



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201625673 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 16 日

- (21) 申請案號：104138282 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 19 日
- (51) Int. Cl. :                    *C07K14/62 (2006.01)*                    *A61K38/28 (2006.01)*  
    *A61K47/48 (2006.01)*                    *A61P3/10 (2006.01)*
- (30) 優先權：2014/11/21            美國                    62/082,857  
    2015/10/16            美國                    62/242,503
- (71) 申請人：默沙東藥廠(美國) MERCK SHARP & DOHME CORP. (US)  
    美國
- (72) 發明人：林 松年 LIN, SONGNIAN (US)；嚴 林 YAN, LIN (US)；霍 培 HUO, PEI (US)；皮薩尼斯基 德密特 PISSARNITSKI, DMITRI (US)；馮 丹青 FENG, DANQING (US)；納格恩 瑞維 NARGUND, RAVI (US)；朱 渝萍 ZHU, YUPING (US)；科克 亞曼特 KEKEC, AHMET (TR)；麥帝森 道格 克莉絲提娜 B MADSEN-DUGGAN, CHRISTINA B. (US)；史 志才 SHI, ZHI-CAI (US)；吳 志才 WU, ZHICAI (US)；穆 迎軍 MU, YINGJUN (US)
- (74) 代理人：陳長文
- 申請實體審查：無    申請專利範圍項數：50 項    圖式數：7            共 244 頁

(54) 名稱

胰島素受體部分促效劑

INSULIN RECEPTOR PARTIAL AGONISTS

(57) 摘要

本發明揭示在胰島素受體處作為部分促效劑之胰島素二聚體及胰島素類似物二聚體。

Insulin dimers and insulin analog dimers that act as partial agonists at the insulin receptor are disclosed.

指定代表圖：

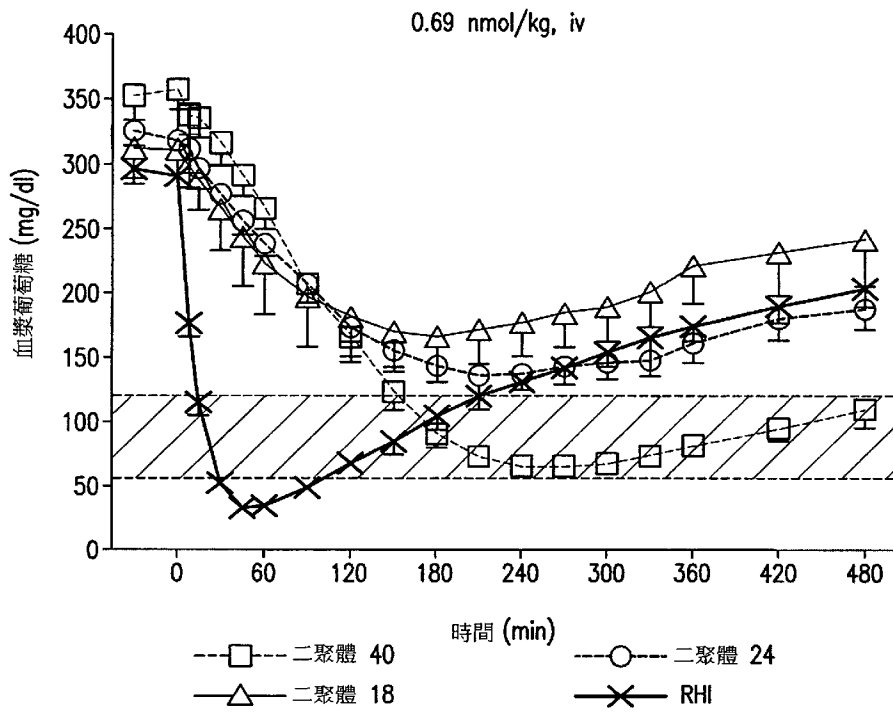


圖1

201625673

## 發明摘要

※ 申請案號：104138282

※ 申請日：104. 11. 19

※IPC 分類：C07K  $\frac{14}{62}$  (2006.01)A61K  $\frac{38}{58}$  (2006.01)

## 【發明名稱】

胰島素受體部分促效劑

A61K  $\frac{47}{48}$  (2006.01)A61P  $\frac{7}{10}$  (2006.01)

INSULIN RECEPTOR PARTIAL AGONISTS

## 【中文】

本發明揭示在胰島素受體處作為部分促效劑之胰島素二聚體及胰島素類似物二聚體。

## 【英文】

Insulin dimers and insulin analog dimers that act as partial agonists at the insulin receptor are disclosed.

**【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】

胰島素受體部分促效劑

INSULIN RECEPTOR PARTIAL AGONISTS

相關申請案之交叉參考

## 【技術領域】

本發明係關於在胰島素受體處作為部分促效劑之胰島素二聚體及胰島素類似物二聚體。

## 【先前技術】

胰島素係用於1型糖尿病(T1DM)病患及許多2型糖尿病(T2DM)之基本療法，該療法在過去十年間被用於所有抗糖尿病藥物使用者中之美國病患之近三分之一。胰島素之全世界市場在2013年時係US\$204億並以比所有其他組合之抗糖尿病藥劑更快之速度增長。然而，當前胰島素療法之挑戰(包括窄TI至低血糖症及體重增加)限制其等更廣泛之應用及使病患達成理想血糖控制之可能性。

除回應於膳食之膳食胰島素分泌外，胰臟以「基礎」速率釋放胰島素，其主要受血漿葡萄糖水平控制以保持適當空腹葡萄糖調控。此主要藉由透過內源性胰島素之肝優選(hepato-preferring)作用控制肝葡萄糖釋放來達成。現代胰島素類似物包括快速作用胰島素及基礎胰島素及此等兩者之混合物。開發快速作用胰島素類似物(RAA)以控制膳食後高血糖症同時使胰島素憑藉延長之作用持續時間調控基礎葡萄糖水平。所有T1DM均使用長效胰島素(組合膳食注射劑)及大多數T2DM病患自基礎產品開始其等胰島素療法。基礎胰島素消耗因全世界糖尿病群體(特定言之T2DM)激增而快速增長。

儘管已在過去數十年間作出連續發展之努力，但相較於生理性基礎胰島素，仍未最佳化可獲得之長效胰島素。此係部分因為主要關注於改善此等類似物之PK平度(flatness)，而非修正周圍組織之相對過胰島素化(over-insulinization)，過胰島素化會促成增加低血糖症風險。因此，低血糖症仍係對病患造成巨大負擔之關鍵醫學風險並引起顯著之發病率及死亡率。

### 【發明內容】

本發明提供包含經共價連接之兩種胰島素分子以形成胰島素分子二聚體之化合物，該胰島素分子二聚體可以常規類胰島素效能(potency)但低於最大活性活化胰島素受體。此等化合物係胰島素受體部分促效劑(IPRA)：其等類似其他胰島素類似物表現以有效降低葡萄糖但具有低血糖症之較低風險。

本發明提供胰島素受體部分促效劑共價胰島素二聚體，其等調配成顯示治療指數(TI)相較於當前護理標準(SOC)基礎胰島素得到改善之新穎及轉形之基礎胰島素(每日一次投與)。在一個實施例中，本發明之IPRA可有效降低糖尿病小型豬(minipig)之葡萄糖且具有低血糖症之低風險且具有每日一次(QD)基礎胰島素之性質。經改善之TI可授權執業醫師開具更侵略性劑量之本發明IPRA以達成控制空腹葡萄糖之目標。IPRA對空腹葡萄糖及HbA1c之密切控制可使其充當1)在T2DM中具有增強之效用(efficacy)及安全性之獨立長效胰島素及2)在T1DM(及一些T2DM)中與其他膳食快速作用胰島素類似物(RAA)劑量一起使用之經改善之基礎性基礎胰島素。因此，本發明提供下列實施例。

本發明提供包含第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體之胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多

肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；及其中該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一個胺基端係共價連接至取代基，限制條件為該連接部分不包括二硫鍵。在特定態樣中，該第一胰島素或胰島素類似物之該A鏈多肽及該B鏈多肽中之至少胺基端係共價連接至取代基。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，各A鏈多肽及各B鏈多肽之胺基端係共價連接至取代基。在特定態樣中，該第一胰島素或胰島素類似物之該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端及該第二胰島素或胰島素類似物之該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端係各共價連接至取代基。在其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物之胺基端係共價連接至取代基之實施例中，在該第一胰島素或胰島素類似物之該等A鏈及B鏈多肽之胺基端上之該取代基可與在該第二胰島素或胰島素類似物之該等A鏈及B鏈多肽之胺基端上之該取代基相同。在其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物之胺基端係共價連接至取代基之實施例中，該第一胰島素或胰島素類似物之該等A鏈及B鏈多肽之胺基端上之該取代基可不同於該第二胰島素或胰島素類似物之該等A鏈及B鏈多肽之胺基端上之該取代基。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係相同或其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係不同。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該連接部分經由在其等各自B鏈多肽之羧基端處或附近之離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基而共價連接該第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及該第二胰島素或胰島素類似物異二聚體。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該取代基具有通式RC(O)-，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、PEG、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基選自由以下組成之群：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，各A鏈多肽獨立地包含胺基酸序列GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (SEQ ID NO:3) 及各B鏈多肽獨立地包含胺基酸序列X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO:4) 或X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (SEQ ID NO:5)，其中X<sub>2</sub>係異白胺酸或蘇胺酸；X<sub>3</sub>係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸；X<sub>8</sub>係蘇胺酸或組胺酸；X<sub>17</sub>係麩胺酸或麩醯胺；X<sub>19</sub>係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；X<sub>23</sub>係天冬醯胺酸或甘胺酸；X<sub>22</sub>係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸；X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；X<sub>26</sub>係白胺酸或甘胺酸；X<sub>27</sub>係苯丙胺酸或天冬胺酸；X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；X<sub>31</sub>係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸；X<sub>32</sub>係離胺酸或脯胺酸；X<sub>33</sub>係蘇胺酸、丙胺酸或不存在；X<sub>34</sub>係精胺酸或不存在；及X<sub>35</sub>係精胺酸或不存在；限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸。

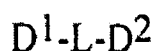
在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，該等第一及第二胰島素或胰島素類似物獨立地係原始人類胰島素、離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素或甘精胰島素。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該連接部分係醯基部分(-C(O)RC(O)-)，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇)(PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈。

在另一態樣中，該連接部分係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-45)，包括(但不限於)草醯基(C2)部分、琥珀醯基(C4)部分、己二醯基(C6)部分、辛二醯基(C8)部分、癸二醯基(C10)部分、十二烷二醯基(C12)部分、十四烷二醯基(C14)部分或十六烷二醯基(C16)部分。

本發明進一步提供包含下式之胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體：



其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>各獨立地係胰島素或胰島素類似物多肽，其中各胰島素多肽係包含透過鏈間二硫鍵連接在一起之A鏈多肽及B鏈多肽之異二聚體；L係連接部分，其中該連接子部分之一端係連接至D<sup>1</sup>之羧基處或附近之胺基酸殘基且該連接子部分之另一端係連接至D<sup>2</sup>之羧基處或附近之胺基酸殘基，限制條件為L不包括二硫鍵聯；且其中該第

一及第二胰島素或胰島素類似物多肽包括取代基連接至該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>係相同或其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>係不同。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該連接部分經由在D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>之羧基端處或附近之離胺酸殘基之ε胺基而共價連接D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該取代基具有通式RC(O)-，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、PEG、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係選自由以下組成之群：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，各A鏈多肽獨立地包含胺基酸序列GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (SEQ ID NO:3) 及各B鏈多肽獨立地包含胺基酸序列X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO:4) 或X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (SEQ ID NO:5)，其中X<sub>2</sub>係異白胺酸或蘇胺酸；X<sub>3</sub>係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸；X<sub>8</sub>係蘇胺酸或組胺酸；X<sub>17</sub>係麩胺酸或麩醯胺；X<sub>19</sub>係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；X<sub>23</sub>係天冬醯胺酸或甘胺酸；X<sub>22</sub>係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸；X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；X<sub>26</sub>係白胺酸或甘胺酸；X<sub>27</sub>係苯丙胺酸或天冬胺酸；X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半

胱胺酸或半胱胺酸； $X_{31}$ 係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸； $X_{32}$ 係離胺酸或脯胺酸； $X_{33}$ 係蘇胺酸、丙胺酸或不存在； $X_{34}$ 係精胺酸或不存在；及 $X_{35}$ 係精胺酸或不存在；限制條件為 $X_{31}$ 或 $X_{32}$ 中之至少一者係離胺酸。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，其中 $D^1$ 及 $D^2$ 獨立地係原始人類胰島素、離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素或甘精胰島素。

在該等胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該連接部分係醯基部分(-C(O)RC(O)-)，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇)(PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該連接部分係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-)，其中n=0-45)，包括(但不限於)草醯基(C2)部分、琥珀醯基(C4)部分、己二醯基(C6)部分、辛二醯基(C8)部分、癸二醯基(C10)部分、十二烷二醯基(C12)部分、十四烷二醯基(C14)部分或十六烷二醯基(C16)部分。

進一步提供包含上述胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體中

之任何一者及醫藥上可接受之載劑之組合物。

本發明進一步提供包含第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體之胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；及視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基，限制條件為(1)該連接部分不包括二硫鍵及(2)當該胰島素或胰島素類似物非為人類胰島素或胰島素類似物及該A鏈多肽與該B鏈多肽之胺基端不包括取代基時，則該連接部分非為草醯基(C2)部分、辛二醯基(C8)部分或十二烷二醯基(C12)部分。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係相同或其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係不同。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該連接部分經由在其等各自B鏈多肽之羧基端處或附近之離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基而共價連接該第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及該第二胰島素或胰島素類似物異二聚體。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該取代基具有通式RC(O)-，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、PEG、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係選自由以下組成之群：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、

胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該第一及第二胰島素或胰島素類似物獨立地係原始人類胰島素、離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素或甘精胰島素。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，各A鏈多肽獨立地包含胺基酸序列GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (SEQ ID NO:3) 及各B鏈多肽獨立地包含胺基酸序列X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO:4) 或X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (SEQ ID NO:5)，其中X<sub>2</sub>係異白胺酸或蘇胺酸；X<sub>3</sub>係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸；X<sub>8</sub>係蘇胺酸或組胺酸；X<sub>17</sub>係麩胺酸或麩醯胺；X<sub>19</sub>係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；X<sub>23</sub>係天冬醯胺酸或甘胺酸；X<sub>22</sub>係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸；X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；X<sub>26</sub>係白胺酸或甘胺酸；X<sub>27</sub>係苯丙胺酸或天冬胺酸；X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；X<sub>31</sub>係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸；X<sub>32</sub>係離胺酸或脯胺酸；X<sub>33</sub>係蘇胺酸、丙胺酸或不存在；X<sub>34</sub>係精胺酸或不存在；及X<sub>35</sub>係精胺酸或不存在；限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸。

在該等胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-

$N(R)SO_2-$ 、 $SO_2N(R)-$ 、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

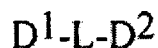
在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該連接部分係醯基部分(-C(O)RC(O)-)，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇)(PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該連接部分係C2-C20醯基部分。

在特定態樣中，該連接部分係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-45)，包括(但不限於)草醯基(C2)部分、琥珀醯基(C4)部分、己二醯基(C6)部分、辛二醯基(C8)部分、癸二醯基(C10)部分、十二烷二醯基(C12)部分、十四烷二醯基(C14)部分或十六烷二醯基(C16)部分。

進一步提供包含上述胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體中之任何一者及醫藥上可接受之載劑之組合物。

本發明進一步提供包含下式之胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體：



其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>各獨立地係胰島素或胰島素類似物多肽，其中各胰島素多肽係包含透過鏈間二硫鍵連接在一起之A鏈多肽及B鏈多肽之異二聚體；L係連接部分，其中該連接子部分之一端係連接至D<sup>1</sup>之羧基處或附近之胺基酸殘基且該連接子部分之另一端係連接至D<sup>2</sup>之羧基處或附近之胺基酸殘基，限制條件為L不包括二硫鍵聯；及視需要，其中D<sup>1</sup>或D<sup>2</sup>中之至少一者包括取代基連接至D<sup>1</sup>或D<sup>2</sup>之該A鏈多肽或該B鏈多肽之胺基端；限制條件為(1)該連接部分不包括二硫鍵及(2)當該

A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端不包括取代基時，則該連接部分非為草醯基(C2)部分、辛二醯基(C8)部分或十二烷二醯基(C12)部分。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>係相同或其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>係不同。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該連接部分經由在D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>之羧基端處或附近之離胺酸殘基之ε胺基而共價連接D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該取代基具有通式RC(O)-，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、PEG、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係選自由以下組成之群：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>獨立地係原始人類胰島素、離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素或甘精胰島素。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，各A鏈多肽獨立地包含胺基酸序列GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (SEQ ID NO:3) 及各B鏈多肽獨立地包含胺基酸序列X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO:4) 或X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (SEQ ID NO:5)，其中X<sub>2</sub>係異白胺酸或蘇胺酸；X<sub>3</sub>係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸；X<sub>8</sub>係蘇胺酸或組胺酸；X<sub>17</sub>係麩胺酸或麩醯胺；X<sub>19</sub>係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；X<sub>23</sub>係天冬醯胺

酸或甘胺酸；X<sub>22</sub>係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸；X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；X<sub>26</sub>係白胺酸或甘胺酸；X<sub>27</sub>係苯丙胺酸或天冬胺酸；X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；X<sub>31</sub>係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸；X<sub>32</sub>係離胺酸或脯胺酸；X<sub>33</sub>係蘇胺酸、丙胺酸或不存在；X<sub>34</sub>係精胺酸或不存在；及X<sub>35</sub>係精胺酸或不存在；限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸。

在該等胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之又另一態樣中，該連接部分係醯基部分(-C(O)RC(O)-)，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇)(PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈。

在該胰島素受體部分促效劑或胰島素二聚體之另一態樣中，該連接部分係C2-C20醯基部分。

在特定態樣中，該連接部分係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-45)，包括(但不限於)草醯基(C2)部分、琥珀醯基(C4)部分、己二醯基(C6)部分、辛二醯基(C8)部分、癸二醯基(C10)部分、十二烷二醯基(C12)部分、十四烷二醯基(C14)部分或十六烷二醯基(C16)部分。

本發明進一步提供一種胰島素類似物二聚體，其包含：

第一胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；其中該胰島素類似物係選自離脯胰島素、天冬胰島素及甘精胰島素；及視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基，限制條件為該連接部分不包括二硫鍵。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係相同或其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係不同。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該連接部分經由其等各自B鏈多肽之羧基端處或附近之離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基而共價連接該第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及該第二胰島素或胰島素類似物異二聚體。

在該胰島素受體部分促效劑之又另一態樣中，該取代基具有通式 $RC(O)-$ ，其中R可係 $R'CH_2$ 、 $R'NH$ 、 $R'O$ ，及 $R'$ 可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、PEG、醣，在特定態樣中， $RC(O)-$ 可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係選自由以下組成之群：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該第一及第二胰島素或胰島素類似物中之至少一者係進一步結合至聚乙二醇、糖部分或

雜環。

在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

在該胰島素受體部分促效劑之又另一態樣中，該連接部分係醯基部分(-C(O)RC(O)-)，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇)(PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該連接部分係C2-C20醯基部分。

在特定態樣中，該連接部分係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-45)，包括(但不限於)草醯基(C2)部分、琥珀醯基(C4)部分、己二醯基(C6)部分、辛二醯基(C8)部分、癸二醯基(C10)部分、十二烷二醯基(C12)部分、十四烷二醯基(C14)部分或十六烷二醯基(C16)部分。

本發明進一步提供一種胰島素類似物二聚體，其包含下式：



其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>各獨立地係胰島素或胰島素類似物多肽，其中各胰島素多肽係包含透過鏈間二硫鍵連接在一起之A鏈多肽及B鏈多肽之異二聚體；L係連接部分，其中該連接子部分之一端係連接至D<sup>1</sup>之羧

基處或附近之胺基酸殘基且該連接子部分之另一端係連接至D<sup>2</sup>之羧基處或附近之胺基酸殘基，限制條件為L不包括二硫鍵聯；其中該胰島素類似物係選自離脯胰島素、天冬胰島素及甘精胰島素；及視需要，其中D<sup>1</sup>或D<sup>2</sup>中之至少一者包括取代基連接至D<sup>1</sup>或D<sup>2</sup>之該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端；限制條件為該連接部分不包括二硫鍵。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>係相同或其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>係不同。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該連接部分經由D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>之羧基端處或附近之離胺酸殘基之ε胺基而共價連接D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>。

在該胰島素受體部分促效劑之又另一態樣中，該取代基具有通式RC(O)-，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O；及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、PEG、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係選自由以下組成之群：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。

在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

在該胰島素受體部分促效劑之又另一態樣中，該連接部分係醯

基部分(-C(O)RC(O)-)，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇) (PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該連接部分係C2-C20醯基部分。

在特定態樣中，該連接部分係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-45)，包括(但不限於)草醯基(C2)部分、琥珀醯基(C4)部分、己二醯基(C6)部分、辛二醯基(C8)部分、癸二醯基(C10)部分、十二烷二醯基(C12)部分、十四烷二醯基(C14)部分或十六烷二醯基(C16)部分。

本發明提供一種胰島素受體部分促效劑，其包含：

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基；及其中該胰島素受體部分促效劑對人類胰島素受體(IR)具有最大反應為原始人類胰島素對該IR之最大反應之約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%，如藉由功能性磷酸化分析測定；或

