 13 範圍內之 pH 值下用為十四烷二醯基-4xGlu 之式 II 之基團醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基獲得。

【0105】 更特定言之，本發明之胰島素衍生物藉由用化合物 (S)-2-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三醯基胺基)-丁醯基胺基)-丁醯基胺基)-丁醯基胺基)-戊二酸 5-(2,5-二側氧基-吡咯啉-1-基)酯（或命名為十四烷二醯基-4xGlu-OSu）（化學製品 4）醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基獲得。

【0106】 在另一具體實例中，本發明之胰島素衍生物藉由用化合物 14-[[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基-2-側氧基乙氧基]乙氧基]乙基-胺基]-2-側氧基乙氧基]乙氧基]乙胺基]-4-氧丁基]胺基]-14-側氧基十四烷酸（或命名為十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-OSu）（化學製

品 5) 醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基獲得。

本合成發明化合物之較佳特徵

【0107】 本發明可參考以下特徵中之一或多者進一步表徵：

1. 一種化合物(S)-2-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三醯基胺基)-丁醯基胺基)-丁醯基胺基)-丁醯基胺基)-戊二酸 5-(2,5-二側氧基-吡咯啉-1-基)酯 (或命名為十四烷二醯基-4xGlu-OSu) (化學製品 4)，其在醯化方法中用作合成本發明之胰島素衍生物中之中間物。

2. 一種化合物 14-(((1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基-2-側氧基乙氧基]乙氧基]乙胺基]-2-側氧基乙氧基]乙氧基]乙胺基]-4-側氧基丁基]胺基)-14-側氧基十四烷酸 (或命名為十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-OSu) (化學製品 5)，其在醯化方法中用作合成本發明之胰島素衍生物中之中間物。

3. 如條項第 1 項至第 2 項中任一項之化合物，其用作胰島素衍生物合成中之中間化合物，該胰島素衍生物為人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素擁有突變 A22K，且在該位置如條項第 1 項至第 2 項中任一項之化合物進行醯化。

4. 如條項第 1 項至第 2 項中任一項之化合物，其用作胰島素衍生物合成中之中間化合物，該胰島素衍生物為人類胰島素之醯化類似物，該類似物相對於人類胰島素為[A22K、desB27、B29R、desB30]，且該類似物在位置 A22K 用如條項第 1 項至第 2 項中任一項之化合物醯化。

5. 如條項第 1 項至第 2 項中任一項之化合物，其用作胰島素衍生物合成中之中間化合物，該胰島素衍生物為人類胰島素之醯化類似物，該類似

物相對於人類胰島素為[A22K、desB27、B29R、desB30]，且該醯化類似物可另外包含 A14E 及/或 B3E 或 B3Q 取代，且該類似物在位置 A22K 用如條項第 1 項至第 2 項中任一項之化合物醯化。

6. 如條項第 1 項之化合物，其用作合成以下各物中之中間化合物：

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；或

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素。

生物活性

【0108】 在另一方面，本發明提供新穎胰島素衍生物，其用作醫藥品或用於製造醫藥品或醫藥組成物。

【0109】 發現本發明之胰島素衍生物為認為充分適用於膳食性用途

之短期且快速作用胰島素衍生物。

【0110】 本發明之胰島素衍生物均具有足以活化胰島素受體以得到所需血糖反應之胰島素受體親和力，亦即能夠降低動物及人類中之血糖。

【0111】 發現本發明之胰島素衍生物具有平衡之胰島素受體（insulin receptor, IR）與胰島素樣成長因子 1 受體（insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R）之親和力比率（IR/IGF-1R）。

【0112】 在一個態樣中，本發明之 A22K 醯化胰島素之 IR/IGF-1R 比率高於 0.3；高於 0.4；高於 0.5；高於 0.6；高於 0.7；高於 0.8；高於 0.9；高於 1；高於 1.5；或高於 2。

【0113】 在另一方面，A22K 醯化胰島素類似物為本發明化合物，其中式 II 之醯基衍生自 1,14-十四烷二酸，且在向豬皮下注射含有 1.6% (w/vol, 近似值) 丙三醇及 30 mM 苯酚/間甲酚之 600 μ M (近似值) 本發明之醯化胰島素類似物之調配物 (pH 7.4) 之後，該醯化胰島素類似物之平均滯留時間 (mean residence time, MRT) 小於 250 分鐘；小於 200 分鐘；小於 175 分鐘；小於 150 分鐘；小於 125 分鐘。

【0114】 在另一具體實例中，A22K 醯化胰島素類似物為本發明化合物，其中式 II 之醯基衍生自 1,16-十六烷二酸，且在向豬皮下注射含有 1.6% (w/vol, 近似值) 丙三醇及 30 mM 苯酚/間甲酚之 600 μ M (近似值) 本發明之醯化胰島素類似物之調配物 (pH 7.4) 之後，該醯化胰島素類似物之平均滯留時間 (MRT) 小於 700 分鐘；小於 600 分鐘；小於 500 分鐘；小於 400 分鐘；小於 300 分鐘。

【0115】 在另一態樣中，本發明係關於本發明之醯化胰島素類似物之

醫藥用途，且尤其係關於此類胰島素衍生物用於治療、預防或緩解與以下相關之疾病、病症或病狀之用途：糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病、葡萄糖耐受性異常、高血糖症、血脂異常、肥胖、代謝症候群（代謝症候群 X、胰島素抗性症候群）、高血壓、認知障礙、動脈粥樣硬化、心肌梗塞、中風、心臟血管病、冠心病、發炎性腸症候群、消化不良或胃潰瘍，該方法包含向有需要之個體投予治療有效量之本發明之胰島素衍生物。

【0116】 在另一具體實例中，本發明係關於此類胰島素衍生物用於治療、預防或緩解與糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病或葡萄糖耐受性異常相關之疾病、病症或病狀之用途，該方法包含向有需要之個體投予治療有效量之本發明之胰島素衍生物。

【0117】 在第三具體實例中，本發明係關於此類胰島素衍生物用於治療、預防或緩解與糖尿病，且尤其 1 型糖尿病或 2 型糖尿病相關之疾病、病症或病狀之用途。

醫藥組成物

【0118】 本發明係關於適用作醫藥品之醯化胰島素類似物。

【0119】 因此，在另一方面，本發明提供新穎的醫藥組成物，其包含治療有效量之本發明之胰島素衍生物。

【0120】 本發明之藥物組成物視情況包含一或多種醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑。

【0121】 本發明之醫藥組成物可進一步包含其他常用於醫藥組成物中之賦形劑，例如防腐劑、螯合劑、張力劑、吸收增強劑、穩定劑、抗氧化劑、聚合物、界面活性劑、金屬離子、油性媒劑及蛋白質（例如人類血

清白蛋白、明膠或蛋白質)。

【0122】 在本發明之一個具體實例中，本發明之醫藥組成物為水性製劑，亦即包含水之製劑。此類製劑典型地為溶液或懸浮液。在另一具體實例中，本發明之醫藥組成物為水溶液。

【0123】 術語「水性製劑 (aqueous preparation)」定義為包含至少 50% w/w 水之製劑。同樣，術語「水溶液 (aqueous solution)」定義為包含至少 50% w/w 水之溶液，且術語「水性懸浮液 (aqueous suspension)」定義為包含至少 50% w/w 水之懸浮液。水性懸浮液可含有活性化合物與適用於製造水溶液懸浮液之賦形劑混合。

【0124】 在本發明之一個具體實例中，胰島素製劑包含本發明之胰島素衍生物之水溶液，其中該胰島素化合物以約 0.1 mM 至約 20.0 mM；更特定言之約 0.2 mM 至約 4.0 mM；約 0.3 mM 至約 2.5 mM；約 0.5 mM 至約 2.5 mM；約 0.6 mM 至約 2.0 mM；或約 0.6 mM 至約 1.2 mM 之濃度存在。

【0125】 在本發明之另一具體實例中，胰島素製劑包含本發明之胰島素衍生物之水溶液，其中該胰島素化合物以約 0.1 mM、約 0.3 mM、約 0.4 mM、約 0.6 mM、約 0.9 mM、約 1.2 mM、約 1.5 mM 或約 1.8 mM 之濃度存在。

【0126】 本發明之醫藥組成物可進一步包含緩衝劑系統。緩衝劑可選自由以下組成之群（但不限於）：乙酸鈉、碳酸鈉、磷酸二氫鈉、磷酸氫二鈉、磷酸鈉及參(羥基甲基)-胺基甲烷、二甘胺酸、麥黃酮、蘋果酸、甘胺醯基-甘胺酸、乙二胺、丁二酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、天冬胺酸或其混合物。此等特定緩衝劑中之一者各構成本發明之替代具體實例。

【0127】 在一個具體實例中，緩衝劑為磷酸鹽緩衝劑。在又一具體實例中，該磷酸鹽緩衝劑之濃度在約 0.1 mM 至 20 mM 之範圍內。在另一具體實例中，該磷酸鹽緩衝劑之濃度在 0.1 mM 至約 10 mM、或約 0.1 mM 至約 8 mM、約 1 mM 至約 8 mM、或約 2 mM 至約 8 mM、或 6 mM 至 8 mM 之範圍內。

【0128】 本發明之可注射醫藥組成物之 pH 值在 3 至 8.5 之範圍內。較佳地，本發明之可注射醫藥組成物之 pH 值在約 6.8 至約 7.8 之範圍內。

【0129】 在一個具體實例中，pH 值在約 7.0 至約 7.8 或 7.2 至 7.6 之範圍內。

【0130】 本發明之胰島素製劑可進一步包含張力劑。張力劑可選自由以下組成之群：鹽（例如氯化鈉）、糖或糖醇、胺基酸（例如 L-甘胺酸、L-組胺酸、精胺酸、離胺酸、異白胺酸、天冬胺酸、色胺酸、蘇胺酸）、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。可使用任何糖，諸如單醣、二醣或多醣或水溶性葡聚糖，包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麥芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、聚葡萄糖、普魯蘭（pullulan）、糊精、環糊精、可溶澱粉、羥乙基澱粉及羧甲基纖維素鈉。在一個具體實例中，糖添加劑為蔗糖。糖醇包含例如甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、甜醇、木糖醇及阿拉伯糖醇。在一個具體實例中，糖醇添加劑為甘露糖醇。上述糖或糖醇可個別或組合使用。此等特定張力劑中之一者或其混合物各構成本發明之替代具體實例。

【0131】 在本發明之一個具體實例中，甘油及/或甘露糖醇及/或氯化

鈉可以與 0 至 250 mM、0 至 200 mM 或 0 至 100 mM 之濃度對應於之量存在。

【0132】 本發明之胰島素製劑可進一步包含醫藥學上可接受之防腐劑。防腐劑可以足以獲得保護作用之量存在。本發明之醫藥組成物中防腐劑之量可由例如領域中之文獻及/或例如市售產品中防腐劑之已知量確定。此等特定防腐劑中之一者或其混合物各構成本發明之替代具體實例。防腐劑在藥物製劑中之用途描述於例如 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 19 版, 1995 中。

【0133】 在一個具體實例中，可注射醫藥組成物包含至少一種酚系化合物作為防腐劑。

【0134】 在另一具體實例中，用於本發明之用途的酚系化合物可高達最終可注射醫藥組成物之約 6 mg/mL，尤其高達最終可注射醫藥組成物之 4 mg/mL 存在。

【0135】 在另一具體實例中，用於本發明之用途的酚系化合物可以高達最終可注射醫藥組成物之約 4.0 mg/mL；尤其約 0.5 mg/mL 至約 4.0 mg/mL；或約 0.6 mg/mL 至約 4.0 mg/mL 之量存在。

【0136】 在另一具體實例中，防腐劑為苯酚。

【0137】 在另一具體實例中，可注射醫藥組成物包含苯酚與間甲酚之混合物作為防腐劑。

【0138】 在另一具體實例中，可注射醫藥組成物包含約 16 mM 苯酚（1.5 mg/mL）及約 16 mM 間甲酚（1.72 mg/mL）。

【0139】 本發明之醫藥組成物可進一步包含螯合劑。螯合劑在醫藥製劑中之用途為熟習此項技術者所熟知。為方便起見，參考 Remington: *The*

Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, 1995。

【0140】 本發明之醫藥組成物可進一步包含吸收增強劑。吸收增強劑之群組可包括（但不限於）菸鹼化合物。術語菸鹼化合物包括菸鹼鹽胺、菸鹼酸、煙酸、煙酸鹽胺及維生素 B3 及/或其鹽及/或其任何組合。

【0141】 在一個具體實例中，菸鹼化合物為菸鹼鹽胺及/或菸鹼酸及/或其鹽。在另一具體實例中，菸鹼化合物為菸鹼鹽胺。用於本發明之用途的菸鹼化合物尤其可為 *N*-甲基菸鹼鹽胺、*N,N*-二乙基菸鹼鹽胺、*N*-乙基菸鹼鹽胺、*N,N*-二甲基菸鹼鹽胺、*N*-丙基菸鹼鹽胺或 *N*-丁基菸鹼鹽胺。

【0142】 在另一具體實例中，菸鹼化合物以約 5 mM 至約 200 mM 之量；尤其約 20 mM 至約 200 mM 之量；約 100 mM 至約 170 mM 之量；或約 130 mM 至約 170 mM 之量存在，諸如約 130 mM、約 140 mM、約 150 mM、約 160 mM 或約 170 mM。

【0143】 本發明之醫藥組成物可進一步包含穩定劑。如本文所用，術語「穩定劑（stabilizer）」係指添加至含有多肽之醫藥製劑中以使肽穩定，亦即增加此類製劑之存放期及/或使用時間之化學製品。為方便起見，參考 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 19 版, 1995。

【0144】 本發明之醫藥組成物可進一步包含一定量之胺基酸鹼基以足以及在組成物存儲期間降低藉由多肽或蛋白質形成聚集體。術語「胺基酸鹼基（amino acid base）」係指胺基酸或胺基酸之組合，其中任何既定胺基酸以其自由鹼形式或其鹽形式存在。胺基酸尤其可為精胺酸、離胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、胺基胍、鳥胺酸或 *N*-單乙基 L-精胺酸、乙硫胺酸或丁硫胺酸或 S-甲基-L 半胱胺酸。在本發明之一個具體實例中，胺基酸鹼基可以與

1 至 100 mM；1 至 50 mM；或 1 至 30 mM 之濃度對應之量存在。

【0145】 在一個具體實例中，本發明之醫藥組成物可進一步包含界面活性劑。如本文所用，術語「界面活性劑 (surfactant)」係指包含水溶性（親水性）部分、頂部及脂溶性（親脂性）片段之任何分子或離子。界面活性劑較佳積聚在界面處，其中親水性部分取向朝向水（親水相）且該親脂性部分取向朝向油或疏水相（亦即玻璃、空氣、油等）。界面活性劑開始形成微胞之濃度被稱為臨界微胞濃度或 CMC。此外，界面活性劑使液體之表面張力降低。界面活性劑亦稱為兩親媒性化合物。界面活性劑在醫藥製劑中之用途為熟習此項技術者所熟知。為方便起見，參考 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 19 版, 1995。

【0146】 本發明進一步係關於製備此類胰島素製劑之方法。本發明之胰島素製劑可藉由使用許多公認方法中的任一者來製備。舉例而言，製劑可藉由混合賦形劑之水溶液與胰島素衍生物之水溶液來製備，其後將 pH 值調節至所需水準且用水將混合物補足至最終體積，隨後無菌過濾。

無鋅醫藥組成物

【0147】 胰島素製劑傳統地包含呈例如氯化物或乙酸鹽形式添加之鋅以獲得醫藥製劑之可接受之穩定性。然而，已出人意料地發現某些本發明之胰島素衍生物可在不添加鋅之情況下在維持足夠化學及物理穩定性的同時調配至醫藥組成物中，由此得以與需要 Zn^{2+} 離子以維持足夠化學及物理穩定性之可比胰島素類似物相比更快地起始作用。無鋅調配物會自皮下組織更快地吸收，且因此顧及膳食性用途。

【0148】 在此態樣中，需要提及無鋅胰島素醫藥組成物實際上難以獲

得，因為痕量鋅或多或少可存在於習知用於製造醫藥組成物之賦形劑中，且尤其用於醫藥容器之橡膠材料中。

【0149】 因此，在一個態樣中，本發明提供包含調配成低鋅組成物之本發明之胰島素衍生物之醫藥組成物，亦即不單獨添加鋅至製劑中。此類醫藥組成物通常稱為「無鋅組成物」，但實際上可將其視為「低鋅組成物」。

【0150】 然而，可提供無鋅賦形劑，讓本發明之胰島素衍生物實際上製備無鋅醫藥組成物。因此，在另一態樣中，本發明提供包含本發明之胰島素衍生物及一或多種醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑不含任何鋅之無鋅醫藥組成物。

【0151】 此外，吾人發現一小類位置 B3 中擁有取代之本發明之 A22K 醯化胰島素衍生物增加了不添加鋅離子且無添加界面活性劑調配之醫藥組成物之化學及物理穩定性。因此，在另一態樣中，本發明提供一種如上所述低鋅或無鋅醫藥組成物，其包含有包含位置 B3 中之額外取代（亦即 B3E 或 B3Q）的本發明之胰島素衍生物及一或多種醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑，然而在該醫藥組成物中尚未添加界面活性劑。

【0152】 在一個具體實例中，本發明提供一種在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物之醫藥組成物，其包含胰島素衍生物及一或多種醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑，其中胰島素衍生物為人類胰島素之醯化類似物，該類似物

相對於人類胰島素為[A22K、B3E 或 B3Q、desB27、B29R、desB30]；

且該胰島素類似物藉由用式 II 之基團醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基來衍生

[醯基]-[連接子]-

其中該連接子基團為由 1 至 10 個選自-gGlu-及-OEG-之胺基酸殘基構成之胺基酸鏈；其中

gGlu 表示 γ 羧胺酸殘基；

OEG 表示 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸之殘基（亦即式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-之基團）；

該等胺基酸殘基可以任何順序存在；且

該胺基酸鏈包含至少一個 gGlu 殘基；且其中該醯基為選自以下之 α, ω -二羧酸之殘基：

1,14-十四烷二酸；

1,15-十五烷二酸；及

1,16-十六烷二酸；

該醯化類似物可另外包含 A14E 取代。

【0153】 在另一具體實例中，位置 B3 中之額外取代為 B3E。

【0154】 在第三具體實例中，位置 B3 中之額外取代為 B3Q。

【0155】 在第四具體實例中，本發明提供一種在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物之醫藥組成物，其包含選自以下之人類胰島素之醯化類似物：

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 胰島素；

A22K(Neps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30

胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十五烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-3xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；及

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰

島素。

【0156】 在另一具體實例中，本發明提供一種如上所述低鋅醫藥組成物，其中鋅離子可以與每 6 個胰島素分子少於 0.2 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.15 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.12 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.1 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.09 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.08 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.07 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.06 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.05 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.04 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.03 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.02 個 Zn^{2+} 離子；每 6 個胰島素分子少於 0.01 個 Zn^{2+} 離子之濃度對應之量存在。

【0157】 在另一具體實例中，本發明提供一種調配為可注射組成物之如上所述低鋅或無鋅醫藥組成物。本發明之醫藥組成物可使用所屬領域中已知之習知方法獲得。舉例而言，組分可以水溶液之形式混合在一起，其後將 pH 值調節至所需水準且用水將混合物補足至最終體積，隨後無菌過濾。

【0158】 可藉助於注射器（視情況藉助於筆樣注射器）藉由皮下、肌

肉內、腹膜內或靜脈內注射來進行非經腸投藥。或者，非經腸投藥可藉助於輸注泵進行。作為另一選項，含有本發明胰島素化合物之胰島素製劑亦可適於經皮投予，例如藉由無針注射或微針貼片（視情況選用之離子導入式貼片）或經黏膜（例如頰內）投予。

【0159】 本發明之胰島素製劑可在多個部位投予需要此治療之患者，例如局部部位，例如皮膚及黏膜部位；規避吸收之部位，例如動脈內、靜脈內、心臟內投予；及涉及吸收之部位，例如皮膚內、皮下、肌肉內或腹腔內投予。

【0160】 在一個具體實例中，本發明之胰島素製劑充分適合在藉由注射用於胰島素療法的筆樣裝置中施用。

【0161】 本發明之醫藥組成物可藉由非經腸投予用於治療糖尿病。

【0162】 在另一具體實例中，本發明之胰島素製劑亦可經製備用於多個通常用於投予胰島素之醫藥裝置，包括使用泵之持續皮下胰島素輸注療法，及/或經製備應用於基礎胰島素療法中。

【0163】 投予患者之本發明胰島素製劑之劑量建議由醫師選定。目前本發明之胰島素衍生物意欲將以約 0.1 mM 至約 20.0 mM；更特定言之約 0.2 mM 至約 4.0 mM；約 0.3 mM 至約 2.5 mM；約 0.5 mM 至約 2.5 mM；約 0.6 mM 至約 2.0 mM；或約 0.6 mM 至約 1.2 mM 之量存在於最終醫藥組成物中。

本發明之醫藥組成物之較佳特徵

【0164】 本發明可參考以下特徵中之一或多者進一步表徵：

1. 一種醫藥組成物，其包含本發明之人類胰島素之醯化類似物及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

2. 如條項第 1 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物。

3. 如條項第 1 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物，其包含在位置 B3 中擁有取代之人類胰島素之醯化類似物。

4. 如條項第 1 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物，其包含擁有取代 B3E 或 B3Q 之人類胰島素之醯化類似物。

5. 如條項第 1 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物，其包含擁有取代 B3E 之人類胰島素之醯化類似物。

6. 如條項第 1 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物，其包含擁有取代 B3Q 之人類胰島素之醯化類似物。

7. 如條項第 1 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物，其包含選自以下之人類胰島素之醯化類似物：

A22K(Meps) 十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十五烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；及

A22K(Meps)-十四烷二醯基-3xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素。

8. 如條項第 1 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物，其包含選自以下之人類胰島素之醯化類似物：

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；及

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素。

9. 如條項第 7 項至第 8 項中任一項之醫藥組成物，其包含每 6 個胰島素分子少於 0.2 個 Zn^{2+} 離子。

10. 如條項第 7 項至第 8 項中任一項之低鋅醫藥組成物，其中尚未添加界面活性劑。

11. 如條項第 7 項至第 8 項中任一項之醫藥組成物，其包含菸鹼化合物。

12. 如條項第 7 項至第 8 項中任一項之醫藥組成物，其包含總濃度為約 20 mM 至約 170 mM 之菸鹼化合物、苯丙胺酸及/或其鹽。

13. 如條項第 7 項至第 8 項中任一項之醫藥組成物，其包含總濃度為約 130 mM 至約 170 mM 之菸鹼化合物、苯丙胺酸及/或其鹽。

14. 如條項第 7 項至第 8 項中任一項之醫藥組成物，其包含醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑及/或佐劑。

治療方法

【0165】 本發明係關於用於治療性用途之藥物。更特定言之，本發明係關於本發明之人類胰島素類似物之醯化衍生物之用途，其係用於治療或預防與糖尿病相關之醫學病狀。

【0166】 因此，在另一態樣中，本發明提供一種治療或緩解包括人類之活動物體之疾病或病症或病狀之方法，該疾病、病症或病狀可選自與以下相關之疾病、病症或病狀：糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病、葡萄糖耐

受性異常、高血糖症、血脂異常、肥胖、代謝症候群（代謝症候群 X、胰島素抗性症候群）、高血壓、認知障礙、動脈粥樣硬化、心肌梗塞、中風、心臟血管病、冠心病、發炎性腸症候群、消化不良或胃潰瘍，該方法包含向有需要之個體投予治療有效量之本發明之人類胰島素之醯化類似物之步驟。

【0167】 在另一具體實例中，本發明提供一種治療或緩解包括人類之活動物體之疾病或病症或病狀之方法，該疾病、病症或病狀可選自與以下相關之疾病、病症或病狀：糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病、葡萄糖耐受性異常、高血糖症、血脂異常、肥胖、代謝症候群（代謝症候群 X、胰島素抗性症候群）、高血壓、認知障礙、動脈粥樣硬化、心肌梗塞、中風、心臟血管病、冠心病、發炎性腸症候群、消化不良或胃潰瘍，該方法包含向有需要之個體投予治療有效量之本發明之人類胰島素之醯化類似物。

【0168】 在第三具體實例中，本發明提供一種治療或緩解包括人類之活動物體之疾病或病症或病狀之方法，該疾病、病症或病狀可選自與以下相關之疾病、病症或病狀：糖尿病、1 型糖尿病、2 型糖尿病、葡萄糖耐受性異常、高血糖症、血脂異常、肥胖、代謝症候群（代謝症候群 X、胰島素抗性症候群）。

【0169】 在第四具體實例中，本發明提供一種治療或緩解包括人類之活動物體之疾病或病症或病狀之方法，該疾病、病症或病狀可選自與糖尿病、尤其 1 型糖尿病或 2 型糖尿病相關之疾病、病症或病狀。

實施例

【0170】 本發明參考以下實施例進一步說明，該等實施例不意欲以任

何方式限制於所主張之本發明之範圍。

胰島素類似物表現及純化

胰島素類似物表現

【0171】 用於本發明之用途的胰島素類似物，亦即雙鏈非醯化胰島素類似物藉由例如 US 6500645 中所揭示之熟知技術在合適宿主細胞中表現編碼所討論之胰島素類似物之 DNA 序列以重組方式產生。胰島素類似物直接表現或作為可在 B-鏈上具有 N 端延伸及/或在 B-鏈與 A-鏈之間具有連接肽（C-肽）之前驅體分子表現。此 N 端延伸及 C-肽在試管內藉由合適蛋白酶，例如水解無色桿菌蛋白酶（*Achromobactor lyticus* protease，ALP）或胰蛋白酶裂解開，且因而將具有分別緊挨著位置 B1 及 A1 之裂解位點。適用於根據本發明之用途之類型的 N 端擴展及 C-肽揭示於例如 US 5395922、765395 及 WO 9828429 中。

【0172】 編碼用於本發明之用途的胰島素類似物前驅體之多核苷酸序列可藉由已建立之方法以合成方式製備，例如 Beaucage 等人(1981) *Tetrahedron Letters* 22 1859-1869 所述之胺基磷酸酯法或 Matthes 等人(1984) *EMBO Journal* 3 801-805 所述之方法。根據胺基磷酸酯法，寡核苷酸在例如自動 DNA 合成器中合成，純化，倍增並接合以形成合成 DNA 構築體。目前較佳之製備 DNA 構築體之方式為聚合酶鏈式反應（polymerase chain reaction，PCR）。

【0173】 重組方法典型地利用能夠在所選微生物或宿主細胞中複製且帶有編碼用於本發明之用途的胰島素類似物前驅體之多核苷酸序列之載體。重組載體可為自主複製載體，亦即以超染色體實體形式存在之載體，

其複製品與染色體複製無關，例如質體、染色體外元素、微小染色體或人工染色體。載體可含有確保自我複製之任何手段。或者，載體可為當引入至宿主細胞中時整合至基因組中且連同已載體整合之染色體一起進行複製之載體。此外，可使用單一載體或質體或兩個或兩個以上載體或質體，其一起含有待引入至宿主細胞之基因組中之完整 DNA，或可使用轉座子。載體可為線性或閉合圓形質體且較佳將含有使得載體穩定整合至宿主細胞之基因組中或使得與基因組無關之載體在細胞中自主複製之元素。

【0174】 重組表現載體可為能夠在酵母中複製之載體。能夠使載體在酵母中重複序列之實例為酵母質體 2 μ m 複製基因 REP 1-3 及複製起點。

【0175】 載體可含有一或多個可選標記，其使得容易地選擇經轉型細胞。可選標記為基因，其產物提供殺生物劑或抗病毒性、重金屬抗性、對營養缺陷型的原養性及其類似物。細菌可選標記之實例為來自枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 或地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*) 之 dal 基因，或賦予抗生素抗性，諸如安比西林 (ampicillin) 抗性、卡那黴素 (kanamycin) 抗性、氯黴素 (chloramphenicol) 抗性或四環素 (tetracycline) 抗性之標記。用於絲狀真菌宿主細胞之可選標記包括 amdS (乙醯胺酶)、argB (鳥胺酸胺甲醯基轉移酶)、pyrG (乳清酸核苷-5'-磷酸去羧酶) 及 trpC (鄰胺基苯甲酸合成酶)。酵母宿主細胞之合適標記為 ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1 及 URA3。充分適用於酵母之可選標記為粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) TPI 基因 (Russell (1985) *Gene* 40 125-130)。

【0176】 在載體中，多核苷酸序列可操作地連接至合適啟動子序列。啟動子可為在所選宿主細胞中展示轉錄活性之任何核酸序列，包括突變、

截短及混合啟動子，且可獲自編碼與宿主細胞同源或異源之細胞外或細胞內多肽之基因。

【0177】 適用於引導細菌宿主細胞中之轉錄之啟動子之實例為獲自大腸桿菌 lac 操縱子、天藍色鏈黴菌 (*Streptomyces coelicolor*) 瓊脂糖酶基因 (dagA)、枯草桿菌聚果糖蔗糖酶基因 (sacB)、地衣芽孢桿菌 α -澱粉酶基因 (amyL)、嗜熱脂肪芽孢桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 產麥芽糖澱粉酶基因 (amyM)、解澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) α -澱粉酶基因 (amyQ) 及地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*) 青黴素酶基因 (penP) 之啟動子。適用於引導絲狀真菌宿主細胞中之轉錄之啟動子之實例為獲自米麴菌 (*Aspergillus oryzae*) TKA 澱粉酶、米黑根毛黴 (*Rhizomucor miehei*) 天冬胺酸蛋白酶、黑麴菌 (*Aspergillus niger*) 中性 α 澱粉酶及黑麴菌酸穩定 α 澱粉酶之基因之啟動子。在酵母宿主中，有用啟動子為釀酒酵母 Mal、TPI、ADH、TDH3 或 PGK 啟動子。

【0178】 編碼用於本發明之用途的胰島素肽主鏈之多核苷酸序列亦典型地可操作地連接至合適終止子。

【0179】 在酵母中，合適終止子為 TPI 終止子 (Alber 等人 (1982) *J. Mol. Appl. Genet* 1 419-434)。

【0180】 熟習此項技術者已熟知分別用以組合編碼用於本發明之用途的胰島素類似物之多核苷酸序列、啟動子及終止子及將其插入含有在所選宿主中複製所需之信息之合適載體中之程序。應瞭解，載體可為藉由以下構築：首先製備含有編碼用於本發明之用途的胰島素主鏈之完整 DNA 序列之 DNA 構築體且隨後將此片段插入合適表現載體中，或依序插入含有個

別元素之基因信息（諸如信號及前肽（B-鏈之 N 端延伸）、C-肽、A-鏈及 B-鏈）之 DNA 片段，之後接合。

【0181】 將包含編碼用於本發明之用途的胰島素類似物之多核苷酸序列之載體引入至宿主細胞中，使得載體維持為染色體整合體或以自我複製染色體外載體形式。術語「宿主細胞」涵蓋因複製期間出現之突變而與母細胞不一致之母細胞之任何後代。宿主細胞可為單細胞微生物，例如原核生物，或非單細胞微生物，例如真核生物。有用單細胞為細菌細胞，諸如革蘭氏陽性細菌，包含（但不限於）芽孢桿菌細胞、鏈黴菌細胞，或革蘭氏陰性細菌，諸如大腸桿菌及假單胞菌屬。真核生物細胞可為哺乳動物、昆蟲、植物或真菌細胞。

【0182】 宿主細胞尤其可為酵母細胞。酵母生物體可為任何適合之酵母生物體，其在培養時將胰島素肽主鏈或其前驅體分泌至培養基中。合適酵母有生物體之實例包括選自釀酒酵母、克魯維酵母（*Saccharomyces kluyveri*）、粟酒裂殖酵母、葡萄汁酵母（*Saccharomyces uvarum*）、乳酸克魯維酵母（*Kluyveromyces lactis*）、多形漢遜酵母（*Hansenula polymorpha*）、甲醇酵母（*Pichia pastoris*）、甲醇畢赤酵母（*Pichia methanolica*）、克魯維畢赤酵母（*Pichia kluyveri*）、解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）、假絲酵母屬（*Candida* sp.）、高蛋白假絲酵母（*Candida utilis*）、可可油假絲酵母（*Candida cacaoi*）、地絲菌屬（*Geotrichum* sp.）及醱酵地絲菌酵母（*Geotrichum fermentans*）之菌株。

【0183】 酵母細胞之轉型可例如由原生質體形成隨後藉由已知方法轉型來實現。用以培養細胞之培養基可為適用於酵母生物體成長之任何習

知培養基。

胰島素類似物純化

【0184】 可藉由習知程序自培養基回收分泌之胰島素類似物或其前驅體，該等習知程序包括藉由離心自培養基分離酵母細胞、過濾或經離子交換基質或經逆相吸收基質捕獲或吸附胰島素類似物或其前驅體、使上清液之蛋白質組分沈澱或藉助於鹽（例如硫酸銨）過濾，隨後藉由多種層析程序（例如離子交換層析法、親和性層析法等）純化。

【0185】 如下進行本發明之胰島素肽主鏈之純化及消化：

【0186】 藉由陽離子交換自酵母培養物上清液純化並濃縮可含有 B-鏈之 N 端延伸及 B-鏈與 A-鏈之間的經修飾 C-肽之單鏈胰島素類似物前驅體（Kjeldsen 等人 (1998) *Prot. Expr. Pur.* 14 309-316）。

【0187】 藉由用離胺酸特異性固定 ALP 消化（Kristensen 等人 (1997) *J. Biol. Chem.* 20 12978-12983）或藉由使用胰蛋白酶分解 B-鏈之 N 端延伸（若存在）及 C-肽使單鏈胰島素類似物前驅體成熟為雙鏈胰島素肽主鏈。

胰蛋白酶消化

【0188】 用水稀釋來自陽離子交換層析步驟之含有胰島素類似物前驅體之洗提液至乙醇濃度為 15 至 20%。添加甘胺酸至濃度為 50 mM 且藉由 NaOH 將 pH 值調節至 9.0 至 9.5。以 1:300（w:w）之比例添加胰蛋白酶且在 4°C 下發生消化。每 20 分鐘以分析方式監測消化直到消化完成。以 3:100（體積:體積）之比例添加 1 M 檸檬酸來終止消化。

【0189】 藉由分析型 LC 經 Waters Acquity 超效液相層析系統使用 C18 管柱分析消化反應，且藉由 MALDI-TOF MS（Bruker Daltonics Autoflex II

TOF/TOF) 確定分子量。

【0190】 藉由逆相 HPLC (Waters 600 系統) 經 C18 管柱使用乙腈梯度來純化雙鏈胰島素類似物。藉由凍乾回收所需胰島素類似物 (例如 A22K、desB27、B29R、desB30 人類胰島素、A22K、B3E、desB27、B29R、desB30、人類胰島素或 A22K、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素)。

【0191】 藉由分析型 LC 經 Waters Acquity 超效液相層析系統使用 C18 管柱確定純度，且藉由 MALDI-TOF MS 確定分子量。

縮寫

ALP-水解無色桿菌蛋白酶

C-肽-連接肽

HPLC-高效液相層析

IR-胰島素受體

IGF-1R 胰島素樣成長因子 1 受體

LC-液相層析

MALDI-TOF-基質輔助雷射脫附電離飛行時間

MS-質譜分析

PCR-聚合酶鏈式反應

PD-藥物效應動力學 (血液/血漿葡萄糖降低效用)

PG-血漿葡萄糖

PK-藥物效應動力學 (血液/血漿胰島素濃度對時間特徵)

tBu 為第三丁基；

DCM 為二氯甲烷；

DIC 為二異丙基碳化二亞胺；

DIPEA = DIEA 為 *N,N*-二異丙基乙胺；

DMF 為 *N,N*-二甲基甲醯胺；

DMSO 為二甲亞砜；

EtOAc 為乙酸乙酯；

Fmoc 為 9-芴基甲氧羰基；

γ Glu(gGlu)為 γ L-麩胺醯基；

HCl 為鹽酸；

HOBt 為 1-羥基苯并三唑；

NMP 為 *N*-甲基吡咯啉酮；

MeCN 為乙腈；

OEG 為[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基羰基；

Su 為丁二醯亞胺基-1-基 = 2,5-二側氧基-吡咯啉-1-基；

OSu 為丁二醯亞胺基-1-基氧基 = 2,5-二側氧基-吡咯啉-1-基氧基；

RPC 為逆相層析法；

RT 為室溫；

TCTU 為四氟硼酸 O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲鎳；

TFA 為三氟乙酸；

THF 為四氫呋喃；

TNBS 為 2,4,6-三硝基苯磺酸；

TRIS 為參(羥基甲基)胺基甲烷；且

TSTU 為四氟硼酸 O-(*N*-丁二醯亞胺基)-1,1,3,3-四甲基鎳。

一般註解

【0192】 以下實施例及通用程序係指本說明書及合成流程中所鑑別之中間化合物及最終產物。使用以下實施例詳細描述本發明化合物之製備，但所述化學反應根據其對製備本發明化合物之通用適用性揭示。