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽

中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基；及其中該胰島素受體部分促效劑對人類胰島素受體(IR)具有最大反應為原始人類胰島素對該IR之最大反應之20%與70%之間；40%與70%之間；50%與70%之間；40%與60%之間或20%與40%之間，如藉由功能性磷酸化分析測定；或

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基；及其中該胰島素受體部分促效劑對人類胰島素受體(IR)具有最大反應為原始人類胰島素對該IR之最大反應之至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%，如藉由功能性磷酸化分析測定；或

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基；及其中該胰島素受體部分促效劑對人類胰島素受體(IR)具有最大反應為原始人類胰島素對該IR之最大反應之小於70%，如藉由功能性磷酸化分析測定；或

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽

及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基；及其中該胰島素受體部分促效劑對人類胰島素受體(IR)具有最大反應為原始人類胰島素對該IR之最大反應之約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%，如藉由功能性磷酸化分析測定。

在上文實施例中，該功能性磷酸化分析可係胰島素受體(IR) AKT-磷酸化分析。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該連接部分不包括二硫鍵且當該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端不包括取代基時，該連接部分非為草醯基(C2)部分、辛二醯基(C8)部分或十二烷二醯基(C12)部分。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係相同或其中該第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係不同。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，其中該連接部分經由其等各自B鏈多肽之羧基端處或附近之離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基而共價連接該第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及該第二胰島素或胰島素類似物異二聚體。

在該胰島素受體部分促效劑之又另一態樣中，該取代基具有通式 $RC(O)-$ ，其中R可係 $R'CH_2$ 、 $R'NH$ 、 $R'O$ ，及 $R'$ 可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、PEG、醣，在特定態樣中， $RC(O)-$ 可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係選自由以下組成之群：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-

烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該等第一及第二胰島素或胰島素類似物獨立地係原始人類胰島素、離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素或甘精胰島素。

在該胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，各A鏈多肽獨立地包含胺基酸序列GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (SEQ ID NO:3)及各B鏈多肽獨立地包含胺基酸序列X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO:4)或X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (SEQ ID NO:5)，其中X<sub>2</sub>係異白胺酸或蘇胺酸；X<sub>3</sub>係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸；X<sub>8</sub>係蘇胺酸或組胺酸；X<sub>17</sub>係麩胺酸或麩醯胺；X<sub>19</sub>係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；X<sub>23</sub>係天冬醯胺酸或甘胺酸；X<sub>22</sub>係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸；X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；X<sub>26</sub>係白胺酸或甘胺酸；X<sub>27</sub>係苯丙胺酸或天冬胺酸；X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；X<sub>31</sub>係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸；X<sub>32</sub>係離胺酸或脯胺酸；X<sub>33</sub>係蘇胺酸、丙胺酸或不存在；X<sub>34</sub>係精胺酸或不存在；及X<sub>35</sub>係精胺酸或不存在；限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸。

在該胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、

雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

在該胰島素受體部分促效劑之又另一態樣中，該連接部分係醯基部分(-C(O)RC(O)-)，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇) (PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈。

在該胰島素受體部分促效劑之另一態樣中，該連接部分係C2-C20醯基部分。

在特定態樣中，該連接部分係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-45)，包括(但不限於)草醯基(C2)部分、琥珀醯基(C4)部分、己二醯基(C6)部分、辛二醯基(C8)部分、癸二醯基(C10)部分、十二烷二醯基(C12)部分、十四烷二醯基(C14)部分或十六烷二醯基(C16)部分。

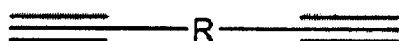
本發明進一步提供一種胰島素二聚體，其包含具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys藉由選自由以下組成之群之雙官能連接子結合在一起：連接子1、連接子2、連接子3、連接子10、連接子11、連接子12、連接子13、連接子14、連接子15、連接子16、連接子17、連接子18、連接子19、連接子20、連接子21、連接子22、連接子23、連接子24、連接子25、連接子26、連接子27、連接子28、連接子29、連接子30、連接子31、連接子32、連接子33、連接子34、連接子35、連接子36、連接子37、連接子38、連接子39、連接子40、連接子41、連接子42、連接子43、連接子44、連接子45、連接子46、連接子47、連接子48、連接子49及連接子50，限制條件為當該雙官能連接子係連接子10、連接子11、連接子12、連接子13或連接子14時，該等第一或第二A鏈或B鏈

多肽中之至少一者係以其N端胺基酸結合至取代基或該第一胰島素異二聚體分子之至少該等N端胺基酸係結合至取代基或該第一胰島素異二聚體及第二胰島素異二聚體兩者之該等N端胺基酸係結合至取代基。

在特定實施例中，該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣。在特定實施例中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。

本發明進一步提供一種胰島素二聚體，其包含具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys係結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第二連接子，該第一B29或B28 Lys及該第二B29或B28 Lys經由該第一連接子及該第二連接子結合在一起。

在另一實施例中，本發明提供一種胰島素類似物二聚體，其包含具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第二連接子，其中該等第一及第二連接子係經由具有以下結構之橋接連接子結合在一起：



其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜

環。在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。

在特定實施例中，該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣。在特定實施例中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。

在另一實施例中，本發明提供一種胰島素類似物二聚體，其包含具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第二連接子，其中該等第一及第二連接子係經由具有以下結構之橋接連接子結合在一起：



其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。

在特定實施例中，該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣。在特定實施例中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。

本發明進一步提供包含本文揭示之胰島素受體部分促效劑中之任何一者及醫藥上可接受之鹽之組合物。

本發明提供一種用於治療糖尿病之方法，其包括向患有糖尿病之個體投與治療有效量之包含上述胰島素受體部分促效劑中之任何一者之組合物。在特定態樣中，該等糖尿病係1型糖尿病、2型糖尿病或妊娠糖尿病。

本發明提供包含上述胰島素受體部分促效劑中之任何一者之組合物於糖尿病治療之用途。在特定態樣中，該等糖尿病係1型糖尿病、2型糖尿病或妊娠糖尿病。

本發明提供本文揭示之胰島素受體部分促效劑中之任何一者於製造用於治療糖尿病之藥劑之用途。在特定態樣中，該等糖尿病係1型糖尿病、2型糖尿病或妊娠糖尿病。

## 定義

胰島素-如本文使用，該術語意謂影響碳水化合物在動物體中之新陳代謝且在糖尿病治療中具有價值之胰臟活性成分。該術語包括與天然生成之胰島素在結構、用途及預期作用方面相同或類似且在糖尿病治療中具有價值之合成及生物技術衍生之產物。該術語係通用術語，其指定包含具有SEQ ID NO: 1中所示之胺基酸序列之A鏈肽及具有SEQ ID NO: 2中所示之胺基酸序列之B鏈肽之51個胺基酸異二聚體，其中A鏈之位置6及11處之半胱胺酸殘基係連接於二硫鍵中；A鏈之位置7及B鏈之位置7處之半胱胺酸殘基係連接於二硫鍵中；及A鏈之位置20及B鏈之位置19處之半胱胺酸殘基係連接於二硫鍵中。

胰島素類似物或類似物-如本文使用之該術語包括包含天然A鏈肽及/或B鏈肽之一或多種修飾之任何異二聚體類似物或單鏈類似物。修飾包括(但不限於)以胺基酸取代選自以下之位置之天然胺基酸：A4、A5、A8、A9、A10、A12、A13、A14、A15、A16、A17、

A18、A19、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B15、B16、B17、B18、B20、B21、B22、B23、B26、B27、B28、B29及B30；刪除位置B1-4及B26-30中之任何或所有位置；或直接結合或藉由聚合或非聚合連接子結合一或多個醯基、聚乙基甘胺酸(PEG)或醯部分；或其任何組合。如由本文揭示之N-連接之糖基化胰島素類似物例示，該術語進一步包括經修飾以具有至少一個N-連接之糖基化位點之任何胰島素異二聚體及單鏈類似物及(特定言之)其中該N-連接之糖基化位點係連接至N-聚醯或被N-聚醯佔用之實施例。胰島素類似物之實例包括(但不限於)揭示於公開之國際申請案WO20100080606、WO2009/099763及WO2010080609中之異二聚體及單鏈類似物，該等案件之揭示內容以引用之方式併入本文中。單鏈胰島素類似物之實例亦包括(但不限於)彼等揭示於公開之國際申請案WO9634882、WO95516708、WO2005054291、WO2006097521、WO2007104734、WO2007104736、WO2007104737、WO2007104738、WO2007096332、WO2009132129；美國專利案第5,304,473號及第6,630,348號；及Kristensen等人，*Biochem. J.* 305: 981-986 (1995)中者，該等案件之揭示內容各以引用之方式併入本文中。

該術語進一步包括在胰島素受體處具有一些或無可偵測活性但經修飾以包括一或多個胺基酸修飾或取代以在胰島素受體處具有天然胰島素在胰島素受體處之活性之至少1%、10%、50%、75%或90%之活性，且進一步包括至少一個N-連接之糖基化位點之單鏈及異二聚體多肽分子。在特定態樣中，該胰島素類似物係相比天然胰島素，在胰島素受體處具有小於80% (或70%)活性之部分促效劑。在胰島素生長激素受體處具有減小之活性及在胰島素受體處具有增強之活性之此等胰島素類似物包括異二聚體及單鏈類似物。

單鏈胰島素或單鏈胰島素類似物-如本文使用，該術語包含結構相關蛋白質之群，其中A鏈肽或功能類似物及B鏈肽或功能類似物係由2至35個胺基酸之肽或多肽或非肽聚合或非聚合連接子共價連接且相較於天然胰島素，其在胰島素受體處具有胰島素活性之至少1%、10%、50%、75%或90%。該單鏈胰島素或胰島素類似物進一步包括三種二硫鍵：第一二硫鍵係在A鏈或其功能類似物之位置6及11處之半胱胺酸殘基之間，第二二硫鍵係在A鏈或其功能類似物之位置7及B鏈或其功能類似物之位置7處之半胱胺酸殘基之間，及第三二硫鍵係在A鏈或其功能類似物之位置20及B鏈或其功能類似物之位置19處之半胱胺酸殘基之間。

連接肽或C-肽-如本文使用，該術語係指類單鏈前胰島素分子之B-C-A多肽序列之連接部分「C」。具體言之，在天然胰島素鏈中，該C-肽連接B鏈之位置30處之胺基酸及A鏈之位置1處之胺基酸。該術語可係指天然胰島素C-肽、猴C-肽及來自將B鏈連接至A鏈之3至35個胺基酸之任何其他肽，因此其係意欲包含在單鏈胰島素類似物(例如，參見美國公開申請案號20090170750及20080057004及WO9634882)及在胰島素前體分子(諸如揭示於WO9516708及美國專利案第7,105,314號中)中將B鏈肽連接至A鏈肽之任何肽。

胺基酸修飾-如本文使用，該術語係指胺基酸之取代或藉由添加化學基團至該胺基酸及/或自該胺基酸移除化學基團引起之胺基酸之衍生，且包括以人類蛋白質中常見之20種胺基酸及非典型或非天然生成之胺基酸中之任何一者進行之取代。非典型胺基酸之商業來源包括Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)；ChemPep Inc. (Miami, FL) 及Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA)。非典型胺基酸可購買自商業供應商、從頭合成或化學修飾或衍生自天然生成之胺基酸。

胺基酸取代-如本文使用，係指藉由不同胺基酸殘基置換一個胺

基酸殘基。

保守胺基酸取代-如本文使用，該術語在本文中係定義為如在下列五種基團中之一者內之交換：

I.小脂族、非極性或略具極性之殘基：

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II.極性、帶負電之殘基及其等醯胺：

Asp、Asn、Glu、Gln、半胱胺酸及同型半胱胺酸；

III.極性、帶正電之殘基：

His、Arg、Lys；或鳥胺酸(Orn)

IV.大、脂族、非極性殘基：

Met、Leu、Ile、Val、Cys、正白胺酸(Nle)、同型半胱胺酸

V.大、芳族殘基：

Phe、Tyr、Trp、乙醯苯丙胺酸

治療-如本文使用，該術語「治療(treat或treating、treated、treatment等)」係指出於減輕、緩解、改變、減緩、改善或影響病症(例如，糖尿病)、病症之症狀(例如，高血糖症)或易患病症之傾向之目的而向有需要之個體投與本發明之IRPA。例如，如本文使用，術語「治療糖尿病」通常係指將葡萄糖血液水平保持在正常水平附近且可包括視給定情況而提高或降低血液葡萄糖水平。

醫藥上可接受之載劑-如本文使用，該術語包括標準醫藥載劑中之任何一者，諸如磷酸鹽緩衝生理鹽水溶液、水、乳液(諸如油/水或水/油乳液)，及適用於向有需要之個體投與或由有需要之個體投與之各種類型之潤濕劑。該術語亦包含由美國聯邦(US Federal)政府之管理機構批准或列於美國藥典(US Pharmacopeia)中或在動物(包括人類)中使用之藥劑中之任何一者。

醫藥上可接受之鹽-如本文使用，該術語係指化合物之保留該親

代化合物之生物活性且在生物學上或其他方面係理想之鹽。本文揭示之許多化合物可藉助於胺基及/或羧基或與其等類似之基團之存在而形成酸及/或鹼鹽。

醫藥可接受之鹼加成鹽可製備自無機及有機鹼。衍生自無機鹼之鹽(僅以實例之方式)包括鈉、鉀、鋰、銨、鈣、鋅及鎂鹽。衍生自有機鹼之鹽包括(但不限於)一級、二級及三級胺之鹽。

醫藥可接受之酸加成鹽可製備自無機及有機酸。衍生自無機酸之鹽包括鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及類似物。衍生自有機酸之鹽包括乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、蘋果酸、丙二酸、琥珀酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、肉桂酸、杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸及類似物。

有效量或治療有效量-如本文使用，係指無毒但足以提供所需效應之胰島素類似物之量。例如一種所需效應將係高血糖症之預防或治療。「有效」量將隨個體不同而變化，取決於該個體之年齡及一般病症；投與模式等。因此，不總是可能指定精確之「有效量」。不總是可能在向有需要之個體投與或由有需要之個體投與前測定最佳有效量。然而，任何個體之情況中之適當「有效」量可由一般技術者使用例行實驗測定。

非經腸-如本文使用，該術語意謂非通過膳食管道而藉由一些其他途徑(諸如鼻內、吸入、皮下、肌肉內、脊柱內或靜脈內)。

#### 【圖式簡單說明】

圖1顯示當以0.69 nmol/kg向糖尿病小型豬投與時，相較於RHI，二聚體24、18及40之葡萄糖降低效應。

圖2A顯示比較化合物A與RHI (蛇麻素(Humulin))在小鼠中進行之胰島素耐受性測試(ITT)之結果。化合物A係以72 U/kg之劑量及300 U/kg之劑量投與及蛇麻素係以18 U/kg之劑量及72 U/kg之劑量投與。

圖**2B**顯示比較化合物**B**與RHI (蛇麻素)在小鼠中進行之胰島素耐受性測試(ITT)之結果。化合物**B**係以72 U/kg之劑量及300 U/kg之劑量投與及蛇麻素係以18 U/kg之劑量及72 U/kg之劑量投與。

圖**2C**顯示比較二聚體**24**與RHI (蛇麻素)在小鼠中進行之胰島素耐受性測試(ITT)之結果。二聚體**24**係以72 U/kg之劑量及300 U/kg之劑量投與及蛇麻素係以18 U/kg之劑量及72 U/kg之劑量投與。

圖**2D**顯示二聚體**55**在小鼠中進行之胰島素耐受性測試(ITT)之結果。二聚體**55**係以120 nmol/kg之劑量及300 nmol/kg之劑量投與。

圖**2E**顯示二聚體**58**在小鼠中進行之胰島素耐受性測試(ITT)之結果。二聚體**58**係以60 nmol/kg之劑量及300 nmol/kg之劑量投與。

圖**2F**顯示二聚體**60**在小鼠中進行之胰島素耐受性測試(ITT)之結果。二聚體**60**係以72 nmol/kg之劑量及300 nmol/kg之劑量投與。

圖**2G**顯示二聚體**67**在小鼠中進行之胰島素耐受性測試(ITT)之結果。二聚體**67**係以120 nmol/kg之劑量及300 nmol/kg之劑量投與。

圖**3**顯示藉由不含麩胱甘肽(GSH)的大鼠腎臟細胞膜(RKCM)培養2小時，化合物A胰島素二聚體降解為胰島素單體。親代值之%係僅由於電離效率之勢差所引起之半定量。

圖**4**顯示藉由含麩胱甘肽(GSH)的大鼠腎臟細胞膜(RKCM)培養2小時，化合物A胰島素二聚體降解為胰島素單體。親代值之%係僅由於電離效率之勢差所引起之半定量。

圖**5**顯示藉由不含麩胱甘肽(GSH)的大鼠腎臟細胞膜(RKCM)培養2小時，二聚體**24**損失一些A鏈多肽但未降解為單體。親代值之%係僅由於電離效率之勢差所引起之半定量。

圖**6**顯示藉由含麩胱甘肽(GSH)的大鼠腎臟細胞膜(RKCM)培養2小時，二聚體**24**損失一些A鏈多肽但未降解為單體。親代值之%係僅由於電離效率之勢差所引起之半定量。

圖 7A 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 4、5、7、8 及 9 之葡萄糖降低效應。

圖 7B 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 18、19、20、21 及 22 之葡萄糖降低效應。

圖 7C 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 23、24、26、27 及 28 之葡萄糖降低效應。

圖 7D 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 29、32、37、38 及 39 之葡萄糖降低效應。

圖 7E 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 40、41、43、44 及 48 之葡萄糖降低效應。

圖 7F 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 55、57、58、60 及 61 之葡萄糖降低效應。

圖 7G 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 62、64、67、69 及 71 之葡萄糖降低效應。

圖 7H 顯示當以 0.69 nmol/kg 向糖尿病小型豬投與時，相較於 RHI，二聚體 72、77 及 78 之葡萄糖降低效應。

### 【實施方式】

本發明提供包含經共價連接之兩種胰島素分子以形成胰島素分子二聚體之化合物，該胰島素分子二聚體可以常規類胰島素效能但低於最大活性活化胰島素受體。此等化合物係胰島素受體部分促效劑 (IRPA)：其等類似其他胰島素類似物表現以有效降低葡萄糖但具有低血糖症之較低風險。

胰島素二聚體已揭示於 Brandenburg 等人，美國專利案第 3,907,763 (1973) 號；Tatnell 等人，*Biochem J.* 216: 687-694 (1983)；Shüttler 及 Brandenburg，*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 363, 317-330, 1982；Weiland 等人，*Proc Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 1154-1158

(1990) ; Deppe等人, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (1994) 350:213-217 ; Brandenburg及Havenith, 美國專利案第6,908,897(B2) (2005)號 ; Knudsen等人, PLOS ONE 7: e51972 (2012) ; DiMarchi等人, WO2011/159895 ; DiMarchi等人, WO 2014/052451 ; 及Herrera等人, WO2014141165 中。最近, 胰島素二聚體已描述於 *Brant-Synthesis and Characterization of Insulin Receptor Partial Agonists as a Route to Improved Diabetes Therapy*, Ph.D. Dissertation, Indiana University (April 2015)及Zaykov及DiMarchi, Poster P212- *Exploration of the structural and mechanistic basis for partial agonism of insulin dimers*, American Peptide Symposium, Orlando FL (June 20-25 (2015) 中。然而, 本發明之發明人已發現該等二聚體之胰島素活性及部分促效劑活性之水平係隨二聚結構、胰島素類似物之序列、二聚連接子之長度及連接兩種胰島素多肽之二聚化位點而變化。本發明人已發現相較於以高劑量投與之天然胰島素或其他胰島素類似物, 本發明之胰島素二聚體當以高劑量投與時已減小促進低血糖症之風險。

本發明提供部分促效劑共價連接之胰島素二聚體, 其等調配成顯示治療指數(TI)相較於當前護理標準(SOC)基礎胰島素得到改善之新穎及轉形之基礎胰島素(每日一次投與)。此等分子可有效降低糖尿病小型豬之葡萄糖且具有低血糖症之低風險且具有每日一次(QD)基礎胰島素之性質。經改善之TI可授權執業醫師開具更侵略性劑量之IRPA二聚體以達成控制空腹葡萄糖之目標。空腹葡萄糖及HbA1c之密切控制可使此等分子充當1)在2型糖尿病(T2DM)中具有增強之效用及安全性之獨立長效胰島素及2)在1型糖尿病T1DM (及一些T2DM)中與其他膳食快速作用胰島素類似物(RAA)劑量一起使用之經改善之基礎性基礎胰島素。

理想之長效胰島素提供以高度穩定及可再生PK/PD連續控制糖尿

病患者之空腹葡萄糖。然而，當前可獲得之基礎胰島素，甚至彼等具有改善之PK/PD穩定性及再生性者仍具有窄治療指數且低血糖症事件因葡萄糖水平接近血糖正常目標而增加。此可通常導致劑量不足以避免低血糖症。預期使用本發明之IRPA之治療會藉由減弱因劑量增加所致之葡萄糖降低之變化速率來改變此效用：低血糖症關係。

### 胰島素A及B鏈

本文揭示具有胰島素受體促效劑活性之胰島素或胰島素類似物二聚體。該等二聚體之胰島素活性之水平係隨二聚結構、胰島素類似物之序列、二聚連接子之長度及連接兩種胰島素多肽之二聚化位點而變化。本發明之胰島素多肽可包含人類胰島素之天然B及A鏈序列(分別係SEQ ID NO: 1及2)或當彼此連接形成異雙螺旋時顯示胰島素促效劑活性之其已知類似物或衍生物中之任何一者。此類類似物包括(例如)具有藉由具有不破壞該胰島素類似物之胰島素活性之一或多個胺基酸刪除；一或多個胺基酸取代及/或一或多個胺基酸嵌入而不同於人類胰島素之A鏈及B鏈之A鏈及B鏈的蛋白質。

此項技術中熟知胰島素類似物之一種類型(「單體胰島素類似物」)。此等係人類胰島素之快速作用類似物，包括(例如)如下之胰島素類似物，其中：

(a)以Asp、Lys、Leu、Val或Ala取代位置B28處之胺基醯基殘基及位置B29處之胺基醯基殘基係Lys或Pro；

(b)刪除位置B27及B30中之任何一者處之胺基醯基殘基或以非天然胺基酸取代之。

在一個實施例中，提供包含在位置B28處經取代之Asp(例如，天冬胰島素(NOVOLOG)；參見SEQ ID NO:9)或在位置28處經取代之Lys及在位置B29處經取代之脯胺酸(例如，離脯胰島素(HUMALOG)；參見SEQ ID NO:6)之胰島素類似物。其他單體胰島素類似物係揭示於

Chance等人，美國專利案第5,514,646號；Chance等人，美國專利申請案序列號08/255,297；Brems等人，Protein Engineering, 5:527-533 (1992)；Brange等人，EPO公開案第214,826號(1987年3月18日公開)；及Brange等人，Current Opinion in Structural Biology, 1:934-940 (1991)中。此等揭示內容以引用之方式明確併入本文中以描述單體胰島素類似物。

胰島素類似物亦可具有以酸性形式置換醯胺化胺基酸。例如，Asn可經Asp或Glu置換。同樣，Gln可經Asp或Glu置換。特定言之，Asn(A18)、Asn(A21)或Asp(B3)或彼等殘基之任何組合可經Asp或Glu置換。另外，Gln(A15)或Gln(B4)或兩者皆可經Asp或Glu置換。

如本文所揭示，提供包含人類胰島素之B鏈及A鏈或其類似物或衍生物之胰島素單鏈類似物，其中該B鏈之羧基端係經由連接部分連接至該A鏈之胺基端。在一個實施例中，該A鏈係胺基酸序列GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 1)及該B鏈包含胺基酸序列FVNQHLCGSH LVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2)或其B30經刪除之羧基縮短序列及彼等序列之類似物，其中各序列經修飾以包含在對應於選自A5、A8、A9、A10、A14、A15、A17、A18、A21、B1、B2、B3、B4、B5、B9、B10、B13、B14、B20、B22、B23、B26、B27、B28、B29及B30之天然胰島素位置之位置處之一至五個胺基酸取代，限制條件為B28或B29中之至少一者係離胺酸。在一個實施例中，該等胺基酸取代係保守胺基酸取代。未不利影響胰島素之所需活性之此等位置之適宜胺基酸取代係熟習此項技術者已知，如證實(例如)於Mayer等人，Insulin Structure and Function, Biopolymers. 2007; 88(5):687-713中，該案之揭示內容以引用之方式併入本文中。

根據一個實施例，該等胰島素類似物肽可包含胰島素A鏈及胰島

素 B 鏈或其類似物，其中該 A 鏈包含與具有 GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 1) 之天然肽之長度共享至少 70% 序列一致性(例如，70%、75%、80%、85%、90%、95%) 之胺基酸序列及該 B 鏈包含與具有 FVNQHLCSGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2) 之天然肽之長度共享至少 60% 序列一致性(例如，60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%) 之胺基酸序列或其 B30 經刪除之羧基縮短序列。

其他胺基酸序列可添加至本發明之胰島素多肽之 B 鏈之胺基端或 A 鏈之羧基端。例如，一系列帶負電之胺基酸可添加至 B 鏈之胺基端，包括(例如)具有 1 至 12、1 至 10、1 至 8 或 1 至 6 個胺基酸長度且包含一或多個帶負電之胺基酸(包括(例如)麩胺酸及天冬胺酸)之肽。在一個實施例中，該 B 鏈胺基端延長包含 1 至 6 個帶電胺基酸。根據一個實施例，所揭示之胰島素多肽包含替代 A 鏈上之 C 端羧酸之 C 端醯胺或酯。

在各種實施例中，該胰島素類似物具有已相對於人類胰島素轉移之等電點。在一些實施例中，等電點之轉移係藉由向胰島素 A 鏈肽之 N 端及/或胰島素 B 鏈肽之 C 端添加一或多個精胺酸、離胺酸或組胺酸殘基來達成。此類胰島素多肽之實例包括 Arg<sup>A0</sup>-人類胰島素、Arg<sup>B31</sup>Arg<sup>B32</sup>-人類胰島素、Gly<sup>A21</sup>Arg<sup>B31</sup>Arg<sup>B32</sup>-人類胰島素、Arg<sup>A0</sup>Arg<sup>B31</sup>Arg<sup>B32</sup>-人類胰島素及 Arg<sup>A0</sup>Gly<sup>A21</sup>Arg<sup>B31</sup>Arg<sup>B32</sup>-人類胰島素。舉另一實例，甘精胰島素(LANTUS；參見 SEQ ID NO: 7 及 8) 係例示性長效胰島素類似物，其中 Asn<sup>A21</sup> 已經甘胺酸置換，且兩個精胺酸殘基已共價連接至 B 肽之 C 端。此等胺基酸變化之效應係轉移分子之等電點，藉此產生在酸性 pH (例如，pH 4 至 6.5) 下可溶但在生理性 pH 下不溶之分子。當甘精胰島素溶液注入肌肉中時，該溶液之 pH 被中

和及該甘精胰島素形成微沉澱，其在注射後24小時內緩慢釋放甘精胰島素及無明顯之胰島素峰並因此降低引起低血糖症之風險。此特性容許每日一次給藥以提供病患之基礎胰島素。因此，在一些實施例中，該胰島素類似物包含其中位置A21處之胺基酸係甘胺酸之A鏈肽及其中位置B31及B32處之胺基酸係精胺酸之B鏈肽。本發明包含本文描述之此等突變及任何其他突變之所有單一或重組合(例如，Gly<sup>A21</sup>-人類胰島素、Gly<sup>A21</sup>Arg<sup>B31</sup>-人類胰島素、Arg<sup>B31</sup>Arg<sup>B32</sup>-人類胰島素、Arg<sup>B31</sup>-人類胰島素)。

在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該胰島素類似物之一或多個醯胺化胺基酸係經酸性胺基酸或另一胺基酸置換。例如，天冬醯胺酸可經天冬胺酸或麩胺酸或另一殘基置換。同樣，麩醯胺可經天冬胺酸或麩胺酸或另一殘基置換。特定言之，Asn<sup>A18</sup>、Asn<sup>A21</sup>或Asn<sup>B3</sup>或彼等殘基之任何組合可經天冬胺酸或麩胺酸或另一殘基置換。Gln<sup>A15</sup>或Gln<sup>B4</sup>或兩者皆可經天冬胺酸或麩胺酸或另一殘基置換。在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該等胰島素類似物在位置A21處具有天冬胺酸或另一殘基或在位置B3處具有天冬胺酸或另一殘基或兩者。

熟習此項技術者將知曉可以其他胺基酸置換胰島素類似物中之又其他胺基酸同時保留該分子之生物活性。例如(但不限於)此項技術中亦廣泛接受下列修飾：以天冬胺酸置換位置B10之組胺酸殘基(His<sup>B10</sup>變為Asp<sup>B10</sup>)；以天冬胺酸置換位置B1之苯丙胺酸殘基(Phe<sup>B1</sup>變為Asp<sup>B1</sup>)；以丙胺酸置換位置B30之蘇胺酸殘基(Thr<sup>B30</sup>變為Ala<sup>B30</sup>)；以丙胺酸置換位置B26之酪胺酸殘基(Tyr<sup>B26</sup>變為Ala<sup>B26</sup>)；及以天冬胺酸置換位置B9之絲胺酸殘基(Ser<sup>B9</sup>變為Asp<sup>B9</sup>)。

在各種實施例中，該胰島素類似物具有作用之延長性。因此，在某些實施例中，該胰島素類似物可用脂肪酸醯化。亦即，於該胰島

素類似物上之胺基與該脂肪酸之羧酸基團之間形成醯胺鍵。該胺基可係該胰島素類似物之N端胺基酸之 $\alpha$ -胺基，或可係該胰島素類似物之離胺酸殘基之 $\epsilon$ -胺基。該胰島素類似物可在野生型人類胰島素中存在之三種胺基中之一或多者處經醯化，可在已引入野生型人類胰島素序列中之離胺酸殘基上醯化。在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該胰島素類似物可在位置A1、B1或A1及B1兩者處經醯化。在某些實施例中，該脂肪酸係選自肉豆蔻酸(C14)、十五烷酸(C15)、棕櫚酸(C16)、十七烷酸(C17)及硬脂酸(C18)。

胰島素類似物之實例可(例如)參見已公開之國際申請案WO9634882、WO95516708、WO20100080606、WO2009/099763及WO2010080609、美國專利案第6,630,348號及Kristensen等人，Biochem. J. 305: 981-986 (1995)中，該等案件之揭示內容以引用之方式併入本文中。在其他實施例中，活體外糖基化或活體內N-糖基化胰島素類似物可經醯化及/或聚乙二醇化。

根據一個實施例，提供一種胰島素類似物，其中該胰島素肽之A鏈包含序列GIVEQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (SEQ ID NO: 3)及B鏈包含序列X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFFYTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO: 4)，其中

X<sub>8</sub>係蘇胺酸或組胺酸；

X<sub>17</sub>係麩胺酸或麩醯胺；

X<sub>19</sub>係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；

X<sub>23</sub>係天冬醯胺酸或甘胺酸；

X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；

X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；

X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；

X<sub>31</sub>係脯胺酸或離胺酸；及

X<sub>32</sub>係脯胺酸或離胺酸，限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸。

在另一實施例中，該B鏈包含序列X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFFYT-X<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub> (SEQ ID NO: 5)，其中

X<sub>22</sub>係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸；

X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；

X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；

X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；

X<sub>31</sub>係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸；

X<sub>32</sub>係離胺酸或脯胺酸；

X<sub>33</sub>係蘇胺酸、丙胺酸或不存在；

X<sub>34</sub>係精胺酸或不存在；及

X<sub>35</sub>係精胺酸或不存在；

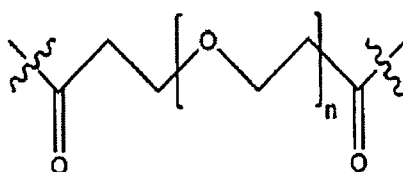
限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸。

### 連接部分

本文揭示之胰島素二聚體係形成於第一與第二胰島素多肽之間，其中各胰島素多肽包含A鏈及B鏈。該等第一及第二胰島素多肽可係兩種鏈胰島素類似物(亦即，其中A及B鏈僅經由內部半胱胺酸殘基之間之鏈間二硫鍵連接)，其中該等第一及第二胰島素多肽係藉由共價鍵、雙官能連接子或使用經銅(I)催化之炔烴-疊氮化物環加成(CuAAC)點擊化學或無銅點擊化學以連接各自B鏈上之連接部分而彼此連接以形成二聚體。根據一個實施例，該等第一及第二胰島素多肽係藉由雙官能連接子將第一胰島素多肽之B鏈之B28或B29離胺酸之側鏈連接至第二胰島素多肽之B鏈之B28或B29胺基酸之側鏈而彼此連接。

在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該連接部分可係視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。該連接部分可係二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分。

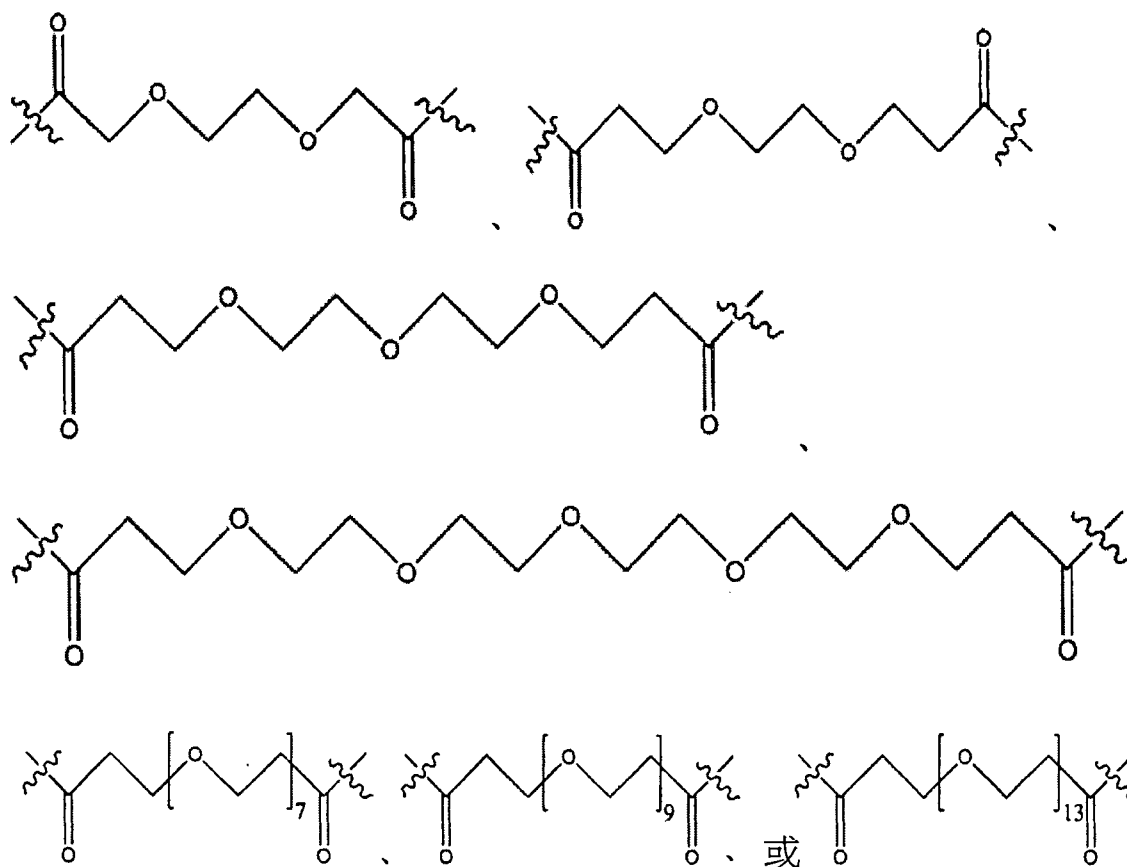
在一個實施例中，該連接部分包含PEG連接子(具有約2至25個乙二醇單元或2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或25個乙二醇單元之短直鏈聚合物)及視需要一或多個胺基酸。在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該PEG連接子包含下列結構：(PEG)<sub>2</sub>、(PEG)<sub>3</sub>、(PEG)<sub>4</sub>、(PEG)<sub>5</sub>、(PEG)<sub>6</sub>、(PEG)<sub>7</sub>、(PEG)<sub>8</sub>、(PEG)<sub>9</sub>、(PEG)<sub>10</sub>、(PEG)<sub>11</sub>、(PEG)<sub>12</sub>、(PEG)<sub>13</sub>、(PEG)<sub>14</sub>、(PEG)<sub>15</sub>、(PEG)<sub>16</sub>或(PEG)<sub>25</sub>。該PEG連接子可係可共價結合或連接至第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之ε胺基之雙官能連接子。結合至第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸基團之ε胺基之雙官能PEG連接子的結構可由下列通式表示：



其中n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或25及波浪線指示在連接子與ε胺基間之鍵。此項技術中熟知用於將PEG結合至離胺酸之ε胺基之方法，例如，參見 Veronese,

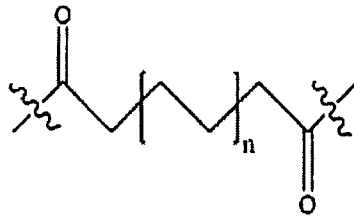
Biomaterials 22: 405-417 (2001)。

在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，將第一胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基結合至第二胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基酸之PEG連接部分係



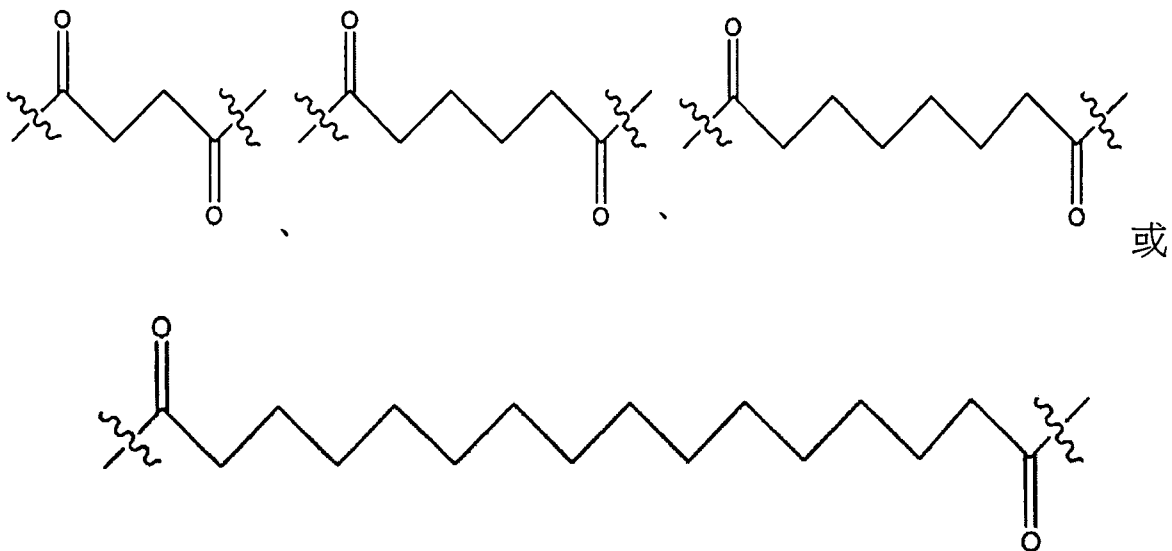
其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基之間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含含有4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16個碳之醯基部分。在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該醯基部分係琥珀醯基(4)、己二醯基(C6)、辛二醯基(C8)或十六烷二醯基(C16)部分。該醯基部分可包含可共價結合或連接至第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基的雙官能連接子。結合至第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸基團之 $\epsilon$ 胺基之雙官能醯基連接子的結構可由下列通式表示：



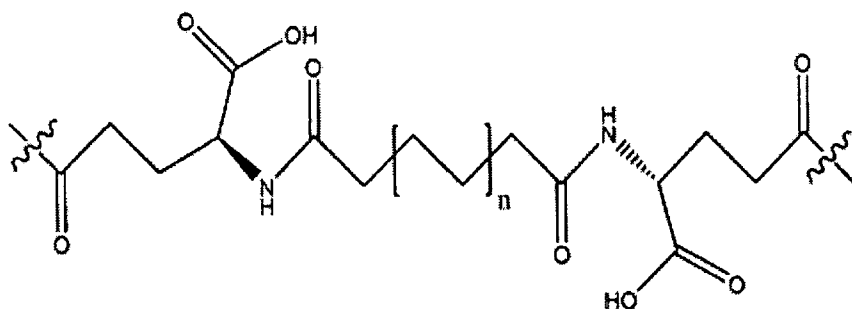
其中 $n=0$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 、 $10$ 、 $11$ 或 $12$ 及波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基之間之鍵。

在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，將第一胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基酸結合至第二胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基酸之醯基連接部分係



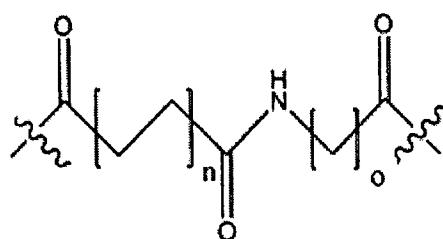
其中波浪線指示在該連接子與胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基之間之鍵。

在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該雙官能醯基連接子可進一步包括在醯基連接子之一端或兩端處之一或兩個胺基酸。例如，在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，在該連接子之一端或兩端處之胺基酸係 $\gamma$ 麩胺酸( $\gamma$ E)，其可由下列通式表示：

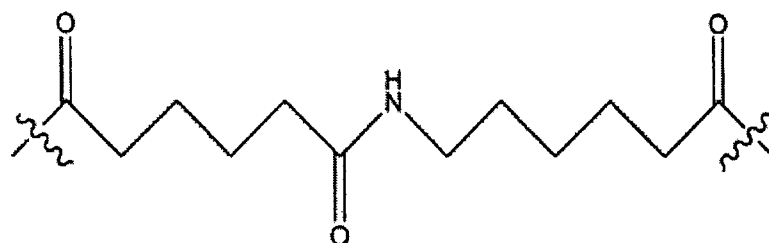


其中 $n=0$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 、 $10$ 、 $11$ 或 $12$ 及波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含含有醯胺之烷基鏈雙官能連接子，其可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基，該連接部分可由下列通式表示：



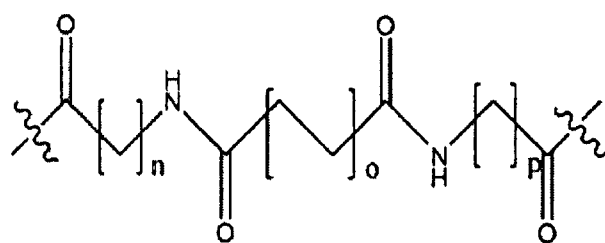
其中 $n=1$ 或 $2$ ， $o=1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 或 $5$ 及波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。在一特定實施例中，該連接部分可具有以下結構：