【0193】 有時，反應可能並不如所述適用於本發明所揭示範圍內之每一化合物。發生反應之化合物將容易藉由熟習此項技術者認可。在此等情況下，反應可藉由熟習此項技術者已知之習知修改，亦即藉由適當保護干擾基團、藉由變為其他習知試劑或藉由反應條件之常規修改成功地進行。

【0194】 或者，本文所揭示或以其他方式習知之其他反應將適用於製備對應之本發明化合物。在所有製備方法中，所有起始物質均為已知的或可容易由已知起始物質製備。所有溫度均以攝氏度闡述，且除非另外指明，否則當提及產率時所有份數及百分比均以重量計，且當提及溶劑及洗提劑時所有份數均以體積計。

【0195】 本發明化合物可藉由利用本領域內典型之以下程序中之一或多個來純化。此等程序可（若需要）對於梯度、pH 值、鹽、濃度、流速、管柱等進行修改。視諸如雜質特徵、所討論之胰島素之可溶性等之因素而定，熟習此項技術者可容易認可並實施此等修改。

【0196】 在酸性 HPLC 或脫鹽之後，化合物藉由凍乾純洗提份來分離。

【0197】 在中性 HPLC 或陰離子交換層析之後，將化合物去鹽、在等電位 pH 值下沈澱或藉由酸性 HPLC 純化。

典型純化程序

RP-HPLC 系統：

【0198】 Gilson 系統由以下組成：215 型液體處置器、322-H2 型泵及 155 型 UV 偵測器（UV 215 nm 及 280 nm）。

陰離子交換及脫鹽系統：

【0199】 Äkta 探測器系統由以下組成：P-900 型泵、UV-900 型 UV 偵測器（UV 214、254 及 280 nm）、pH/C-900 型 pH 值及傳導率偵測器、Frac-950 型洗提份收集器。

酸性 RP-HPLC：

管柱：Phenomenex Gemini，5 μ M 5 μ C18 110A，30×250 mm

流速：20 mL/min

緩衝劑 A：含 0.1% TFA 之水

緩衝劑 B：含 0.1% TFA 之乙腈

中性 RP-HPLC：

管柱：Phenomenex Gemini，5 μ M 5 μ C18 110A，30×250 mm

流速：20 mL/min

緩衝劑 A：10 mM Tris、15 mM (NH₄)₂SO₄，pH = 7.3，含 20%乙腈之 milliQ

緩衝劑 B：含 20% milliQ 之乙腈

陰離子交換層析：

管柱-材料：Poros50HQ 或 Source30Q

流速：與管柱相關

緩衝劑 A：15 mM Tris、25 mM NH₄OAc、50% EtOH，pH = 7.5。

緩衝劑 B：15 mM Tris，500 mM NH₄OAc，50% EtOH，pH = 7.5。

脫鹽：

管柱：HiPrep 26/10

流速：20 mL/min

緩衝劑 A：含 0.1% TFA 之水

緩衝劑 B：含 0.1% TFA 之乙腈

【0200】 以溶液（參見下文）或例如 WO 2009/115469 中所述固相合成醯化試劑。

固相合成通式 III 之醯化試劑之通用程序

[醯基]-[連接子]-Act

其中醯基及連接子基團如上所定義，且 Act 為活性酯之離去基，諸如 *N*-羥基丁二醯亞胺（OSu）或 1-羥基苯并三唑，且

其中醯基部分之醯基及連接子部分內之羧酸以第三丁酯形式加以保護。

【0201】 通式 III 之化合物可經固體載體使用熟習此項技術者已知之固相肽合成領域中之程序來合成。

【0202】 一種此類程序包含使經 Fmoc 保護之胺基酸連接至聚苯乙烯 2-氯三苯甲基氯樹脂。連接可在三級胺，如三乙胺或 *N,N*-二異丙基乙基胺存在下使用自由經正保護之胺基酸實現（參見以下參考文獻）。此胺基酸之 C 末端端（連接至樹脂）位於偶合至本發明之母胰島素之合成序列之末端時。

【0203】 在 Fmoc 胺基酸連接至樹脂之後，使用例如二級胺（如哌啶或二乙胺）使 Fmoc 基團脫除保護基，隨後偶合另一（或同一）經 Fmoc 保護之胺基酸並脫除保護基。合成序列藉由偶合經單第三丁基保護之脂肪

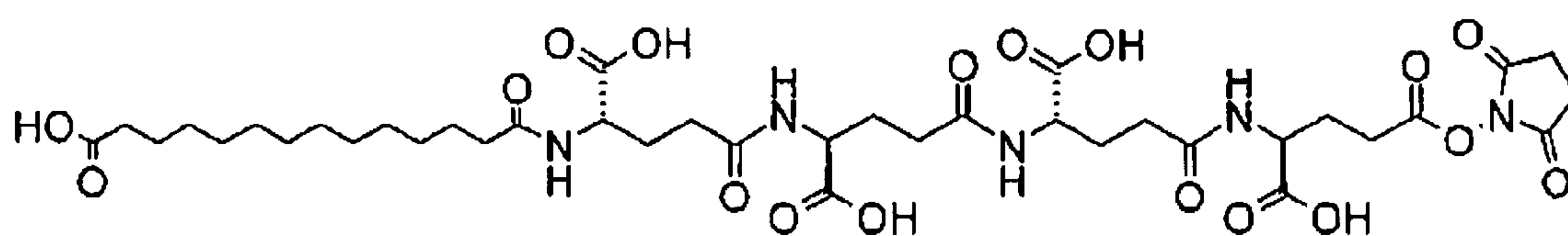
(α, ω)二酸，如十六烷二酸、十五烷二酸或十四烷二酸單第三丁酯來終止。

【0204】 自樹脂裂解化合物使用稀酸實現，如 0.5-5% TFA/DCM（含三氟乙酸之二氯甲烷）、乙酸（例如於 DCM 中 10%或 HOAc/三氟乙醇/DCM 1:1:8）或含六氟異丙醇之 DCM（參見例如 F.Z. Dörwald; *Organic Synthesis on Solid Phase*; Wiley-VCH 2000, ISBN 3-527-29950-5；N. Sewaid 及 H.- D. Jakubke: *Peptides: Chemistry and Biology*; Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3；或 *The Combinatorial Chemistry Catalog*, 1999, Novabiochem AG，及其中所引用之參考文獻）。由此確保不脫除化合物中作為羧酸保護基存在之第三丁酯。

【0205】 最終，使 C 端羧基（自樹脂釋放）活化為例如 *N*-羥基丁二醯亞胺酯（OSu）。此活化酯例如使用純 TFA 使脫除保護基，且直接或在純化（結晶）之後作為偶合劑用於與本發明之母胰島素連接中。以下說明此程序。

說明以固相合成醯化試劑之通用程序之實施例：

合成十四烷二醯基-4xGlu-OSu（化學製品 4）



【0206】 使 2-氯三苯甲基樹脂 100-200 目 1.5 mmol/g（15.79 g，23.69 mmol）在無水二氯甲烷（150 mL）中膨脹 20 分鐘。將 Fmoc-Glu-OtBu（6.72 g，15.79 mmol）及 *N,N*-二異丙基乙胺（10.46 mL，60.01 mmol）於無水二氯甲烷（120 mL）中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 16 小時。過濾樹脂且用 *N,N*-二異丙基乙胺（5.5 mL，31.59 mmol）於甲醇/二氯甲烷混合物（9:1，

150 mL, 5 min) 中之溶液處理。接著用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。

【0207】 藉由用含 20% 吡啶之 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL, 1×5 min, 1×20 min) 處理來移除 Fmoc 基團。用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、2-丙醇 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。將 Fmoc-Glu-OtBu (10.08 g, 23.69 mmol)、四氟硼酸 *O*-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲鎂尿 (TCTU, 8.42 g, 23.69 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (7.43 mL, 42.64 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (120 mL) 中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 16 小時。過濾樹脂且用 *N,N*-二異丙基乙胺 (5.5 mL, 31.59 mmol) 於甲醇/二氯甲烷混合物 (9:1, 150 mL, 5 min) 中之溶液處理。接著用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。

【0208】 藉由用含 20% 吡啶之 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL, 1×5 min, 1×20 min) 處理來移除 Fmoc 基團。用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、2-丙醇 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。將 Fmoc-Glu-OtBu (10.08 g, 23.69 mmol)、四氟硼酸 *O*-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲鎂尿 (TCTU, 8.42 g, 23.69 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (7.43 mL, 42.64 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (120 mL) 中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 16 小時。過濾樹脂且用 *N,N*-二異丙基乙胺 (5.5 mL, 31.59 mmol) 於甲醇/二氯甲烷混合物 (9:1, 150 mL, 5 min) 中之溶液處理。接著用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。

【0209】 藉由用含 20%吡啶之 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL, 1×5 min, 1×20 min) 處理來移除 Fmoc 基團。用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、2-丙醇 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。將 Fmoc-Glu-OtBu (10.08 g, 23.69 mmol)、四氟硼酸 *O*-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲鎂 (TCTU, 8.42 g, 23.69 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (7.43 mL, 42.64 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (120 mL) 中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 16 小時。過濾樹脂且用 *N,N*-二異丙基乙胺 (5.5 mL, 31.59 mmol) 於甲醇/二氯甲烷混合物 (9:1, 150 mL, 5 min) 中之溶液處理。接著用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。

【0210】 藉由用含 20%吡啶之 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL, 1×5 min, 1×20 min) 處理來移除 Fmoc 基團。用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、2-丙醇 (2×150 mL)、二氯甲烷 (2×150 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL) 洗滌樹脂。將十四烷二酸單第三丁酯 (7.45 g, 23.69 mmol)、四氟硼酸 *O*-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲鎂 (TCTU, 8.42 g, 23.69 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (7.43 mL, 42.64 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (40 mL) 及二氯甲烷 (80 mL) 之混合物中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 16 小時。過濾樹脂且用二氯甲烷 (2×150 mL)、*N,N*-二甲基甲醯胺 (2×150 mL)、甲醇 (2×150 mL) 及二氯甲烷 (10×150 mL) 洗滌。

【0211】 產物藉由用三氟乙醇 (150 mL) 處理隔夜而自樹脂裂解。濾出樹脂且用二氯甲烷 (3×100 mL) 洗滌。減壓移除溶劑。藉由矽膠管柱層析 (梯度洗提二氯甲烷/甲醇 100:0 至 95:5) 純化殘餘物, 得到呈白色固體狀

之標題化合物。

【0212】 真空乾燥產物，得到(S)-2-((S)-4-第三丁氧基羰基-4-((S)-4-第三丁氧基羰基-4-[(S)-4-第三丁氧基羰基-4-(13-第三丁氧基羰基-十三醯基胺基)-丁醯基胺基]-丁醯基胺基)-戊二酸 1-第三丁酯。

【0213】 產率：14.77 g (89%)。

【0214】 ^1H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl_3 , δ H): 7.22 (d, $J=7.7$ Hz, 1 H); 6.97 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H); 6.72 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H); 6.41 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H); 4.59-4.43 (m, 4 H); 2.49-2.13 (m, 16 H); 2.06-1.72 (m, 4 H); 1.70-1.52 (m, 4 H); 1.52-1.38 (m, 45 H); 1.35-1.21 (m, 16 H)。

【0215】 LC-MS 純度：100% (ELSD)。

【0216】 LC-MS Rt (Sunfire 4.6 mm $\times$ 100 mm, 乙腈/水 50:50 至 100:0+0.1% FA)：7.39 min。

【0217】 LC-MS m/z ：1055.0 ($M+H$) $^+$ 。

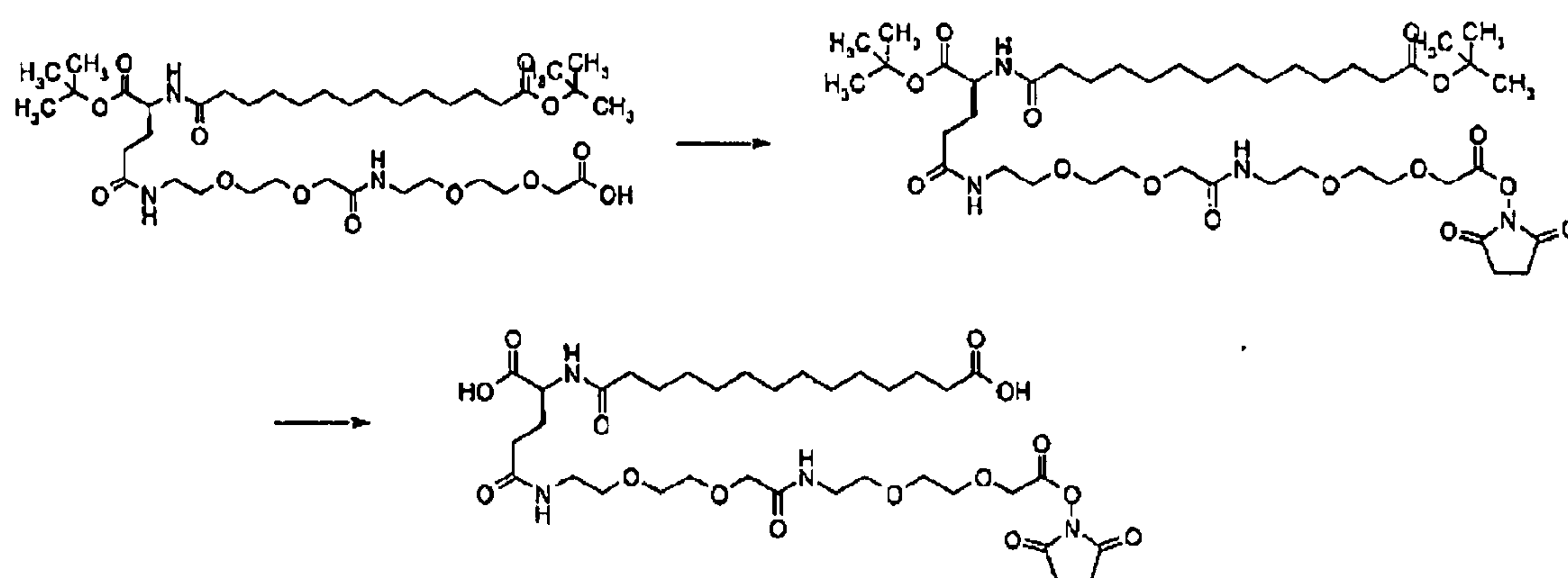
【0218】 將所獲得之經第三丁基保護之十四烷二醯基-4xGlu-OH ((S)-2-((S)-4-第三丁氧基羰基-4-((S)-4-第三丁氧基羰基-4-[(S)-4-第三丁氧基羰基-4-(13-第三丁氧基羰基-十三醯基胺基)-丁醯基胺基]-丁醯基胺基)-戊二酸 1-第三丁酯) 溶解於四氫呋喃中。依序添加 DIPEA、溶解於乙腈中之 TSTU。攪拌反應混合物 3 h，接著真空蒸發，再溶解於乙酸乙酯中，用 0.1M HCl (水溶液) 洗滌，經 MgSO_4 脫水，過濾且真空蒸發。LC-MS (電噴霧)： $m/z = 1174.7$ ($M+\text{Na}^+$)。計算值：1175.4。

【0219】 將經保護並經 OSu 活化之化合物溶解於 10 mL TFA 中且在室溫下攪拌隔夜。添加乙醚且濾出所形成之沈澱且真空乾燥隔夜，得到

(S)-2-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-((S)-4-羧基-4-(13-羧基-十三醯基胺基)-丁醯基胺基)-丁醯基胺基)-丁醯基胺基)-戊二酸 5-(2,5-二側氧基-吡咯啉-1-基)酯 (十四烷二醯基-4xGlu-OSu)。LC-MS (電噴霧): $m/z = 872.2 (M+H^+)$ 。計算值: 871.9。

說明以固相合成醯化試劑之通用程序之實施例：

合成十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-OSu (化學製品 5)



13-((S)-1-第三丁氧基羰基-3-[2-(2-((2-(2-羧基甲氧基-乙氧基)-乙基胺甲醯基)-甲氧基)-乙氧基)-乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基)-十三烷酸第三丁酯

【0220】 使 2-氯三苯甲基樹脂 100-200 目 1.7 mmol/g (79.8 g, 135.6 mmol) 在無水二氯甲烷(450 mL)中膨脹 20 分鐘。將{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 34.9 g, 90.4 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (59.9 mL, 343.6 mmol) 於無水二氯甲烷 (100 mL) 中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 4 小時。過濾樹脂且用 *N,N*-二異丙基乙胺 (31.5 mL, 180.8 mmol) 於甲醇/二氯甲烷混合物 (4:1, 150 mL, 2×5 min) 中之溶液處理。接著用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×300 mL)、二氯甲烷 (2×300 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (3×300 mL) 洗滌樹脂。藉由用含 20% 吡啶之二甲基甲醯胺 (1×5 min, 1×30 min, 2×300 mL) 處理來移除 Fmoc 基團。用 *N,N*-二甲基

甲醯胺 (3×300 mL)、2-丙醇 (2×300 mL) 及二氯甲烷 (350 mL, 2×300 mL) 洗滌樹脂。

【0221】 將{2-[2-(9H-芴-9-基甲氧羰基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙酸 (Fmoc-OEG-OH, 52.3 g, 135.6 mmol)、四氟硼酸 O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲鎔 (TCTU, 48.2 g, 135.6 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (42.5 mL, 244.1 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (250 mL) 中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 2 小時。因為茚三酮測試仍為陽性，所以過濾樹脂且用相同量之試劑再處理 30 分鐘。過濾樹脂且用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×300 mL)、二氯甲烷 (2×300 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (3×300 mL) 洗滌。藉由用含 20% 哌啶之二甲基甲醯胺 (1×5 min, 1×30 min, 2×300 mL) 處理來移除 Fmoc 基團。用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (3×300 mL)、2-丙醇 (2×300 mL) 及二氯甲烷 (350 mL, 2×300 mL) 洗滌樹脂。

【0222】 將(S)-2-(9H-芴-9-基甲氧羰基胺基)-戊二酸 1-第三丁酯 (Fmoc-LGlu-OtBu, 57.7 g, 135.6 mmol)、四氟硼酸 O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲鎔 (TCTU, 48.2 g, 135.6 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (42.5 mL, 244.1 mmol) 於 *N,N*-二甲基甲醯胺 (250 mL) 中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 1 小時。過濾樹脂且用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×300 mL)、二氯甲烷 (2×300 mL) 及 *N,N*-二甲基甲醯胺 (2×300 mL) 洗滌。藉由用含 20% 哌啶之二甲基甲醯胺 (1×5 min, 1×30 min, 2×300 mL) 處理來移除 Fmoc 基團。用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (3×300 mL)、2-丙醇 (2×300 mL) 及二氯甲烷 (350 mL, 2×300 mL) 洗滌樹脂。

【0223】 將十四烷二酸單第三丁酯 (C14(OtBu)-OH, 42.7 g, 135.6

mmol)、四氟硼酸 O-(6-氯-苯并三唑-1-基)-*N,N,N,N*-四甲基脲 (TCTU, 48.2 g, 135.6 mmol) 及 *N,N*-二異丙基乙胺 (42.5 mL, 244.1 mmol) 於二氯甲烷/*N,N*-二甲基甲醯胺混合物 (4:1, 300 mL) 中之溶液添加至樹脂中且震盪混合物 1.5 小時。過濾樹脂且用 *N,N*-二甲基甲醯胺 (6×300 mL)、二氯甲烷 (4×300 mL)、甲醇 (4×300 mL) 及二氯甲烷 (7×600 mL) 洗滌。藉由用 2,2,2-三氟乙醇 (600 mL) 處理 18 小時自樹脂裂解產物。濾出樹脂且用二氯甲烷 (4×300 mL)、二氯甲烷/2-丙醇混合物 (1:1, 4×300 mL)、2-丙醇 (2×300 mL) 及二氯甲烷 (6×300 mL) 洗滌。合併溶液；蒸發溶劑且藉由管柱層析 (Silicagel 60A, 0.060-0.200 mm；洗提劑：二氯甲烷/甲醇 1:0-9:1) 純化粗產物。

【0224】 真空乾燥且獲得呈橙色油狀之純 13-[(S)-1-第三丁氧基羰基-3-[2-(2-{[2-(2-羧基甲氧基-乙氧基)-乙基胺甲醯基]-甲氧基}-乙氧基)-乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基]-十三烷酸第三丁酯。

【0225】 產率：55.2 g (77%)。

【0226】 RF (SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 9:1)：0.35。

【0227】 ¹H NMR 光譜 (300 MHz, CDCl₃, δ H): 7.37 (bs, 1 H); 7.02 (bs, 1 H); 6.53 (d, J=7.9 Hz, 1 H); 4.54-4.38 (m, 1 H); 4.17 (s, 2 H); 4.02 (s, 2 H); 3.82-3.40 (m, 16 H); 2.37-2.12 (m, 7 H); 2.02-1.82 (m, 1 H); 1.71-1.51 (m, 4 H); 1.47 (s, 9 H); 1.43 (s, 9 H); 1.25 (bs, 16 H)。

【0228】 LC-MS 純度：100%。

【0229】 LC-MS Rt (Sunfire 4.6 mm×100 mm, 乙腈/水 70:30 至 100:0+0.1% FA)：3.93 min。

【0230】 LC-MS m/z：791.0 (M+H)⁺。

【0231】 將 13-((S)-1-第三丁氧基羰基-3-[2-(2-([2-(2-羧基甲氧基-乙氧基)-乙基胺甲醯基]-甲氧基)-乙氧基)-乙基胺甲醯基]-丙基胺甲醯基)-十三烷酸第三丁酯 (十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-OH, 8.89 g, 11.3 mmol) 溶解於 100 mL 乙腈中，且將 TSTU (4.07 g, 13.5 mmol) 及 DIPEA (2.35 mL, 13.5 mmol) 添加該攪拌溶液中且在室溫下攪拌混合物 1 小時。蒸發溶劑且將殘餘物溶解於二氯甲烷中且用 0.05M HCl 洗滌兩次。

【0232】 乾燥 (MgSO₄) 有機相且真空蒸發。由此獲得 9.98 g (100%) 呈油狀之 13-((S)-1-第三丁氧基羰基-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-二側氧基-吡咯啉-1-氧羰基甲氧基)-乙氧基]-乙基胺甲醯基)-甲氧基)-乙氧基]-乙基胺甲醯基)-丙基胺甲醯基)-十三烷酸第三丁酯。

【0233】 將 13-((S)-1-第三丁氧基羰基-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-二側氧基-吡咯啉-1-氧羰基甲氧基)-乙氧基]-乙基胺甲醯基)-甲氧基)-乙氧基]-乙基胺甲醯基)-丙基胺甲醯基)-十三烷酸第三丁酯 (4 g) 溶解於三氟乙酸(10 mL)中且在室溫下攪拌混合物 1 小時且真空蒸發。將殘餘物溶解於二氯甲烷 (10 mL) 中且真空蒸發。添加冷乙醚 (10 mL) 致使白色油脂固體沈澱。藉由傾析將此物分離且真空乾燥。由此得到 3.4 g (定量) 14-[[[(1S)-1-羧基-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基-2-側氧基乙氧基]乙氧基]乙胺基]-2-側氧基乙氧基]乙氧基]乙胺基]-4-側氧基丁基]胺基]-14-側氧基十四烷二酸 (十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-OSu)，該儲存在-18°C 下。

【0234】 LC-MS (電噴霧): m/z = 775.33; 計算值: 774.8。

醯化及純化胰島素衍生物

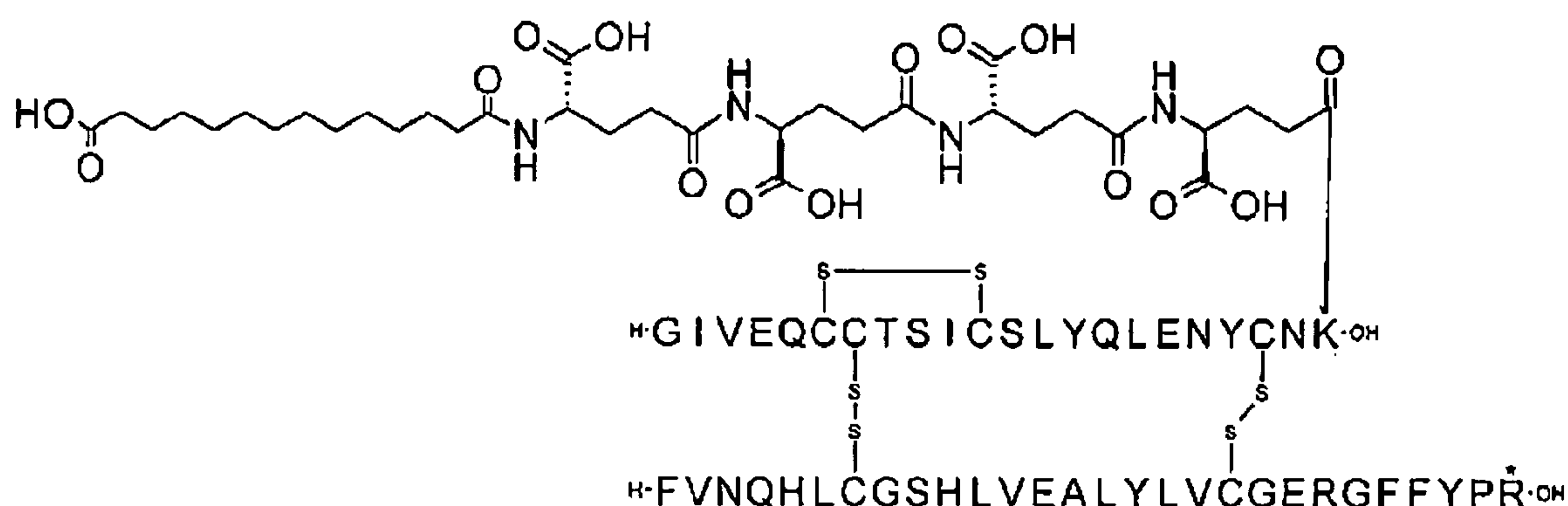
【0235】 醯化及純化本發明之胰島素衍生物之通用程序 (A) 描述於

以下實施例 1 中。此程序亦已應用於合成以下實施例 2-25 之化合物。純化亦對此等衍生物中之一些實施使用其他方法（如上所述）。

實施例 1；通用程序（A）

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0236】 IUPAC（OpenEye，IUPAC 型式）名稱：
N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰島素（人類）-(A)-肽基)-N{ ϵ }[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



【0237】 將 A22K、desB27、B29R、desB30 人類胰島素（2.0 g）溶解於 40 mL 0.1M Na₂CO₃（水溶液）中且用 1M NaOH（水溶液）將 pH 值調節至 11.2。將十四烷二醯基-4xgGlu-OSu（0.454 g）溶解於 2 mL DMF 中且逐滴添加至胰島素溶液中，同時用 1M NaOH（水溶液）使 pH 值保持為恆定的 11.2）。在室溫下攪拌反應混合物 30 min，接著使用 0.1M HCl（水溶液）平衡至 pH=7.5，且用 1:1 EtOH/milliQ 水稀釋。

【0238】 藉由 Poros50HQ 74mL 管柱陰離子交換層析用含 25 至 500 mM 乙酸銨之 15 mM Tris、50 體積%乙醇（pH 7.5）（乙酸）洗提來純化所得

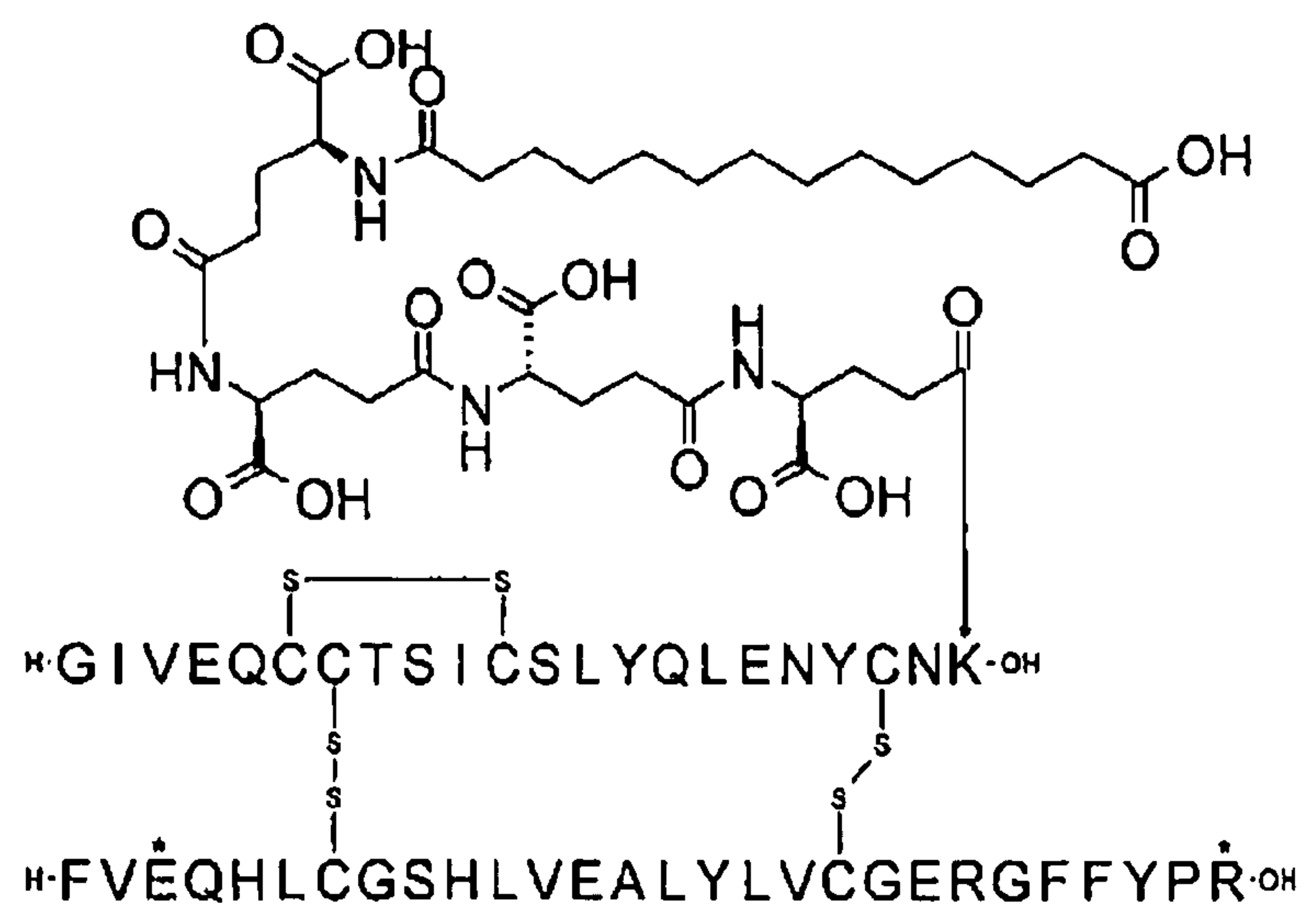
胰島素。經逆相管柱用含有 0.1%三氟乙酸之乙腈/milliQ 水梯度洗提進行純洗提份之脫鹽。將所得純胰島素凍乾。LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1629.98$ (M+4)/4。計算值：1630.65。

【0239】 如上所述合成醯化試劑十四烷二醯基-4xgGlu-OSu。

實施例 2：通用程序（A）

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0240】 IUPAC（OpenEye，IUPAC 型式）名稱：
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素（人類）-(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-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



【0241】 此類似物根據實施例 1 中所描述之方法來製備。

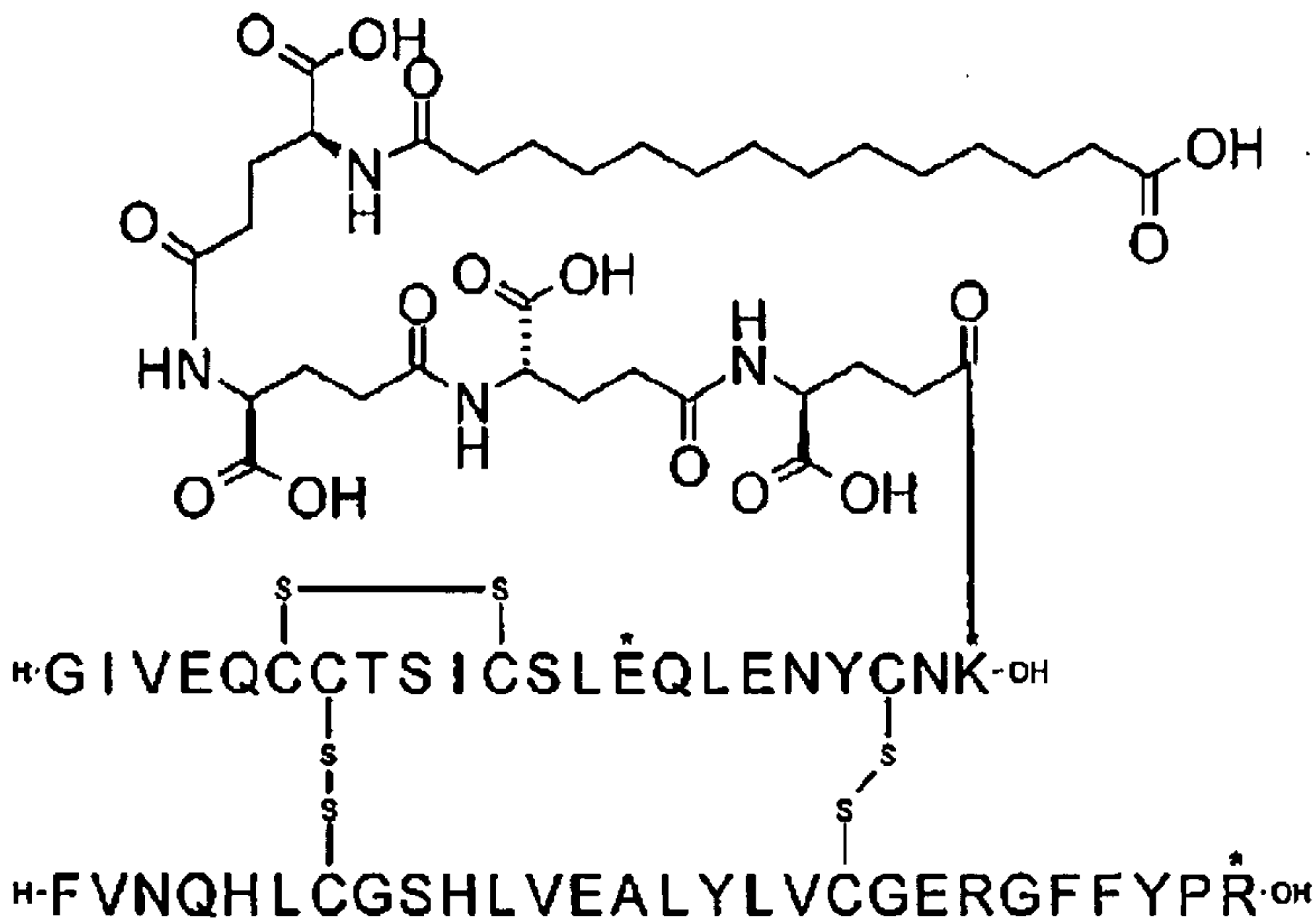
【0242】 LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1633.9$ (M+4H⁺)。計算值：1634.4

實施例 3：通用程序（A）

A14E、A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人

類胰島素；

【0243】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱：
N{ α }([GluA14,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(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
基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



【0244】 LC-MS (電噴霧)：m/z = 1622.2 (M+4)/4。計算值：1622.1

實施例 4；通用程序 (A)

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類
胰島素；

【0245】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱：
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(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
基十五醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基] 胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-
肽。