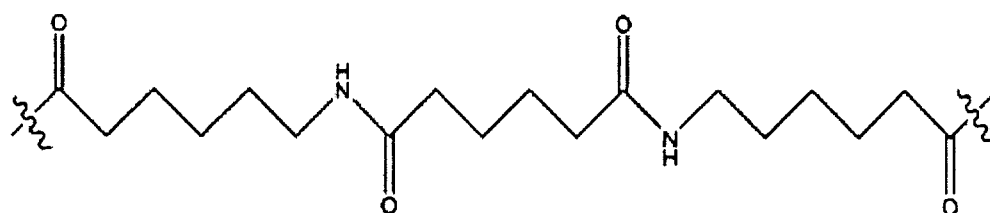
其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含含有醯胺之烷基鏈雙官能連接子，其可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29

或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基，該連接部分可由下列通式表示：

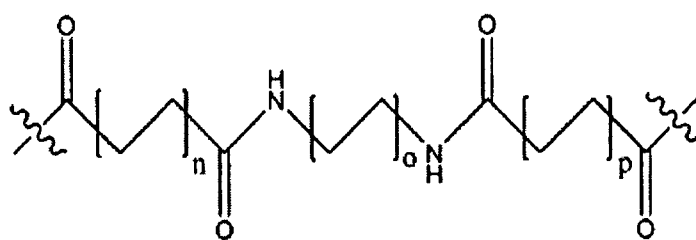


其中 $n=1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 或 $5$ ， $o=1$ 或 $2$ ， $p=1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 或 $5$ 及波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。在一特定實施例中，該連接部分可具有以下結構：



其中波浪線指示在該連接子與胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含含有醯胺之烷基鏈雙官能連接子，其可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基，及該連接部分可由下列通式表示：



其中 $n=1$ 或 $2$ ， $o=1$ 、 $2$ 或 $3$ ， $p=1$ 或 $2$ 及波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。在一特定實施例中，該連接部分具有以下結構：

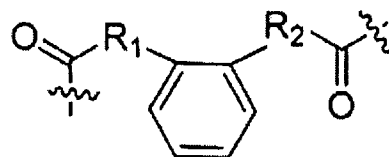


其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在特定實施例中，該連接部分包含為連接部分提供剛性之環結構。在特定實施例中，該環結構包含苶基或具有3、4、5、6、7或8個碳之飽和或不飽和脂環基。在特定實施例中，該脂環基包含環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環戊基或環辛基。在特定實施例中，該不飽和脂環基(環烷烴)包含環丙烯基、環丁烯基、環戊烯基、環己烯基、環庚烯基或環辛烯基。在特定實施例中，該環結構可進一步包含一或多個飽和或不飽和脂族側鏈。在特定實施例中，該環結構可進一步包含一或多個包含一或多個雜原子之脂族側鏈。在特定實施例中，該雜原子係O、S或N。

在特定實施例中，該環結構包含雜原子。在特定實施例中，該雜原子可係O、S或N。在特定實施例中，該環結構包含苶基或具有3、4、5、6、7或8個碳之飽和或不飽和脂環基，其中一或多個碳經選自N、O及S之雜原子取代。包括雜原子之環結構之實例包括(但不限於)環氧乙烷、氮丙啶(ethylenimine)、氧雜環丁烷(trimethyloxide)、咪喃、四氫咪喃、噻吩、吡咯啉、哌喃、哌啉、咪唑、噻唑、二噁烷、嗎啉、嘧啉、三唑、硫坦、1,3-二氮雜環丁烯、2,3-二氫氮啞(2,3-dihydroazete)、1,2-氧硫雜環戊烷、異噁唑、噁唑、噻咯、氧雜環庚烷(oxepane)、噻呼、3,4,5,6-四氫-2H-氮呼、1,4-硫氮呼、偶氮環辛烷及硫雜環辛烷。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,1二醯基表示：



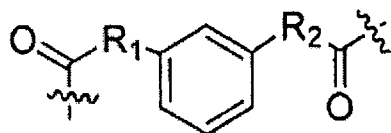
其中 $R_1$ 及 $R_2$ 可係相同或不同，其中 $R_1$ 及 $R_2$ 獨立地係鍵結、飽和或不飽和C1-C20或C1-C6烷基鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分、聚(乙二醇)(PEG)鏈(PEG)<sub>2</sub>、(PEG)<sub>3</sub>、(PEG)<sub>4</sub>、(PEG)<sub>5</sub>、(PEG)<sub>6</sub>、(PEG)<sub>7</sub>、(PEG)<sub>8</sub>、(PEG)<sub>9</sub>、(PEG)<sub>10</sub>、(PEG)<sub>11</sub>、(PEG)<sub>12</sub>、(PEG)<sub>13</sub>、(PEG)<sub>14</sub>、(PEG)<sub>15</sub>、(PEG)<sub>16</sub>或(PEG)<sub>2</sub>及其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,1二醯基表示：



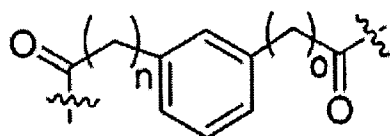
其中n及o獨立地係0、1、2、3、4或5，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,3二醯基表示：



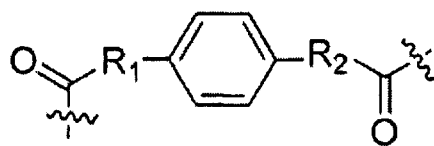
其中 $R_1$ 及 $R_2$ 可係相同或不同，其中 $R_1$ 及 $R_2$ 獨立地係鍵結、飽和或不飽和C1-C20或C1-C6烷基鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分、聚(乙二醇)(PEG)鏈(PEG)<sub>2</sub>、(PEG)<sub>3</sub>、(PEG)<sub>4</sub>、(PEG)<sub>5</sub>、(PEG)<sub>6</sub>、(PEG)<sub>7</sub>、(PEG)<sub>8</sub>、(PEG)<sub>9</sub>、(PEG)<sub>10</sub>、(PEG)<sub>11</sub>、(PEG)<sub>12</sub>、(PEG)<sub>13</sub>、(PEG)<sub>14</sub>、(PEG)<sub>15</sub>、(PEG)<sub>16</sub>或(PEG)<sub>2</sub>及其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,3二醯基表示：



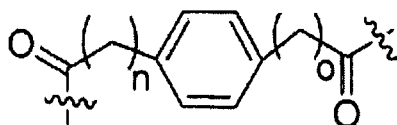
其中n及o獨立地係0、1、2、3、4或5，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,4二醯基表示：



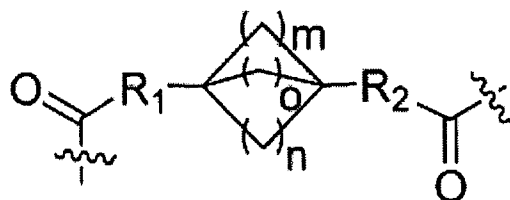
其中R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>可係相同或不同，其中R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>獨立地係鍵結、飽和或不飽和C1-C20或C1-C6烷基鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分、聚(乙二醇)(PEG)鏈(PEG)<sub>2</sub>、(PEG)<sub>3</sub>、(PEG)<sub>4</sub>、(PEG)<sub>5</sub>、(PEG)<sub>6</sub>、(PEG)<sub>7</sub>、(PEG)<sub>8</sub>、(PEG)<sub>9</sub>、(PEG)<sub>10</sub>、(PEG)<sub>11</sub>、(PEG)<sub>12</sub>、(PEG)<sub>13</sub>、(PEG)<sub>14</sub>、(PEG)<sub>15</sub>、(PEG)<sub>16</sub>或(PEG)<sub>2</sub>及其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之ε胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之ε胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,4二醯基表示：



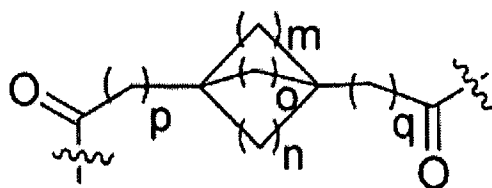
其中n及o獨立地係0、1、2、3、4或5其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之ε胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之ε胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,3二醯基表示：



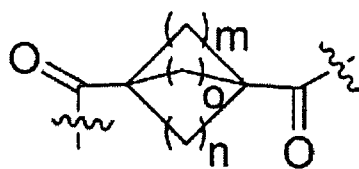
其中 $m$ 、 $n$ 及 $o$ 各獨立地係1或2； $R_1$ 及 $R_2$ 可係相同或不同，其中 $R_1$ 及 $R_2$ 獨立地係鍵結、飽和或不飽和C1-C20或C1-C6烷基鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分、聚(乙二醇)(PEG)鏈(PEG)<sub>2</sub>、(PEG)<sub>3</sub>、(PEG)<sub>4</sub>、(PEG)<sub>5</sub>、(PEG)<sub>6</sub>、(PEG)<sub>7</sub>、(PEG)<sub>8</sub>、(PEG)<sub>9</sub>、(PEG)<sub>10</sub>、(PEG)<sub>11</sub>、(PEG)<sub>12</sub>、(PEG)<sub>13</sub>、(PEG)<sub>14</sub>、(PEG)<sub>15</sub>、(PEG)<sub>16</sub>或(PEG)<sub>2</sub>及其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,3二醯基表示：



其中 $m$ 、 $n$ 及 $o$ 各獨立地係1或2；其中 $p$ 及 $q$ 獨立地係0、1、2、3、4或5，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,3二醯基表示：



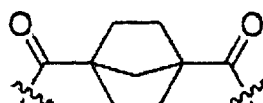
其中  $m$ 、 $n$  及  $o$  各獨立地係 1 或 2；其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置 B29 或 B28 處之離胺酸之  $\epsilon$  胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置 B29 或 B28 離胺酸殘基之  $\epsilon$  胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之環己烷-1,4 二醯基表示：



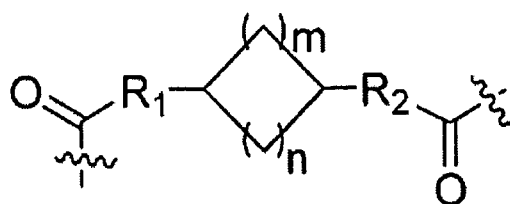
及其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置 B29 或 B28 處之離胺酸之  $\epsilon$  胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置 B29 或 B28 離胺酸殘基之  $\epsilon$  胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之環己烷-1,4 二醯基表示：



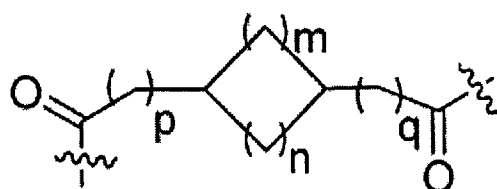
及其中波浪線指示在連接子與該等胰島素多肽之位置 B29 或 B28 處之離胺酸之  $\epsilon$  胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置 B29 或 B28 離胺酸殘基之  $\epsilon$  胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,3 二醯基表示：



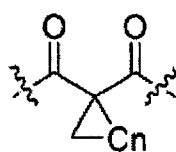
其中m及n各獨立地係0、1或2，限制條件為m及n兩者非0；R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>可係相同或不同，其中R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>獨立地係鍵結、飽和或不飽和C1-C20或C1-C6烷基鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地係氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分、聚(乙二醇)(PEG)鏈(PEG)<sub>2</sub>、(PEG)<sub>3</sub>、(PEG)<sub>4</sub>、(PEG)<sub>5</sub>、(PEG)<sub>6</sub>、(PEG)<sub>7</sub>、(PEG)<sub>8</sub>、(PEG)<sub>9</sub>、(PEG)<sub>10</sub>、(PEG)<sub>11</sub>、(PEG)<sub>12</sub>、(PEG)<sub>13</sub>、(PEG)<sub>14</sub>、(PEG)<sub>15</sub>、(PEG)<sub>16</sub>或(PEG)<sub>2</sub>及其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之ε胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之ε胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之苯-1,3二醯基表示：



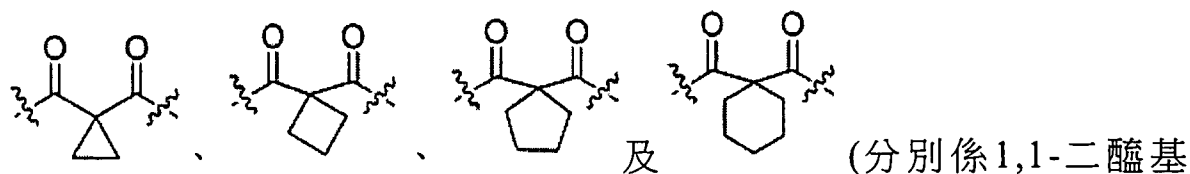
其中m及n各獨立地係1或2；其中p及q獨立地係0、1、2、3、4或5，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之ε胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之ε胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之1,1二醯基表示



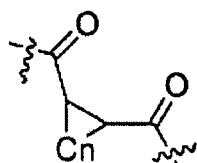
其中n係1、2、3或4，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素

多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。在特定實施例中，該1,1-二醯基可具有選自以下之結構：

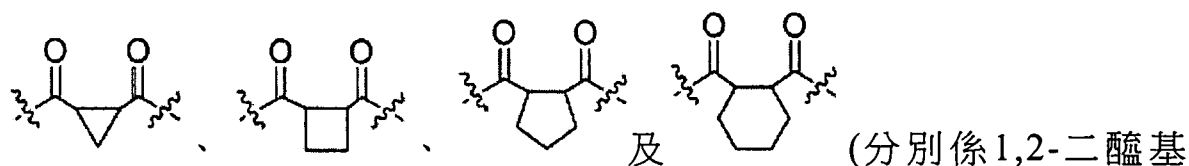


-C3；1,2-二醯基-C4；1,1-二醯基-C5；及1,1-二醯基-C6)，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之1,2-二醯基表示：

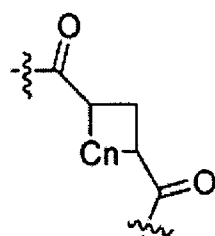


其中n係1、2、3或4，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。在特定實施例中，該1,2-二醯基可具有選自以下之結構：

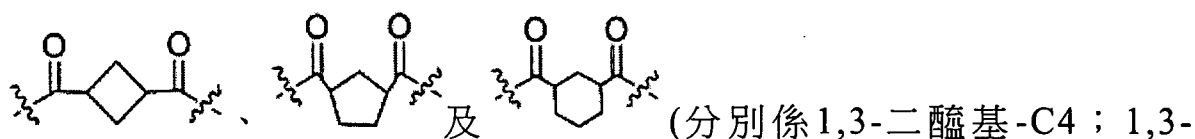


-C3；1,2-二醯基-C4；1,2-二醯基-C5；及1,2-二醯基-C6)，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之1,3-二醯基表示：

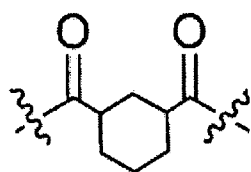


其中n係1、2或3，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。在特定實施例中，該1,3二醯基可具有選自以下之結構：



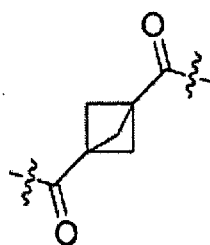
其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之1,4二醯基表示：



(1,4-二醯基-C6)，其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在另一實施例中，該連接部分包含可共價結合或連接至該等第一及第二胰島素多肽之位置B29或B28離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基之雙官能連接子，該連接部分可由具有下列通式之環丁基-1,3二醯基表示：

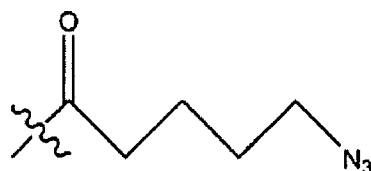


及其中波浪線指示在該連接子與該等胰島素多肽之位置B29或

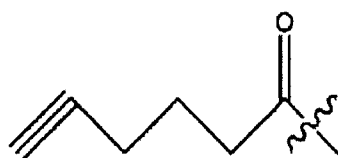
B28處之離胺酸之 $\epsilon$ 胺基間之鍵。

在本發明之另一態樣中，該等第一及第二胰島素多肽可使用經銅催化之炔烴-疊氮化物環加成(CuAAC) (特定言之，CuAAC點擊化學)而結合在一起。在此態樣中，該第一胰島素多肽之B29或B28離胺酸之 $\epsilon$ 胺基係結合至具有近端及遠端之連接子部分，其中該連接子部分之近端係結合至 $\epsilon$ 胺基且該遠端包含疊氮基。在此態樣中，該第二胰島素多肽之B29或B28離胺酸之 $\epsilon$ 胺基係結合至具有近端及遠端之連接子部分，其中該連接子部分之近端係結合至 $\epsilon$ 胺基且該遠端包含炔烴基。在 $\text{Cu}^{2+}$ 及還原劑之存在下，該等疊氮及炔烴基將形成包含三唑部分之連續連接部分。參見美國專利案第8,129,542號，其以全文引用之方式併入本文中以描述CuAAC點擊化學。

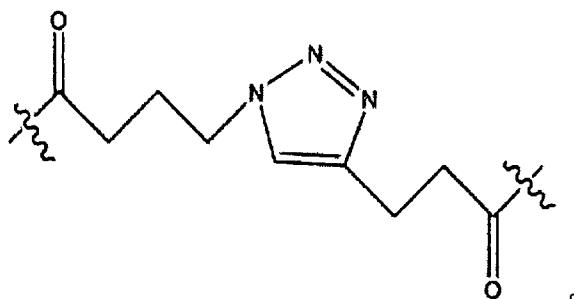
在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該第一胰島素多肽可已將B29或B28離胺酸之 $\epsilon$ 胺基結合至具有下式之連接子：



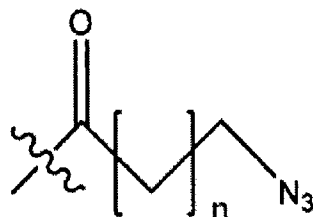
及該第二胰島素多肽可已將B29或B28離胺酸之 $\epsilon$ 胺基結合至具有下式之連接子：



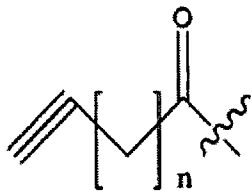
。在 $\text{Cu}^{2+}$ 及還原劑之存在下，該等連接子組合以提供具有下列結構之連接部分：



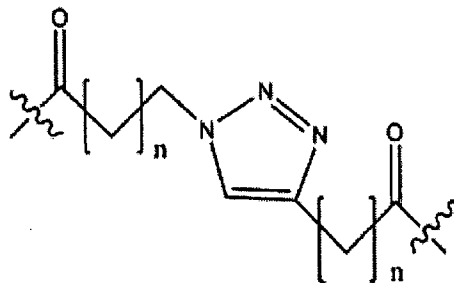
在該等胰島素受體部分促效劑之特定態樣中，該第一胰島素多肽可已將B29或B28離胺酸之 $\epsilon$ 胺基結合至具有下式之連接子：



其中 $n=1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 或 $10$ 及該第二胰島素多肽可已將B29或B28離胺酸之 $\epsilon$ 胺基結合至具有下式之連接子：

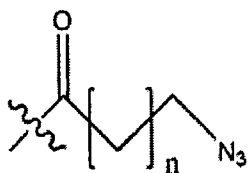


其中 $n=1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 或 $10$ 。在 $\text{Cu}^{2+}$ 及還原劑之存在下，該等連接子組合以提供具有下列結構之連接部分：



其中各 $n$ 獨立地係 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 或 $10$ 。

在另一態樣中，該第一胰島素多肽及該第二胰島素多肽皆可已將其各自B29或B28離胺酸之 $\epsilon$ 胺基結合至具有下式之連接子：

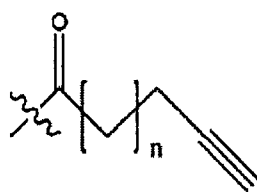


其中各 $n$ 獨立地係 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 或 $10$ 。該等連接子結合形成連接部分可藉由提供具有以下結構之分子(中間物或橋接連接子)達成：



其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。

在另一態樣中，該第一胰島素多肽及該第二胰島素多肽皆可已將其各自B29或B28離胺酸之ε胺基結合至具有下式之連接子：



其中各n獨立地係1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。該等連接子結合形成連接部分可藉由提供具有以下結構之分子(中間物或橋接連接子)達成：

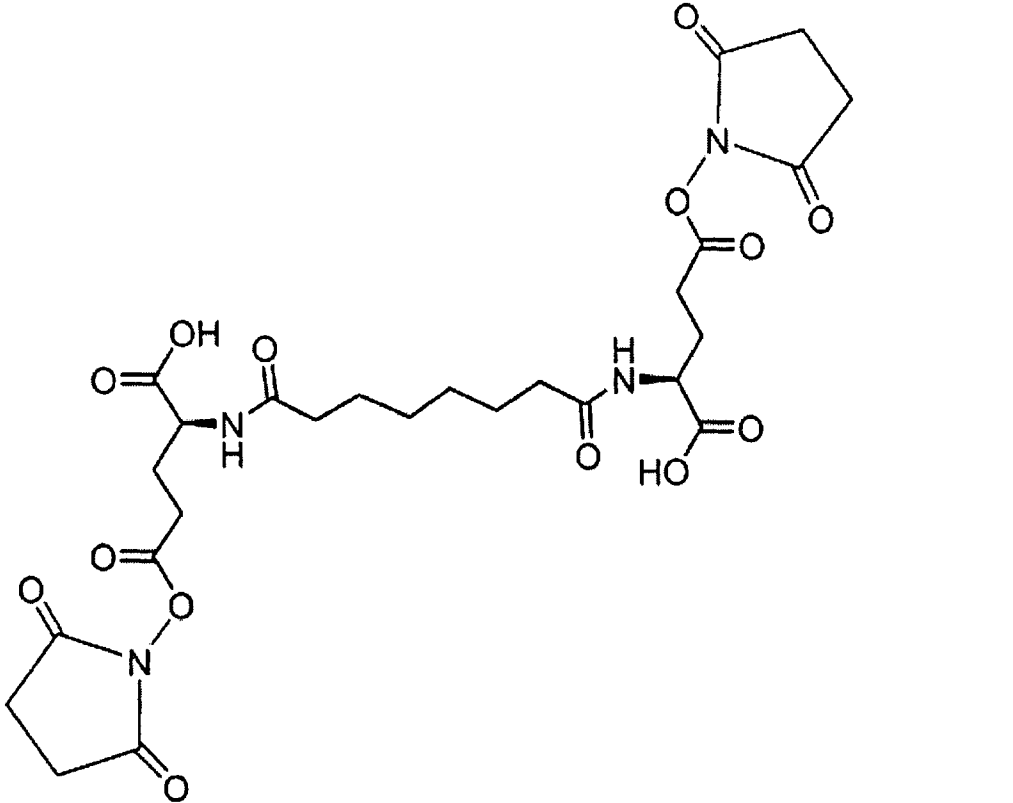
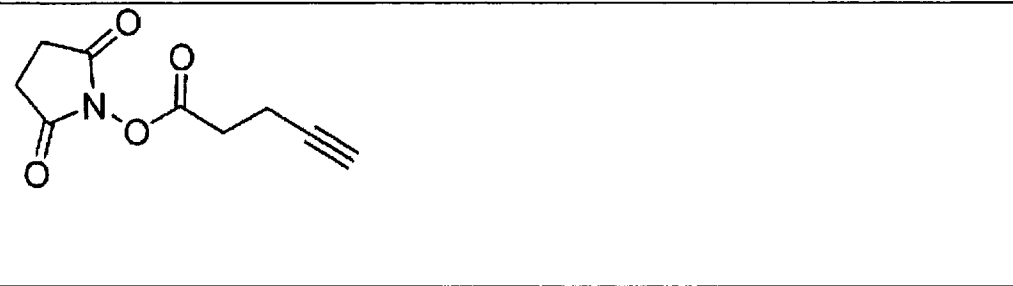
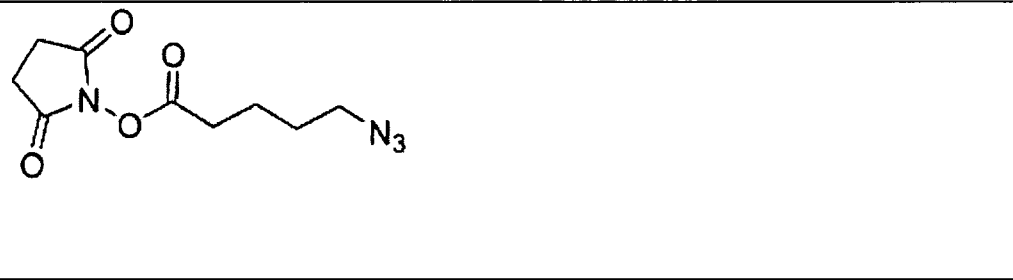
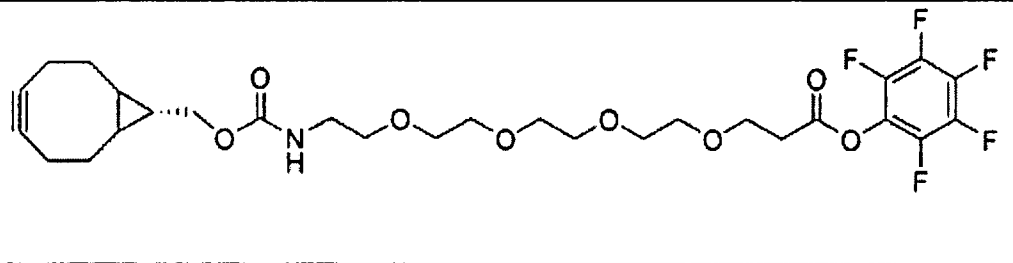
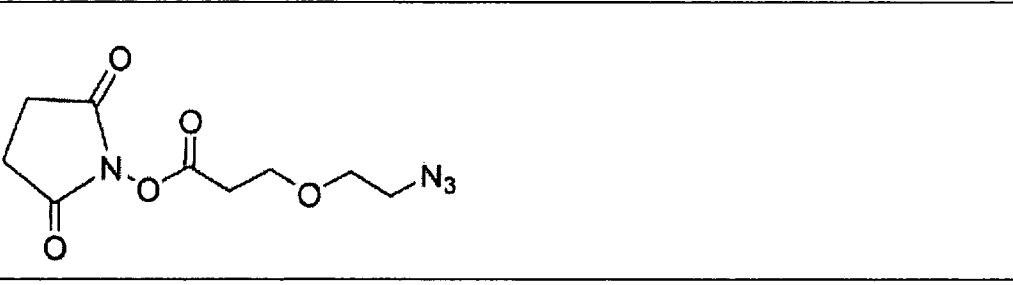


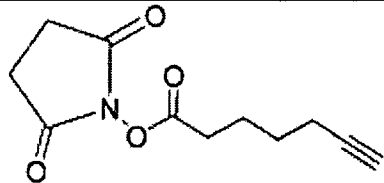
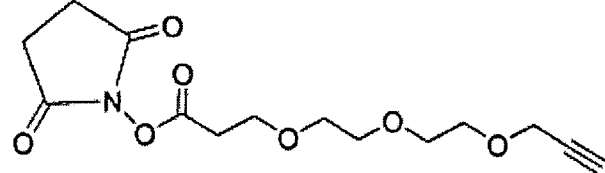
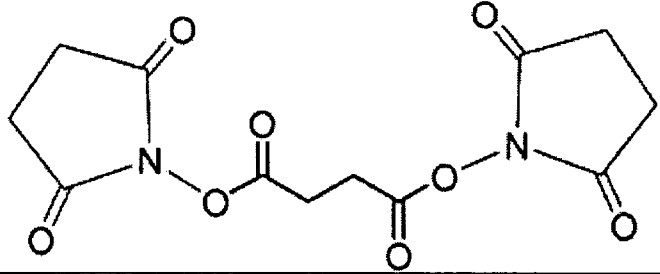
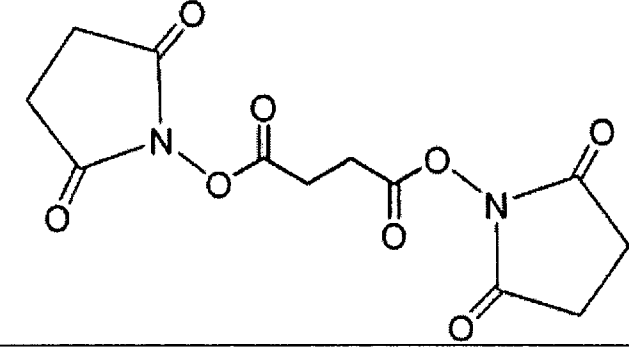
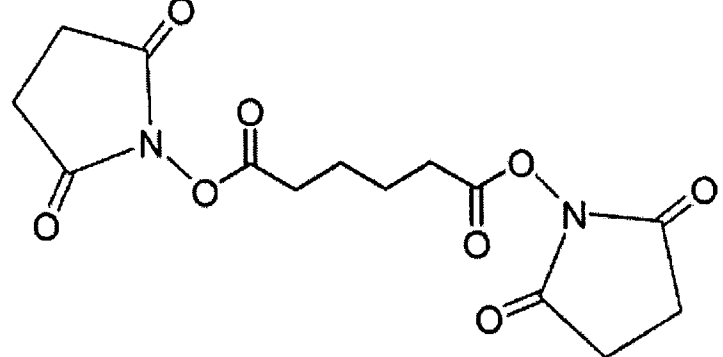
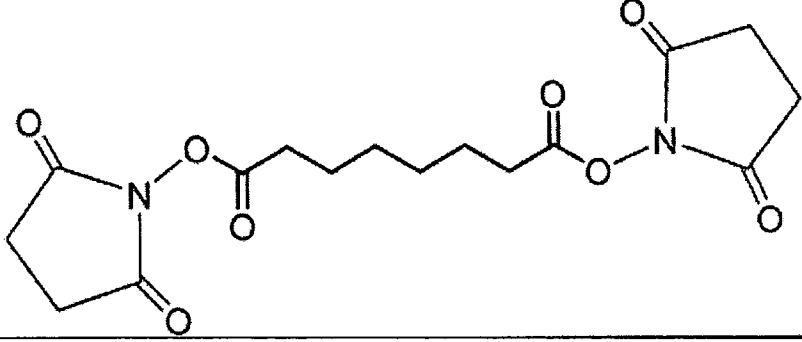
其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。

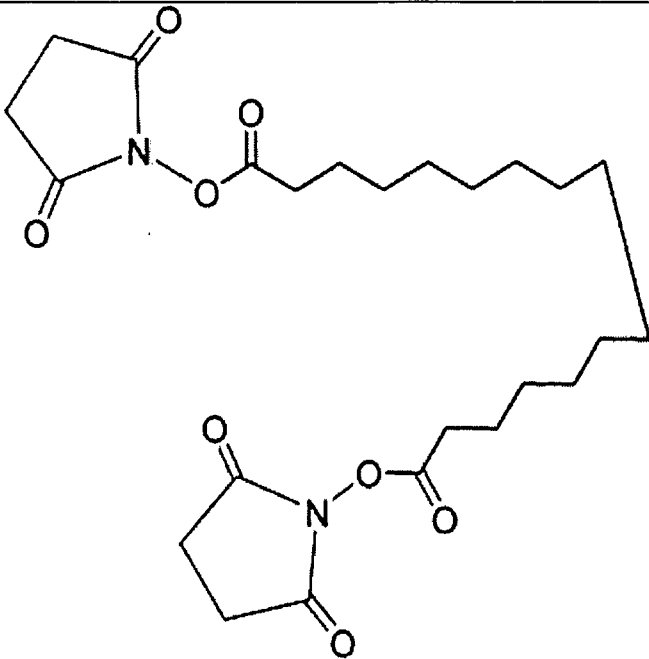
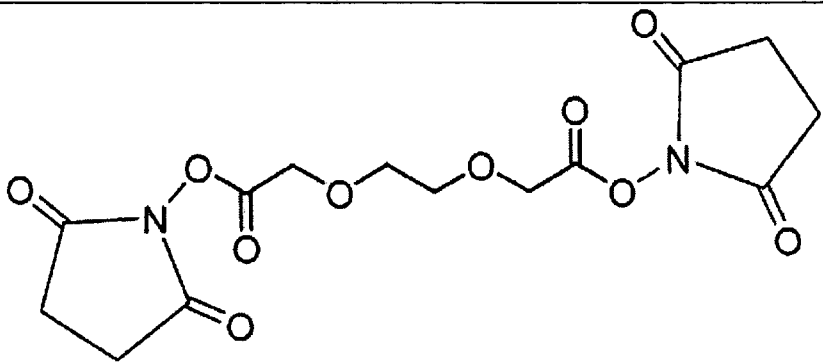
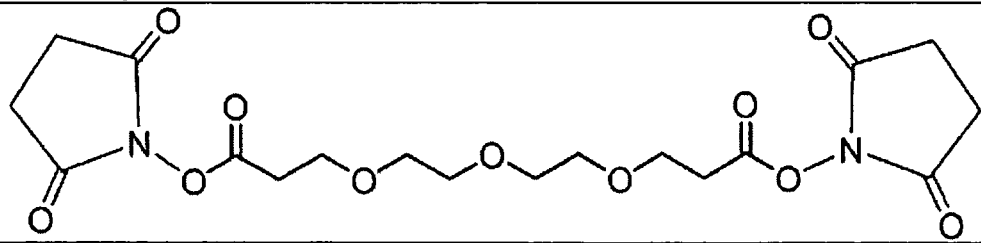
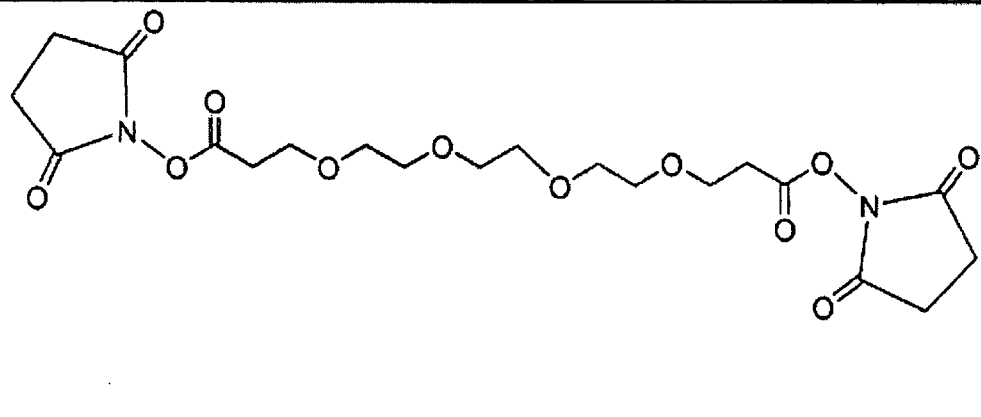
在特定態樣中，該第一胰島素聚合物係以B29或B28離胺酸之ε胺基結合至由上述疊氮化物終止之連接子及該第二胰島素多肽係以B29或B28離胺酸之ε胺基處結合至以環辛炔部分終止之連接子及該等連接子係使用無銅環加成點擊化學結合以形成連接子部分。例如，參見美國專利案第7,807,619號，其以全文引用之方式併入本文中。

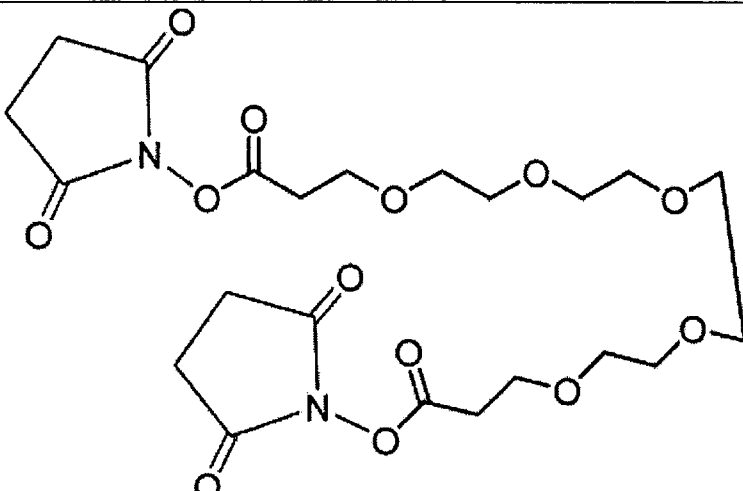
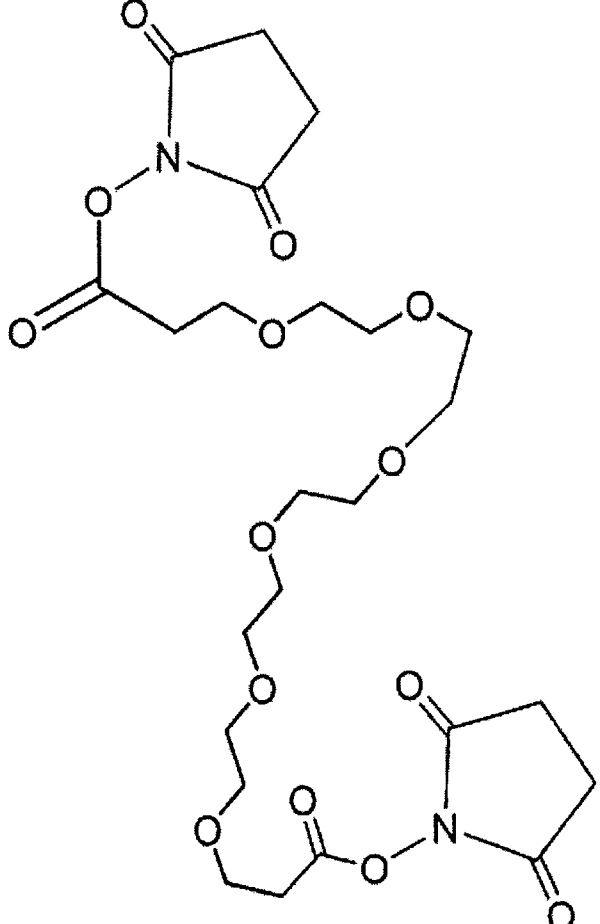
下表顯示例示性連接子，其等可用以構築本發明之二聚體。所示二聚體包含用以結合至B29或B29離胺酸之 $\epsilon$ 胺基之2,5-二側氧基吡咯啶基。

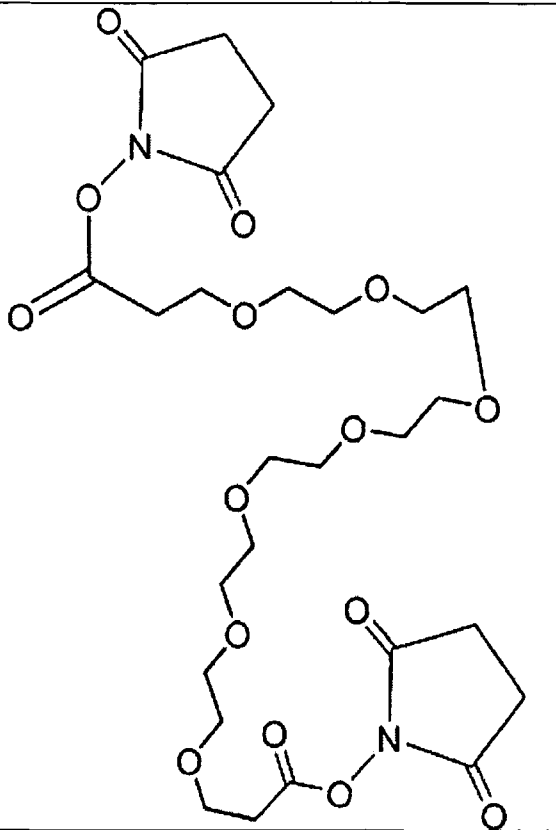
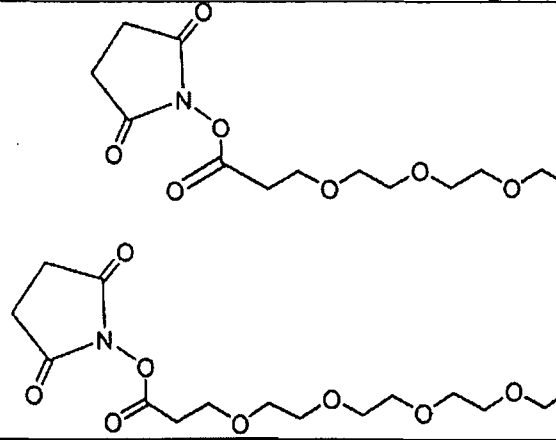
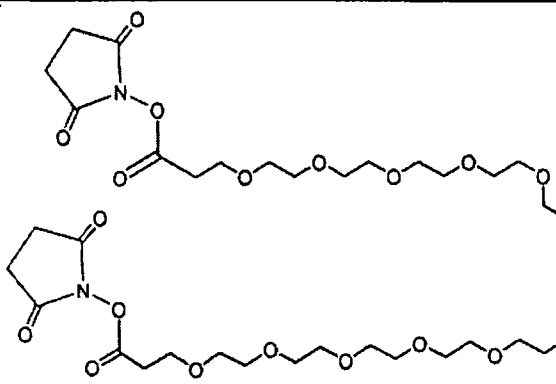
| 連接子之表格 |     |            |
|--------|-----|------------|
|        | 連接子 | 名稱         |
| 1      |     | C6+Nc6     |
| 2      |     | C6N+C6+NC6 |