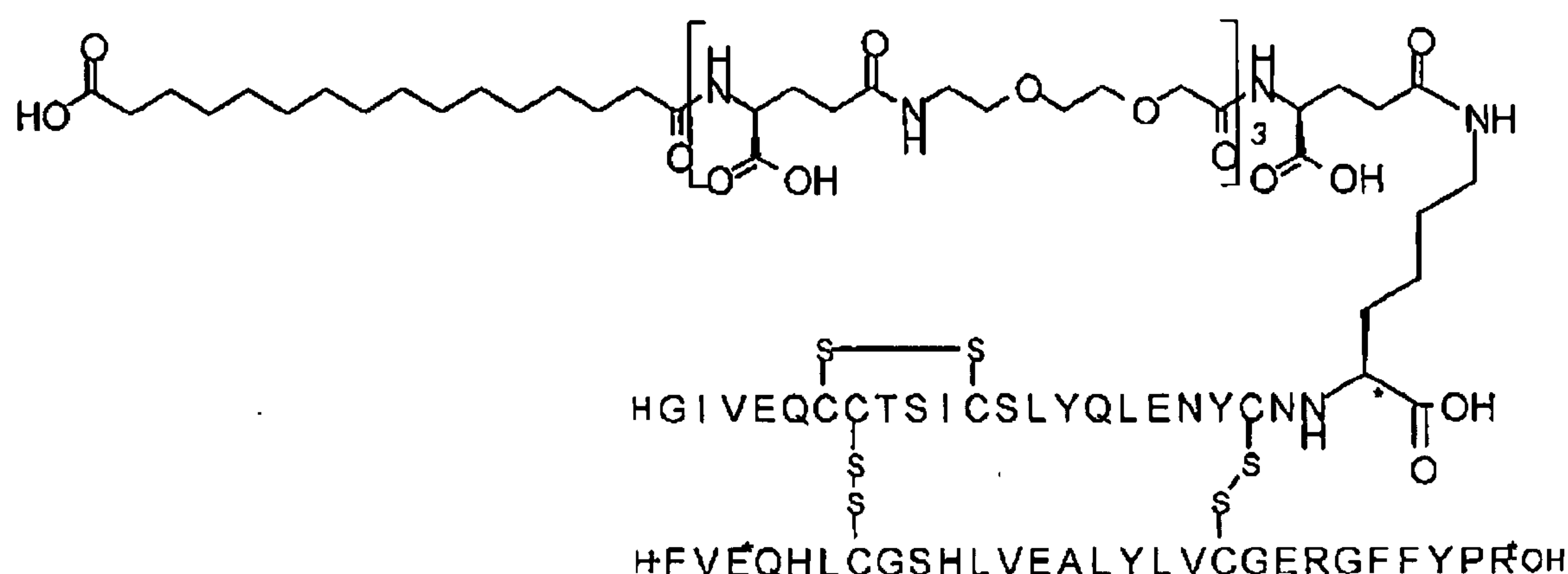


【0248】 LC-MS (電噴霧): $m/z = 1616.6 (M+4)/4$ 。計算值: 1617.1

實施例 6: 通用程序 (A)

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素;

【0249】 IUPAC (OpenEye, IUPAC 型式) 名稱:
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(A)- 肽基)-N{ ϵ }[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



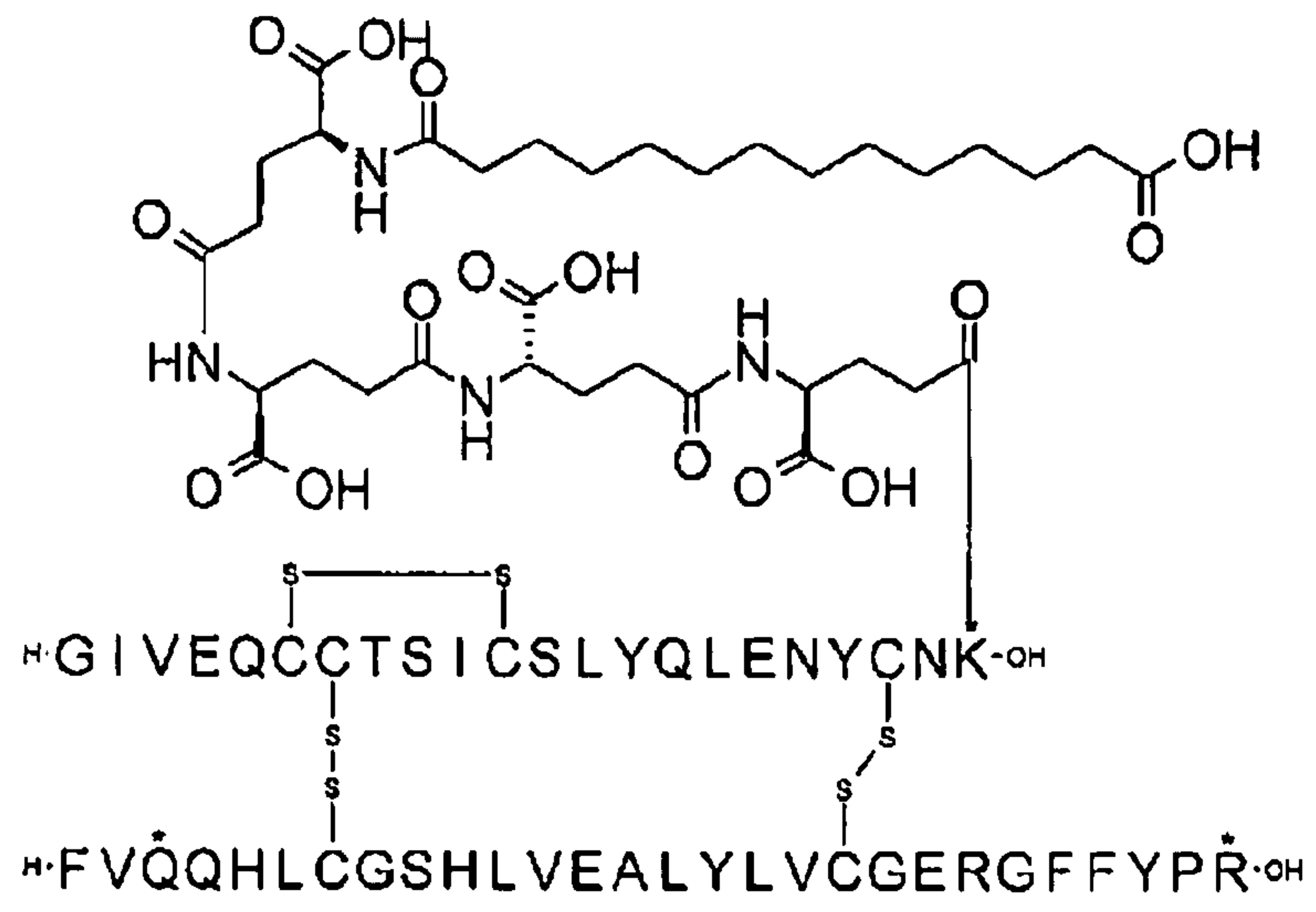
【0250】 LC-MS (電噴霧): $m/z = 1749.9 (M+4)/4$ 。計算值: 1750.3

實施例 7: 通用程序 (A)

A22K(Meps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素;

【0251】 IUPAC (OpenEye, IUPAC 型式) 名稱:
N{ α }([GlnB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(A)- 肽

基)-N{ ε }[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。

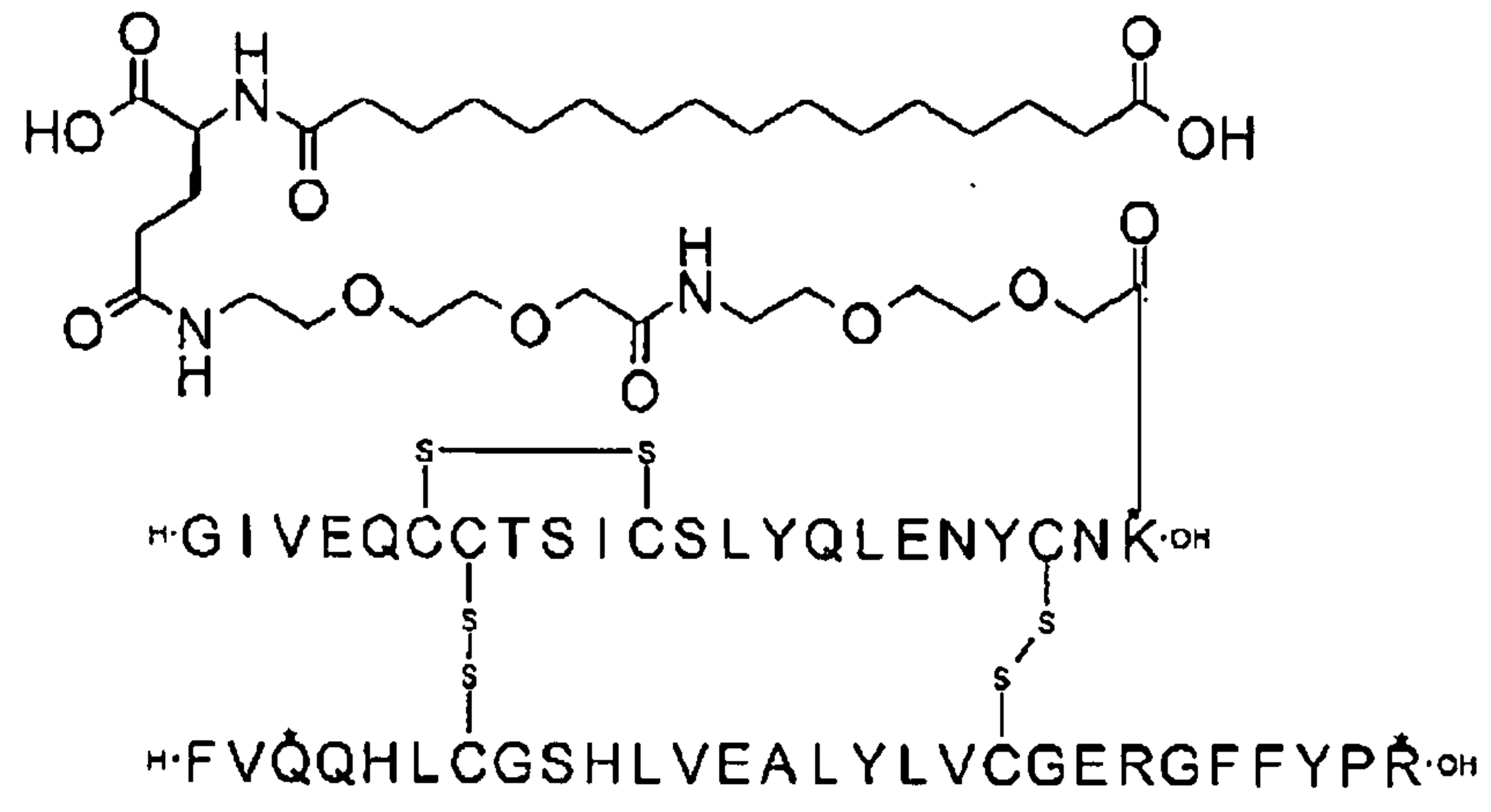


【0252】 LC-MS (電噴霧) : m/z = 1634.2 (M+4)/4 。計算值 : 1633.1

實施例 8：通用程序 (A)

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0253】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱 : N{ α }([GlnB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(A)- 肽基)-N{ ε }[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]-乙醯基]Lys,(B)-肽。

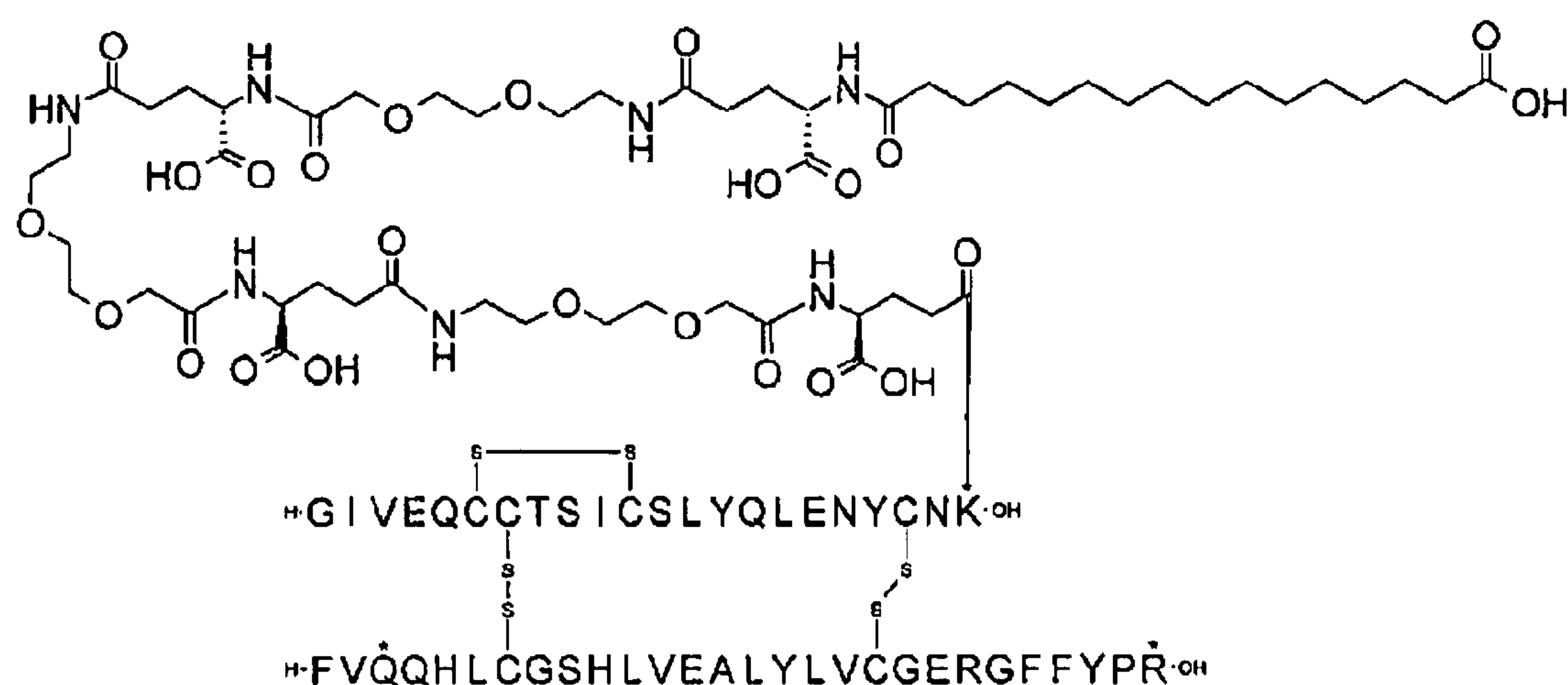


【0254】 LC-MS (電噴霧): $m/z = 1616.6 (M+4)/4$ 。計算值: 1615.8

實施例 9: 通用程序 (A)

A22K(Meps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素;

【0255】 IUPAC (OpenEye, IUPAC 型式) 名稱:
 $N\{\alpha\}([GlnB3, ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-$ 胰島素 (人類) -(A)-肽基)- $N\{\epsilon\}[(4S)-4-$ 羧基 -4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4- 羧基 -4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4- 羧基 -4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



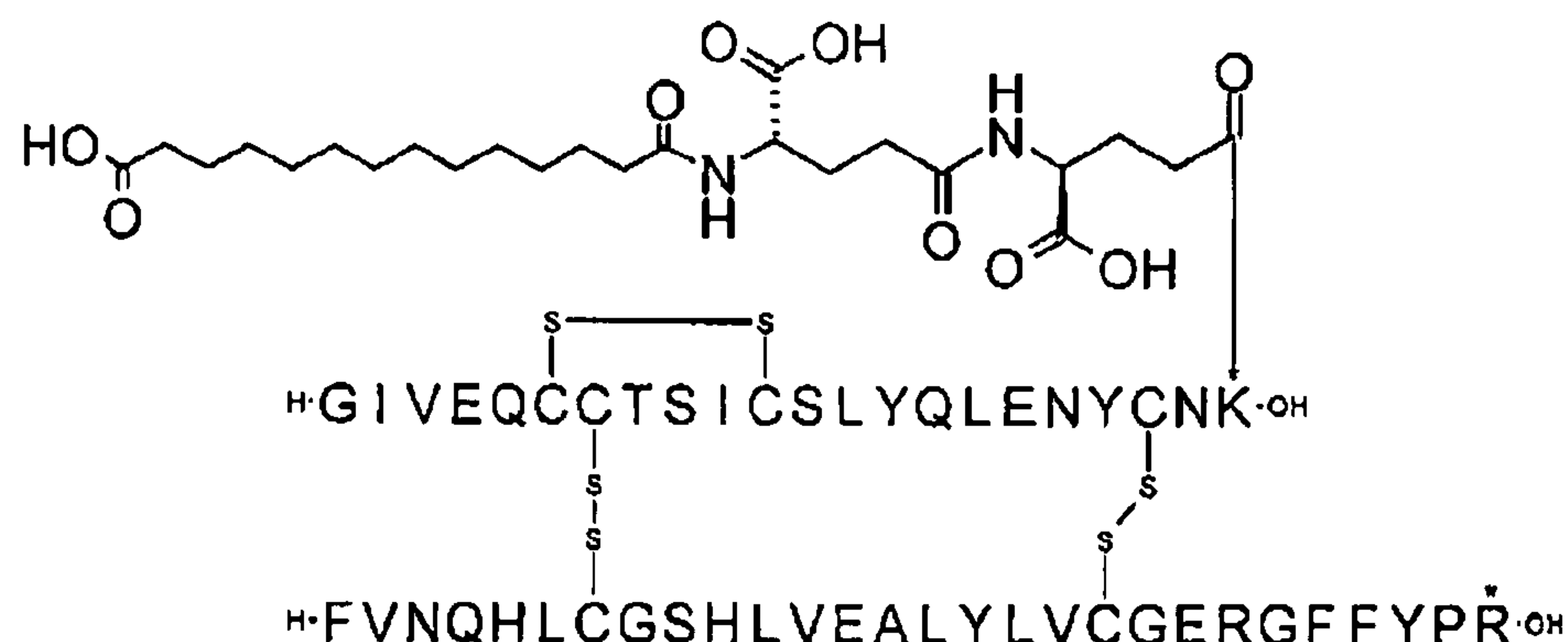
【0256】 LC-MS (電噴霧): $m/z = 1749.8 (M+4)/4$ 。計算值: 1748.5

實施例 10: 通用程序 (A)

A22K(Meps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素;

【0257】 IUPAC (OpenEye, IUPAC 型式) 名稱:
 $N\{\alpha\}([ArgB29], des-ThrB27, ThrB30-$ 胰島素 (人類) -(A)-肽基)- $N\{\epsilon\}[(4S)-4-$

羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三酰基氨基)丁酰基]氨基]丁酰基]Lys,(B)-
肽。

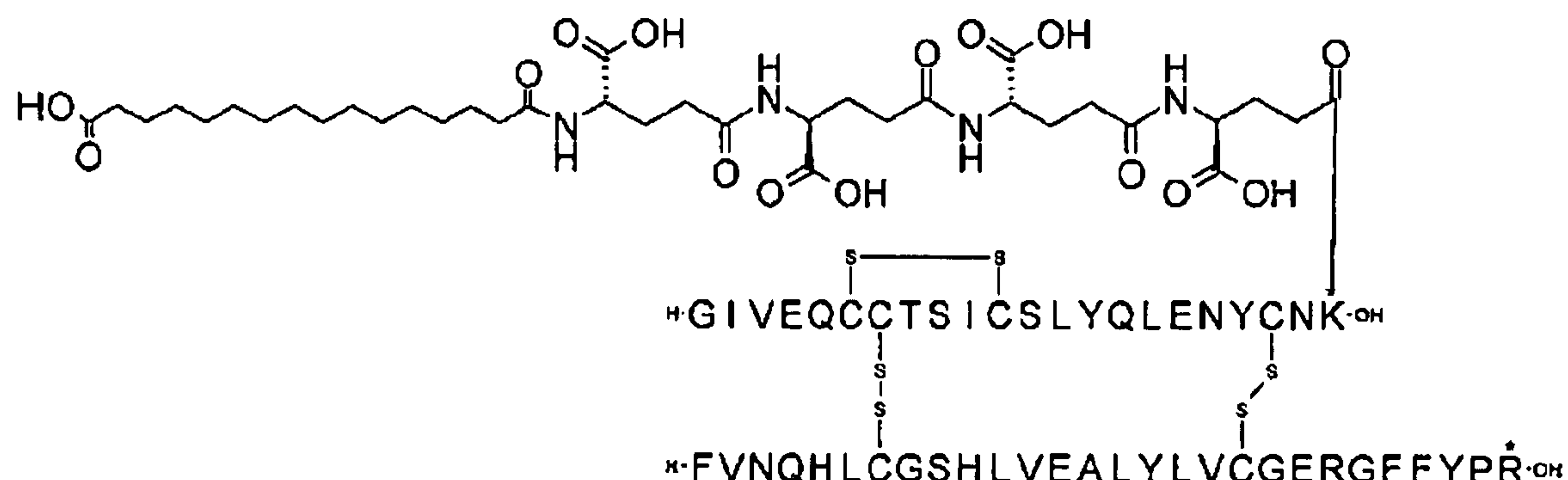


【0258】 LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1565.6 (M+4)/4$ 。計算値：1566.1

實施例 11：通用程序 (A)

A22K(Meps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

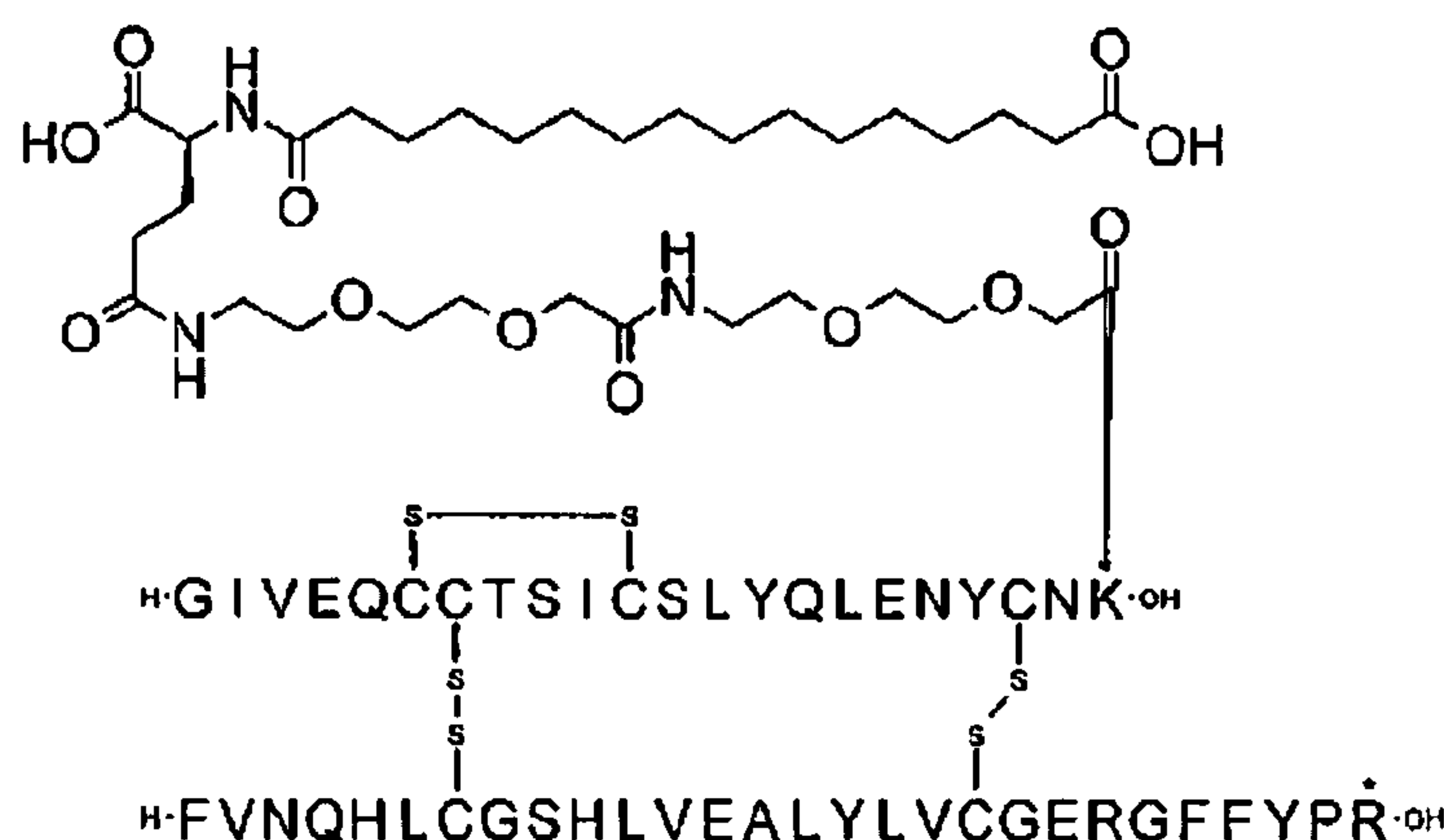
【0259】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱 :
N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰島素 (人類) -(A)-肽基)-N{ ϵ }[(4S)-4-
羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-[[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五醯基胺基)
丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



【0260】 LC-MS (電噴霧) : $m/z = 1637.4 (M+4)/4$ 。計算値 : 1636.6

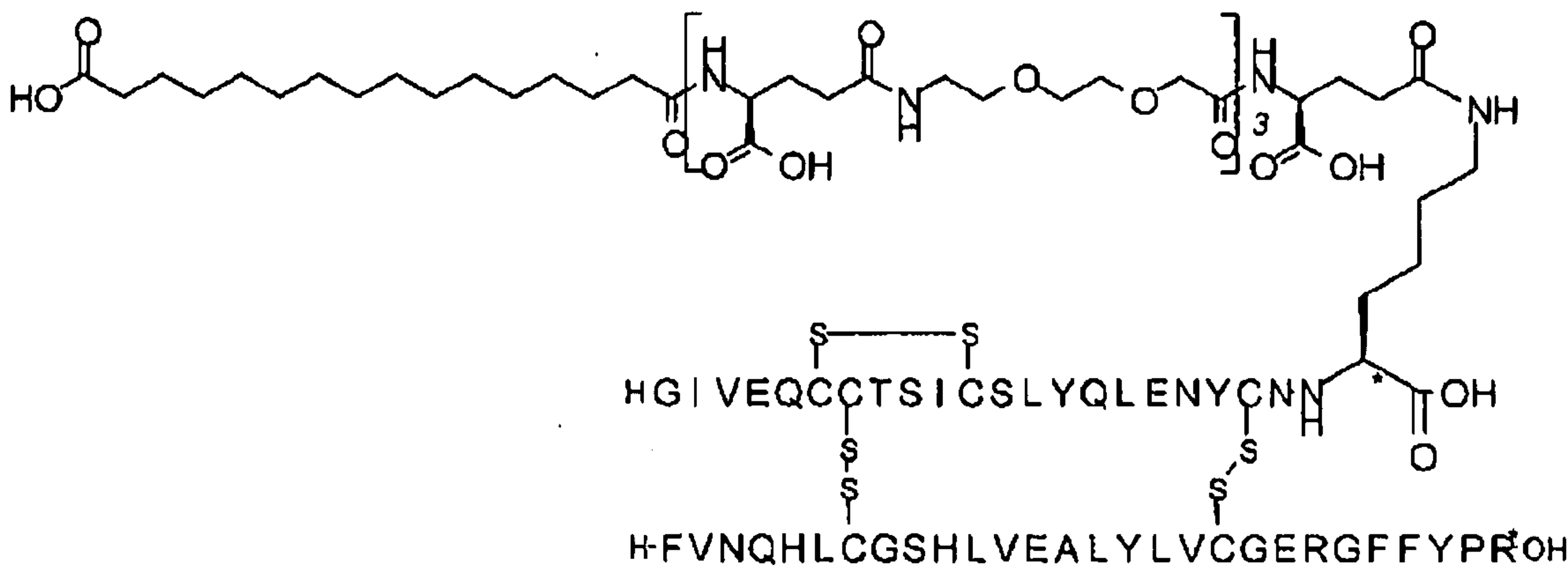
實施例 12：通用程序 (A)

【0261】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱 :
N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(A)- 肽
基)-N{ ϵ }[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-羧基-4-(15-羧基十五醯基胺基)丁醯基]胺
基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]Lys,(B)-肽。



實施例 13：通用程序 (A)

【0263】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型 式) 名 稱 :
N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰島素 (人類) -(A)-肽基)-N{ ϵ }[(4S)-4-
羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基
-4-(15-羧基十五醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]
胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]
丁醯基]Lys,(B)-肽。

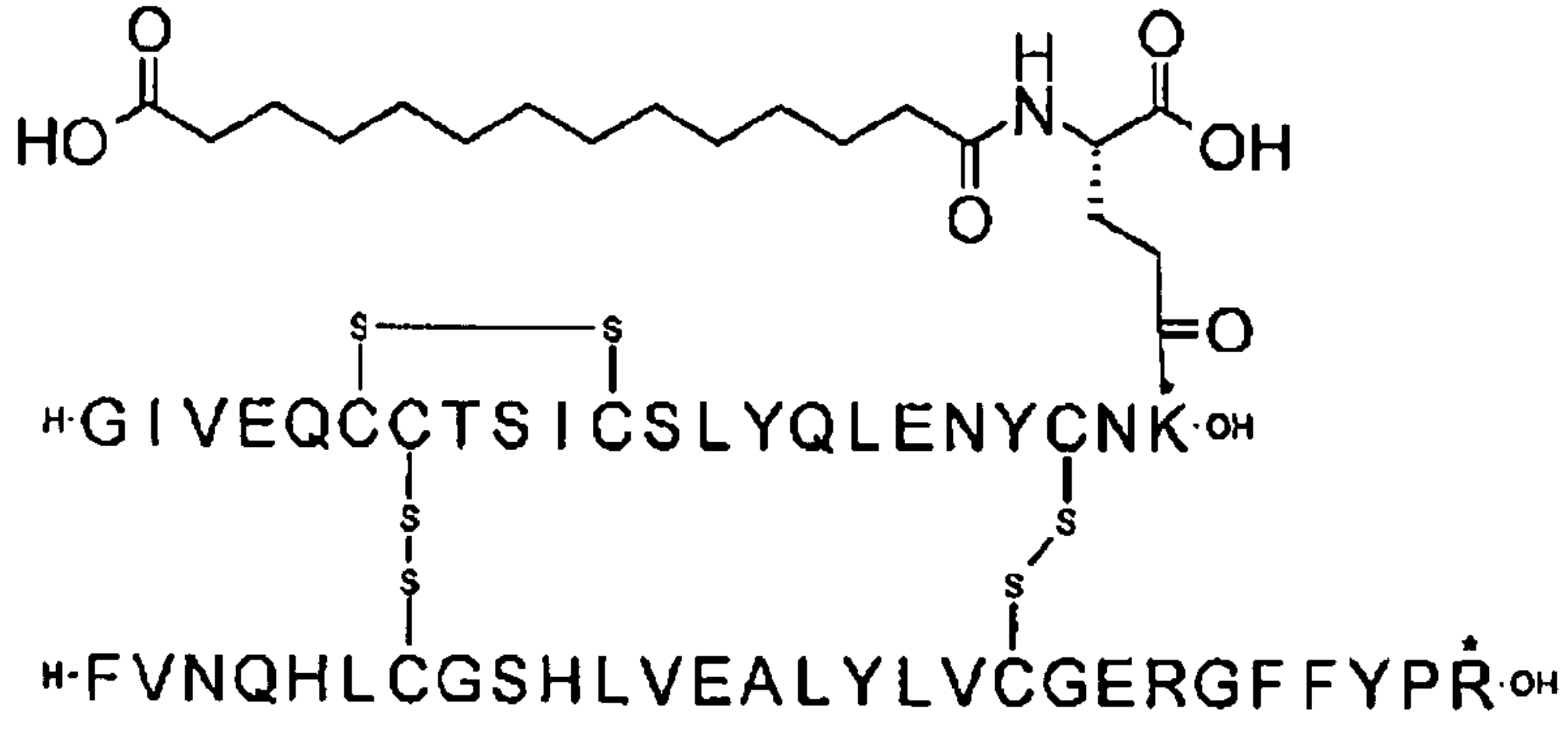


【0264】 LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1746.4 (M+4)/4$ 。計算值：1746.5。

實施例 14；通用程序（A）

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0265】 IUPAC（OpenEye，IUPAC 型式）名稱：
N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰島素（人類）-(A)-肽基)-N{ ϵ }[(4S)-4-
羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]Lys,(B)-肽。



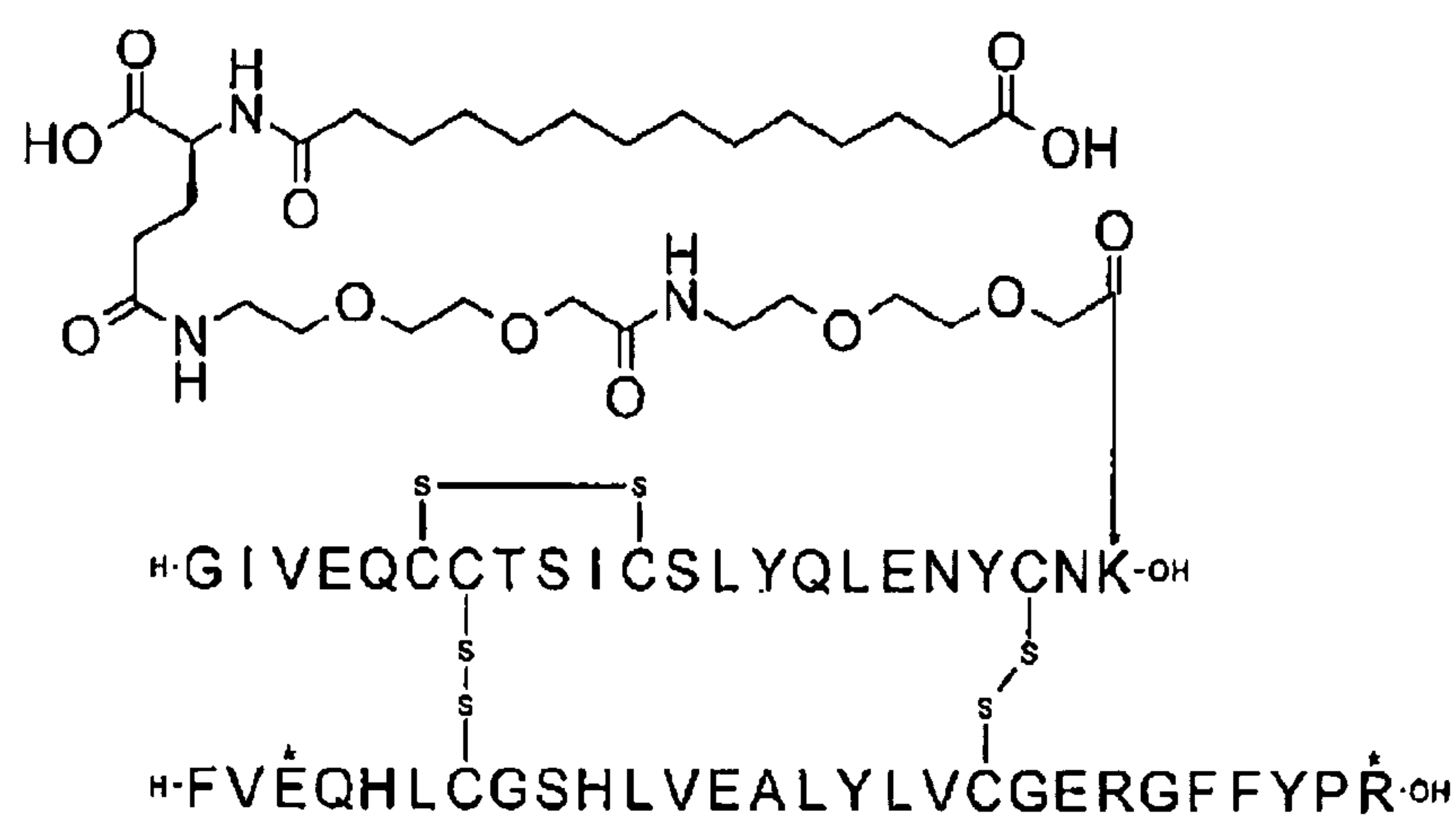
【0266】 LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1533.2 (M+4)/4$ 。計算值：1533.8

實施例 15；通用程序（A）

A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30
人類胰島素；

【0267】 IUPAC（OpenEye，IUPAC 型式）名稱：
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰島素（人類）-(A)-肽

基)-N{ ε }[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]- 乙醯基]Lys,(B)-肽。

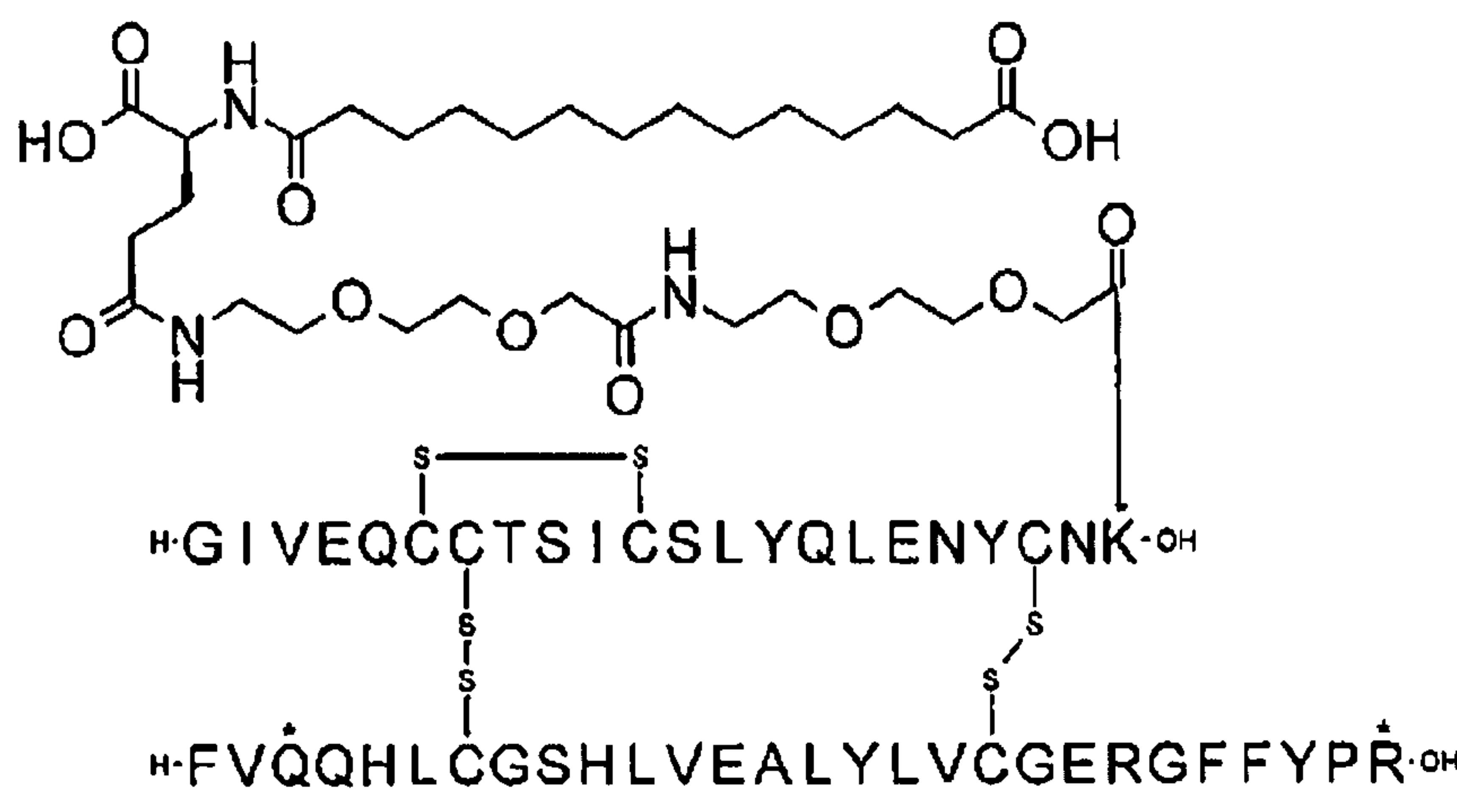


【0268】 LC-MS（電噴霧）：m/z = 1610.7 (M+4)/4。計算值：1610.1

實施例 16；通用程序（A）

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30
人類胰島素；

【0269】 IUPAC（OpenEye，IUPAC 型式）名稱：
N{ α }([GlnB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素（人類）-(A)- 肽
基)-N{ ε }[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺
基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]Lys,(B)-肽。



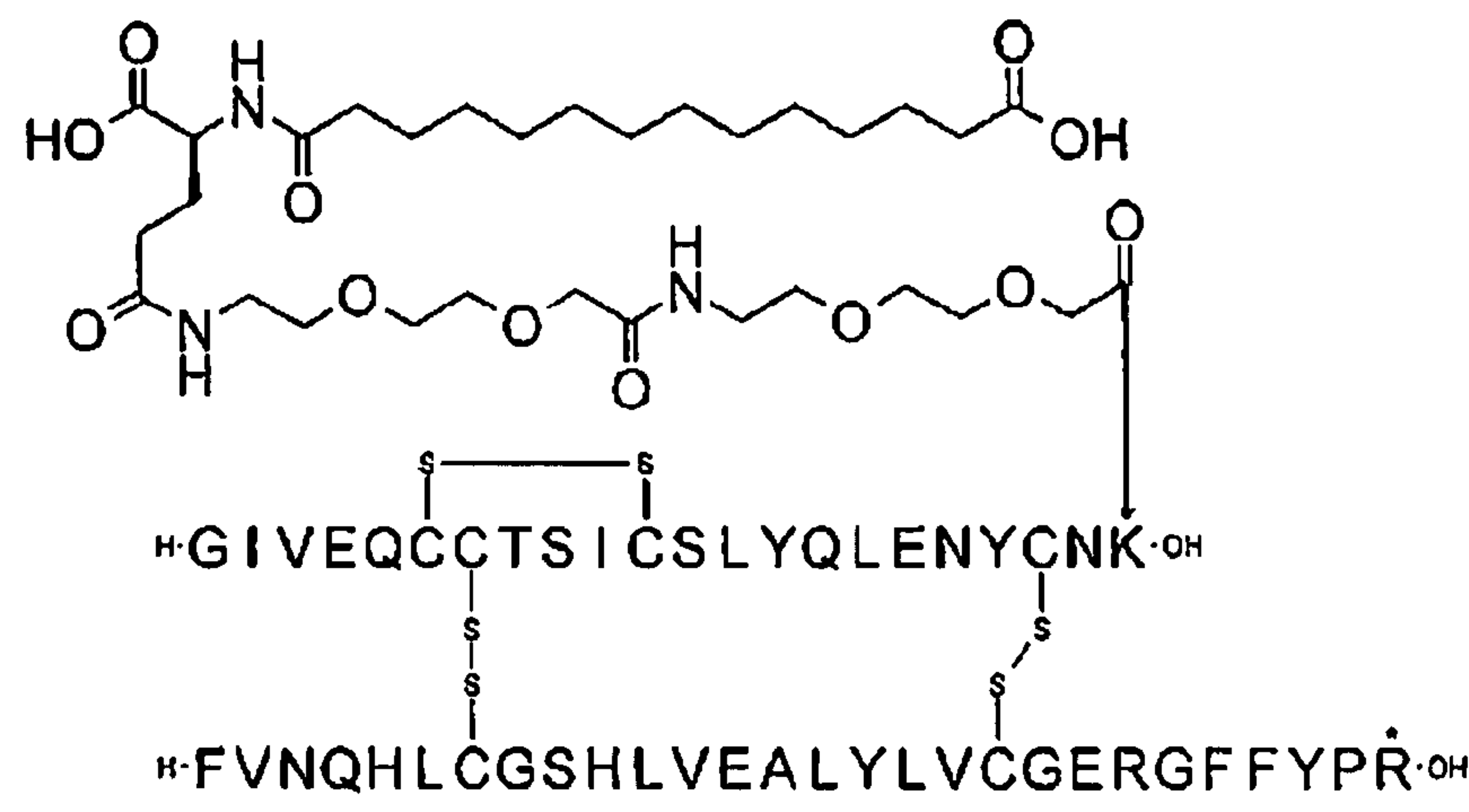
【0270】 LC-MS（電噴霧）：m/z = 1609.7 (M+4)/4。計算值：1609.9



實施例 17；通用程序（A）

A22K(Meps)-十四烷二醯基-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0271】 IUPAC （ OpenEye ， IUPAC 型式 ） 名稱：
N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素（人類）-(A)- 肽基)-N{ ϵ }[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]Lys,(B)-肽。

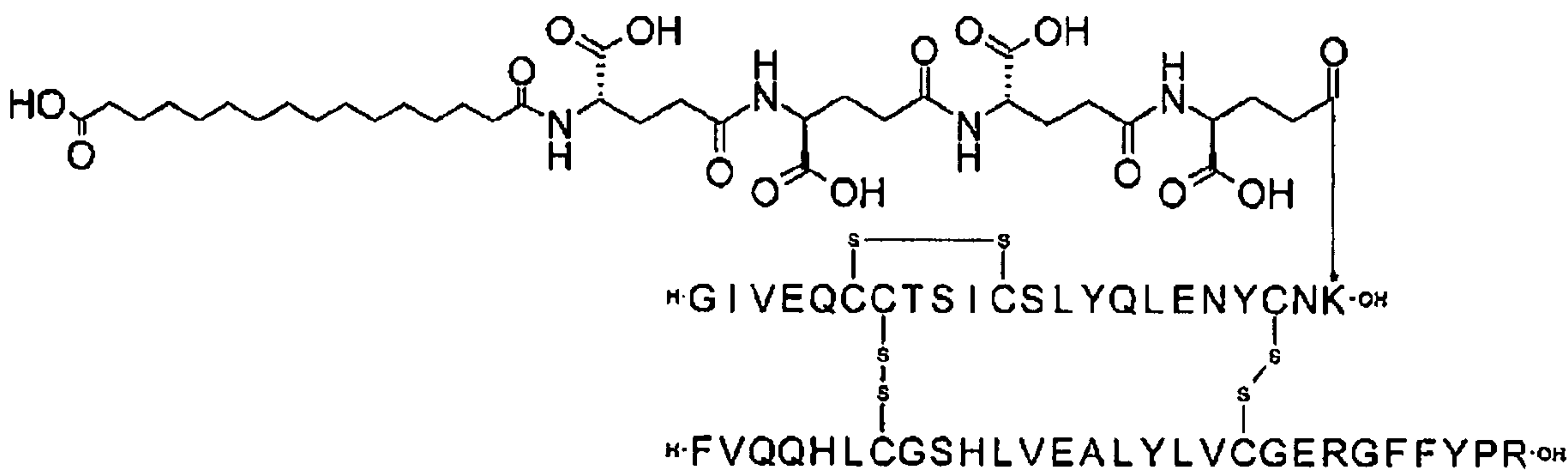


【0272】 LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1606.3 (M+4)/4$ 。計算值：1606.4

實施例 18；通用程序（A）

A22K(Neps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0273】 IUPAC （ OpenEye ， IUPAC 型式 ） 名稱：
N{ α }([GlnB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素（人類）-(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-羧基十五醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。

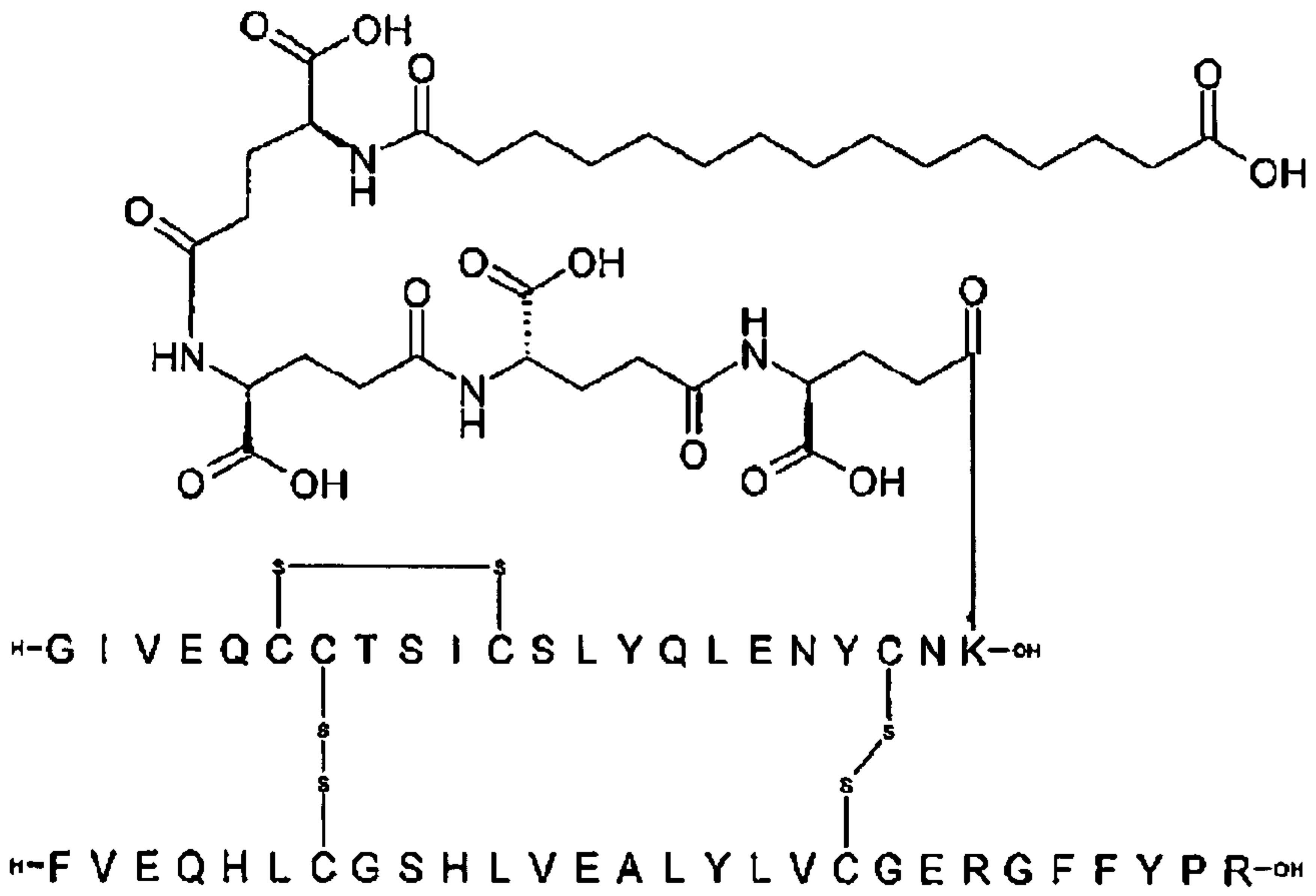


【0274】 LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1640.9 (M+4)/4$ 。計算值：1641.1

實施例 19；通用程序（A）

A22K(Meps)-十五烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0275】 IUPAC（OpenEye，IUPAC 型式）名稱：
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素（人類）-(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-(14-羧基十四醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



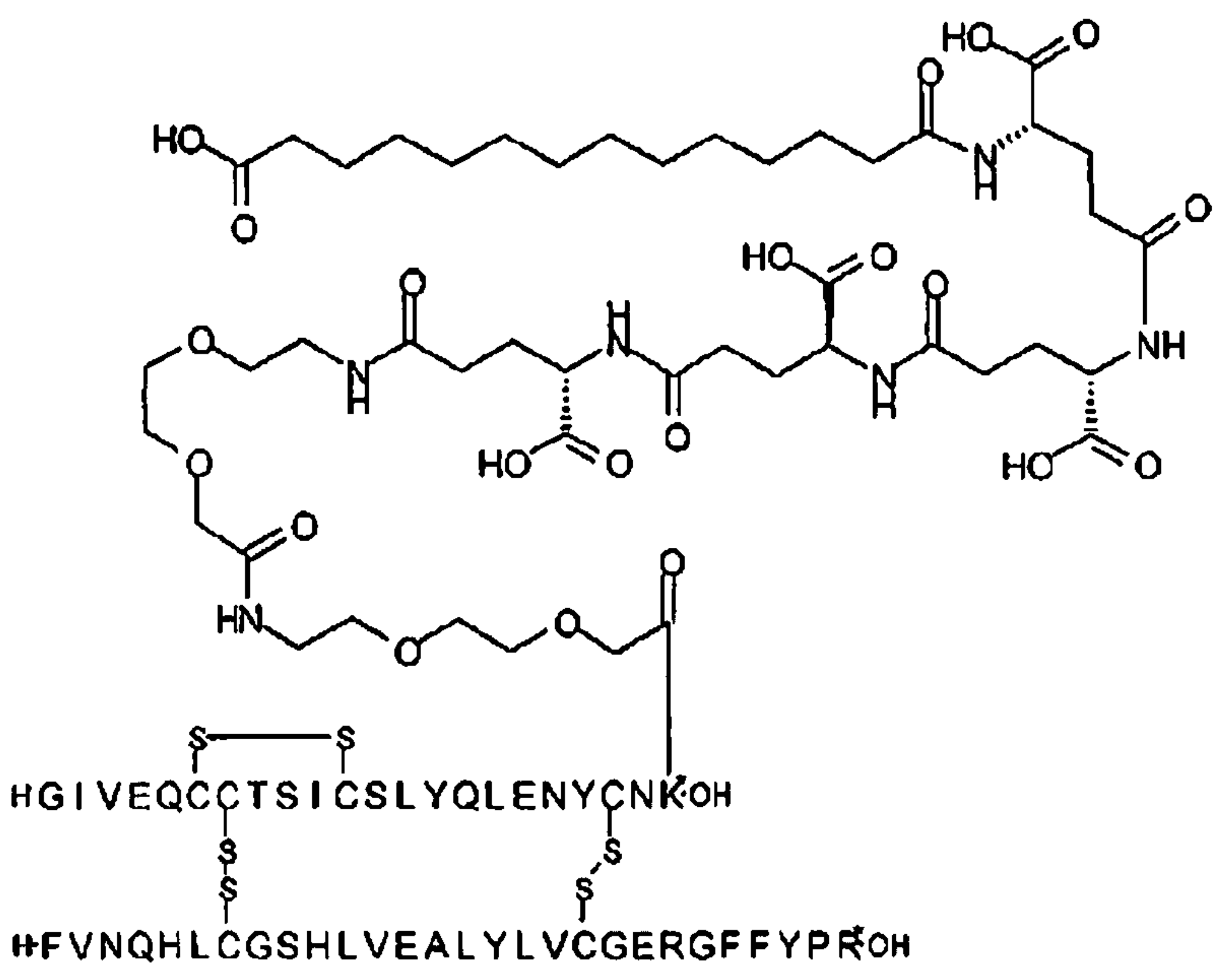
【0276】 LC-MS（電噴霧）： $m/z = 1637.63 (M+4)/4$ 。計算值：1636.76

實施例 20；通用程序（A）



A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0277】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱：
N{ α }([ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(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-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]Lys,(B)-肽。



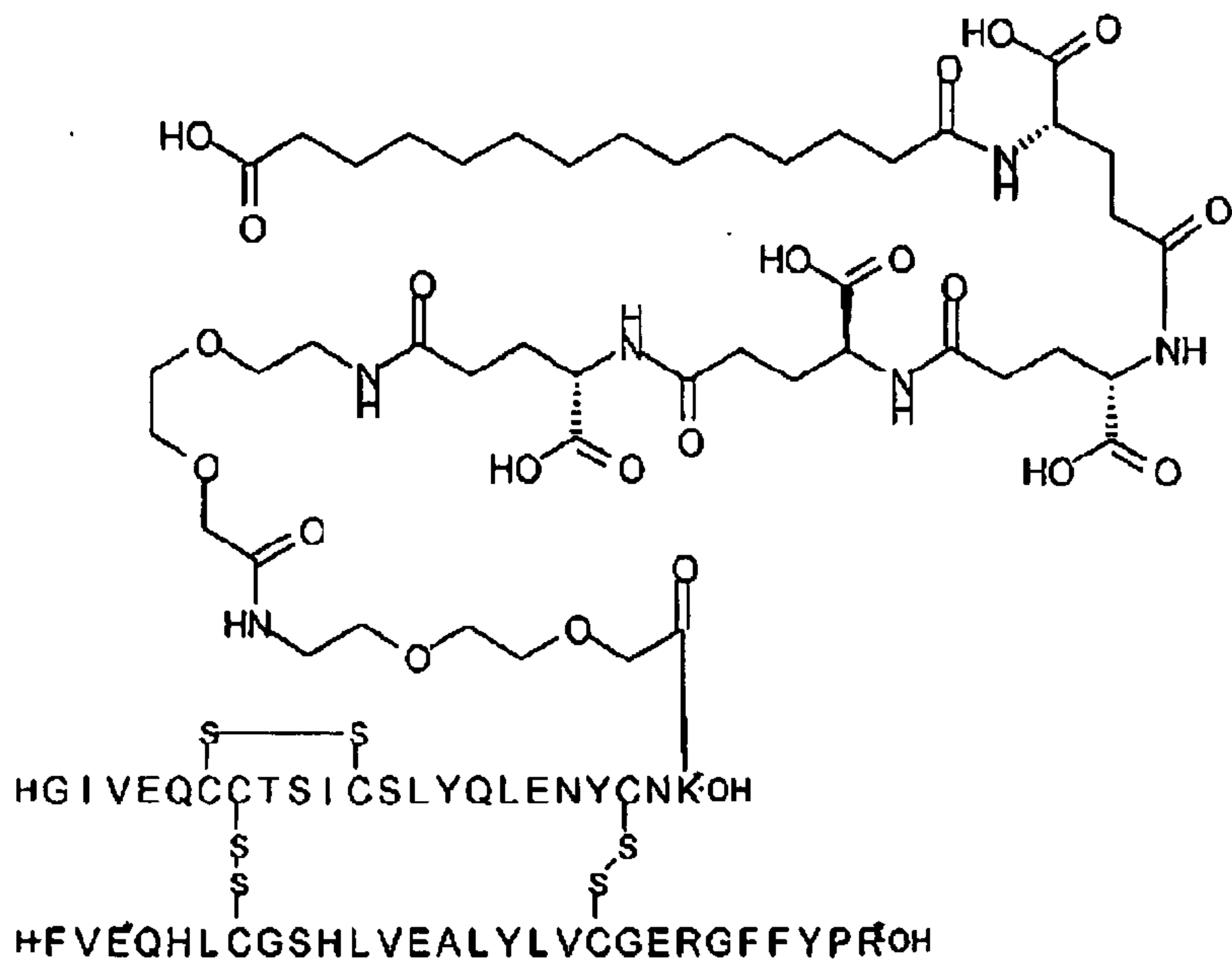
【0278】 LC-MS (電噴霧)：m/z = 1703.0 (M+4)/4。計算值：1703.2

實施例 21；通用程序 (A)

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0279】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱：
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(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-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]-乙醯基]Lys,(B)-肽。



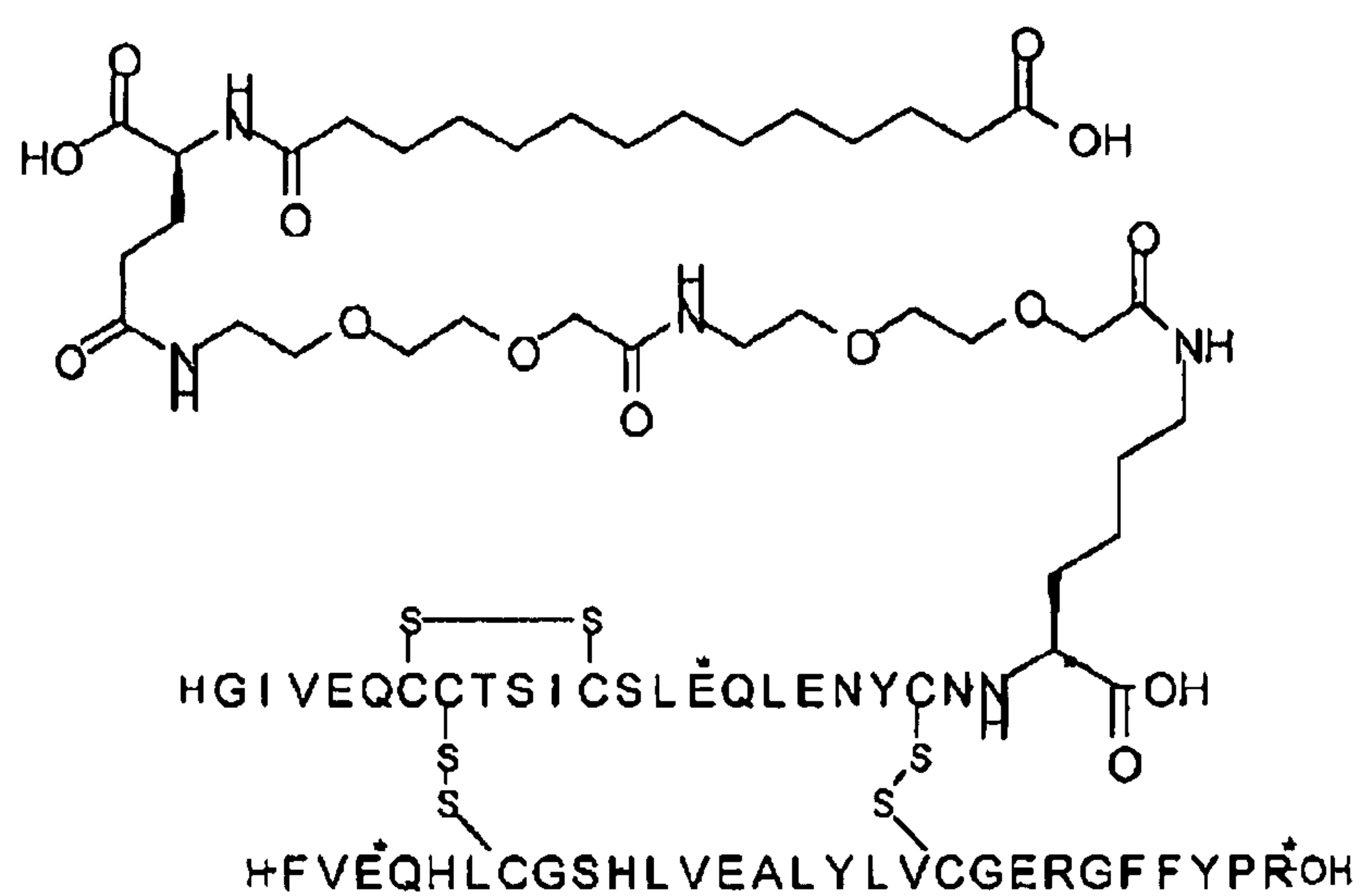
【0280】 LC-MS（電噴霧）：m/z = 1706.6 (M+4)/4。計算值：1707.0

實施例 22：通用程序（A）

A14E、A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xQEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0281】 IUPAC（OpenEye，IUPAC 型式）名稱：
N{ α }([GluA14,GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30-胰島素（人類）-(A)-肽
基)-N{ ε }[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺
基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]Lys,(B)-肽。



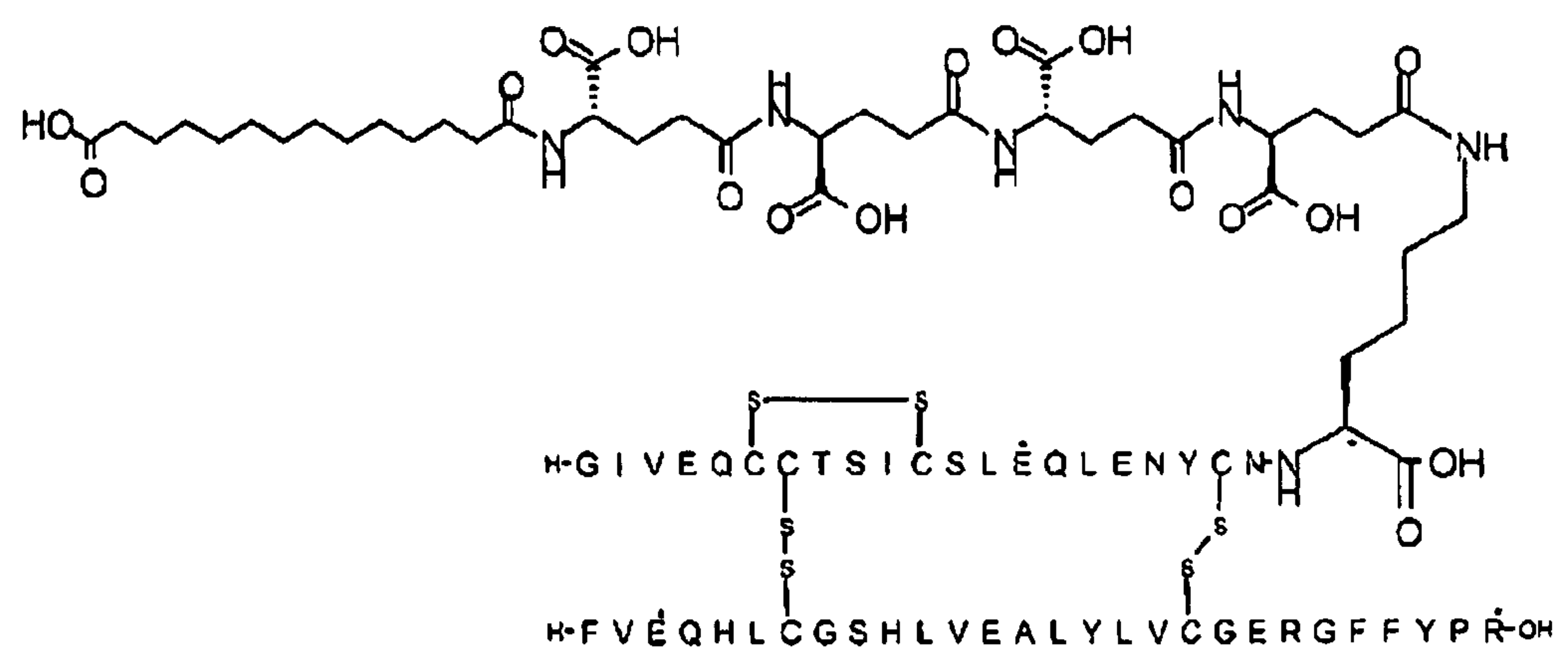


【0282】 LC-MS (電噴霧) : m/z = 1601.9 (M+4)/4 。計算値 : 1601.6

實施例 23 ; 通用程序 (A)

A14E、A22K(N(e_{ps})-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30
人類胰島素 ;

【0283】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱 :
N{ α }([GluA14,GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(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
基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]-丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-
肽。

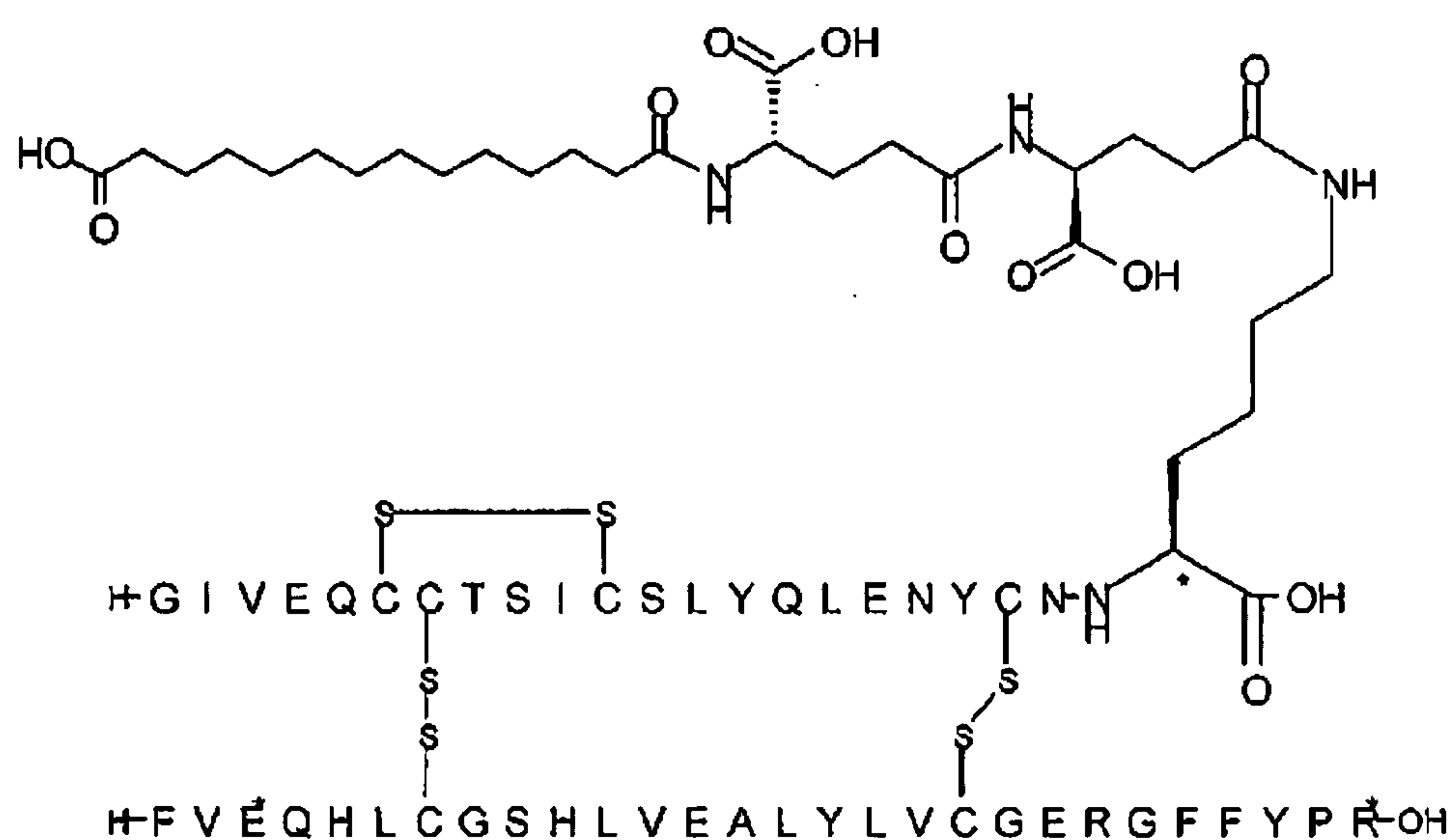


【0284】 LC-MS (電噴霧) : m/z = 1625.9 (M+4)/4 。計算値 : 1625.8

實施例 24；通用程序 (A)

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0285】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱：
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(A)- 肽基)-N{ ϵ }[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。

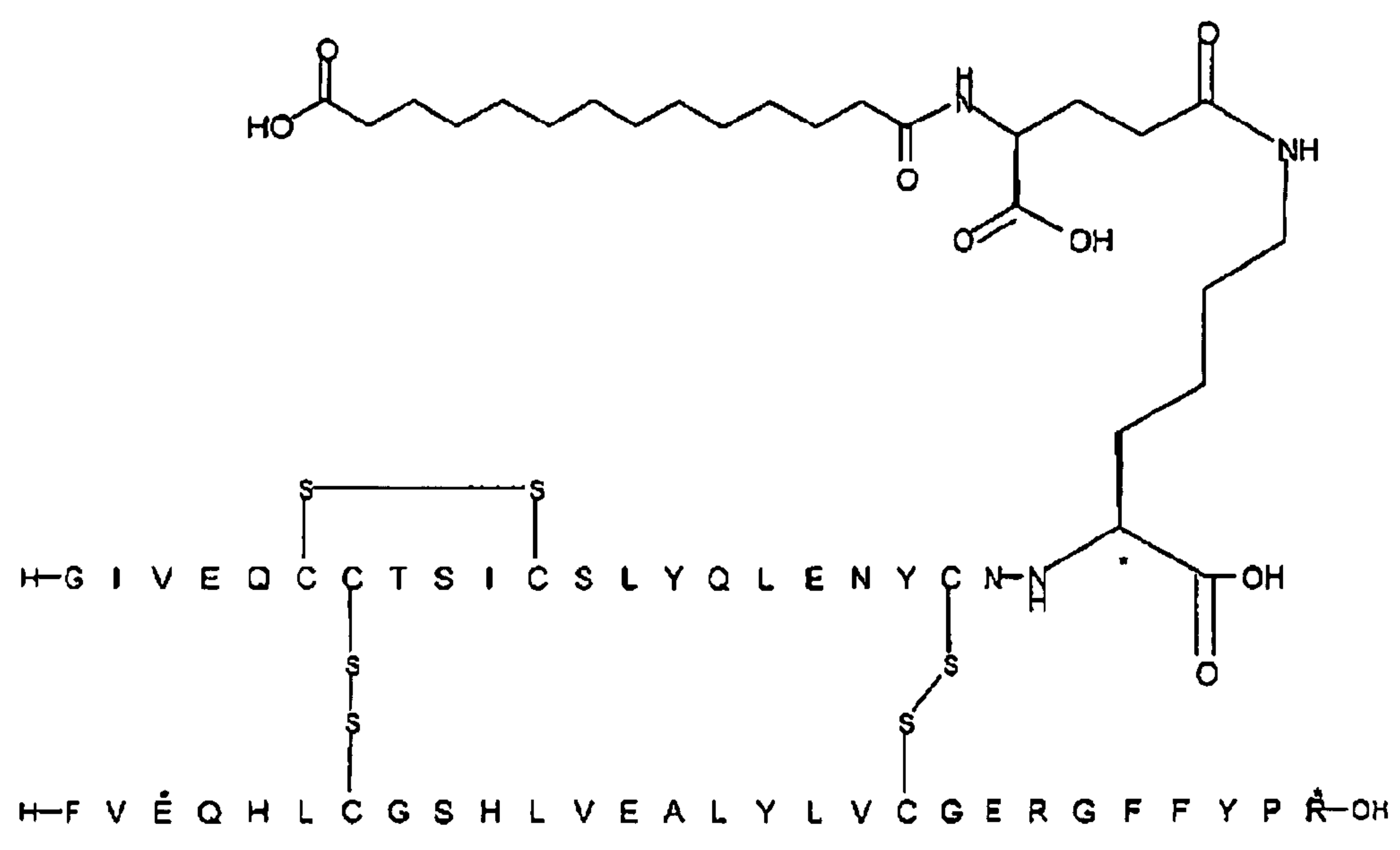


【0286】 LC-MS (電噴霧) : $m/z = 1537.7 (M+4)/4$ 。計算值：1537.5

實施例 25；通用程序 (A)

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

【0287】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱：
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(A)- 肽基)-N{ ϵ }[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]Lys,(B)-肽。