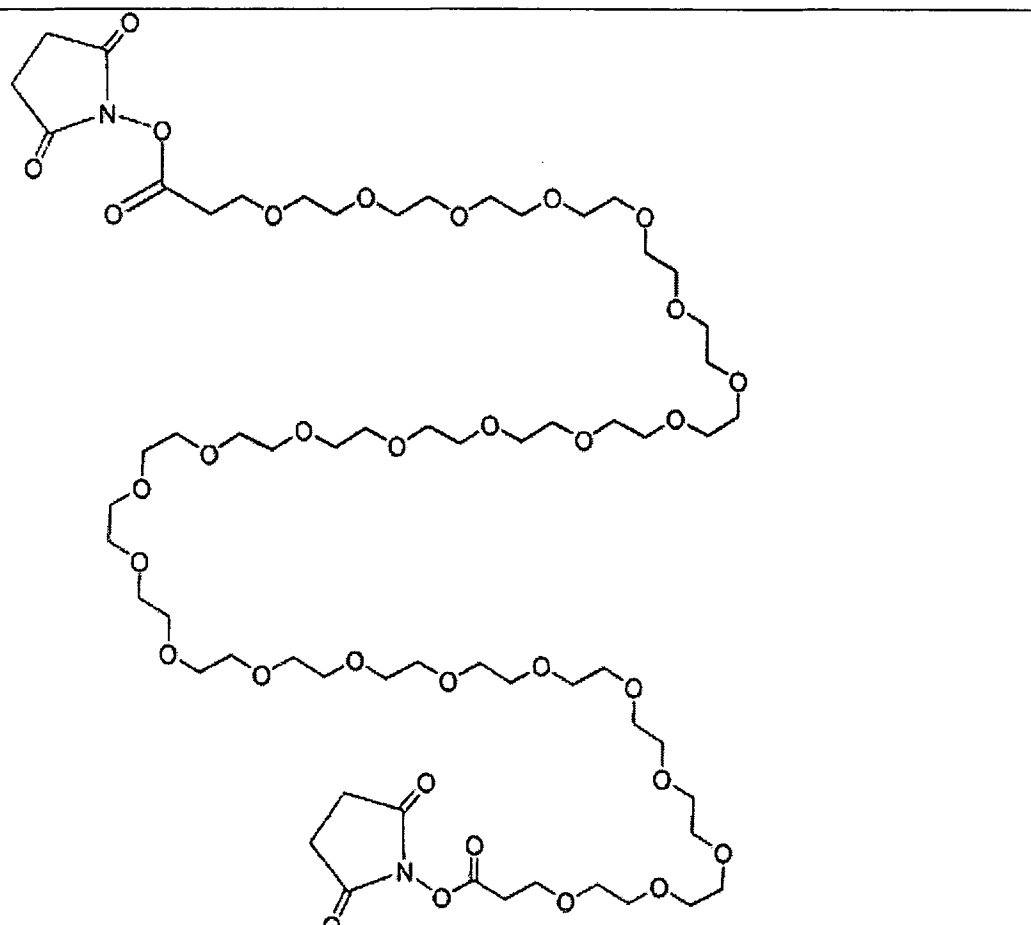
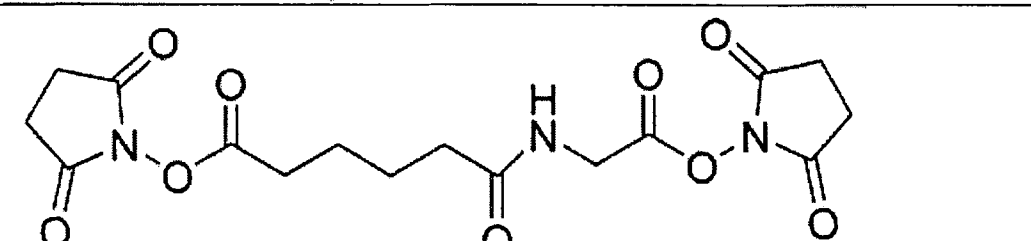
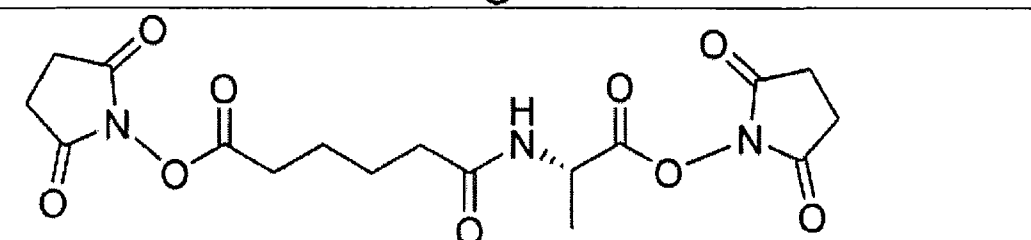
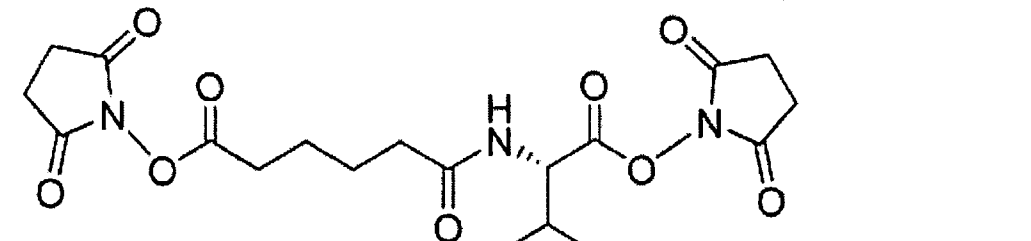
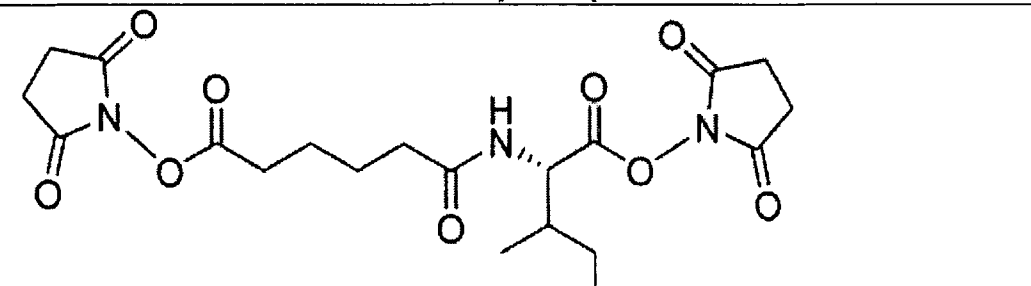
|   |  |                           |
|---|--|---------------------------|
| 3 |    | $\gamma$ E-C8- $\gamma$ E |
| 4 |   | 點擊-1                      |
| 5 |  | 點擊-2                      |
| 6 |  | 點擊-3                      |
| 7 |  | 點擊-4                      |

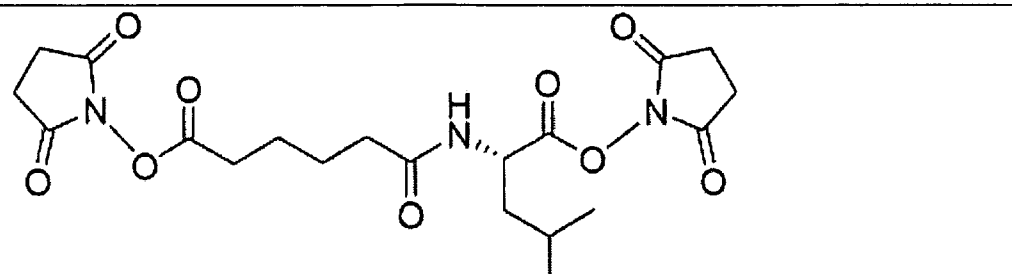
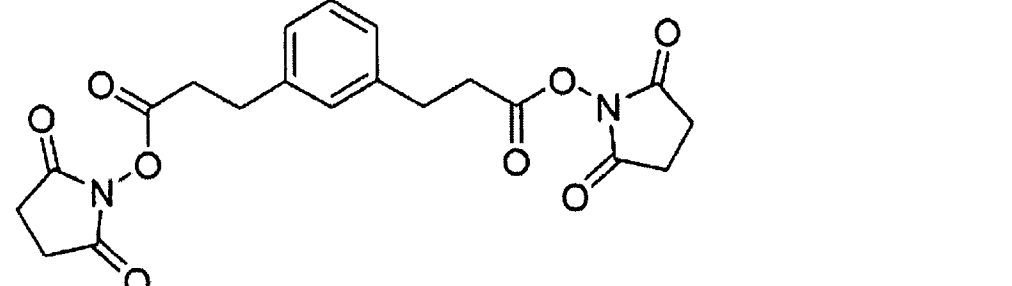
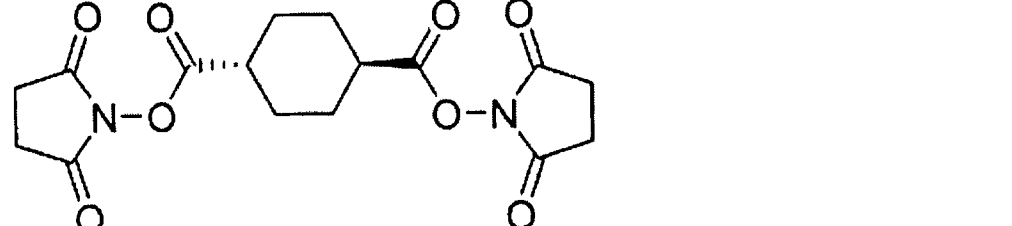
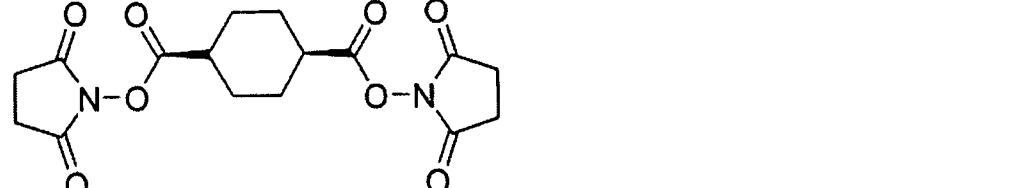
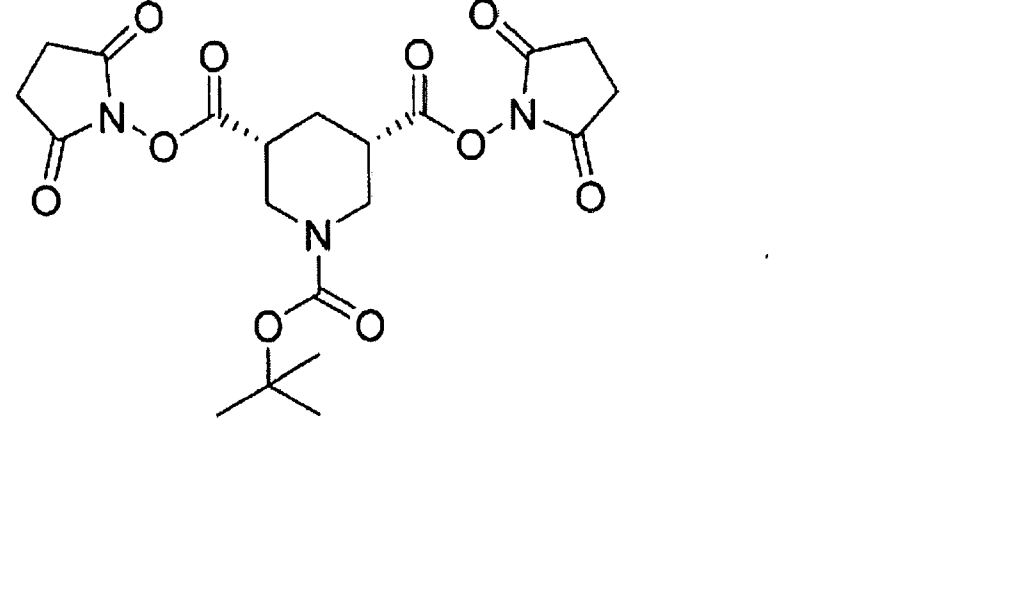
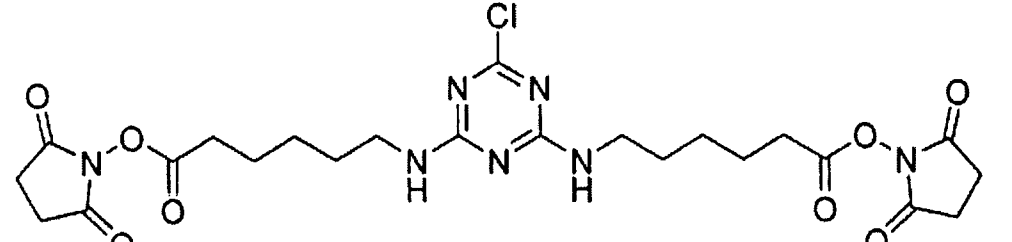
|    |   |      |
|----|---|------|
| 8  |    | 點擊-5 |
| 9  |    | 點擊-6 |
| 10 |    | C2   |
| 11 |   | C4   |
| 12 |  | C6   |
| 13 |  | C8   |

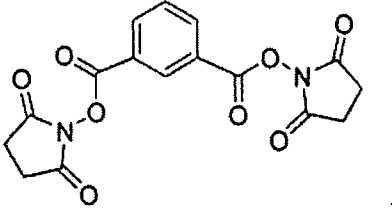
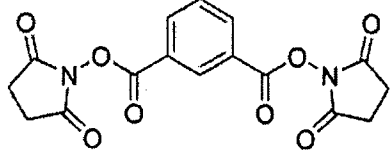
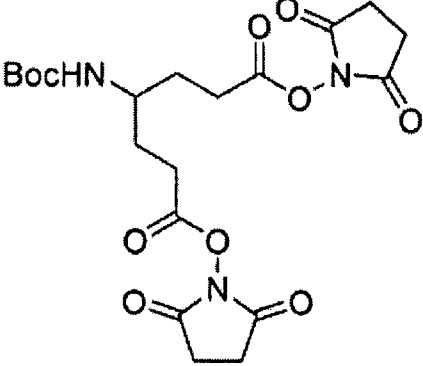
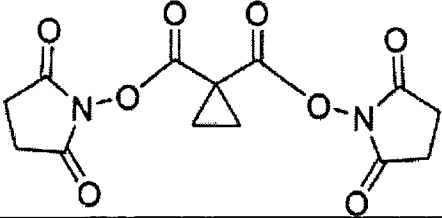
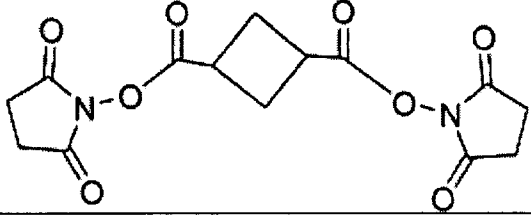
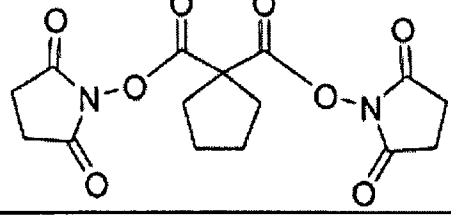
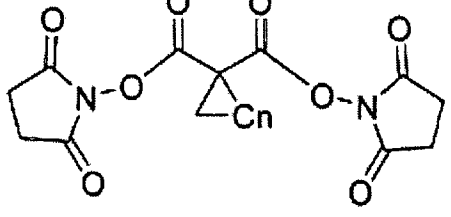
|    |  |      |
|----|--|------|
| 14 |     | C16  |
| 15 |    | PEG2 |
| 16 |  | PEG3 |
| 17 |  | PEG4 |

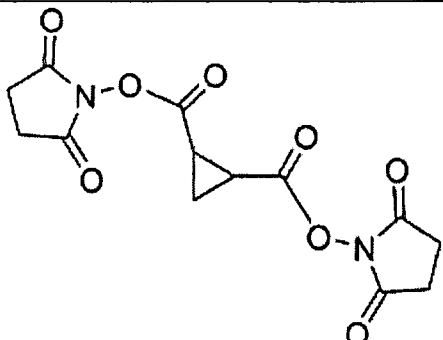
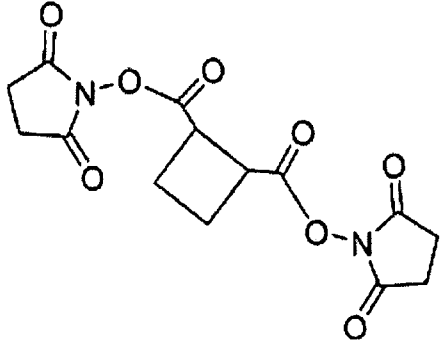
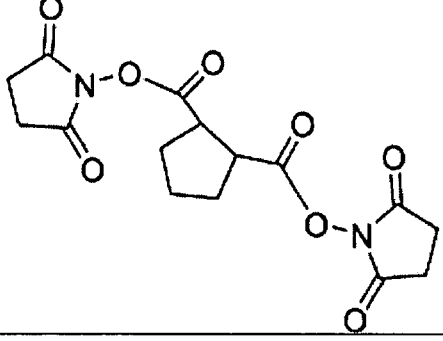
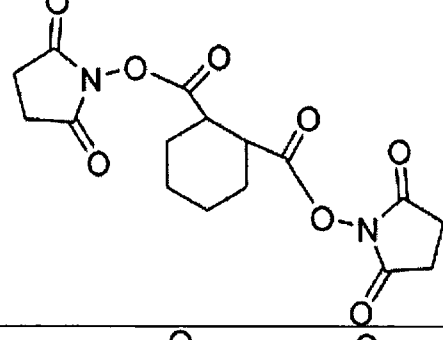
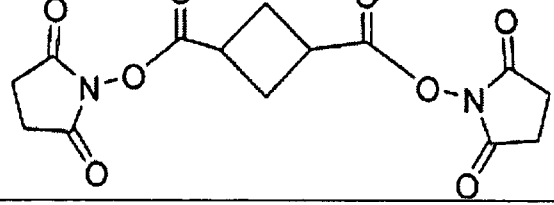
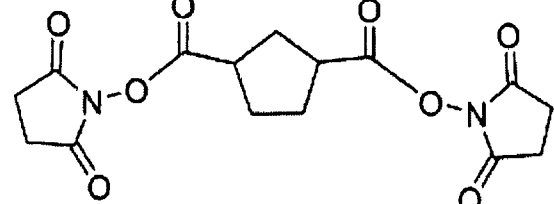
|           |  |             |
|-----------|--|-------------|
| <p>18</p> |   | <p>PEG5</p> |
| <p>19</p> |  | <p>PEG6</p> |

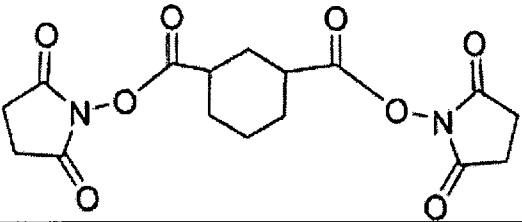
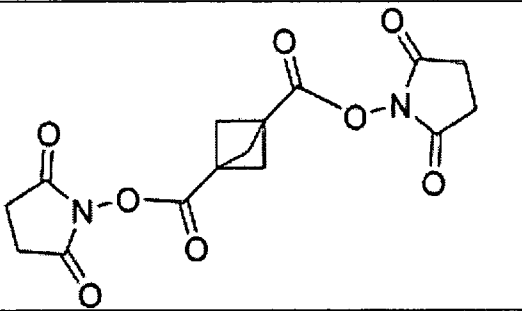
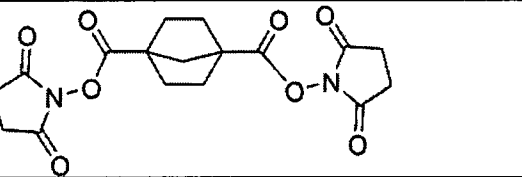
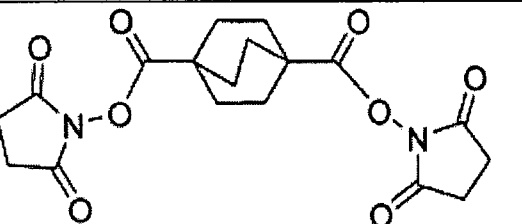
|    |   |       |
|----|---|-------|
| 20 |    | PEG7  |
| 21 |   | PEG9  |
| 22 |  | PEG13 |

|           |  |                |
|-----------|--|----------------|
| <p>23</p> |   | <p>PEG25</p>   |
| <p>24</p> |  | <p>C6-甘胺酸</p>  |
| <p>25</p> |  | <p>C6-丙胺酸</p>  |
| <p>26</p> |  | <p>C6-異白胺酸</p> |
| <p>27</p> |  | <p>C6-白胺酸</p>  |

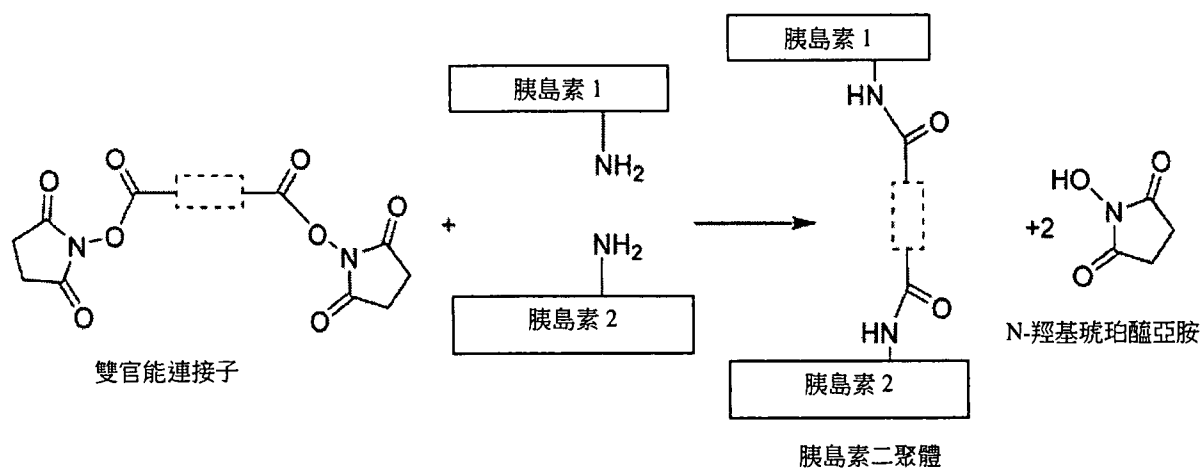
|    |  |   |
|----|--|---|
| 28 |    | C6-纈胺酸  |
| 29 |    | 二丙基苯酚   |
| 30 |    | 反式環己烷1,4-二酸   |
| 31 |   | 順式環己烷1,4-二酸   |
| 32 |  | (3R,5S)- 哌 啶 - 1,3,5- 三 羧 酸 1- (第 三 丁 酯) 3,5- 雙 (2,5- 二 側 氧 基 吡 咯 啶 -1- 酯 ) (Tert-butyl-piperidine-tricarb) |
| 33 |  | C6N- 氯 -1,3,5- 三 嗪 -NC6   |

|    |  |            |
|----|--|------------|
| 34 |                     | 對苯二甲酸酯     |
| 35 |                     | 間苯二甲酸酯     |
| 36 |                     | 庚二酸酯       |
| 37 |                    | 1,1-二醯基-C3 |
| 38 |                   | 1,1-二醯基-C4 |
| 39 |                   | 1,1-二醯基-C5 |
| 40 |  <p>n=1、2、3或4</p> | 1,1-二醯基-C6 |

|    |   |            |
|----|---|------------|
| 41 |    | 1,2-二醯基-C3 |
| 42 |    | 1,2-二醯基-C4 |
| 43 |   | 1,2-二醯基-C5 |
| 44 |  | 1,2-二醯基-C6 |
| 45 |  | 1,3-二醯基-C4 |
| 46 |  | 1,3-二醯基-C5 |

|    |  |                    |
|----|--|--------------------|
| 47 |   | 1,3-二醯基-C6         |
| 48 |   | 1,4-二醯基-環<br>丁基-C1 |
| 49 |   | 1,4-環己基-C1         |
| 50 |  | 1,4-環己基-C2         |