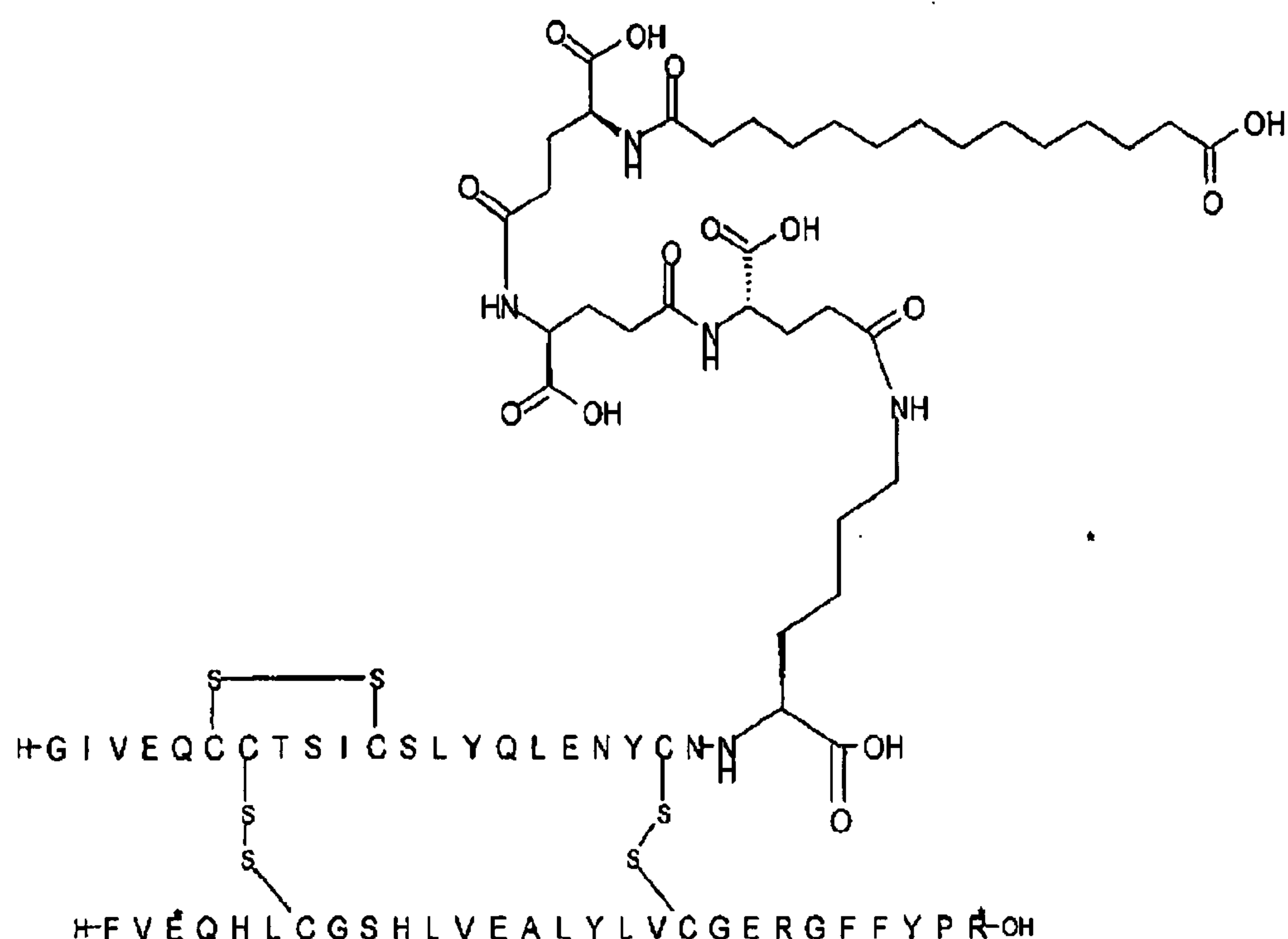


【0288】 LC-MS (電噴霧) : m/z= 1537.7 (M+4)/4 。計算値 : 1537.5

實施例 26 ; 通用程序 (A)

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-3xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素 ;

【0289】 IUPAC (OpenEye , IUPAC 型式) 名稱 :
N{ α }([GluB3,ArgB29],des-ThrB27,ThrB30- 胰島素 (人類) -(A)- 肽基)-N{ ε }[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-[[[(4S)-4-羧基-4-(13-羧基十三醯基胺基)丁醯基]胺基]丁醯基]胺基]丁醯基]Lys,(B)-肽。



【0290】 此類似物可根據實施例 1 中所描述之方法來製備。

實施例 27；所選之本發明之胰島素衍生物之胰島素受體親和力，經所溶解之受體量測

【0291】 本發明之胰島素類似物之人類胰島素受體（IR）之相對結合親和力藉由競爭結合用閃爍近接分析（scintillation proximity assay，SPA）來確定（根據 Giendorf T 等人(2008)*Biochemistry* 47 4743-4751）。

【0292】 簡言之，在 96 孔 Optiplates（Perkin-Elmer Life Sciences）中對人類胰島素標準物與待測試之胰島素類似物進行一系列稀釋，隨後添加含 [¹²⁵I]-A14Y]-人類胰島素、抗 IR 小鼠抗體 83 -7、溶解之人類 IR-A（藉由麥胚凝集素層析自過度表現 IR-A 全受體之幼倉鼠腎（baby hamster kidney，BHK）細胞半純化）及 SPA 珠粒（抗小鼠聚乙烯甲苯 SPA 珠粒，GE Healthcare）之由 100 mM HEPES（pH 7.8）、100 mM NaCl、10 mM MgSO₄ 及 0.025%（v/v）Tween

20 組成之結合緩衝劑。在 22°C 下在輕輕震盪下培育板 22-24 h，在 2000 rpm 下離心 2 分鐘且經 NXT (Perkin-Elmer Life Sciences) 計數。

【0293】 根據四參數對數模型(Vølund A (1978) *Biometrics* 34 357-365) 分析來自 SPA 之資料，且相對於相同培養板內量測之人類胰島素標準物之結合親和力計算類似物之結合親和力。

【0294】 亦使用結合緩衝劑含有 1.5% HSA (w/v) (Sigma A1887) 之相關分析，以模擬更多生理病狀。

【0295】 胰島素受體親和力及所選本發明之胰島素類似物之其他試管內資料呈現於以下表 1 中。

實施例 28：經膜相關受體量測之所選之本發明之胰島素衍生物之胰島素受體親和力及胰島素樣成長因子-1 受體親和力

【0296】 自經含有人類 IR-A、IR-B 或 IGF-IR 插入物之 pZem219B 載體穩定轉染之 BHK 細胞純化膜相關人類 IR 及 IGF-1R。收集 BHK 細胞且在冰冷緩衝劑中均質化 (25 mM HEPES pH 7.4, 25 mM CaCl₂ 及 1 mM MgCl₂、250 mg/L 桿菌肽、0.1 mM Pefablock)。勻漿經 41% (w/v) 蔗糖襯墊分層且在 4°C 下在 95000g 下離心 75 分鐘。收集血漿膜，用緩衝劑 (如上) 1:5 稀釋且在 4°C 下在 40000g 下再次離心 45 分鐘。使集結粒再懸浮於最小體積之緩衝劑中且經由針 (尺寸 23) 抽取三次，之後存儲於 -80°C 下直到使用。

【0297】 藉由競爭結合在 SPA 設備中測定膜相關人類 IR-A、IR-B 或 IGF-1R 中之任一者之相對結合親和力。在 96 孔 OptiPlates (Perkin-Elmer Life Sciences) 中一式兩份進行 IR 分析。在 25°C 下在輕輕攪拌下用含 50 pM [¹²⁵I-A14Y]-人類胰島素之總體積為 200 μL 之分析緩衝劑 (50 mM HEPES、

150 mM NaCl、5 mM MgSO₄、0.01% Triton X-100、0.1% (w/v) HSA (Sigma A1887)、完全無EDTA之蛋白酶抑制劑)、50 μg 塗佈小麥胚芽凝集物(WGA)之 PVT 微粒 (GE Healthcare) 且遞增濃度之配位體培育膜蛋白質 150 分鐘。藉由使板在 2000 rpm 下離心 2 分鐘來終止分析且藉由經 NXT (Perkin-Elmer Life Sciences) 計數定量結合放射能。

【0298】基本上如 IR 結合分析進行 IGF-1R 分析 IR 結合分析，其中例外為改用膜相關 IGF-1R 及 50 pM [¹²⁵I-Tyr31]-人類 IGF-1。根據四參數對數模型 (Vølund A (1978) *Biometrics* 34 357-365) 分析來自 SPA 之資料，且相對於在相同培養板內量測之人類胰島素標準物之結合親和力計算待測試之類似物之結合親和力。

【0299】以下表 1 中給出本發明之所選胰島素類似物之 IR (A 同功異構物) 及 IGF-1R 結合資料。

表 1

本發明之所選胰島素類似物之 IR（A 同功異構物）及 IGF-1 受體結合

資料

實施 編號	相對 IR-A 親和 力* （在 0% HSA 下） （%）	相對 IR-A 親和 力* （在 1.5% HSA 下）（%）	相對 IR-A 親和 力** （在 0.1% HSA 下）（%）	相對 IGF-1R 親 和力*** （在 0.1% HSA 下）（%）	IR IGF1 比 率****
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
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
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

*) 溶解之經選殖人類胰島素受體 A 同功異構物，資料以相對於人類胰島素之百分比表示，方案在實施例 27 中給出。

**) 膜相關之經選殖人類胰島素受體一種同功異構物受體，資料以相對於人類胰島素之百分比表示，方案在實施例 28 中給出。

***) 膜相關之經選殖人類胰島素樣成長因子-1 受體，資料以相對於人類胰島素之百分比表示，方案在實施例 28 中給出。

****) 膜相關受體之 IR-A 與 IGF-1R 親和力之比率，方案來自實施例 28。

實施例 29：藉由 SEC-HPLC 稀釋分析之單體-二聚體平衡

【0300】 進行一系列 SEC-HPLC 稀釋（尺寸排阻 HPLC）以分析無鋅胰島素之單體-二聚體平衡。藉由在 Superose 12 10/300 GL 管柱上注射不同體積（2.5-80 μ L）之 0.6 mM 待測試之胰島素類似物且用 0.8 mL/min 之流動速率下之 140 mM NaCl、10 mM Tris（pH 7.7）洗提，將樣本以實際上與注射體積成正比稀釋。基於滯留時間隨稀釋之改變計算兩個參數；分子量增加（Mw-增加）及 R-斜率。

【0301】 R-斜率以滯留時間對 log（注射體積）曲線之斜率導出，然而 Mw-增加通過一組參比樣品計算為最低與最高注射體積之間的表觀分子量增加。兩個參數反映胰島素類似物響應於稀釋解離之傾向，且因此可在皮下注射時獲得快速解離成單體。

【0302】 此等測定及先前技術之胰島素類似物之彼等測定之結果呈現於以下表 2-4 中。

表 2

分子量增加（Mw-增加）

本發明之化合物

實施例之化合物	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
10	-0.08	6.01
11	-0.13	10.71



表 3

分子量增加 (Mw-增加)

先前技術之化合物 (WO 2009/022013[‡])

先前技術 實施例編號 [‡]	R-斜率 (min/ μ L)	MW-增加 (%)
門冬胰島素	-0.04	3.00
人類胰島素	-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

【0303】 既定實施例編號為先前技術 (例如 WO 2009/022013) 中已知並描述之無 B27Thr 殘基缺失 (desB27) 之 A22K 醯化類似物。

表 4

分子量增加 (Mw-增加)

先前技術之化合物 (WO 2007/096431[‡])

先前技術 實施例編號 [‡]	R-斜率 (min/ μ L)	MW-增加 (%)
11	*	*
12	-0.66	74.4

*) 因胰島素類似物在 pH 7.4 下之可溶性不良故無資料可獲得

【0304】 既定實施例編號為先前技術 (例如 WO 2007/096431) 中已知並描述之無 B27Thr 殘基缺失 (desB27) 之 A22K 醯化類似物。

結論

【0305】 可推斷本發明之 A22K 醯化胰島素為 desB27 類似物，與先

前技術之類似 A22K 醯化類似物（無 B27Thr 殘基缺失）相比，更易於響應於稀釋而解離，且因此更可用於膳食性大丸劑投予。可進一步推斷在此分析中本發明之胰島素比人類胰島素（亦用作膳食性胰島素，但與門冬胰島素相比具有更慢之作用特徵）更類似於門冬胰島素（可以 NovoRapid®或 NovoLog®（Novo Nordisk A/S）市售，用作膳食性胰島素），相對於彼等先前技術之化合物強調本發明衍生物之改良特性。

【0306】 本發明之類似物均具有較小負 R-斜率，-0.13 至-0.02（表 2），因此與人類胰島素（R-斜率為-0.65；參見表 3）相比更類似於門冬胰島素（R-斜率為-0.04；參見表 3）。相反，所有所測試之先前技術之類似之類似物均具有類似於人類胰島素之 R-斜率（-0.52 至-0.78；表 3 及 4）。因此，所有本發明之類似物均展示與先前技術相比較小之 Mw-增加（分別高達 10.7%對 53-83%）（參見表 2、3 及 4）。

【0307】 此等資料指示與先前技術之類似之類似物相比本發明化合物更具單體性。在此態樣中，本發明化合物類似於門冬胰島素，然而先前技術之類似之類似物類似於人類胰島素。

實施例 30；藉由小角 X 射線散射（SAXS）量測之自我締合

【0308】 使用 SAXS 資料估計待測試之胰島素類似物在皮下注射後之自我締合狀態。在 pH 7.4 下自無含有 0.6 mM 待測試之胰島素類似物之及 140 mM NaCl 之 Zn 調配物收集 SAXS 資料。對於各類似物，使用 SAXS 散射特徵具有來自多組分混合物中之所有個別組分之強度貢獻之事實估計單體、二聚體及較大物質之相對量。藉由使用來自各組分之強度（形狀因數），可估計混合物中各組分之體積分率貢獻。使用非負或不受限制之最小平方

法之演算法之線性等式之系統用以使實驗與計算散射曲線之間的差異減到最小。單體、二聚體六聚體等之晶體結構自計算形狀因數。體積分率以百分比（%）表示。

【0309】 使用具有已知濃度之參考樣品且假定分子質量之比率與針對量測濃度正規化之零度角處分散強度 $I(0)$ 之比率一致來粗略估計平均分子量。

【0310】 自本發明之衍生物及先前技術之衍生物獲得之結果展示於以下表 5、6 及 7 中。

表 5

本發明之衍生物之 SAXS 資料

實施例編號	迴轉半徑，Rg (nm)	Dmax** (nm)	單體 (%)	二聚體 (%)	較大物質 (%)
1	1.8	6.5	80	0	20
2	1.4	4.3	74	24	2
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

表 6

先前技術之衍生物之 SAXS 資料（WO 2009/022013[‡]）

實施例編號 [‡]	迴轉半徑，Rg (nm)	Dmax (nm)	單體 (%)	二聚體 (%)	較大物質 (%)
5	2.9	10	48	0	52
4	3.2	11.4	0	58	42
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

表 7

先前技術之衍生物之 SAXS 資料 (WO 2007/096431[†])

實施例編號 [†]	迴轉半徑, Rg (nm)	Dmax (nm)	單體 (%)	二聚體 (%)	較大物質 (%)
12	3.1	12.0	48	0	52
11*	**	*	*	*	*

*) 分析緩衝劑中沈澱之衍生物表明存在極大之物質或聚集體。不可獲得資料。

【0311】 自此等研究可推斷在模擬注射後皮下組織條件之條件下本發明之衍生物更易於解離成單體，且因此在皮下注射之後與先前技術之類似物相比更快速地吸收。對於本發明之類似物單體含量在 63-83%之範圍內，對比於對於先前技術之類似物為 0-48%。可進一步推斷，對於先前技術之類似物，觀測到之最大分子物質尺寸較大 (Rg 與 Dmax) 並且發現量較大 (42-62%對比於對於本發明之類似物為 1-22%)。此情況強調與先前技術之類似物相比用於膳食性用途之類似物之效用。

實施例 31：製備醫藥製劑

【0312】 本發明之醫藥製劑可調配成水溶液。用例如氯化鈉及/或丙三醇使水溶液等張。此外，水性介質可含有緩衝劑及防腐劑。將製劑之 pH 值調節至所需值且視所討論之胰島素類似物之等電點 pI 而定可在約 3 至約 8.5 之間，約 3 與約 5 之間或為約 6.5、或約 7.4、或約 7.5。

製備無鋅胰島素調配物

【0313】 將無鋅胰島素類似物溶解於水溶液中，其在最終調配物中含有 0.6 mM 胰島素類似物、16 mM 間甲酚、16 mM 苯酚、7 mM 磷酸二鈉、適當量之菸鹼鹽胺及丙三醇，且使用 1 N 鹽酸/1 N NaOH 將 pH 值調節至 7.3



至 7.5（在室溫下量測）。

【0314】 添加水達最終體積且經由 0.2 μ m 過濾器將溶液無菌過濾。
將調配物填充至 2 ml 小瓶中且使用螺旋蓋密封。

表 8

胰島素製劑之例示性組成

	實施例 編號	胰島素衍生物 (mM)	苯酚 (mM)	間甲酚 (mM)	菸鹼醯胺 (mM)	丙三醇 (% w/v)	磷酸鹽 (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
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

實施例 32；蛋白質調配物之物理穩定性之評估的 ThT 原纖維化分析

【0315】 肽之物理穩定性低可引起澱粉狀蛋白原纖維形成(在樣品中觀測到井然有序之纖維樣大分子結構)，最終導致凝膠形成。硫代黃素 T（ThT）在結合至原纖維時具有獨特螢光特徵[Naiki 等人 (1989) *Anal. Biochem.* 177 244-249；LeVine (1999) *Methods. Enzymol.* 309 274-284]。

【0316】 提出部分摺疊之肽中間物之形成為啟始原纖維化之一般機制。極少彼等中間物成核以形成上面可組合有其他中間物且進行原纖維化之模板。滯後時間對應於時間間隔，其中細胞核之臨界質量增加且表觀速率常數為形成原纖維本身之速率（圖 1）。

樣品製備

【0317】 在各分析之前新鮮製備樣品。使各組成之樣品與水性 ThT 溶液（0.1 毫克 ThT）以 990:10 之容積比混合且轉移至 96 孔微量滴定板（Packard Opti-Plate™-96，白色聚苯乙烯）中。通常，一行孔中置放各樣品之四或八個複本（對應於一種測試條件）。用 Scotch 15 襯墊（Qiagen）密封該板。

培育及螢光測量

【0318】 在 Fluoroskan Ascent FL 螢光讀板儀或 Varioskan 板讀取器（Thermo LabSystems）中在既定溫度下培育、震盪且量測 ThT 螢光發射。將溫度調節至 37°C。在所有呈現之資料中，將回旋震盪調節至 960 rpm，幅度為 1 mm。使用經由 444 nm 濾光器之激發及經由 485 nm 濾光器之發射量測進行螢光量測。各運作藉由在分析溫度下培育培養板 10 分鐘起始。每 20 分鐘量測培養板長達 45 小時。每次量測之間，將培養板震盪且如所述加熱。

資料處理

【0319】 在 Microsoft Excel 中產生螢光對時間曲線且將滯後時間估計為滯後區域與原纖維化區域之線性接近之間的交切，如圖 14A、14B 及 14C 中所示（分別為圖示 1A、1B 及 1C）。滯後時間之增加對應於物理穩定性增加。資料點典型地為四或八種樣品之平均值。

【0320】 所獲得之本發明之 A22K 醯化類似物及先前技術之無 B27Thr 殘基缺失（desB27）之 A22K 醯化類似物之結果展示於以下表 8 中。

表 8

量測為無鋅製劑之 ThT 滯後時間之物理穩定性

實施例編號	調配物	ThT 分析中之滯後時間 (h)	RSD (%)
2	A	26.7	27
2	B	34.9	16
2	C	42	6
4	D	43.5	5
4	E	45	*
4	F	45	*
7	G	26.3	20
7	H	20.2	31
7	I	15	15
18	J	14	17
WO 2009/022013 實施例 5		15.0	17
WO 2007/096431 實施例 12		4.7	17

*在 ThT 分析之時間間隔內無原纖維化

【0321】 推斷與先前技術之類似之類似物相比，本發明之 A22K 醯化胰島素類似物在無鋅調配物中在添加與不添加菸鹼醯胺之情況下展示朝向原纖維化之較好或類似穩定性（亦即物理穩定性增加）。此情況極出人意料，因為 SAXS 及 SEC-HPLC 稀釋資料指示本發明之胰島素類似物尺寸較小（亦即由單體及二聚體構成），熟習此項技術者預期其將產生較小物理穩定性。

實施例 33；胰島素化學穩定性之分析

尺寸排阻層析

所用調配物：參見實施例 31

【0322】 經 Waters Acquity BEH200 SEC 管柱（150×2.4 mm，部件編號 186005225）用含有 55%（v/v）乙腈、0.05%TFA 之洗提劑在 0.2 ml/min 之流動速率及 40°C 之管柱溫度下進行高分子量蛋白質（HMWP）及單體胰島素

類似物之定量確定。用可調諧吸光度偵測器 (Waters Acquity TUV) 在 215 nm 下進行偵測。600 μ M 胰島素類似物調配物與 600 μ M 人類胰島素標準物之注射體積為 1.5 μ l。在 5、25 及 37°C 下在 2 ml 小瓶中培育各類似物製劑。在定義時間下，量測製劑之 HMWP 及含量。結果展示於以下表 9 中。

表 9

存儲在 37°C 下之 HMWP 含量

在 37°C 下 之週數	實施例編號 2			實施例編號 4			實施例編號 7			實施例 編號 18	WO 2009/022013 實施例編號 5
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	-
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%

*未測出

【0323】 推斷藉由在無鋅調配物中在 37°C 下存儲形成高分子量蛋白質 (HMWP) 遠小於本發明之胰島素衍生物 (在實施例 2、4 及 7 之本發明之胰島素分別存儲 8 週之後形成多達 6.8% HMWP)，然而先前技術之類似之胰島素衍生物導致形成 29.1% HMWP。進一步推斷本發明之胰島素衍生物當儲存於 37°C 時在無鋅調配物中且在菸鹼鹽胺存在下形成低含量之 HMWP。

逆相層析 (Reverse Phase Chromatography, UPLC)

【0324】 經 UPLC 系統使用尺寸為 2.1x150mm、粒徑為 1.7 μ m 且微孔尺寸為 100 Å 之 Phenomenex Kinetex C18 管柱 (Phenomenex 部件號 00F-4475-AN) 在 0.3 ml/min 之流動速率下在 50°C 下及在 215 nm 下 UV 偵測進行胰島素相關雜質之測定。用由以下組成之移動相進行洗提：A：10% (v/v)



乙腈、0.09M 磷酸氫二銨（pH 3.6）,及 B：80%（v/v）乙基。梯度：0 -7 min 15% B 至 26% B 之線性變化，7-34 min 線性變化至 40% B，34-36 min 線性變化至 80% B 以進行管柱洗滌，之後在 39 min 返回至初始條件 15% B。將雜質之量測定為按在防腐劑洗提之後測定之總吸收面積之百分比計量之吸收面積。在 5、25 及 37°C 下在 2 ml 小瓶中培育各類似物製劑。在定義時間下，量測製劑之胰島素相關雜質。結果展示於以下表 10 中。

表 10

儲存在 37°C 下之純度

在 37°C 下 之週數	實施例編號 2			實施例編號 4			實施例編號 7			實施 例編 號 18	WO 2009/022013 實施例編號 5
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	-
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%

*未測出

【0325】 推斷在無鋅調配物中本發明之胰島素衍生物遠比先前技術之類似 A22K 醯化類似物更穩定。先前技術之類似物不穩定以使得在 37°C 下存儲 8 週之後小於 5%（對應於 84%點之純度損失）之衍生物完整。本發明之胰島素類似物（由實施例 2、4 及 7 之化合物表示）在 37°C 下存儲 8 週之後分別具有小於 7.7、5.5 及 15%點純度損失。進一步推斷本發明之胰島素衍生物在添加有菸鹼醯胺之無鋅調配物中穩定。

實施例 34；LYD 豬中之皮下 PK/PD 特徵

【0326】 本發明之胰島素衍生物可藉由向豬皮下投予來測試，例如與

市售調配物中之門冬胰島素（NovoRapid）比較，或與根據此方案之先前技術之類似 A22K 醯化胰島素類似物比較。可測試衍生物之藥物動力學及/或藥效動力學參數。

所用通用方法

注射區域之超音波檢查及標記

【0327】 在麻醉以置放永久性靜脈內導管期間，用「MyLabFive」型 Esaote 超音波掃描儀及「LA435 6-18 MHz」型線性探針藉由超音波對豬進行檢測。識別右側或左側（與導管相反）耳與肩胛骨之間的面積為 2x2 cm 且無下層肌肉（適用於皮下注射）之中段脖子且藉由刺紋標記。

餵食時程

【0328】 在實驗之前使豬禁食（無早餐）。

【0329】 在整個實驗期間豬正常圈養且其未經麻醉。使豬禁食直至收集 12 小時血液樣品，但取水自由。在 12 小時血液樣品之後，餵食豬食物及蘋果。

給藥

【0330】 將筆芯注射劑（Penfill）安置於 NovoPen®4 中。各豬使用新針。使用針閉鎖裝置以使皮下滲透至表層下 5 mm 的安全性最大。計算並標註各豬之劑量體積（IU 體積）。

【0331】 劑量體積(U)=[(重量×劑量 nmol/kg)/濃度 nmol/mL]×100 U/mL

【0332】 對豬在脖子之右側或左側（與導管相反）側面皮下組織中給藥且使針在注射之後保持於皮下組織中最少 10 秒以使化合物安全沈積。

治療低血糖症

【0333】 在皮下給藥之後，應準備葡萄糖溶液靜脈內注射以預防低血糖症，亦即將 4-5 個注射器（20 mL）充滿無菌 20%葡萄糖，備用。根據臨床症狀及血糖儀（Glucocard X-計）之血糖量度診斷低血糖。

【0334】 治療由緩慢靜脈內注射 50-100 mL 20%葡萄糖（10-20 g 葡萄糖）組成。經 5-10 分鐘逐份給予葡萄糖直至起作用。

血液取樣

【0335】 在實驗之前用不添加 10 IU/mL 肝素之無菌 0.9% NaCl 檢查頸靜脈導管之通暢性。

【0336】 在給藥之前及之後，在以下時間點下在廢裏自中心靜脈導管獲取血液樣品：

給藥前（-10、0）、3、6、9、12、15、20、30、45、60、90、120、150、180、240、300、360、420、480、540、600 及 720 分鐘

【0337】 用 3 通旋塞獲取樣品。在獲取樣品之前抽出 4-5 ml 廢血液並丟棄。

【0338】 將 0.8 ml 血液樣品收集至塗佈有 EDTA 之管中以進行葡萄糖及胰島素分析。

【0339】 在各血液樣品之後，用 5 ml 不添加 10 IU/mL 肝素之無菌 0.9% NaCl 沖洗導管。

【0340】 將管輕輕傾斜最少 10 次以確保血液與抗凝血劑（EDTA）充分混合且在一分鐘之後將其置放於濕冰上。在取樣之後 1 小時內將管在 3000 rpm 及 4°C 下旋轉 10 min。將樣品儲存於濕冰上直至用移液管吸移。

【0341】 需要無菌技術以避免導管中細菌生長及凝固風險增加。

在實驗之後導管關閉

【0342】 若血液取樣不使用無菌技術進行，則可經由已用於血液取樣之導管緩慢靜脈內施予用 1 ml/10 kg Pentrexyl® (1 g 安比西林溶解於 10 ml 0.9% NaCl 中) 之單一靜脈內治療。此治療之後，用 10 ml 0.9% NaCl 沖洗導管。

【0343】 用 5 ml 添加肝素 (10 IU/mL) 之無菌 0.9% NaCl 沖洗導管。用具有乳膠注射膜之新盧爾鎖 (luer-lock) 使導管關閉，且經由膜注射 1.0 ml TauroLockHep500 作為導管之閉鎖。

分析血液樣品

【0344】 血漿葡萄糖：將 10 μ l 血漿吸入 500 μ l 緩衝溶液中以用 BIOSEN 自動分析儀量測血漿中之葡萄糖濃度。

【0345】 血漿胰島素：將 1 $\times$ 50 μ l 血漿吸入 0.65 ml Micronic®管中 (ELISA/LOCI/SPA 設備) 以使用 ELISA 或 LC-MS 分析。

【0346】 將血漿在 -20°C 下冷凍儲存。

實施例 35：LYD 豬中實施例 1 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵

【0347】 遵循以上通用程序，獲得實施例 1 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵

所用調配物

【0348】 實施例 1 之胰島素衍生物，pH=7.4；609 μ M；1.6% (w/vol) 丙三醇；30 mM 苯酚 (0 Zn/六聚體)。

【0349】 門冬胰島素，市售調配物，600 μ M；1.6% (w/vol) 丙三醇；7 mM 磷酸鹽；10 mM 氯化鈉；300 μ M 乙酸鋅；16 mM 苯酚；16 mM 間甲

酚。

【0350】 此等測定之結果呈現於隨附圖 1-4 及以下表 11 中。

表 11

藥物動力學參數（平均值±SD）

化合物		Tmax ^a (min)	Cmax/D pM/ (nmol/kg)	AUC/D pM*min/ (pmol/kg)	%外 推	T1/2 ^b (min)	MRT (min)
實施例 1 0 Zn/六聚體 1 nmol/kg (n=8)	平均值	11	1212	122	2	116	165
	SD		456	25		10	20
NovoRapid® 0.5 nmol/kg (n=8)	平均值	11	1277	67	2	67	93
	SD		788	26		16	19
NovoRapid® 1 nmol/kg (n=8)	平均值	14	880	64	2	75	110
	SD		335	20		7	11

- ^a T_{max} 以中值給出
- ^b T_{1/2} 以調和平均值±假 SD 給出
- ^c 根據靜脈內資料(未圖示)計算之生物可用性

結論

【0351】 推斷在無鋅之調配物中實施例 1 之胰島素衍生物具有與門冬胰島素（NovoRapid®）市售調配物極類似之 PK/PD 特徵。此外，此胰島素衍生物之平均滯留時間為 165 分鐘。可推斷實施例 1 之胰島素衍生物適用作快速作用（膳食性）胰島素。

實施例 36；LYD 豬中實施例 2 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵

【0352】 遵循以上通用程序，獲得實施例 2 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0353】 實施例 2 之胰島素衍生物，pH=7.367；607 μM；1.6%（w/vol）

丙三醇；30 mM 苯酚（0 Zn/六聚體）。

【0354】 門冬胰島素，市售調配物，600 μ M；1.6%（w/vol）丙三醇；7 mM 磷酸鹽；10 mM 氯化鈉；300 μ M 乙酸鋅；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚。

【0355】 此等測定之結果呈現於隨附圖 4-5 及以下表 12 中。

表 12

藥物動力學參數（平均值 $\pm$ SD）

化合物		Tmax ^a (min)	Cmax/D pM/ (nmol/kg)	AUC/D pM*min/ (pmol/kg)	%外推	T1/2 ^b (min)	MRT (min)
實施例 2 0 Zn/六聚體 1 nmol/kg (n=7)	平均值	45	762	68	5	64	111
	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

^a T_{max} 以中值給出
^b T_{1/2} 以調和平均值 $\pm$ 假 SD 給出
^c 根據靜脈內資料(未圖示)計算之生物可用性

結論

【0356】 推斷在無鋅之調配物中實施例 2 之胰島素衍生物具有與門冬胰島素極類似之 PK/PD 特徵。此外，此胰島素衍生物之平均滯留時間為 111 分鐘，與 NovoRapid®(門冬胰島素) 無明顯不同。可推斷實施例 2 之胰島素衍生物適用作快速作用（膳食性）胰島素。

實施例 37；LYD 豬中實施例 11 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵

【0357】 遵循以上通用程序，獲得實施例 11 之胰島素衍生物之以下

PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0358】 實施例 11 之胰島素衍生物，pH=7.44；689 μ M；1.6% (w/vol) 丙三醇；30 mM 苯酚（0 Zn/六聚體）。

【0359】 此等測定之結果呈現於隨附圖 6-7 及以下表 13 中。

【0360】 圖 6 及 7 分別展示以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之實施例 11 之胰島素（1 nmol/kg）之 PK（藥物動力學）特徵（胰島素濃度對時間），及所得血漿葡萄糖變化（1 nmol/kg）

表 13

藥物動力學參數（平均值 $\pm$ SD）

化合物		Tmax ^a (min)	Cmax/D pM/(nmol/kg)	AUC/D pM*min/ (pmol/kg)	%外 推	T1/2 ^b (min)	MRT (min)
實施例 11 1 nmol/kg (n=4)	平均值 SD	38	1207 330	261 60	12	245 32	334 46

^a T_{max} 以中值給出

^b T_{1/2} 以調和平均值 $\pm$ 假 SD 給出

【0361】 推斷在無鋅之調配物中實施例 11 之胰島素衍生物具有作為膳食性胰島素之 PK 特徵。此外，此胰島素衍生物之平均滯留時間為 334 分鐘，與類似（此外）之含有 1,16-十六烷二酸之先前技術之胰島素衍生物 A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素（WO 2009/022013，實施例 45，（MRT = 1287 分鐘）所獲得之特徵相比明顯更短，參見下文。可推斷實施例 11 之胰島素衍生物適用作快速作用（膳食性）胰島素。

實施例 38；LYD 豬中實施例 4 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵

【0362】 遵循以上通用程序，獲得實施例 4 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0363】 實施例 4 之胰島素衍生物，pH=7.43；621 μ M；1.8% (w/vol) 丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚，10 mM 氯化鈉 (0 Zn/六聚體)。

【0364】 此等測定之結果呈現於隨附圖 8-9 及以下表 14 中。

表 14

藥物動力學資料

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)
實施例 4	平均值	45	1272	255	8	160	235
0 zn/六聚體	SD		394	41		26	34
1 nmol/kg							

a) T_{max} 以中值給出
b) T_{1/2} 以調和平均值±假 SD 給出

【0365】 推斷在無鋅之調配物中實施例 4 之胰島素衍生物具有作為膳食性胰島素之 PK 特徵。此外，此胰島素衍生物之平均滯留時間為 160 分鐘，與類似之含有 1,16-十六烷二酸之先前技術之胰島素衍生物 A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素 (WO 2009/022013，實施例 45，(MRT = 1287 分鐘) 所獲得之特徵相比明顯更短，參見下文。可推斷實施例 4 之胰島素衍生物適用作快速作用 (膳食性) 胰島素。

實施例 39；LYD 豬中先前技術之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵

【0366】 遵循以上通用程序，獲得先前技術之胰島素衍生物

A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素 (WO 2009/022013，實施例 45) 之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0367】 WO 2009/022013 實施例 45 之化合物，588 μ M；1.6% (w/vol) 丙三醇；30 mM 苯酚；7 mM tris，pH=7.4 (0 Zn/六聚體)，1 nmol/kg。

【0368】 此等測定之結果呈現於隨附圖 10 及 11 以及以下表 15 中。

【0369】 圖 10 及 11 分別展示以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之先前技術之胰島素 (亦即 A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素 (WO 2009/022013，實施例 45)) (1 nmol/kg) 之 PK (藥物動力學) 特徵 (胰島素濃度對時間)，及所得血漿葡萄糖變化 (1 nmol/kg)。

表 15

皮下給藥 1 nmol/kg WO 2009/0022013 實施例 45 之化合物後之藥物動力學參數

化合物		AUC/D pM*min/(pmol/kg)	Tmax ^a (min)	Cmax/D pM/(nmol/kg)	MRT (min)	T1/2 ^b (min)
WO 2009/022013 實施例 45	平均值	422	45	736	1287	987
0 Zn/六聚體 (n=4) 1 nmol/kg	SD	51	17	344	86	36

^a T_{max} 以中值±SD 給出

^b T_{1/2} 以調和平均值±假 SD 給出

【0370】 推斷在無鋅之調配物中先前技術之胰島素衍生物 (WO 2009/022013 實施例 45) 與可能源自一部分皮下儲存物之延遲吸收之拖延性拖尾有關。24 小時(1440 分鐘) 時間點處此胰島素之血漿濃度為 98 pM。此外，血糖降低作用延伸至持續至少 8 小時 (480 分鐘)。平均滯留時間為 1287

分鐘，幾乎 1 天。由此使此先前技術之胰島素不適用於膳食性用途。

實施例 40：LYD 豬中先前技術之胰島素衍生物之接近類似物之皮下 PK/PD 特徵

【0371】 遵循以上通用程序，獲得如 WO 2009/022013 中所述之先前技術表示之 C14 二酸類似物 A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素（尤其參見實施例 45（A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素）之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0372】 A22K(Meps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B29R、desB30 人類胰島素（WO 2009/022013 實施例 45 之 1,16-十六烷二醯基（C16 二酸）類似物之 1,14-十四烷二醯基（C14 二酸）類似物）、588 μ M；1.6%（w/vol）丙三醇；30 mM 苯酚；7 mM tris，pH=7.4（0 Zn/六聚體）

【0373】 此等測定之結果呈現於隨附圖 9 及以下表 16 中。

【0374】 圖 12 及 13 分別展示以每 6 個胰島素分子 0 個鋅調配之先前技術表示之胰島素類似物之 C14 二酸類似物（亦即 A22K(Meps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG）、B29R、desB30 人類胰島素（WO 2009/022013，實施例 45））（1 nmol/kg）之 PK（藥物動力學）特徵（胰島素濃度對時間），及所得血漿葡萄糖變化（每個動物 72 nmol）。

表 16

皮下給藥 1 nmol/kg WO 2009/0022013 實施例 45 之先前技術化合物之 C16 二酸類似物之 C14 二酸類似物（每個動物 72 nmol）後之藥物動力學參數

動物編號	劑量 pmol/kg	Tmax min	Cmax/D pM/(nmol/kg)	AUC/D pM*min/(pmol/kg)	%外推 %	T1/2 min	MRT 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					
調和平均值						168	
假 SD						25	

結論

【0375】 推斷在無鋅調配物中先前技術（WO 2009/022013 實施例 45）之胰島素衍生物之 C14 二酸形式與可能源自一部分皮下儲存物延遲吸收之拖延性拖尾有關。10 小時(600 分鐘)時間點處此胰島素之血漿濃度為 24 pM。

【0376】 發現先前技術之此 C14 二酸類似物之平均滯留時間（MRT）為 271 分鐘。由本發明之實施例 1 及 2 之 C14 二酸類似物獲得之對應結果分別為 165 及 111 分鐘。此外，血糖降低作用延伸至持續至少 11 小時（660 分鐘）。

【0377】 由此使此先前技術之胰島素不適用於膳食性用途。

實施例 41；肥胖 Zucker 大鼠中實施例 2 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD

特徵，調配物中有及無 170 mM 菸鹼醯胺下之特徵之比較

【0378】 遵循以上通用程序，獲得實施例 2 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0379】 實施例 2 之胰島素衍生物，pH=7.43；621 μ M；1.8% (w/vol) 丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚、10 mM 氯化鈉 (0 Zn/六聚體)，有及無 170 mM 菸鹼醯胺。

【0380】 大鼠以 40 nmol/kg 給藥。

【0381】 此等測定之結果呈現於隨附圖 15 中。

【0382】 推斷實施例 2 之胰島素之無鋅調配物中包括 170 mM 菸鹼醯胺，皮下給藥至 Zucker 大鼠，產生甚至更快速作用之 PK 特徵，具有較快 T_{max} 。因此展示本發明之實施例 2 之胰島素調配物包括菸鹼醯胺產生甚至更適合於膳食性用途之胰島素調配物。

實施例 42；肥胖 Zucker 大鼠中實施例 7 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵，調配物中有及無 170 mM 菸鹼醯胺下之特徵之比較

【0383】 遵循以上通用程序，獲得實施例 7 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物：

【0384】 實施例 7 之胰島素衍生物，pH=7.39；604 μ M；1.6% (w/vol) 丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚、7 mM 磷酸鈉、10 mM 氯化鈉 (0 Zn/六聚體)、170 mM 菸鹼醯胺。

【0385】 實施例 7 之胰島素衍生物，pH=7.39；599 μ M；1.6% (w/vol)

丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚；7 mM 磷酸鈉；10 mM 氯化鈉（0 Zn/六聚體）。

【0386】 大鼠以 40 nmol/kg 給藥。

【0387】 此等測定之結果呈現於隨附圖 16-17 中。

【0388】 推斷實施例 7 之胰島素之無鋅調配物中包括 170 mM 菸鹼醯胺，皮下給藥至 Zucker 大鼠，產生甚至更快速作用之 PK 特徵，具有較快 T_{max} 。因此展示本發明之實施例 7 之胰島素調配物包括菸鹼醯胺產生甚至更適合於膳食性用途之胰島素調配物。

實施例 43：肥胖 Zucker 大鼠中實施例 16 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵，調配物中有及無 170 mM 菸鹼醯胺下之特徵之比較

【0389】 遵循以上通用程序，獲得實施例 16 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0390】 實施例 16 之胰島素衍生物，pH=7.44；599 μ M；1.6%（w/vol）丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚、7 mM 磷酸鈉、10 mM 氯化鈉（0 Zn/六聚體）；170 mM 菸鹼醯胺。

【0391】 實施例 16 之胰島素衍生物，pH=7.40；581 μ M；1.6%（w/vol）丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚；7 mM 磷酸鈉；10 mM 氯化鈉（0 Zn/六聚體）。

【0392】 大鼠以 40 nmol/kg 給藥。

【0393】 此等測定之結果呈現於隨附圖 18-19 中。

【0394】 推斷在實施例 16 之胰島素之無鋅調配物中包括 170 mM 菸

鹼醯胺，皮下給藥至 Zucker 大鼠，產生甚至更快速作用之 PK 特徵，具有較快 $T_{\max}$ 。因此展示本發明之實施例 16 之胰島素調配物包括菸鹼醯胺產生甚至更適合於膳食性用途之胰島素調配物。

實施例 44；LYD 豬中實施例 4 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵，調配物中有及無 170 μ M 菸鹼醯胺下之特徵之比較

【0395】 遵循以上通用程序，獲得實施例 4 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0396】 實施例 4 之胰島素衍生物，pH=7.42；0.604 mM 胰島素衍生物；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚；2% (w/vol) 丙三醇；7 mM 磷酸鹽（0 Zn/六聚體）。

【0397】 實施例 4 之胰島素衍生物，pH=7.43；0.605 mM 胰島素衍生物；170 mM 菸鹼醯胺；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚；0.6% (w/vol) 丙三醇；7 mM 磷酸鹽。

【0398】 豬以 1 nmol/kg 給藥。

【0399】 此等測定之結果呈現於隨附圖 20 中。

【0400】 推斷在實施例 4 之胰島素之無鋅調配物中包括 170 μ M 菸鹼醯胺，皮下給藥至豬，產生甚至更快速作用之 PK 特徵，具有較快 $T_{\max}$ 。因此展示本發明之實施例 4 之胰島素調配物包括菸鹼醯胺產生甚至更適合於膳食性用途之胰島素調配物。

實施例 45；LYD 豬中實施例 2 之胰島素衍生物之皮下 PK/PD 特徵，調配物中有及無 170 μ M 菸鹼醯胺下之特徵之比較

【0401】 遵循以上通用程序，獲得實施例 2 之胰島素衍生物之以下 PK 及 PD 特徵。

所用調配物

【0402】 實施例 2 之胰島素衍生物，pH=7.4；608 μ M；2%（w/vol）丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚，7 mM 磷酸鈉（0 Zn/六聚體）。

【0403】 實施例 2 之胰島素衍生物，pH=7.4；614 μ M；170 μ M 菸鹼醯胺、0.6%（w/vol）丙三醇；16 mM 苯酚；16 mM 間甲酚、7 mM 磷酸鈉（0 Zn/六聚體）。

【0404】 豬以 1 nmol/kg 給藥。

【0405】 此等測定之結果呈現於隨附圖 21 中。

【0406】 推斷在實施例 2 之胰島素之無鋅調配物中包括 170 μ M 菸鹼醯胺，皮下給藥至豬，產生甚至更快速作用之 PK 特徵，具有較快 $T_{\max}$ 。因此展示本發明之實施例 2 之胰島素調配物包括菸鹼醯胺產生甚至更適合於膳食性用途之胰島素調配物。

【符號說明】

無

補充序列表

<110> 諾佛 儂迪克股份有限公司(Novo Nordisk A/S)
<120> 新穎胰島素衍生物及其醫療用途

<140> TW 104106145
<141> 2015-02-26

<150> EP 14157215.6
<151> 2014-02-28

<160> 5

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類胰島素類似物的A鏈

<220>
<221> 鏈
<222> (1)..(22)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> 乙醯化; (N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu);
(N(eps)-十六烷二醯基-4xgGlu);
(N(eps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG);
(N(eps)-十六烷二醯基-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> 人類胰島素類似物的A鏈

<220>
<221> 鏈
<222> (1)..(22)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> 乙醯化; (N(eps)十四烷二醯基-4xgGlu);
(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu);
(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG).

<400> 2
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn Lys
20

<210> 3
<211> 28

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類胰島素類似物的B鏈

<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> 人類胰島素類似物的B鏈

<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

<210> 5
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類胰島素類似物的B鏈

<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

申請專利範圍

1. 一種胰島素衍生物，該胰島素衍生物為人類胰島素之醯化類似物，該類似物

相對於人類胰島素為[A22K、desB27、B29R、desB30]；

且該胰島素類似物藉由醯化在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基來衍生，該醯化係使用式 II 之基團

[醯基]-[連接子]-

其中該連接子基團為由 1 至 10 個選自-gGlu-及-OEG-之胺基酸殘基構成之胺基酸鏈；其中

gGlu 表示 γ 羧胺酸殘基；

OEG 表示 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸之殘基（亦即式-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-之基團）；

該等胺基酸殘基可以任何順序存在；且

該胺基酸鏈包含至少一個 gGlu 殘基；且

其中該醯基為選自以下之 α, ω -二羧酸之殘基：

1,14-十四烷二酸；

1,15-十五烷二酸；及

1,16-十六烷二酸；

該醯化類似物可另外包含 A14E 及/或 B3E 或 B3Q 取代。

2. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素衍生物，該類似物相對於人類胰島素為[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]；且該胰島素類似物在 A22 位置處之離胺酸殘基之 ϵ 胺基處被醯化。

3. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素衍生物，其中該連接子基團係選自 -gGlu- ； -2xgGlu- ； -3xgGlu- ； -4xgGlu- ； -gGlu-2xOEG- ； -gGlu-3x(OEG-gGlu)- ； -4xgGlu-2xOEG- ； -2xOEG- ；及 -2xOEG-gGlu- 。
4. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素衍生物，其中該醯基為衍生自 1,14-十四烷二酸；1,15-十五烷二酸；或 1,16-十六烷二酸之二酸基。
5. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素衍生物，其中該式 II 之基團（亦即[醯基]-[連接子]-）為十四烷二醯基-gGlu-；十四烷二醯基-2xgGlu-；十四烷二醯基-3xgGlu-；十四烷二醯基-4xgGlu-；十四烷二醯基-gGlu-2xOEG-；十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG-；十四烷二醯基-2xOEG-；十五烷二醯基-4xgGlu；十六烷二醯基-4xgGlu-；十六烷二醯基-gGlu-2xOEG-；或十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu-。
6. 如申請專利範圍第 1 項之胰島素衍生物，其為
A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；
A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；
A14E、A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；
A22K(N(eps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；A22K(N(eps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3E、desB27、B29R、
desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類
胰島素；A22K(N(eps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、
desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3Q、desB27、B29R、
desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類
胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、desB27、B29R、desB30
人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30
人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30
人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類
胰島素；

A22K(N(eps)-十五烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類

胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

或

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-3xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素。

7. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項至第 6 項中任一項之胰島素衍生物及一或多種醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。
8. 如申請專利範圍第 7 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物。
9. 如申請專利範圍第 7 項之醫藥組成物，其在無添加鋅離子下調配為低鋅組成物，且其包含選自以下之人類胰島素之醯化類似物：

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十五烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；A22K(N(eps)-十六烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-3x(gGlu-OEG)-gGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十六烷二醯基-4xgGlu)、B3Q、desB27、B29R、desB30 人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu-2xOEG)、desB27、B29R、desB30 人

類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、desB30

人類胰島素；

A14E、A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu-2xOEG)、B3E、desB27、B29R、
desB30 人類胰島素；

A14E、A22K(N(eps)-十四烷二醯基-4xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30
人類胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-2xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類
胰島素；

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-gGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類胰
島素；

及

A22K(N(eps)-十四烷二醯基-3xgGlu)、B3E、desB27、B29R、desB30 人類
胰島素。

10. 如申請專利範圍第 8 項之醫藥組成物，其調配為低鋅組成物，其包含
每 6 個胰島素分子少於 0.2 個 Zn^{2+} 離子。
11. 如申請專利範圍第 8 項之醫藥組成物，其中尚未添加界面活性劑。
12. 如申請專利範圍第 8 項之醫藥組成物，其包含菸鹼化合物。
13. 如申請專利範圍第 12 項之醫藥組成物，其中該菸鹼化合物是菸鹼鹽胺。
14. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 6 項中任一項之胰島素衍生物之用
途，其用於製造用以治療或預防以下疾病之醫藥品：糖尿病、葡萄糖
耐受性異常、高血糖症、血脂異常、肥胖、代謝症候群（代謝症候群 X、