可如下示意性顯示雙官能連接子結合至在兩種胰島素或胰島素類似物分子之B鏈多肽之位置B29或B28處之離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基以形成由連接部分連接之胰島素二聚體：



其中該等胰島素1及胰島素2分子可相同或不同及該雙官能連接子與結合後之所得及連接部分可具有本文揭示之任何連接子及所得連接部分之結構。

### 胰島素多肽之修飾

在一些實施例中，該胰島素受體部分促效劑之該等A鏈多肽或B鏈多肽中之至少一者係經修飾以包含醯基。該醯基可直接共價連接至該胰島素多肽之胺基酸，或經由間隔子間接連接至該胰島素多肽之胺基酸，其中該間隔子位於該胰島素多肽之胺基酸與醯基之間。該胰島素多肽可在與其中親水性部分連接之相同胺基酸位置處或在不同胺基酸位置處經醯化。例如，醯化可發生於任何位置，包括A-或B鏈多肽之任何胺基酸及連接部分內之位置，限制條件為醯化後仍保留未經醯化之胰島素多肽所顯示之活性。非限制性實例包括在A鏈之位置A1及B鏈之位置B1處之醯化。

在本發明之一個特定態樣中，該第一及/或第二胰島素多肽(或其衍生物或結合物)係藉由胰島素多肽之胺基酸之側鏈的胺、羥基或硫醇之直接醯化修飾以包含醯基。在一些實施例中，該第一及/或第二胰島素多肽係透過胺基酸之側鏈胺、羥基或硫醇直接醯化。因此，可提供A鏈多肽或B鏈多肽序列中之一或多個胺基酸取代已經修飾之胰島素多肽，包括(例如)在位置A1、A14、A15、B1、B10或B22處或在連接部分之任何位置處經包含側鏈胺、羥基或硫醇之胺基酸之取代。

在一些實施例中，在該第一及/或第二胰島素多肽與該醯基之間之間隔子係包含側鏈胺、羥基或硫醇之胺基酸(或包含含有側鏈胺、羥基或硫醇之胺基酸之二肽或三肽)。在一些實施例中，該間隔子包含親水性雙官能間隔子。在一特定實施例中，該間隔子包含胺基聚(烷氧基)羧酸。因此，該間隔子可包含(例如) $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ ，其中m係1至6之任何整數及n係2至12之任何整數，諸如(例如)8-胺基-3,6-二氧雜辛酸，其可購買自Peptides International, Inc. (Louisville, KY)。在一個實施例中，該親水性雙官能間隔子包含兩個或更多個反應性基團，例如，胺、羥基、

硫醇及羧基或其任何組合。在某些實施例中，該親水性雙官能間隔子包含羥基及羧酸。在其他實施例中，該親水性雙官能間隔子包含胺基及羧酸。在其他實施例中，該親水性雙官能間隔子包含硫醇基及羧酸。

在一些實施例中，在該第一及/或第二胰島素多肽與該醯基之間之間隔子係疏水性雙官能間隔子。此項技術中已知疏水性雙官能間隔子。例如，參見Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)，其以全文引用之方式併入本文中。在某些實施例中，該疏水性雙官能間隔子包含兩個或更多個反應性基團，例如，胺、羥基、硫醇及羧基或其任何組合。在某些實施例中，該疏水性雙官能間隔子包含羥基及羧酸。在其他實施例中，該疏水性雙官能間隔子包含胺基及羧酸。在其他實施例中，該疏水性雙官能間隔子包含硫醇基及羧酸。包含羧酸及羥基或硫醇基之合適之疏水性雙官能間隔子係此項技術中已知且包括(例如) 8-羥基辛酸及8-巯基辛酸。

根據某些實施例，該雙官能間隔子可係合成或天然生成之胺基酸，其包含3至10個原子長度之胺基酸主鏈(例如，6-胺基己酸、5-胺基戊酸、7-胺基庚酸及8-胺基辛酸)。或者，該間隔子可係具有3至10個原子(例如，6至10個原子)長度之肽主鏈之二肽或三肽間隔子。二肽或三肽間隔子之與胰島素多肽連接之各胺基酸可獨立地選自由以下組成之群：天然生成及/或非天然生成之胺基酸，包括(例如)天然生成之胺基酸(Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr)之任何D或L異構物或選自由以下組成之群之非天然生成之胺基酸之任何D或L異構物： $\beta$ -丙胺酸( $\beta$ -Ala)、N- $\alpha$ -甲基-丙胺酸(Me-Ala)、胺基丁酸(Abu)、 $\alpha$ -胺基丁酸( $\gamma$ -Abu)、胺基己酸( $\epsilon$ -Ahx)、胺基異丁酸(Aib)、胺基甲基吡咯羧酸、胺基哌啶羧酸、胺基絲胺酸(Ams)、胺基四氫哌喃-4-羧酸、精

胺酸N-甲氧基-N-甲基醯胺、 $\beta$ -天冬胺酸( $\beta$ -Asp)、氮坦羧酸、3-(2-苯并噻唑基)丙胺酸、 $\alpha$ -第三丁基甘胺酸、2-胺基-5-脲基-正戊酸(瓜胺酸, Cit)、 $\beta$ -環己基丙胺酸(Cha)、乙醯胺基甲基-半胱胺酸、二胺基丁酸(Dab)、二胺基丙酸(Dpr)、二羥基苯丙胺酸(DOPA)、二甲基噻唑啉(DMTA)、 $\gamma$ -麩胺酸( $\gamma$ -Glu)、同型絲胺酸(Hse)、羥基脯胺酸(Hyp)、異白胺酸N-甲氧基-N-甲基醯胺、甲基-異白胺酸(MeIle)、異哌啶甲酸(Isn)、甲基-白胺酸(MeLeu)、甲基-離胺酸、二甲基-離胺酸、三甲基-離胺酸、甲醇基脯胺酸、甲硫胺酸-亞砷(Met(O))、甲硫胺酸-砷(Met(O<sub>2</sub>))、正白胺酸(Nle)、甲基-正白胺酸(Me-Nle)、正纈胺酸(Nva)、鳥胺酸(Orn)、對胺基苯甲酸(PABA)、青黴胺(Pen)、甲基苯丙胺酸(MePhe)、4-氯苯丙胺酸(Phe(4-Cl))、4-氟苯丙胺酸(Phe(4-F))、4-硝基苯丙胺酸(Phe(4-NO<sub>2</sub>))、4-氰基苯丙胺酸((Phe(4-CN))、苯基甘胺酸(Phg)、哌啶基丙胺酸、哌啶基甘胺酸、3,4-去氫脯胺酸、吡咯啶基丙胺酸、肌胺酸(Sar)、硒基半胱胺酸(Sec)、U-苄基-磷絲胺酸、4-胺基-3-羥基-6-甲基庚酸(Sta)、4-胺基-5-環己基-3-羥基戊酸(ACHPA)、4-胺基-3-羥基-5-苯基戊酸(AHPPA)、1,2,3,4,-四氫-異喹啉-3-羧酸(Tic)、四氫哌喃甘胺酸、噻吩基丙胺酸(Thi)、U-苄基-磷酪胺酸、O-磷酪胺酸、甲氧基酪胺酸、乙氧基酪胺酸、O-(雙-二甲基胺基-磷醯基)-酪胺酸、酪胺酸硫酸四丁基銨、甲基-纈胺酸(MeVal)、1-胺基-1-環己烷羧酸(Acx)、胺基戊酸、 $\beta$ -環丙基-丙胺酸(Cpa)、炔丙基甘胺酸(Prg)、烯丙基甘胺酸(Alg)、2-胺基-2-環己基-丙酸(2-Cha)、第三丁基甘胺酸(Tbg)、乙烯基甘胺酸(Vg)、1-胺基-1-環丙烷羧酸(Acp)、1-胺基-1-環戊烷羧酸(Acpe)、烷基化3-巰基丙酸、1-胺基-1-環丁烷羧酸(Acb)。在一些實施例中，該二肽間隔子係選自由以下組成之群：Ala-Ala、 $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala、Leu-Leu、Pro-Pro、 $\gamma$ -胺基丁酸- $\gamma$ -胺基丁酸及 $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu。

該第一及/或第二胰島素多肽可藉由長鏈烷烴之醯化修飾以包含醯基。在特定態樣中，該長鏈烷烴包含胺、羥基或硫醇基(例如，十八胺、十四醇及十六硫醇)，其與該胰島素多肽之羧基或其經活化之形式反應。該胰島素多肽之羧基或其經活化之形式可係該胰島素多肽之胺基酸(例如，麩胺酸、天冬胺酸)之側鏈之一部分或可係肽主鏈之一部分。

在某些實施例中，該第一及/或第二胰島素多肽係藉由與該胰島素多肽連接之間隔子來醯化長鏈烷烴而經修飾以包含醯基。在特定態樣中，該長鏈烷烴包含胺、羥基或硫醇基，其與該間隔子之羧基或其經活化之形式反應。包含羧基或其經活化之形式之合適之間隔子係描述於本文中且包括(例如)雙官能間隔子(例如，胺基酸、二肽、三肽、親水性雙官能間隔子及疏水性雙官能間隔子)。如本文使用，術語「羧基之經活化之形式」係指具有通式 $R(C=O)X$ 之羧基，其中 $X$ 係離去基團及 $R$ 係胰島素多肽或間隔子。例如，羧基之經活化之形式可包括(但不限於)醯基氯化物、酞及酯。在一些實施例中，該經活化之羧基係具有 $N$ -羥基琥珀醯亞胺(NHS)離去基團之酯。

關於本發明之其中長鏈烷烴係經肽、胰島素多肽或間隔子醯化之此等態樣，該長鏈烷烴可具有任何尺寸且可包含任何長度之碳鏈。該長鏈烷烴可係直鏈或分支鏈。在某些態樣中，該長鏈烷烴係 $C_4$ 至 $C_{30}$ 烷烴。例如，該長鏈烷烴可係以下中之任何一者： $C_4$ 烷烴、 $C_6$ 烷烴、 $C_8$ 烷烴、 $C_{10}$ 烷烴、 $C_{12}$ 烷烴、 $C_{14}$ 烷烴、 $C_{16}$ 烷烴、 $C_{18}$ 烷烴、 $C_{20}$ 烷烴、 $C_{22}$ 烷烴、 $C_{24}$ 烷烴、 $C_{26}$ 烷烴、 $C_{28}$ 烷烴或 $C_{30}$ 烷烴。在一些實施例中，該長鏈烷烴包含 $C_8$ 至 $C_{20}$ 烷烴，例如， $C_{14}$ 烷烴、 $C_{16}$ 烷烴或 $C_{18}$ 烷烴。

在一些實施例中，該第一及/或第二胰島素多肽之胺、羥基或硫醇基可經膽固醇酸醯化。在一特定實施例中，該肽係透過經烷基化之

去胺基Cys間隔子(即，烷基化之3-巯基丙酸間隔子)連接至膽固醇酸。此項技術中已知經由胺、羥基及硫醇之合適之肽醯化方法。例如，參見 Miller, *Biochem Biophys Res Commun* 218: 377-382 (1996)；Shimohigashi and Stammer, *Int J Pept Protein Res* 19: 54-62 (1982)；及 Previero等人，*Biochim Biophys Acta* 263: 7-13 (1972) (針對透過羥基醯化之方法)；及 San及 Silvius, *J Pept Res* 66: 169-180 (2005) (針對透過硫醇醯化之方法)；*Bioconjugate Chem.* 「Chemical Modifications of Proteins: History and Applications」，第1、2-12頁(1990)；Hashimoto 等人，*Pharmacuetical Res.* 「Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity」，第6卷，第2期，第171-176頁(1989)。

該第一及/或第二胰島素多肽之經醯化之肽之醯基可具有任何尺寸(例如，任何長度碳鏈)且可係直鏈或分支鏈。在本發明之一些特定實施例中，該醯基係C<sub>4</sub>至C<sub>30</sub>脂肪酸。例如，該醯基可係以下中之任何一者：C<sub>4</sub>脂肪酸、C<sub>6</sub>脂肪酸、C<sub>8</sub>脂肪酸、C<sub>10</sub>脂肪酸、C<sub>12</sub>脂肪酸、C<sub>14</sub>脂肪酸、C<sub>16</sub>脂肪酸、C<sub>18</sub>脂肪酸、C<sub>20</sub>脂肪酸、C<sub>22</sub>脂肪酸、C<sub>24</sub>脂肪酸、C<sub>26</sub>脂肪酸、C<sub>28</sub>脂肪酸或C<sub>30</sub>脂肪酸。在一些實施例中，該醯基係C<sub>8</sub>至C<sub>20</sub>脂肪酸，例如，C<sub>14</sub>脂肪酸或C<sub>16</sub>脂肪酸。在一些實施例中，該醯基係脛。

在替代實施例中，該醯基係膽汁酸(bile acid)。該膽汁酸可係任何適合膽汁酸，包括(但不限於)膽酸(cholic acid)、鵝去氧膽酸、去氧膽酸、石膽酸、牛膽酸、甘膽酸及膽固醇酸。

本文描述之經醯化之第一及/或第二胰島素多肽可經進一步修飾以包含親水性部分。在一些特定實施例中，該親水性部分可包含聚乙二醇(PEG)鏈。親水性部分之併入可透過任何合適之方式(諸如任何本文描述之方法)。在一些實施例中，該經醯化之單鏈類似物包含選自

由以下組成之群之胺基酸：Cys、Lys、Orn、同型Cys或Ac-Phe，且該胺基酸之側鏈係共價結合至親水性部分(例如，PEG)。在一個實施例中，該醯基係連接至位置A1、A14、A15、B1、B2、B10或B22(根據天然胰島素之A及B鏈之胺基酸編號)，視需要經由包含Cys、Lys、Orn、同型Cys或Ac-Phe之間隔子。

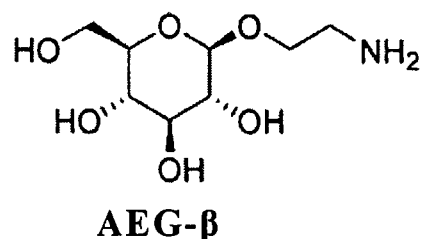
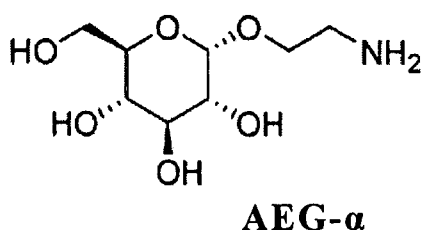
或者，該經醯化之第一及/或第二胰島素多肽包含間隔子，其中該間隔子係既經醯化亦經修飾以包含親水性部分。合適之間隔子之非限制性實例包括包含一或多個選自由Cys、Lys、Orn、同型Cys及Ac-Phe組成之群之胺基酸之間隔子。

在一些實施例中，該胰島素受體部分促效劑之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之至少一個N端胺基酸的胺基端係經修飾以包含取代基。該取代基可直接共價連接至該N端胺基酸之胺基或經由間隔子間接連接至胺基，其中該間隔子位於胰島素多肽之該N端胺基酸之胺基與取代基之間。該取代基可係如上文討論之醯基部分。該取代基可具有通式 $RC(O)-$ ，其中R可係 $R'CH_2$ 、 $R'NH$ 、 $R'O$ ，及 $R'$ 可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣，在特定態樣中， $RC(O)-$ 可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基團或PEG2基團(參見本文針對取代基之結構之實例)。胰島素之胺甲醯化已由Oimoni等人，Nephron 46: 63-66 (1987)揭示及在N端處包含胺甲醯基之胰島素二聚體已揭示於公開之PCT申請案號WO2014052451(例如，MIU-90)中。

在特定實施例中，至少一個N端胺基酸係經由N2氮結合至包含連接至具有通式 $RC(O)-$ 基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯之取代基，其中R可係 $R'CH_2$ 、 $R'NH$ 、 $R'O$ ，及 $R'$ 可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣，在特定態樣中， $RC(O)-$ 可係乙醯基、苯乙醯基、

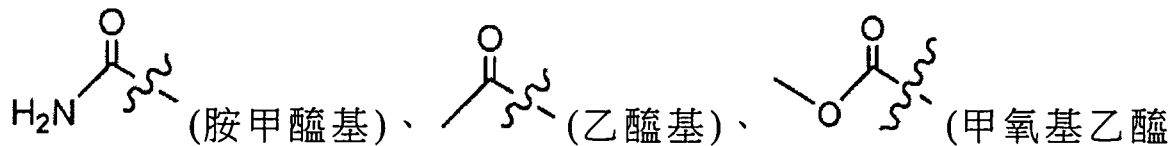
胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基團或PEG2基團。

在特定實施例中，共價連接至該等第一及第二胰島素多肽之一或多個胺基端之醣可係單醣，例如，參見二聚體51。在一些實施例中，該醣包含一或多個胺基。在某些實施例中，該醣及胺基由C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基(例如，C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基)分開。在一些實施例中，該醣係胺基乙基葡萄糖(AEG)。在某些實施例中，醣配體具有「D」組態。在其他實施例中，醣配體具有「L」組態。吾人於下文中顯示此等例示性醣之結構。熟習此項技術者將知曉其他例示性醣。

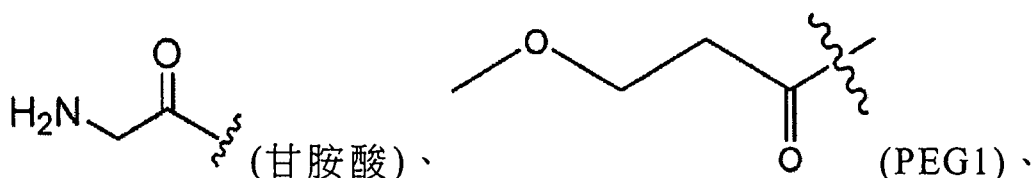


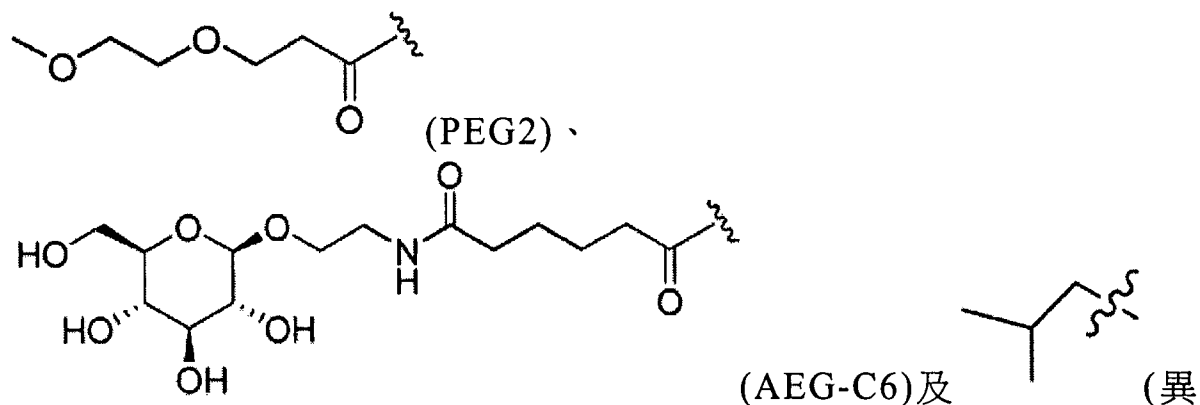
通常，該等醣可直接或經由連接子間接結合至該等第一及第二胰島素多肽中之一或多者之胺基端。在特定態樣中，該連接子係烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-45、0-20、0-10或0-5)。

結合至N-端胺基之例示性取代基可係

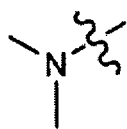


基)、





丁基)，其中波浪線指示在該取代基與N端胺基間之鍵。該取代基亦可係



(Me<sub>2</sub> ; N-二甲基)，其中波浪線指示在Me<sub>2</sub>與N端胺基酸之 $\alpha$ 碳間之鍵。

### 例示性胰島素二聚體

在特定實施例中，本發明提供胰島素二聚體，其中具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys係藉由選自由以下組成之群之雙官能連接子結合在一起：連接子1、連接子2、連接子3、連接子10、連接子11、連接子12、連接子13、連接子14、連接子15、連接子16、連接子17、連接子18、連接子19、連接子20、連接子21、連接子22、連接子23、連接子24、連接子25、連接子26、連接子27、連接子28、連接子29、連接子30、連接子31、連接子32、連接子33、連接子34、連接子35、連接子36、連接子37、連接子38、連接子39、連接子40、連接子41、連接子42、連接子43、連接子44、連接子45、連接子46、連接子47、連接子48、連接子49及連接子50，限制條件為當該雙官能連接子係連接子10、連接子11、連接子12、連接子13或連接子14時，該等第一或第二A鏈或B鏈多肽中之至少一者係以其N端胺基酸結合至如本文所揭示之取代基