胰島素抗性症候群)、高血壓、認知障礙、動脈粥樣硬化、心肌梗塞、中風、心臟血管病、冠心病、發炎性腸症候群、消化不良或胃潰瘍。

15. 如申請專利範圍第 14 項之用途，其中所述糖尿病為 1 型糖尿病或 2 型糖尿病。

圖式

PK 平均值SEM

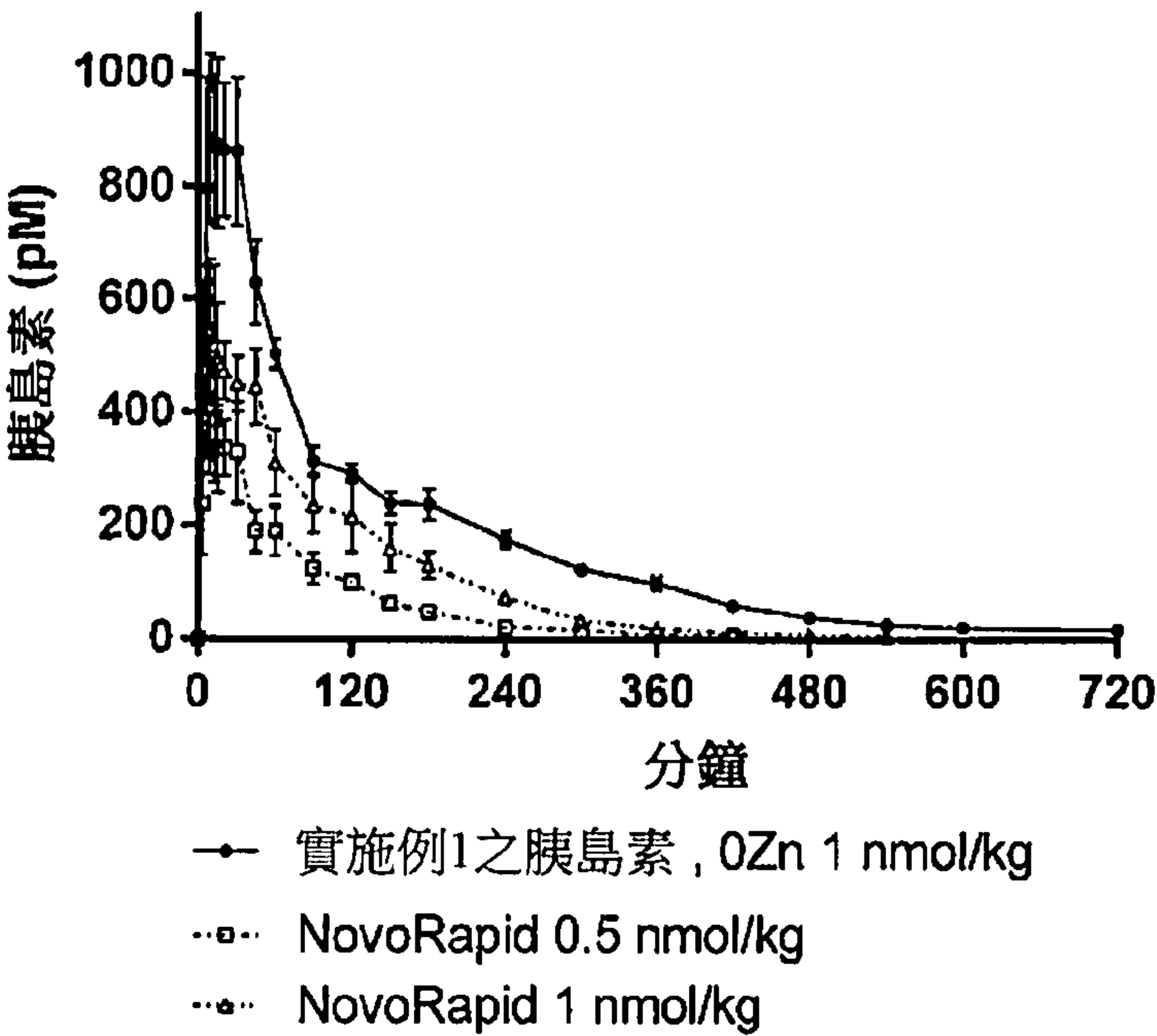


圖1

PK 平均值SEM

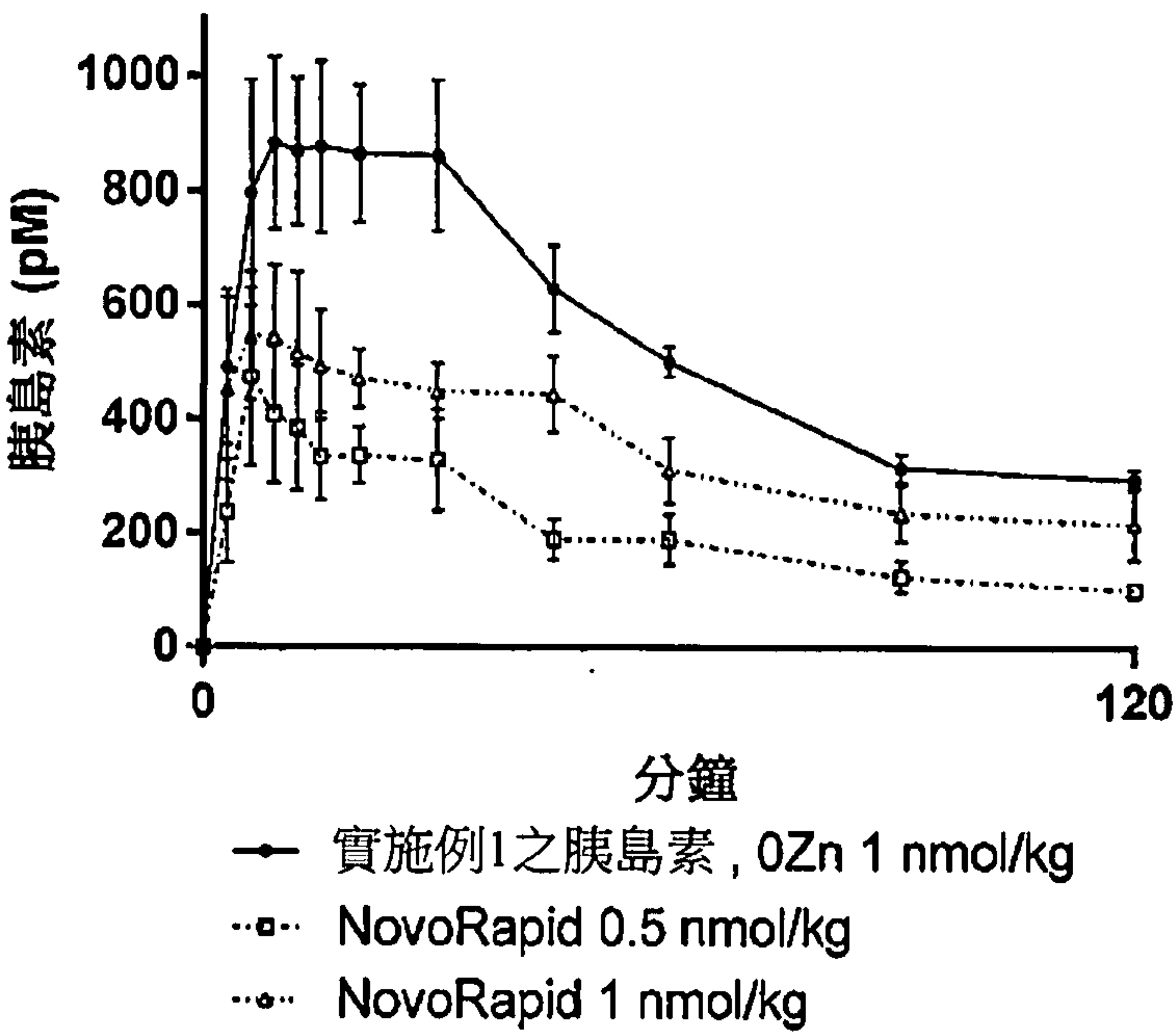


圖2

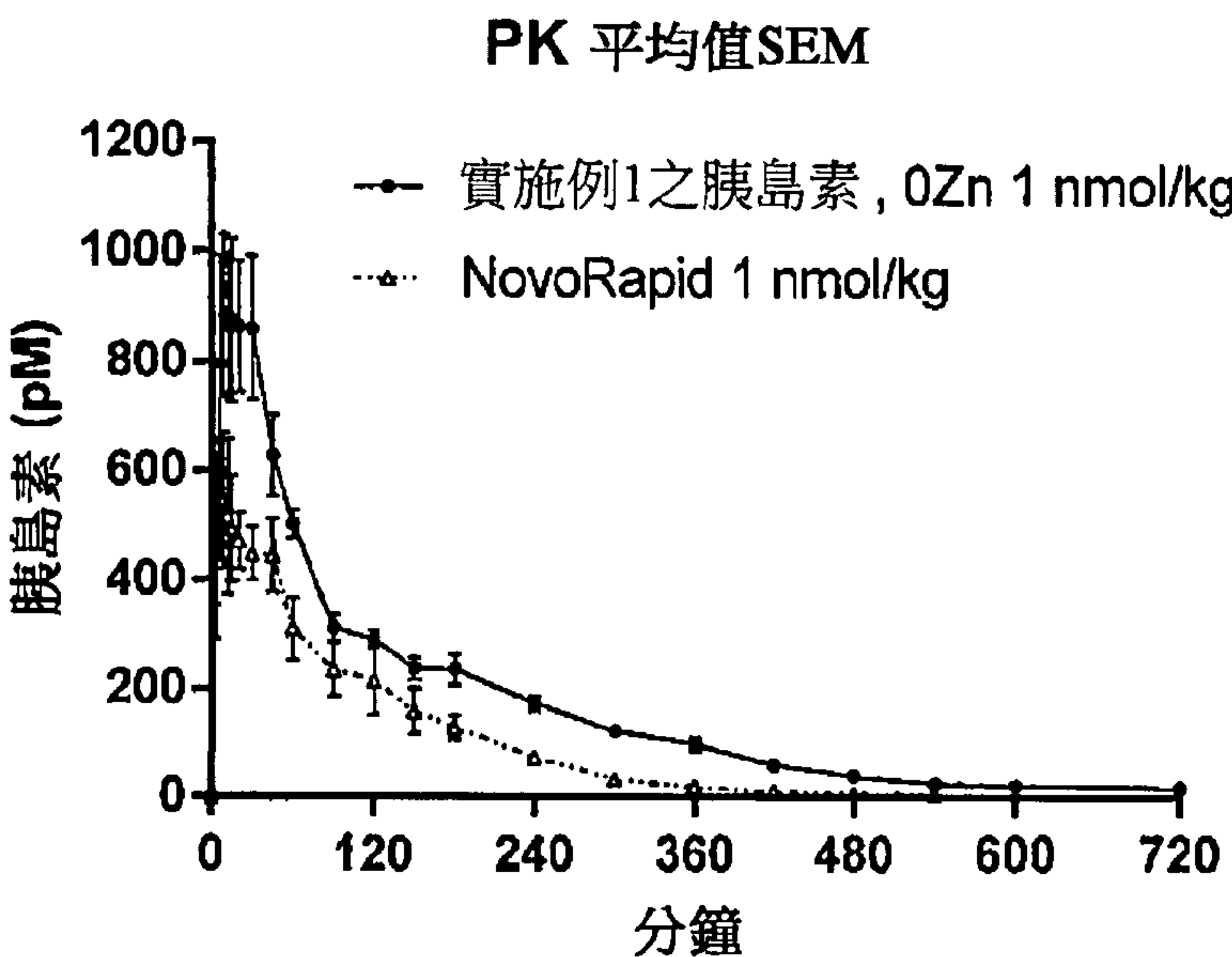


圖3a

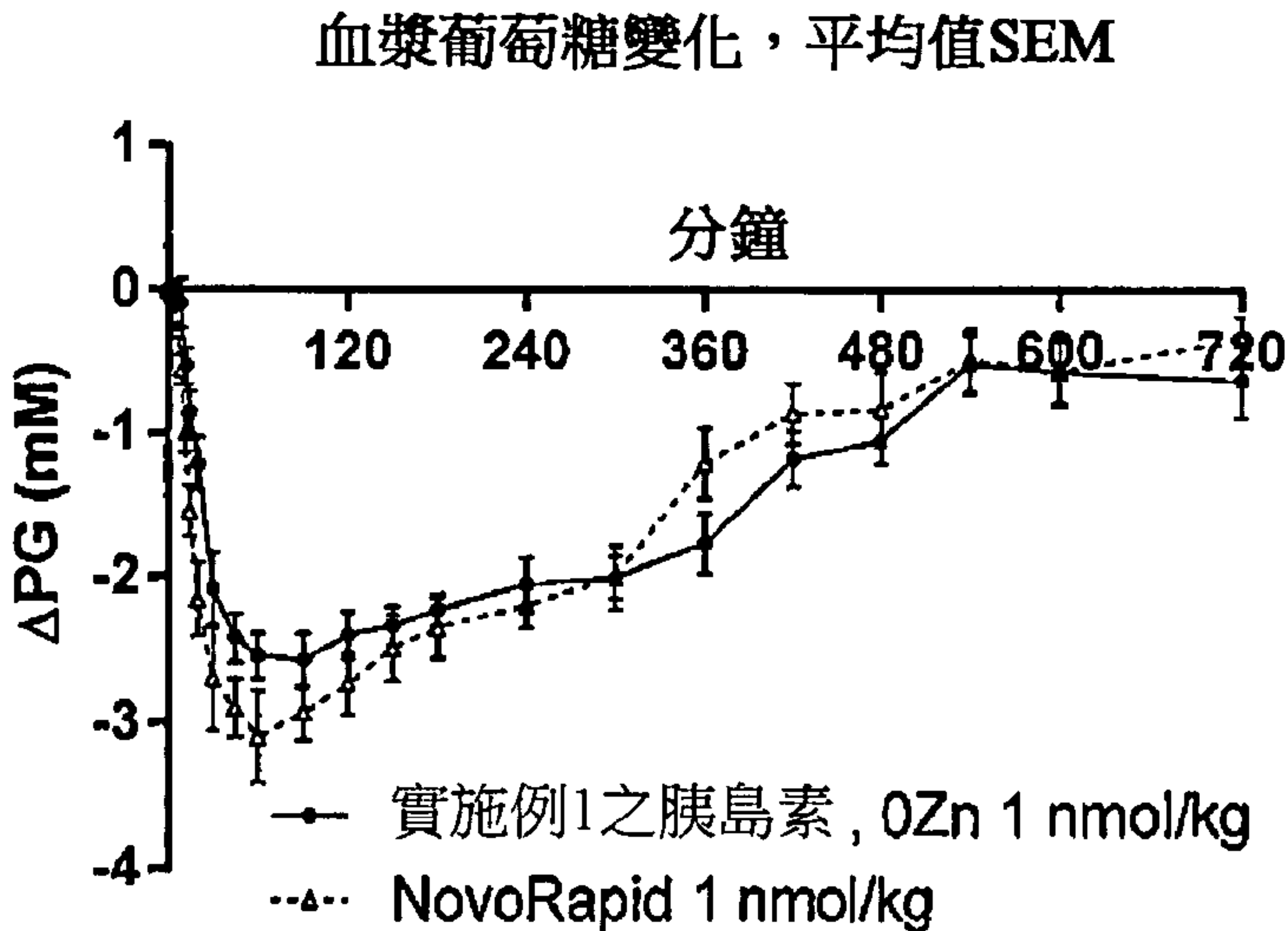


圖3b

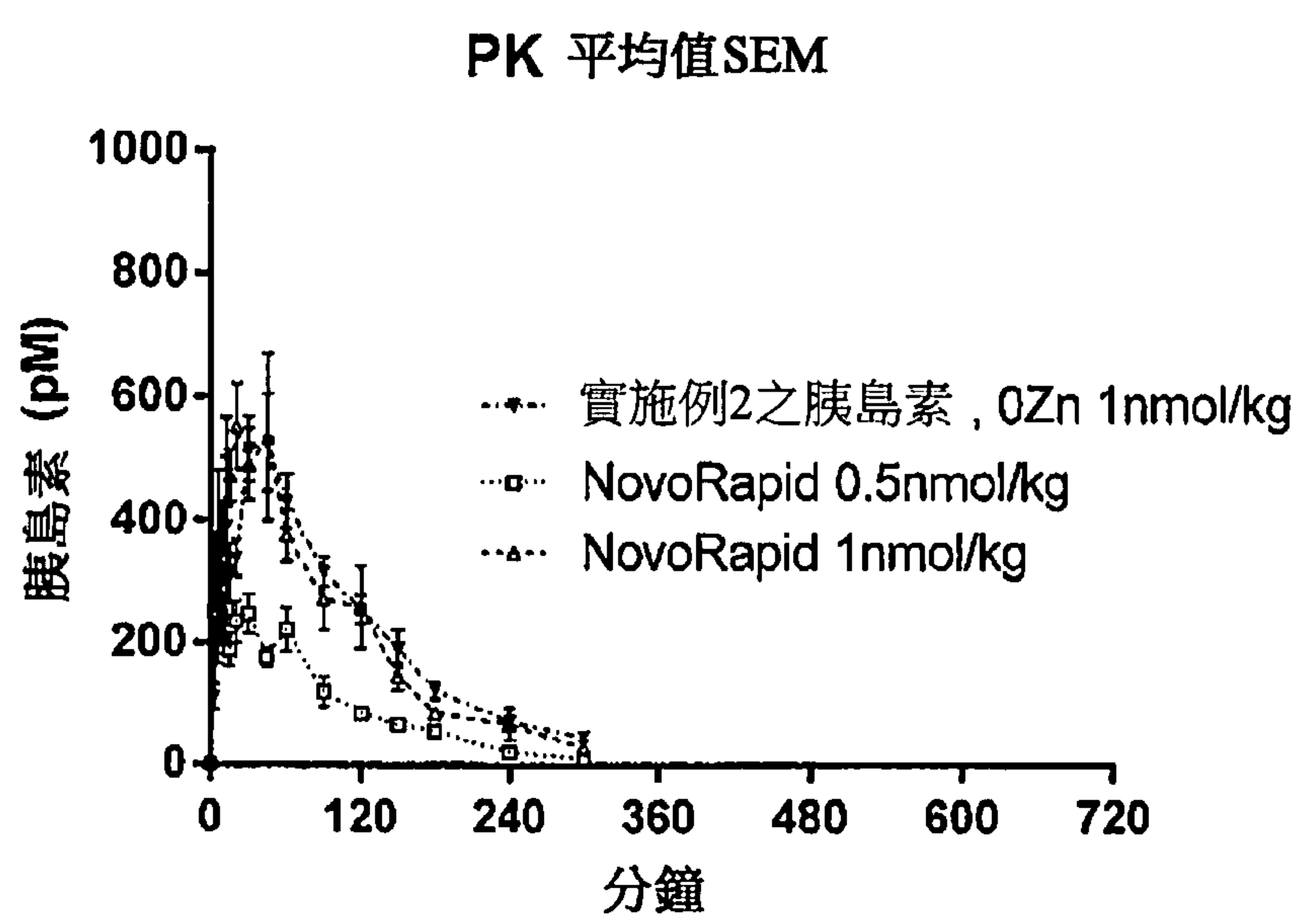


圖4a

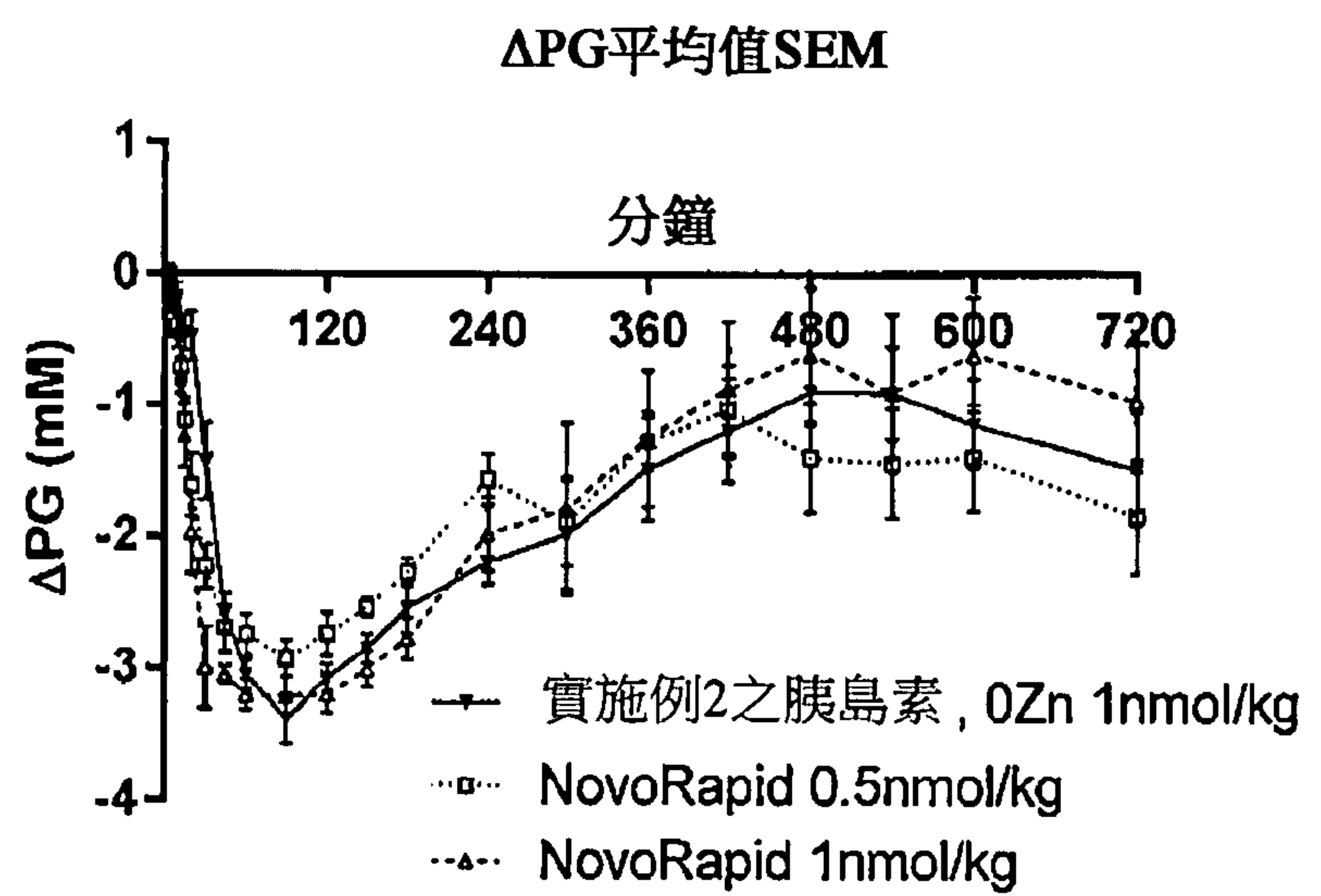


圖4b

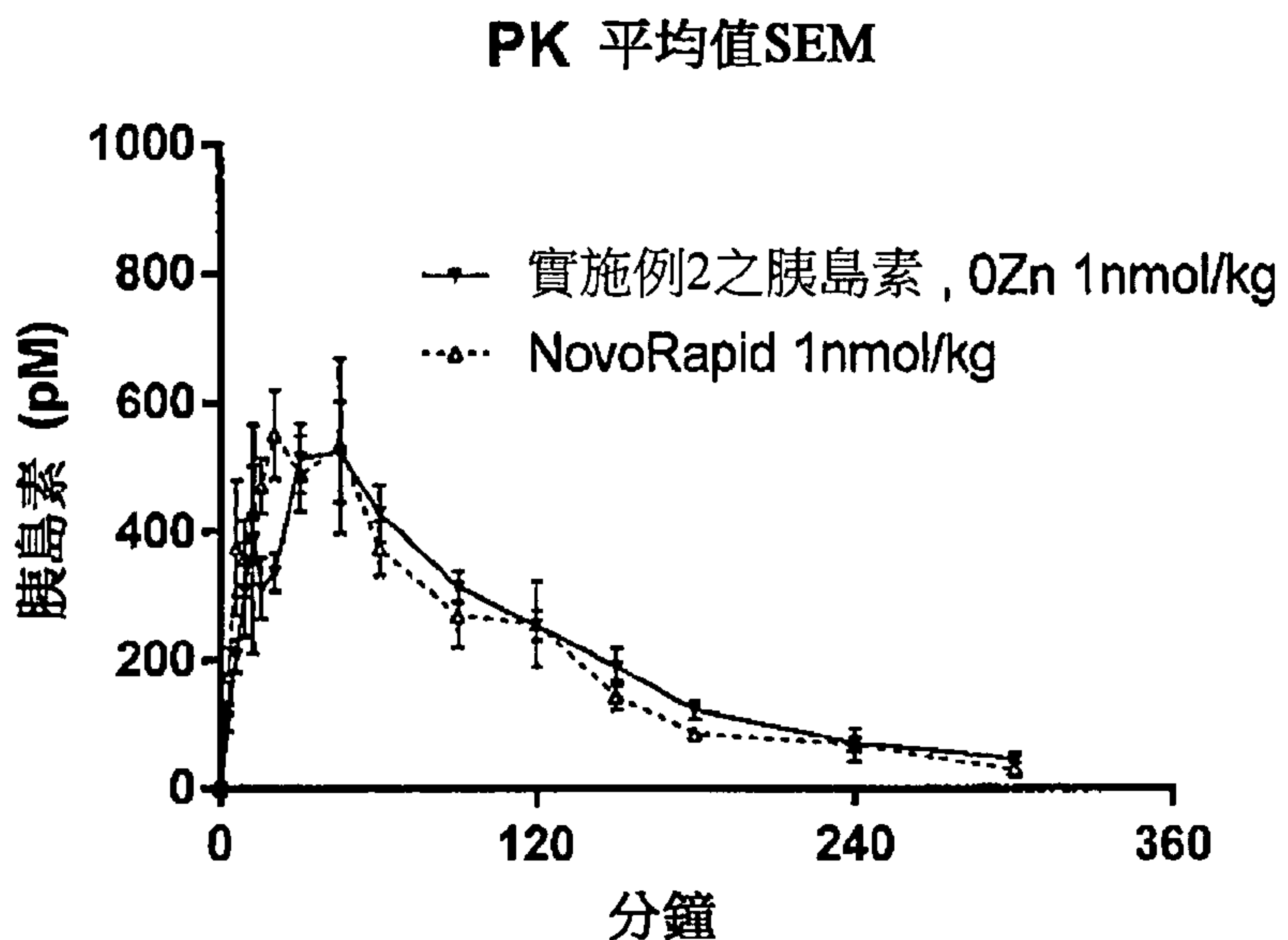


圖5a

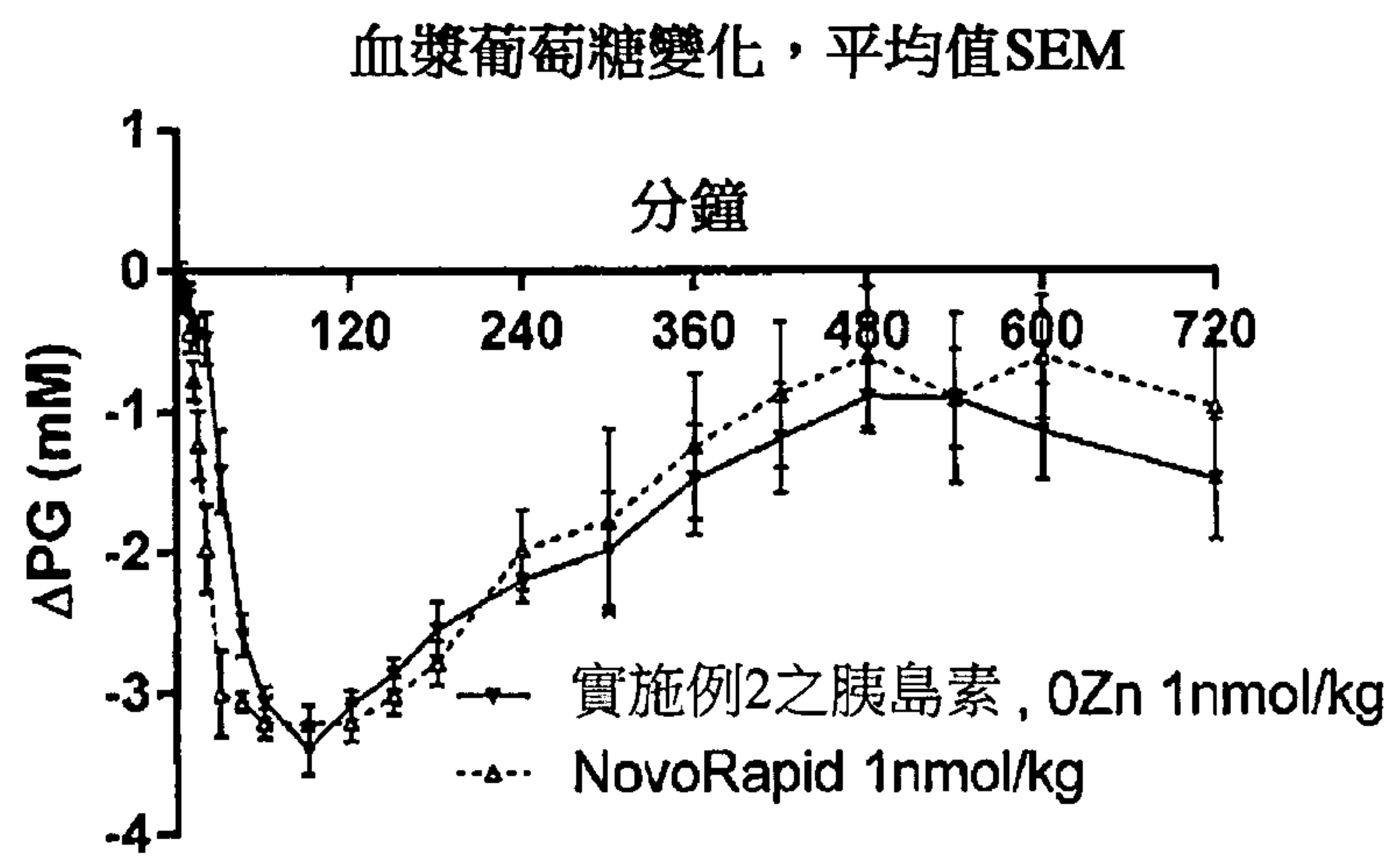


圖5b



.

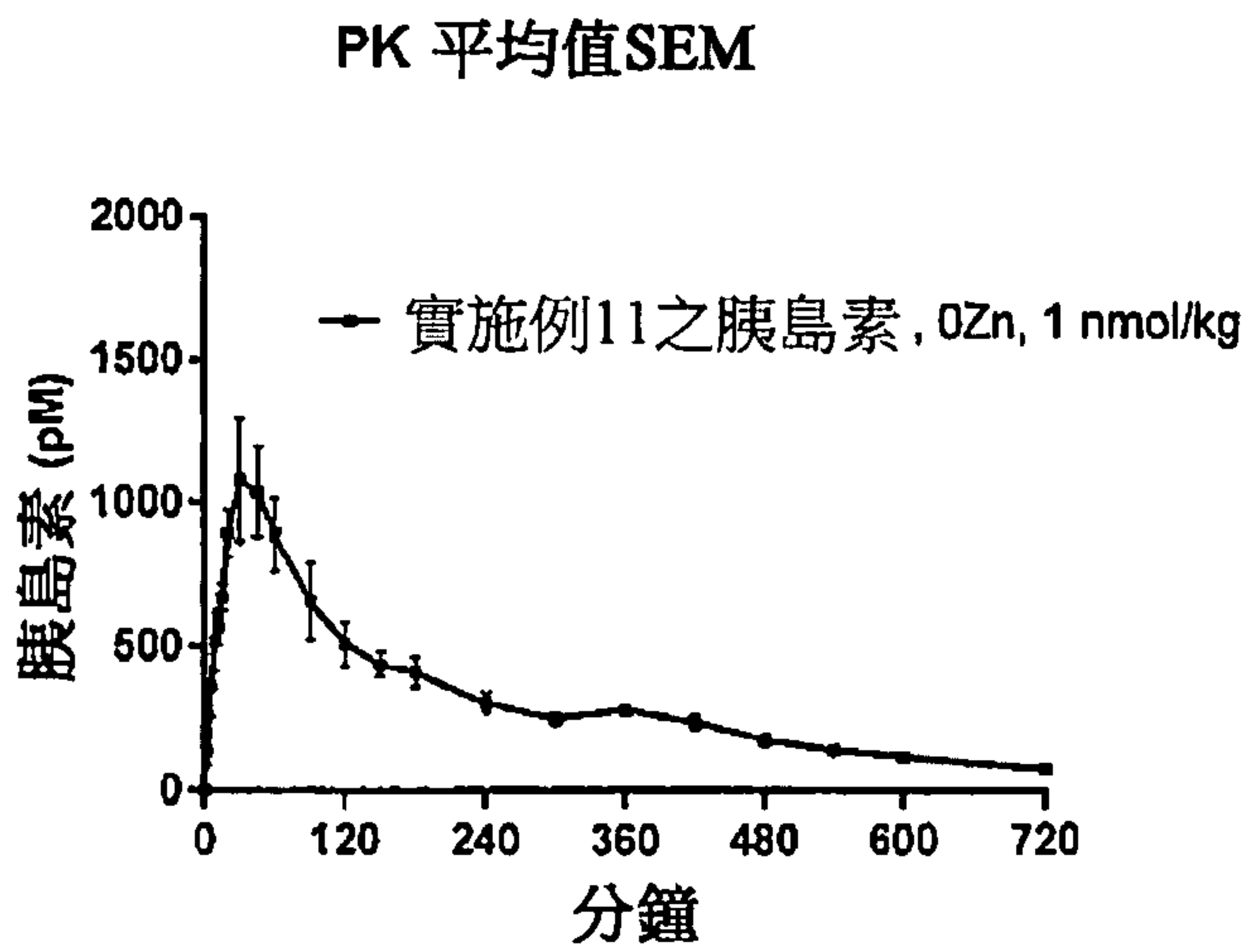


圖6

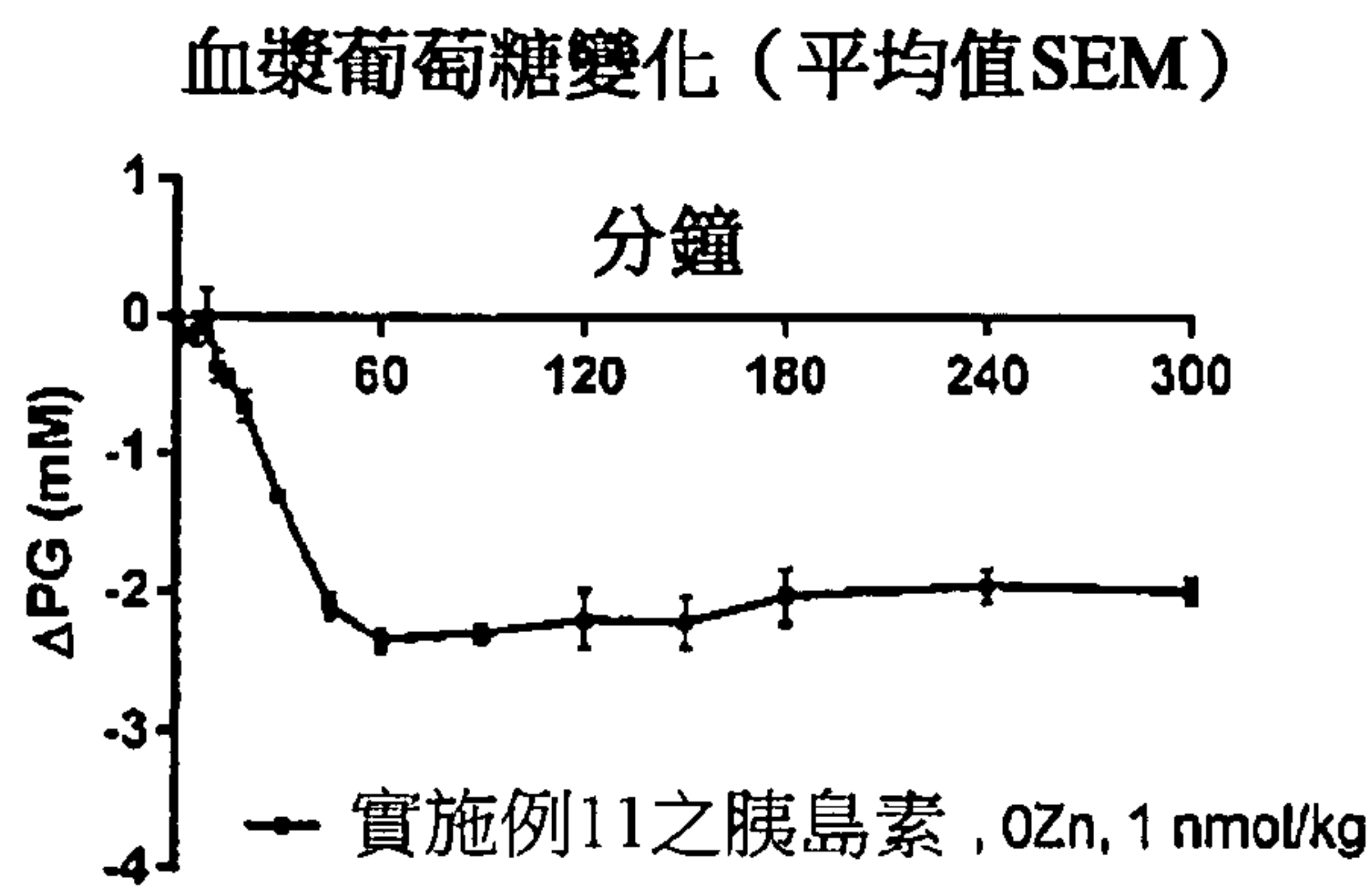


圖7

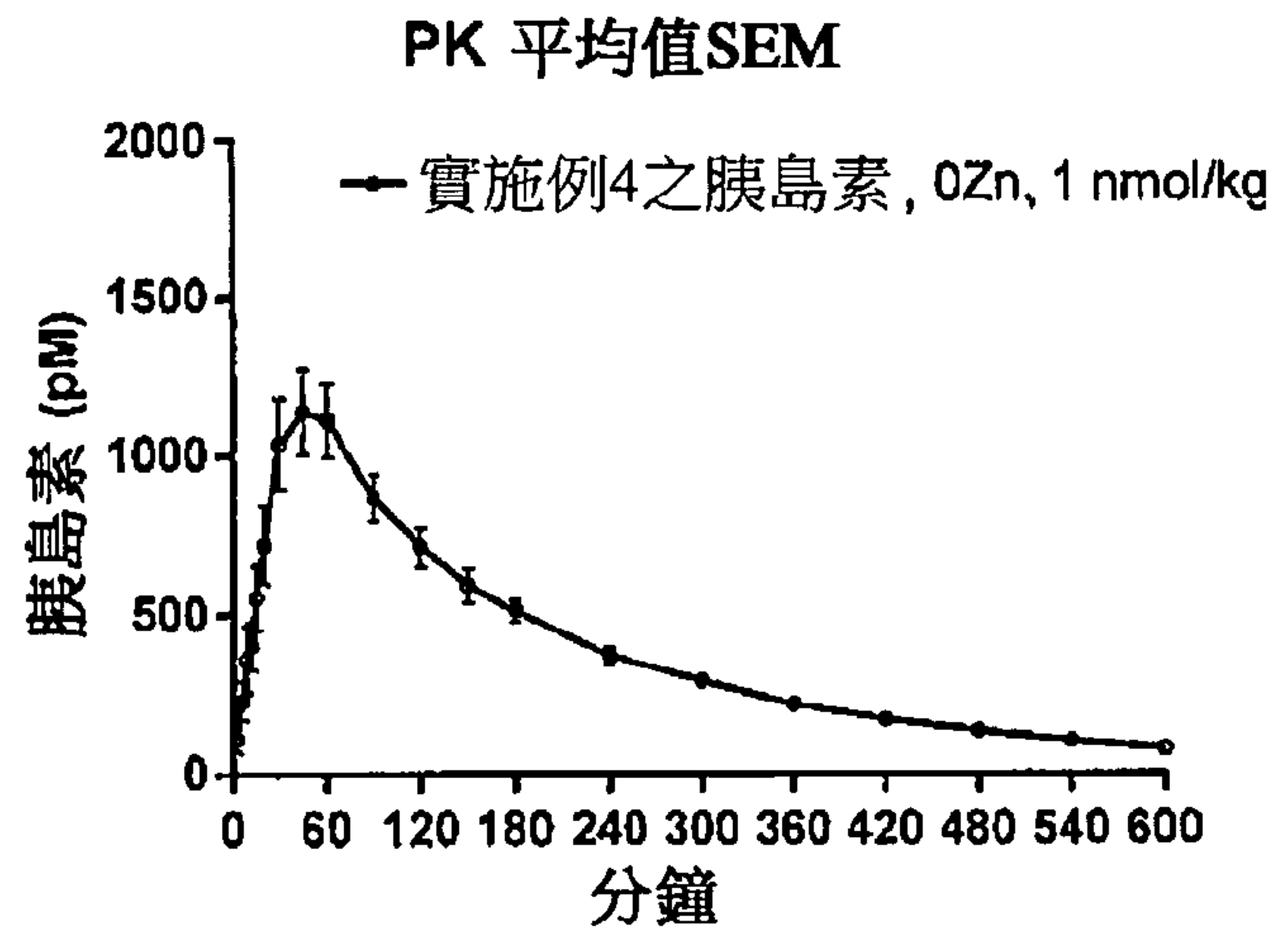


圖8

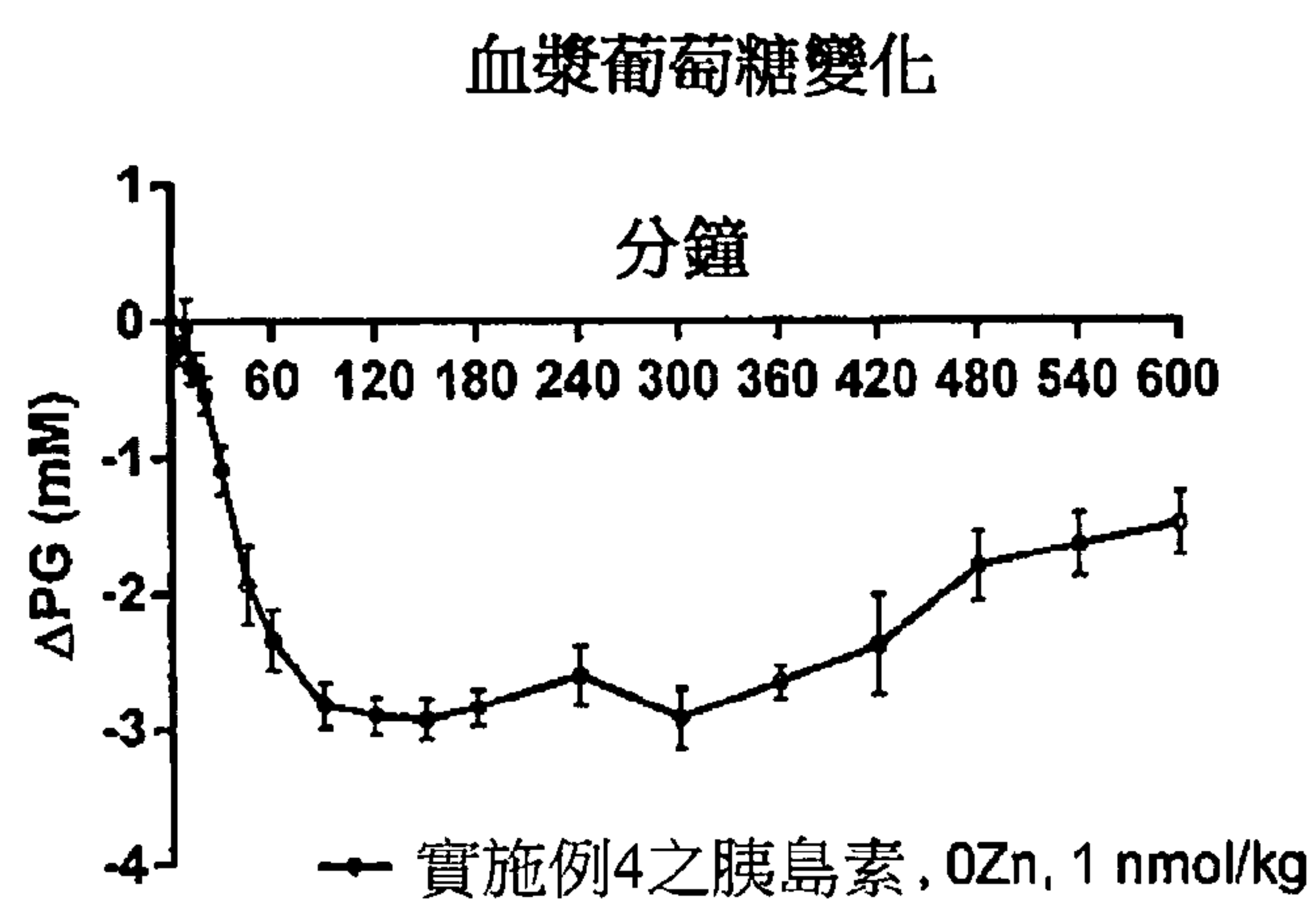


圖9

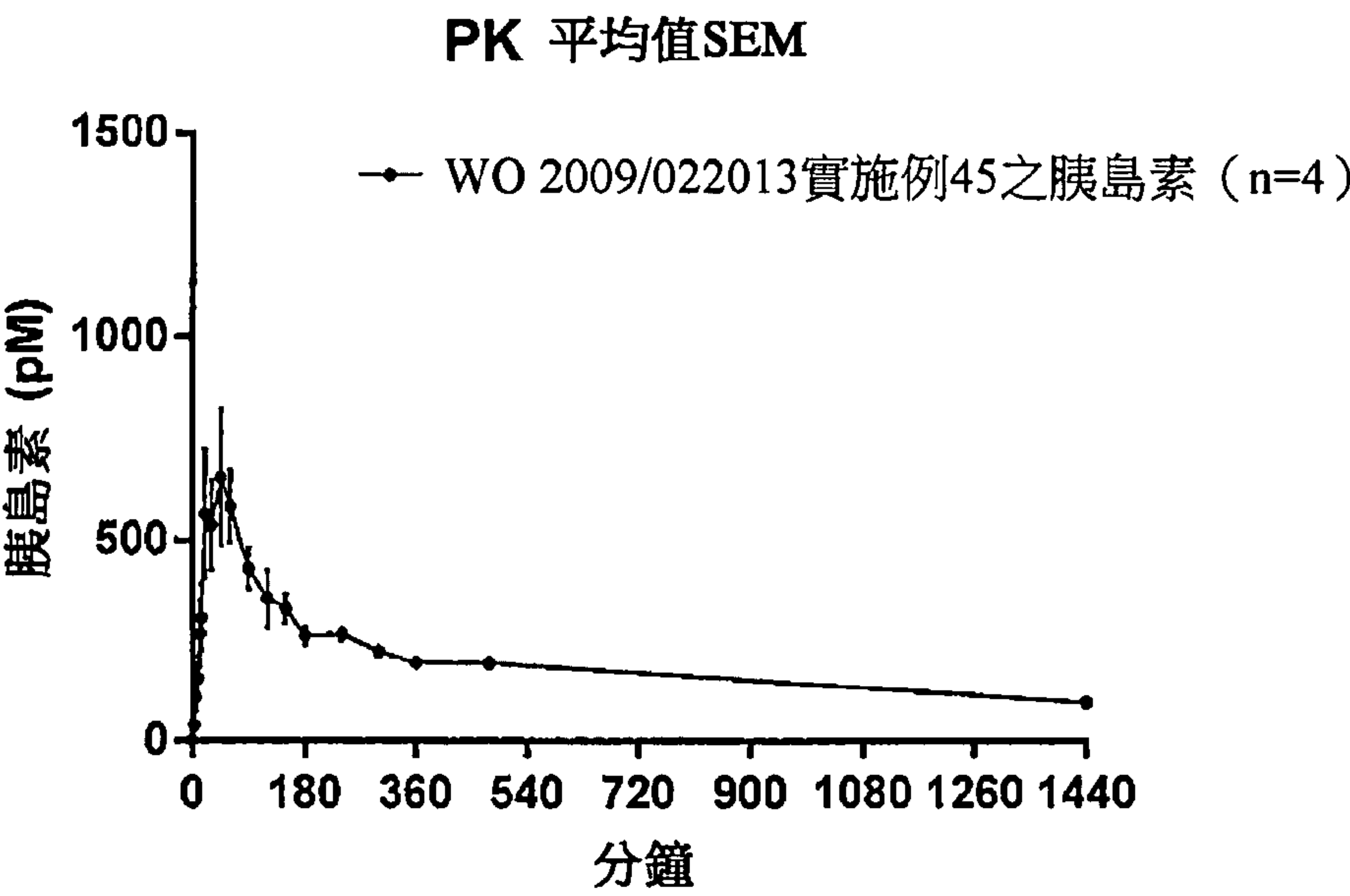


圖10

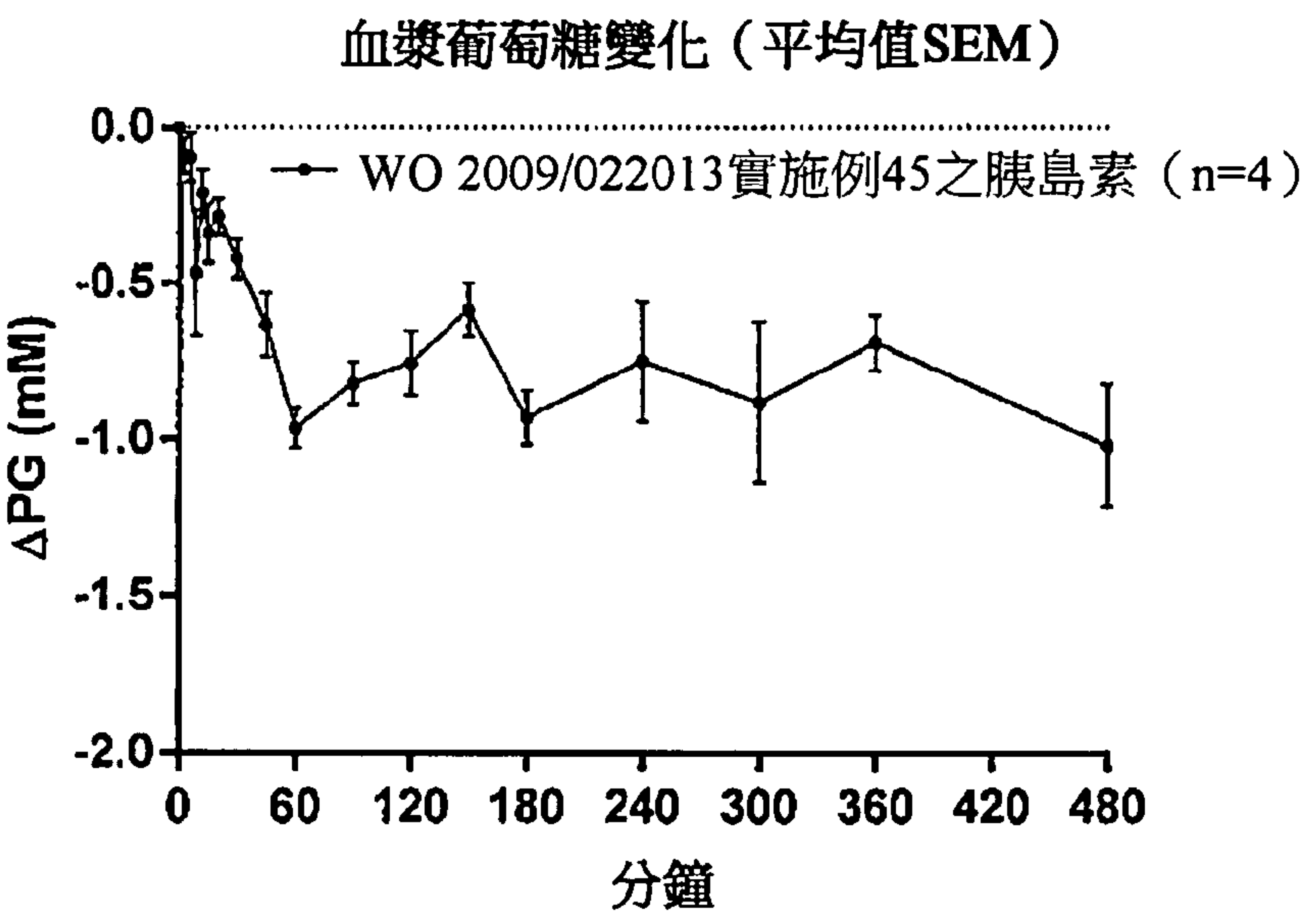


圖11

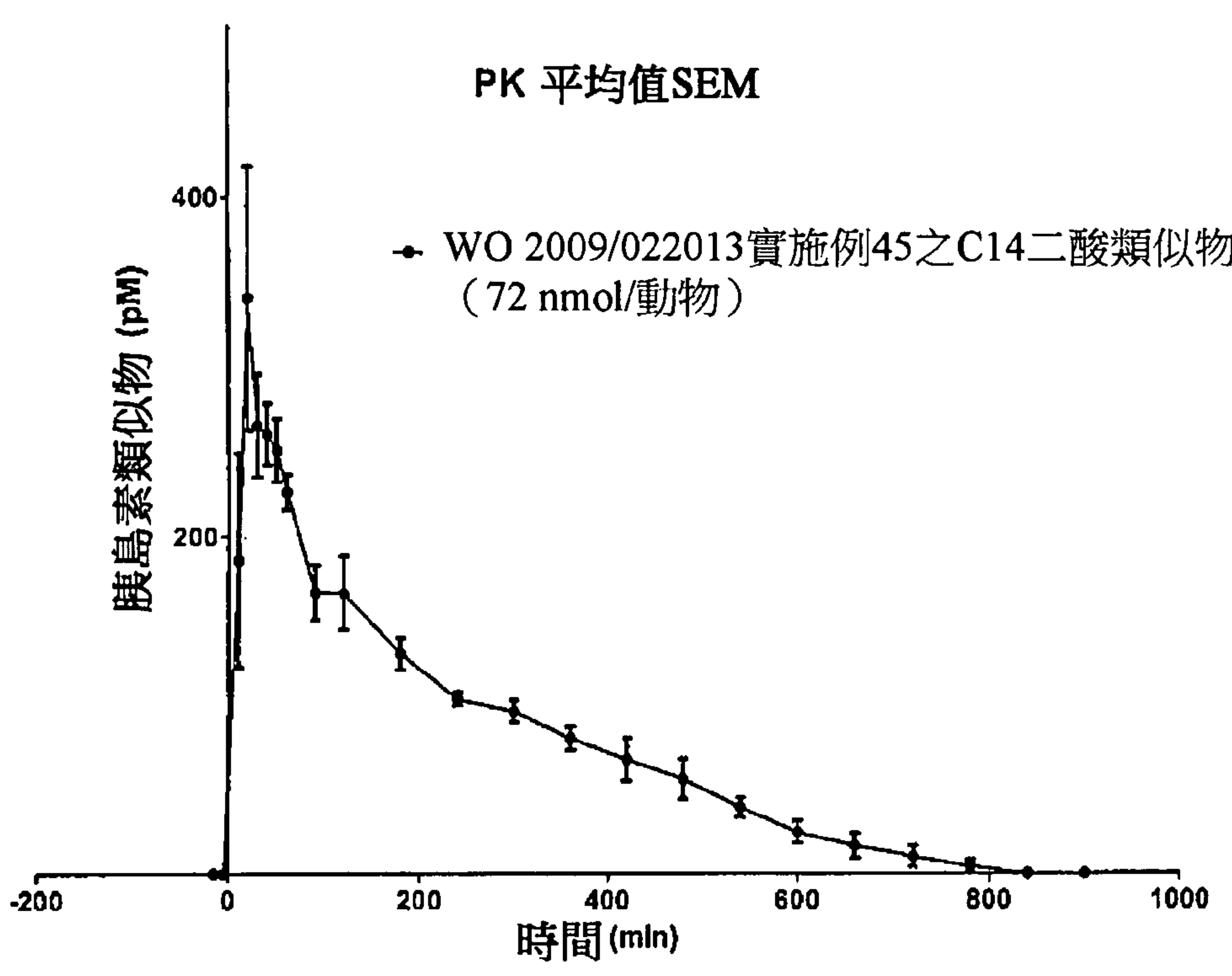


圖12

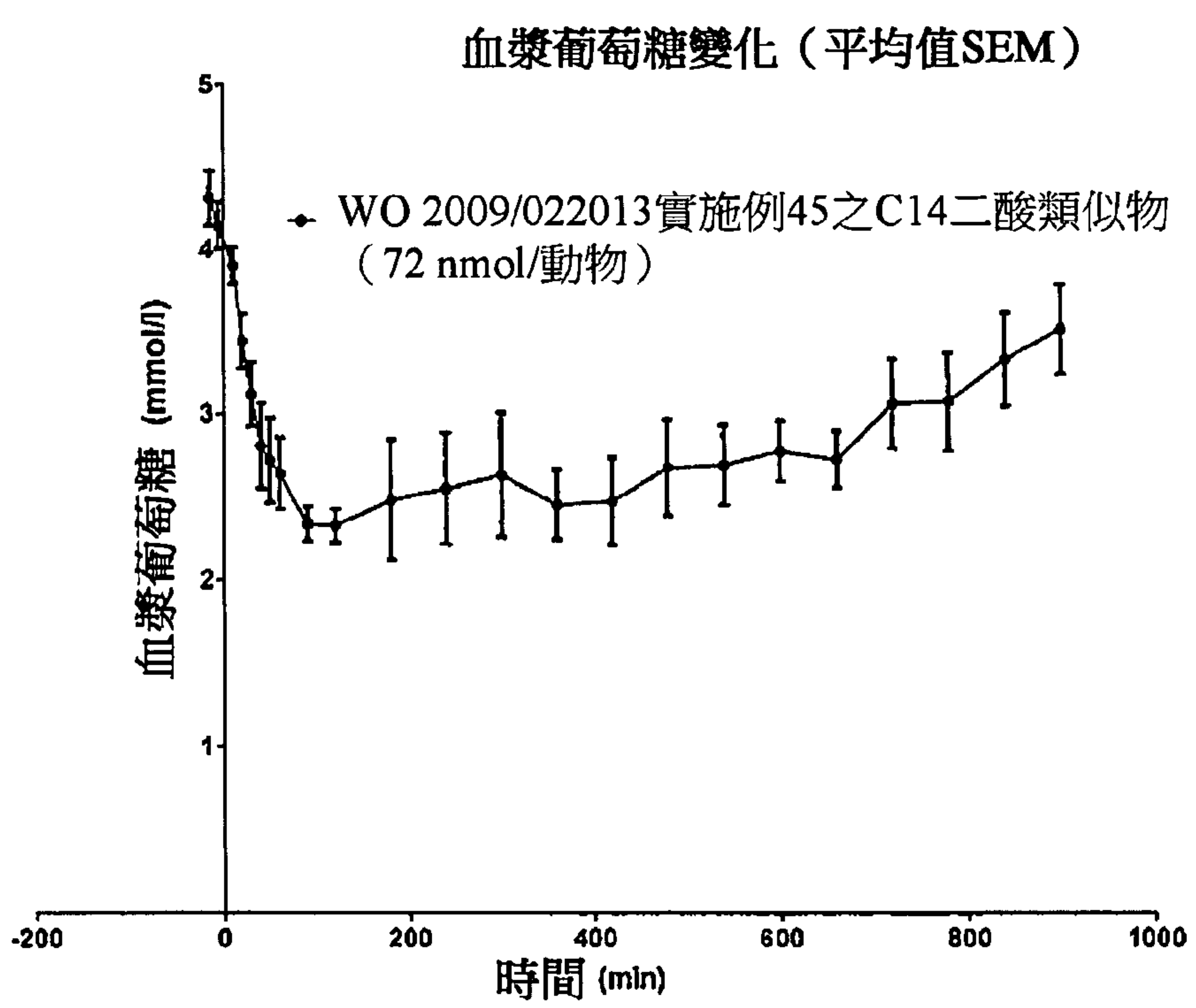


圖13

(圖示1A)

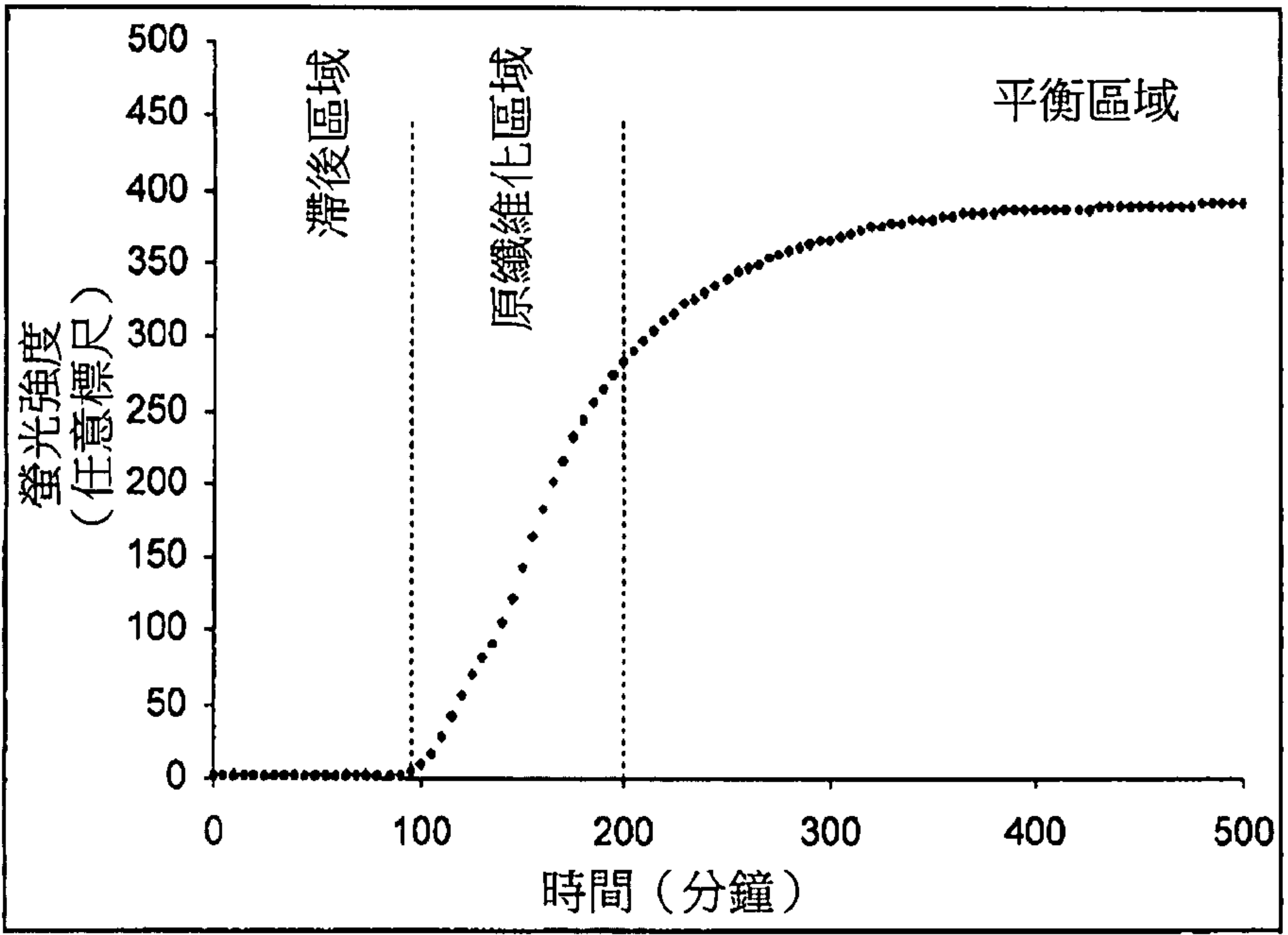


圖14A

(圖示1B)

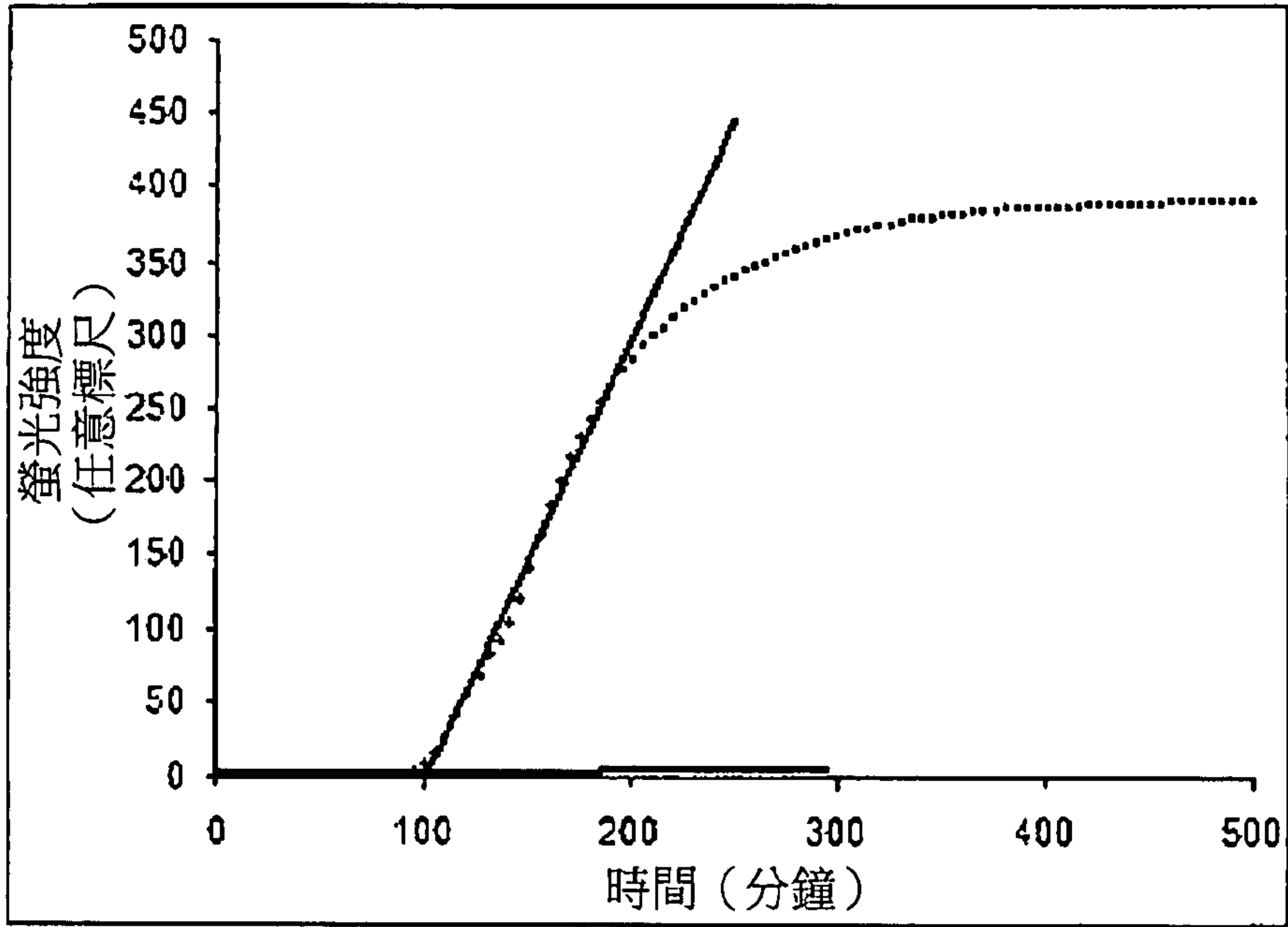


圖14B

(圖示1C)

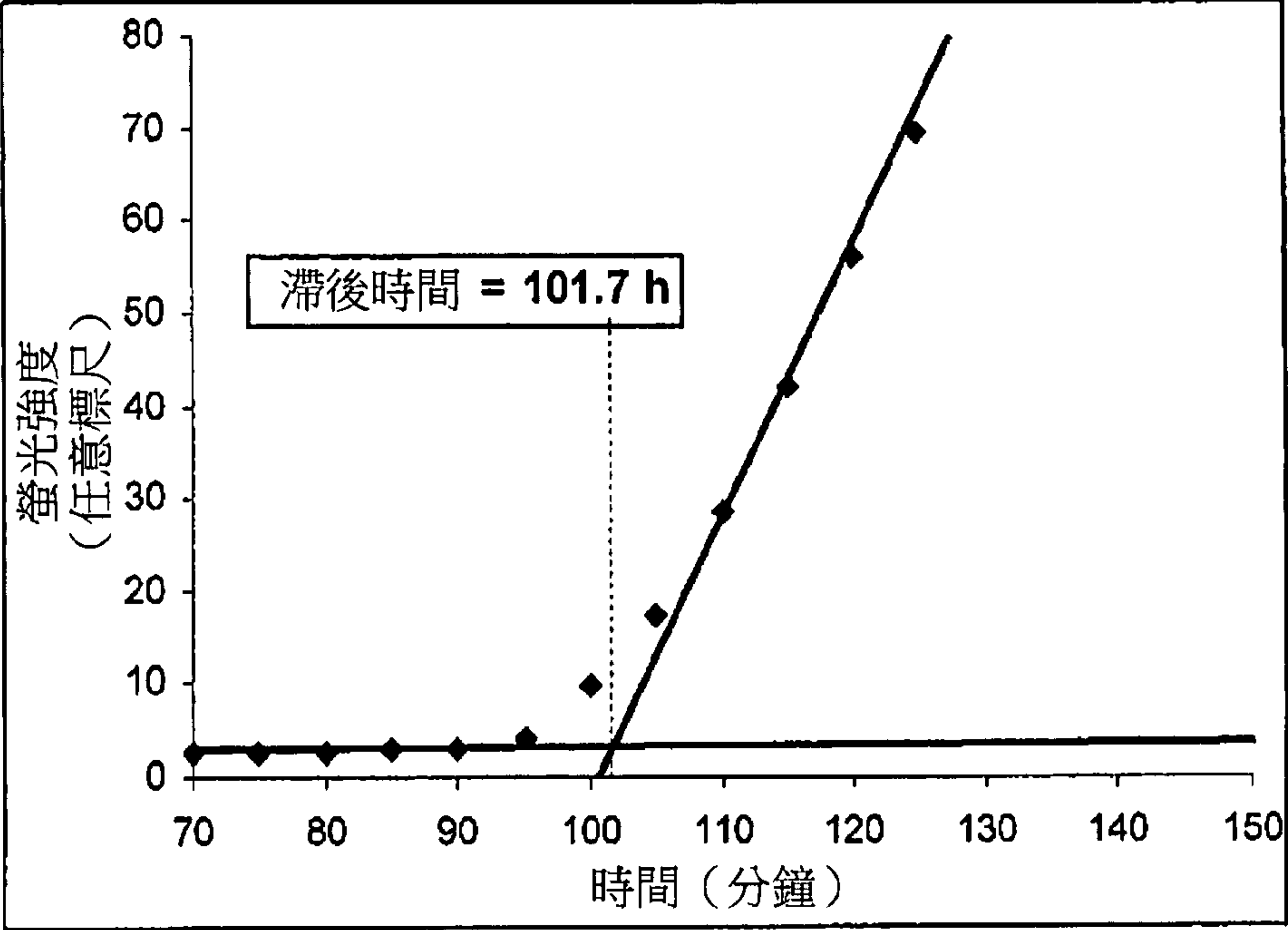


圖14C

Zucker大鼠PK-實施例2之胰島素

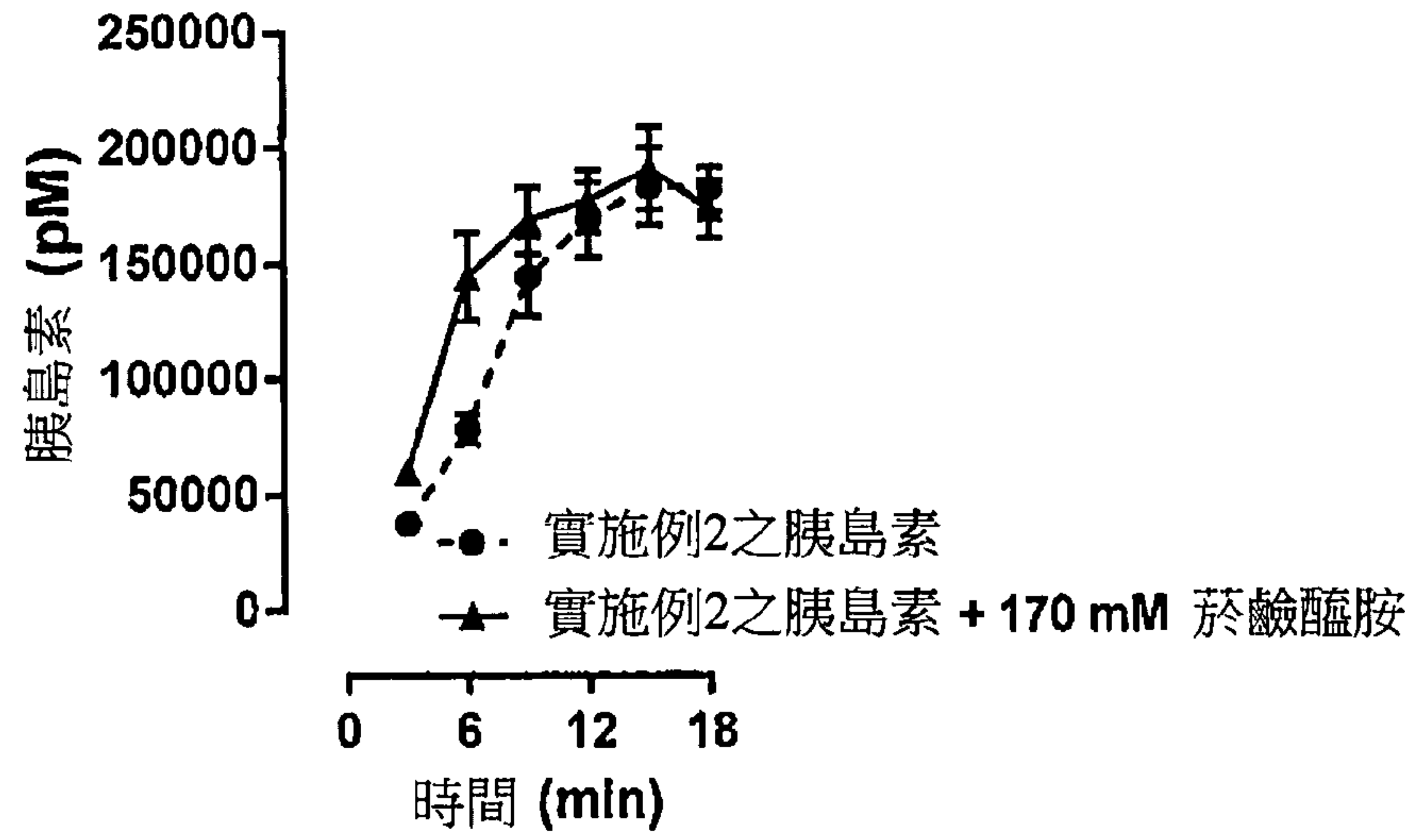


圖15

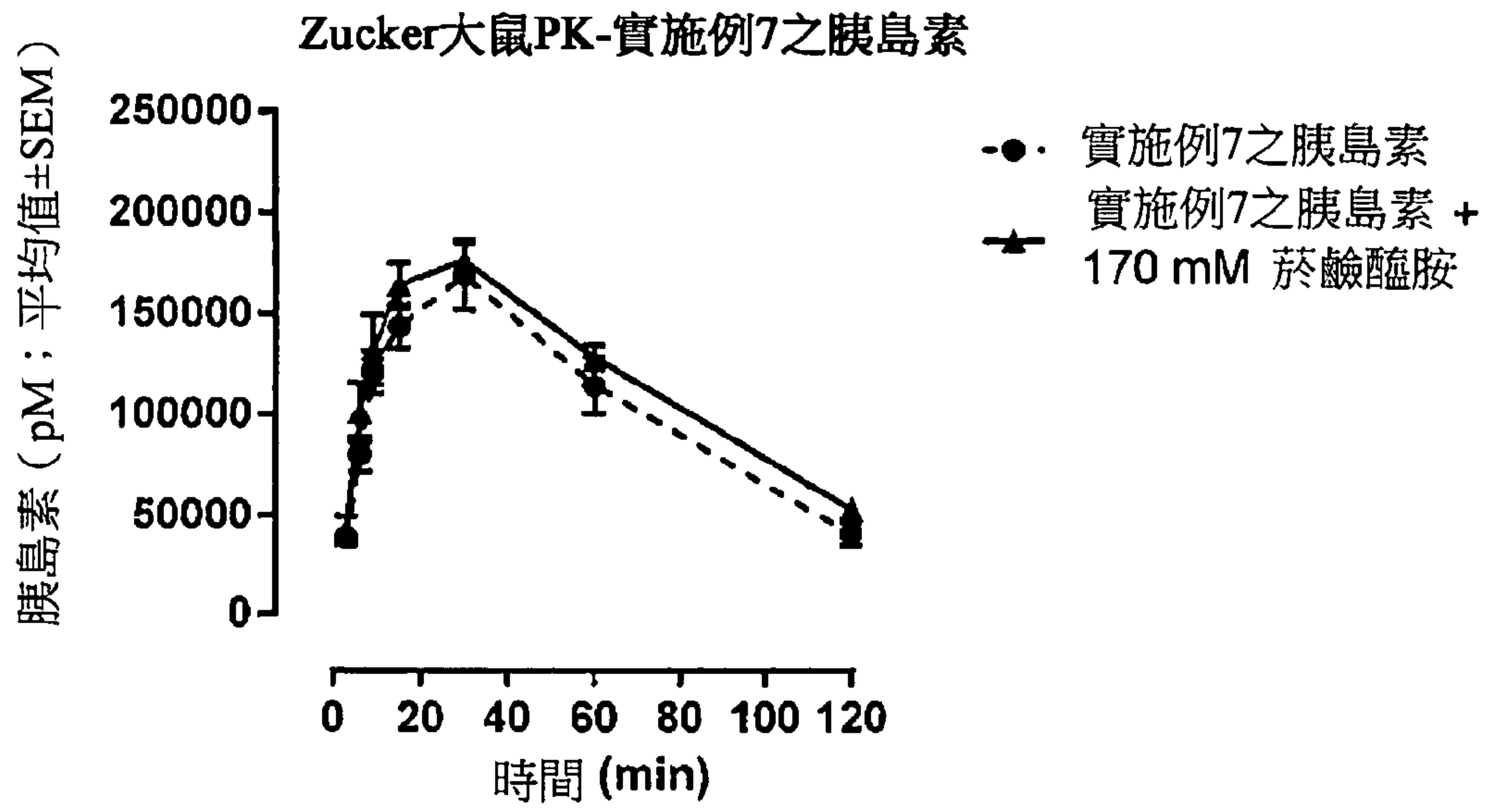


圖16

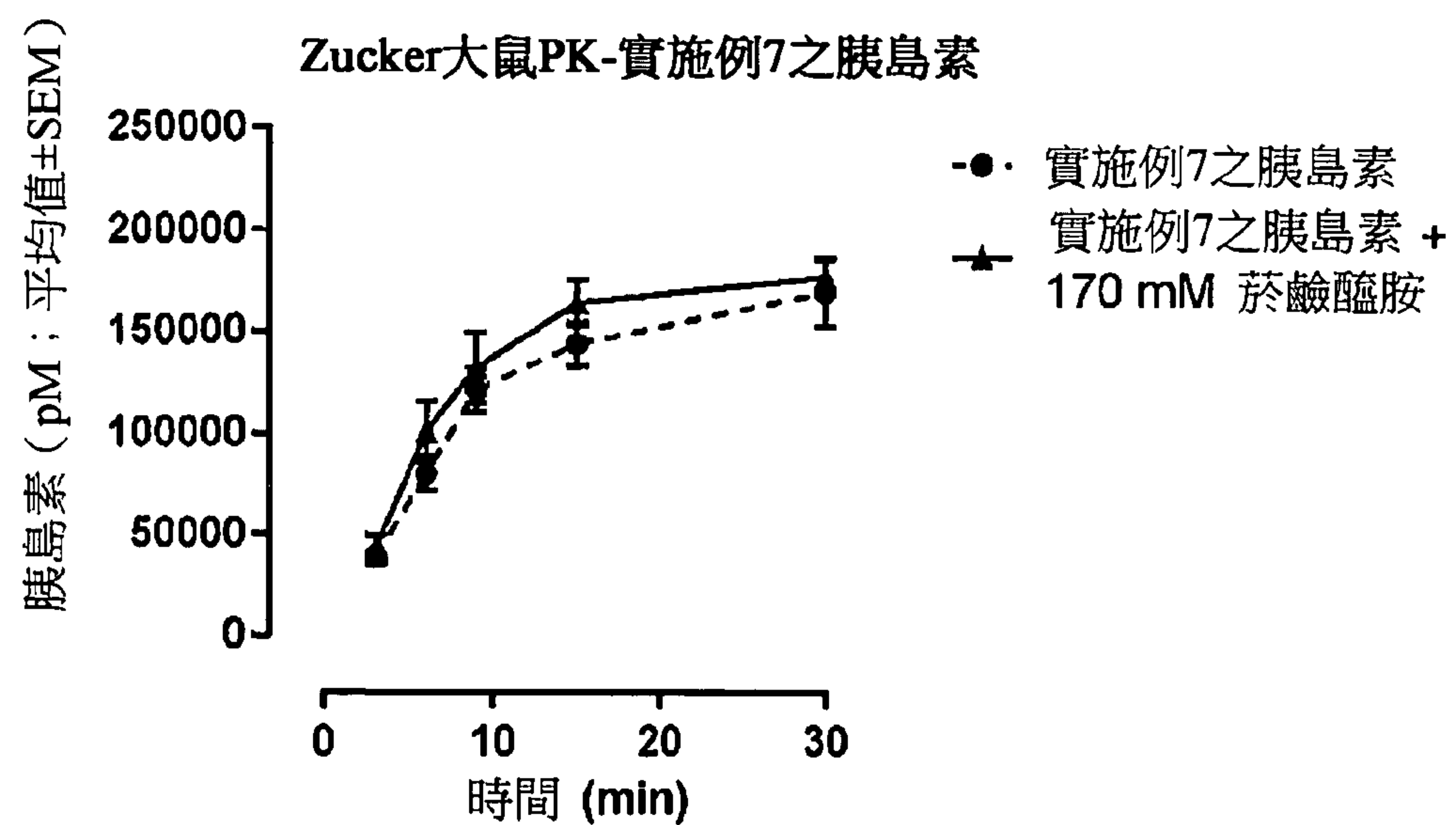


圖17

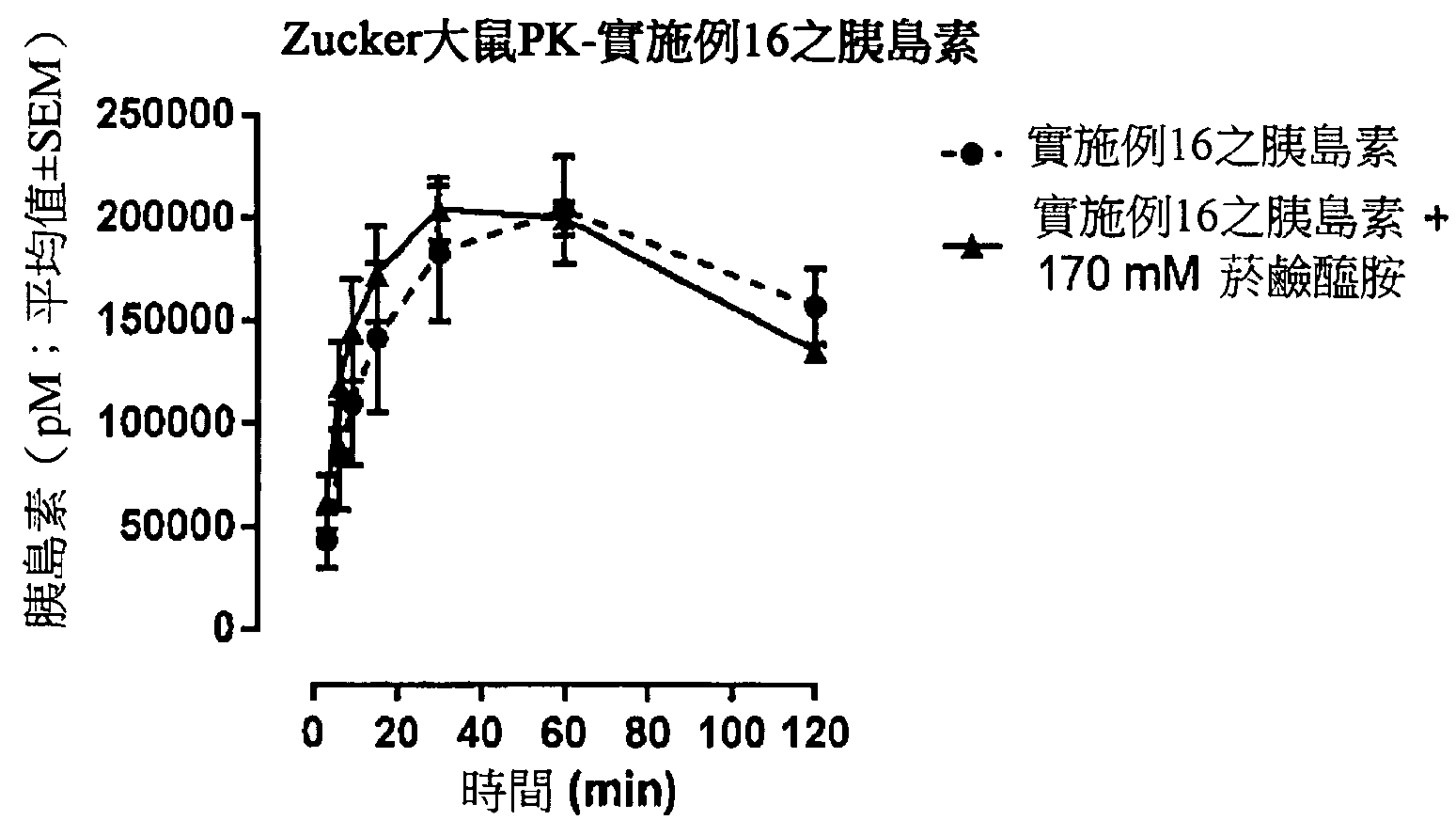


圖18

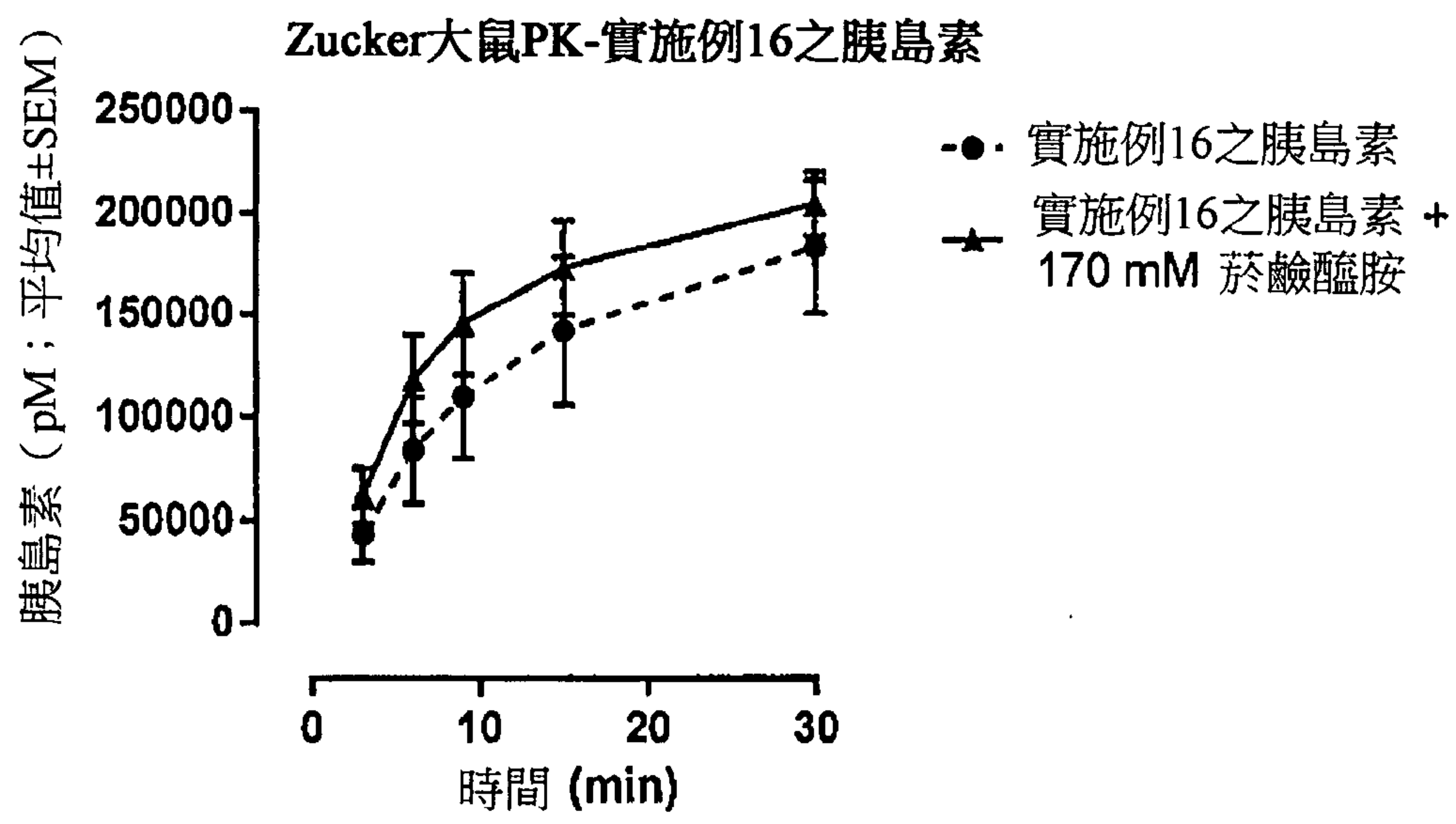


圖19

豬PK-實施例4之胰島素

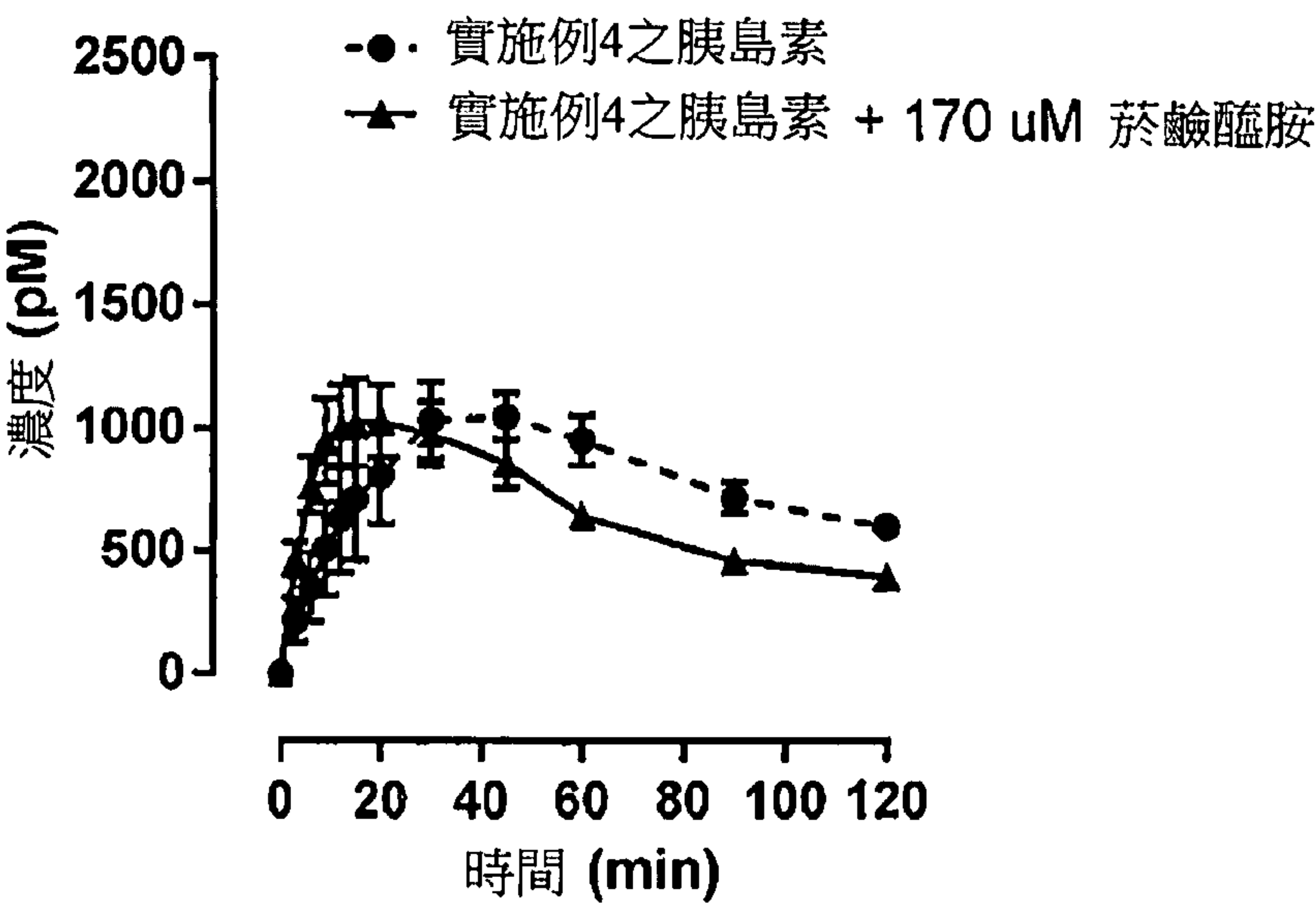


圖20

豬PK-實施例2之胰島素

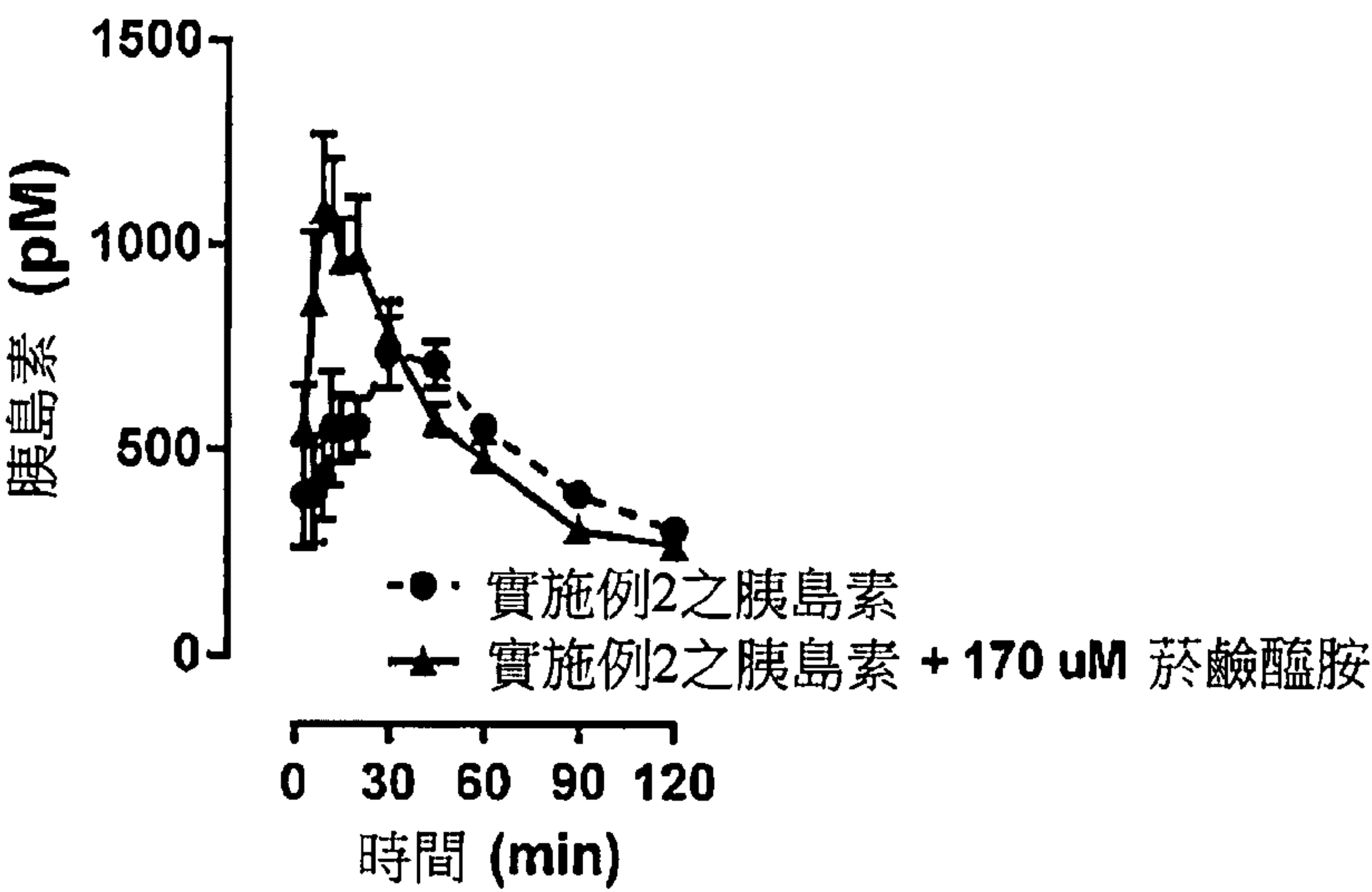


圖21