或該等第一胰島素異二聚體分子之至少N端胺基酸係結合至如本文所揭示之取代基或該第一胰島素異二聚體及第二胰島素異二聚體兩者之該等N端胺基酸係結合至取代基。在特定實施例中，該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。

在特定實施例中，本發明提供胰島素二聚體，其中具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys係結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys係結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第二連接子，該第一B29或B28 Lys及該第二B29或B28 Lys經由該第一連接子及該第二連接子結合在一起。在特定實施例中，該等第一或第二A鏈或B鏈多肽中之至少一者係以其N端胺基酸結合至如本文所揭示之取代基或該第一胰島素異二聚體分子之至少該等N端胺基酸係結合至如本文描述之取代基或第一胰島素異二聚體及第二胰島素異二聚體兩者之該等N端胺基酸係結合至取代基。在特定實施例中，該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。

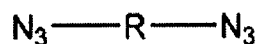
在特定實施例中，本發明提供胰島素二聚體，其中具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys係結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys係結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第二連接子，其中該等第一及第二連接子經由具有以下結構之橋接連接子結合在一起：



其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。在特定實施例中，該等第一或第二A鏈或B鏈多肽中之至少一者係以其N端胺基酸結合至如本文揭示之取代基或該第一胰島素異二聚體分子之至少該等N端胺基酸係結合至如本文揭示之取代基或該第一胰島素異二聚體及第二胰島素異二聚體兩者之該等N端胺基酸係結合至取代基。在特定實施例中，該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。

在特定實施例中，本發明提供胰島素二聚體，其中具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys係結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體

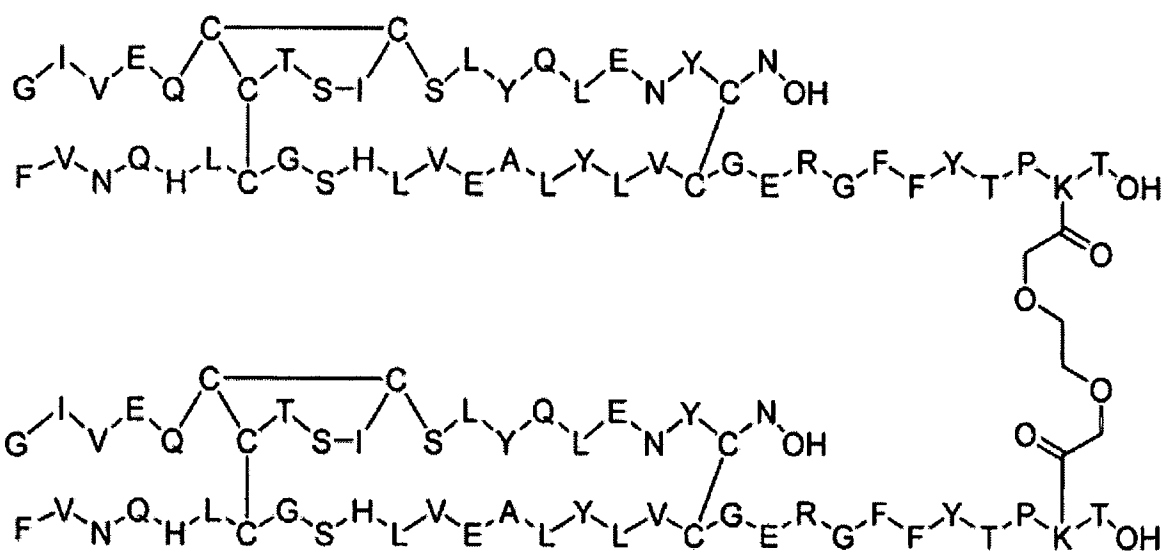
之第二B29或B28 Lys係結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第二連接子，其中該等第一及第二連接子係經由具有下列結構之橋接連接子結合在一起：



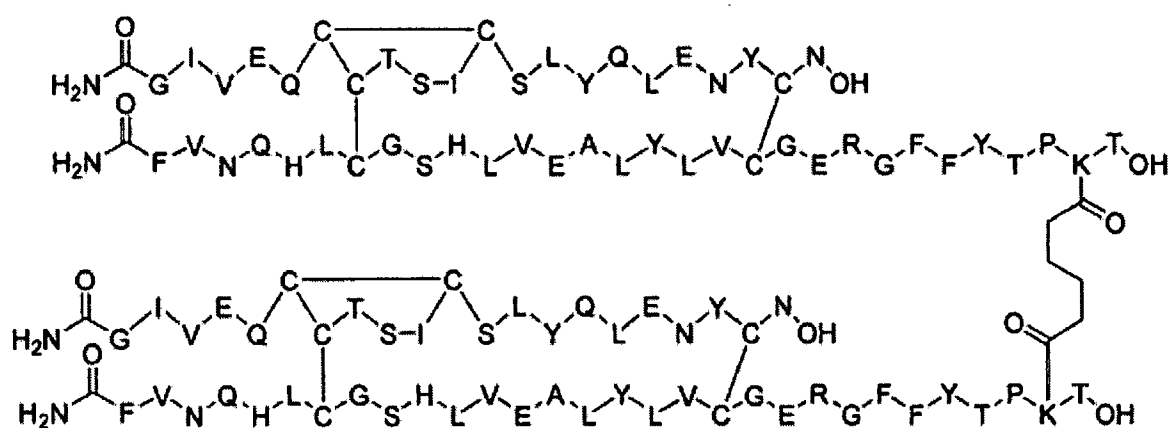
其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環。在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。在特定實施例中，該等第一或第二A鏈或B鏈多肽中之至少一者係以其N端胺基酸結合至如本文揭示之取代基或該第一胰島素異二聚體分子之至少該等N端胺基酸係結合至如本文揭示之取代基或該第一胰島素異二聚體及第二胰島素異二聚體兩者之該等N端胺基酸係結合至取代基。在特定實施例中，該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣，在特定態樣中，RC(O)-可係乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基或烷氧基羰基。在特定態樣中，該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。

在其他實施例中，該等第一及第二胰島素異二聚體可包含本文揭示之胰島素或胰島素類似物分子中之任何一者。

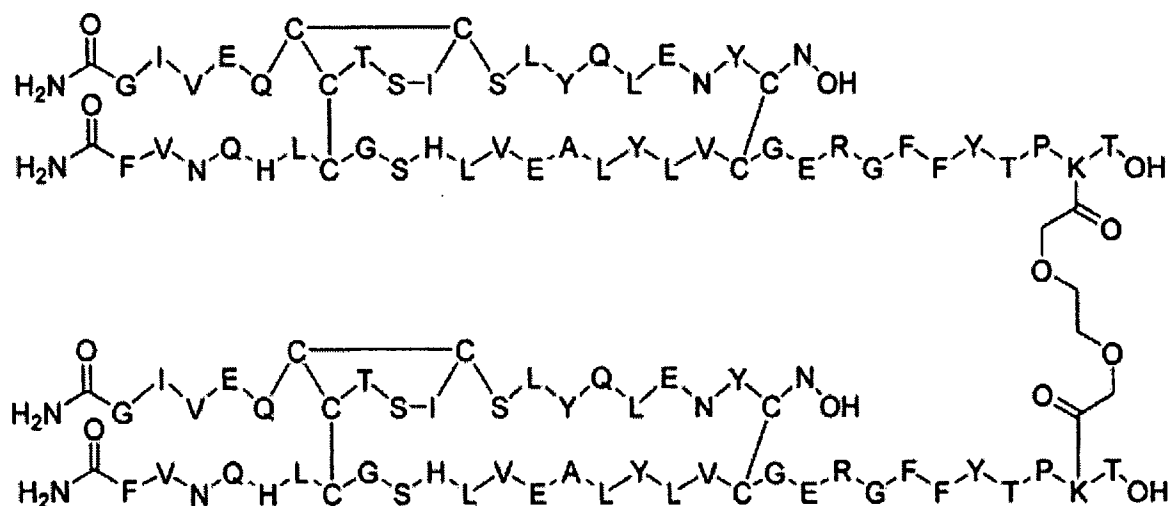
本發明亦提供選自以下之胰島素二聚體：



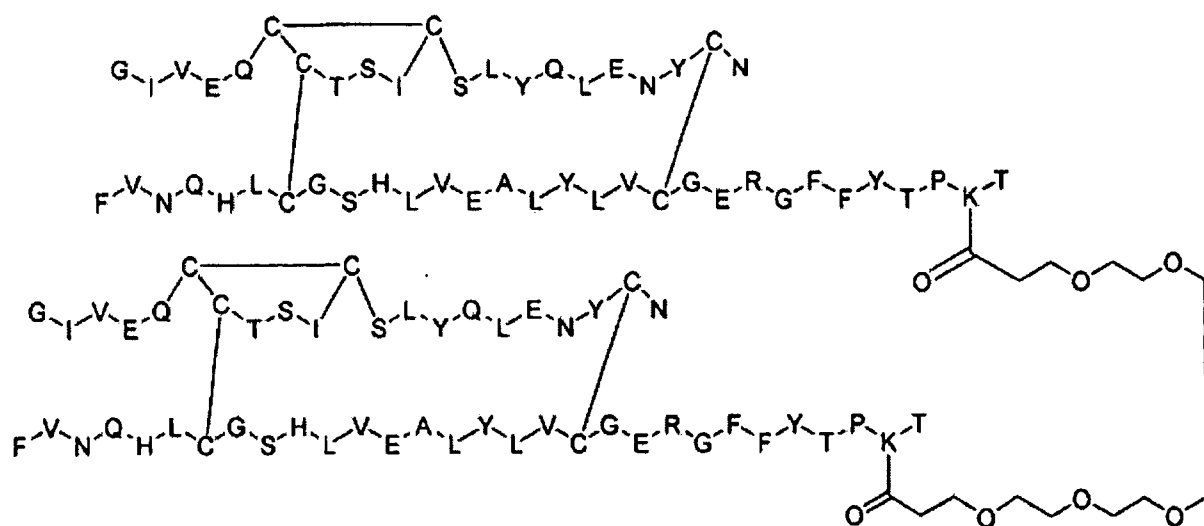
二聚體 1 ;



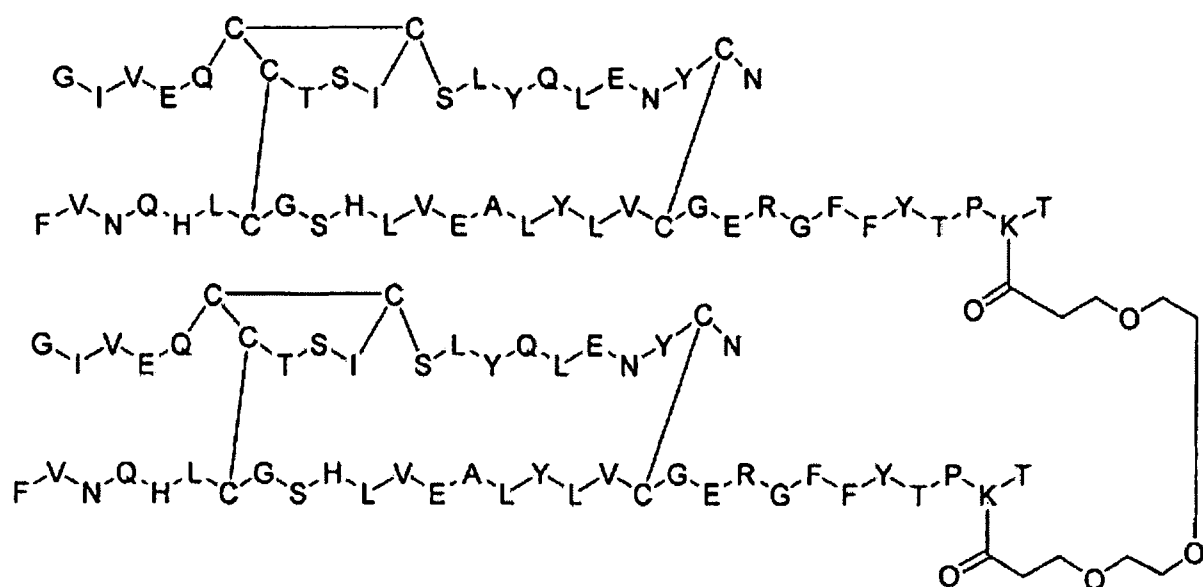
二聚體 2 ;



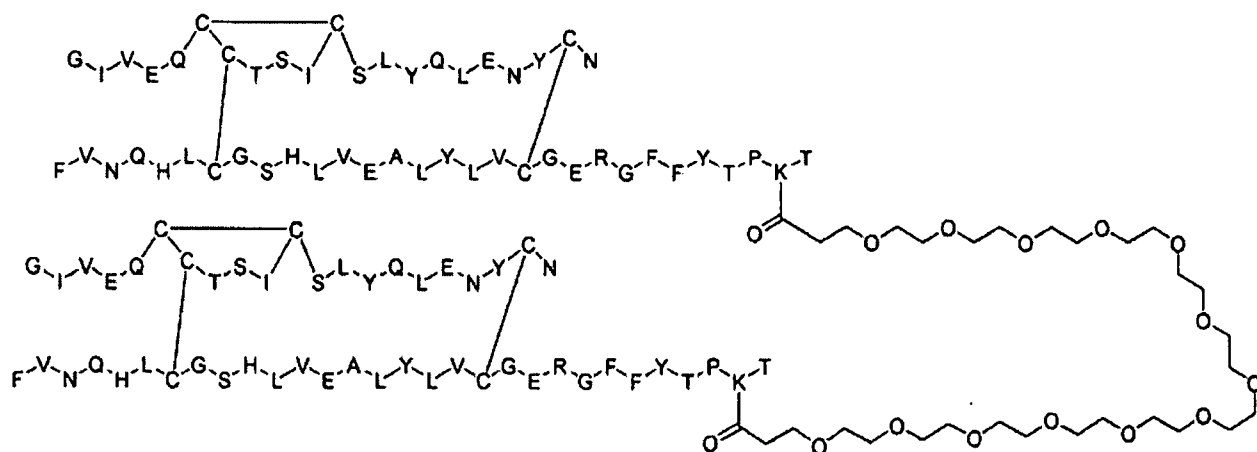
二聚體 3 ;



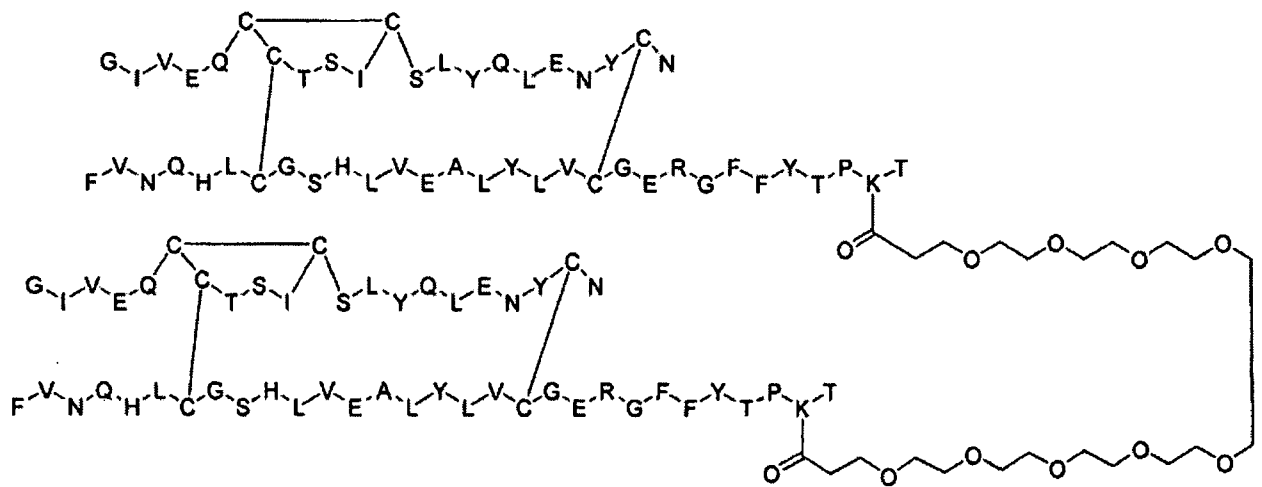
二聚體4；



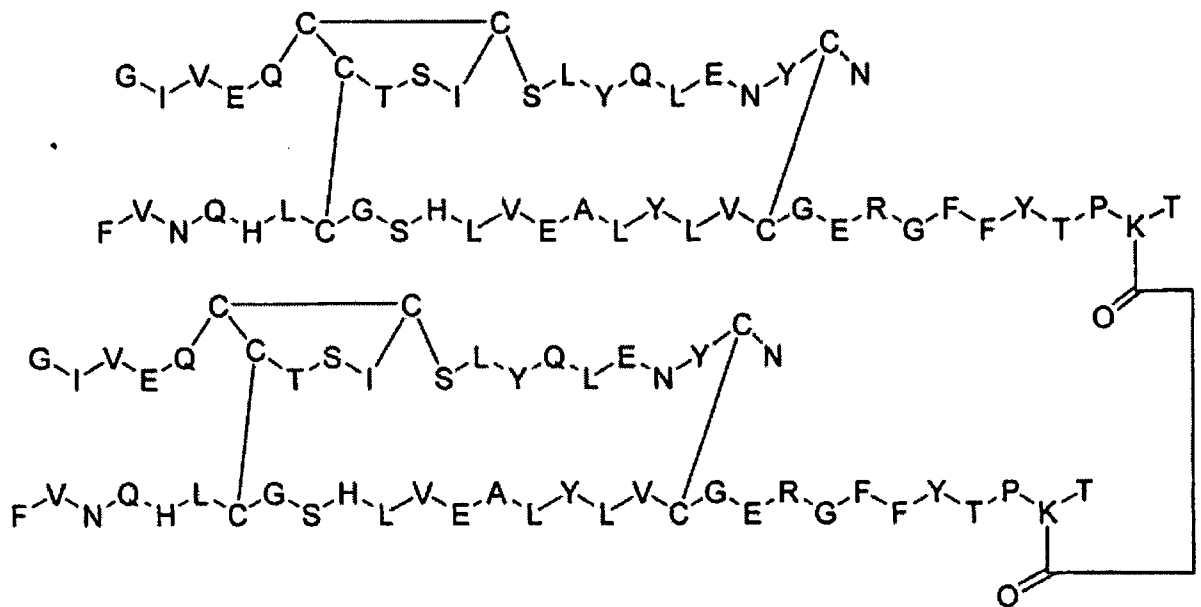
二聚體5；



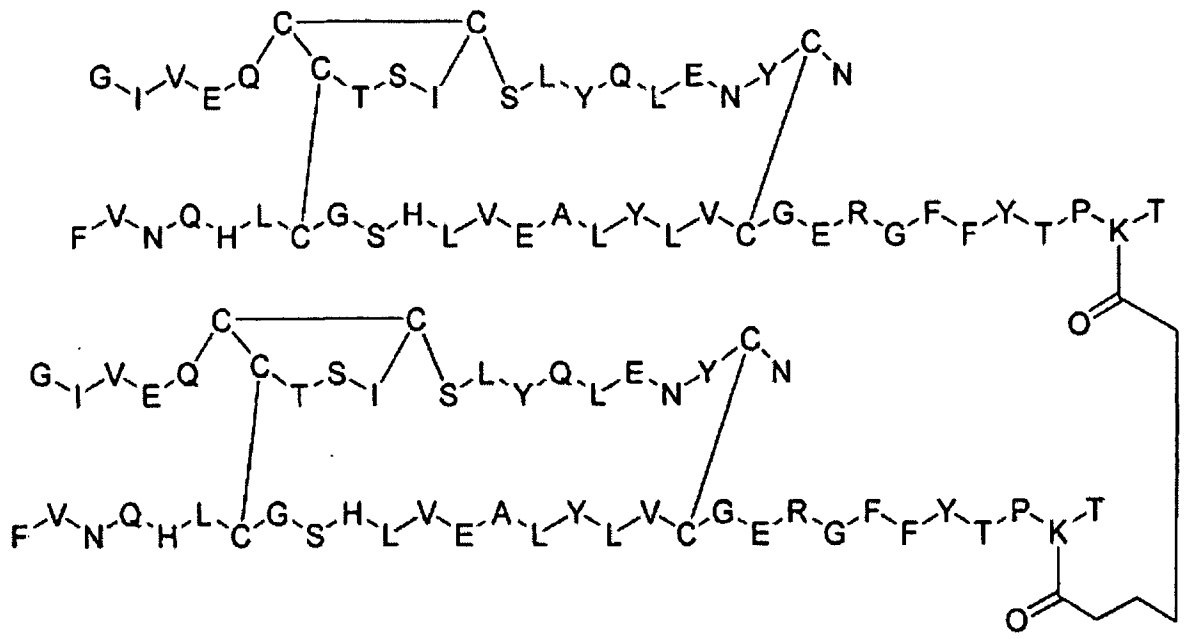
二聚體6；



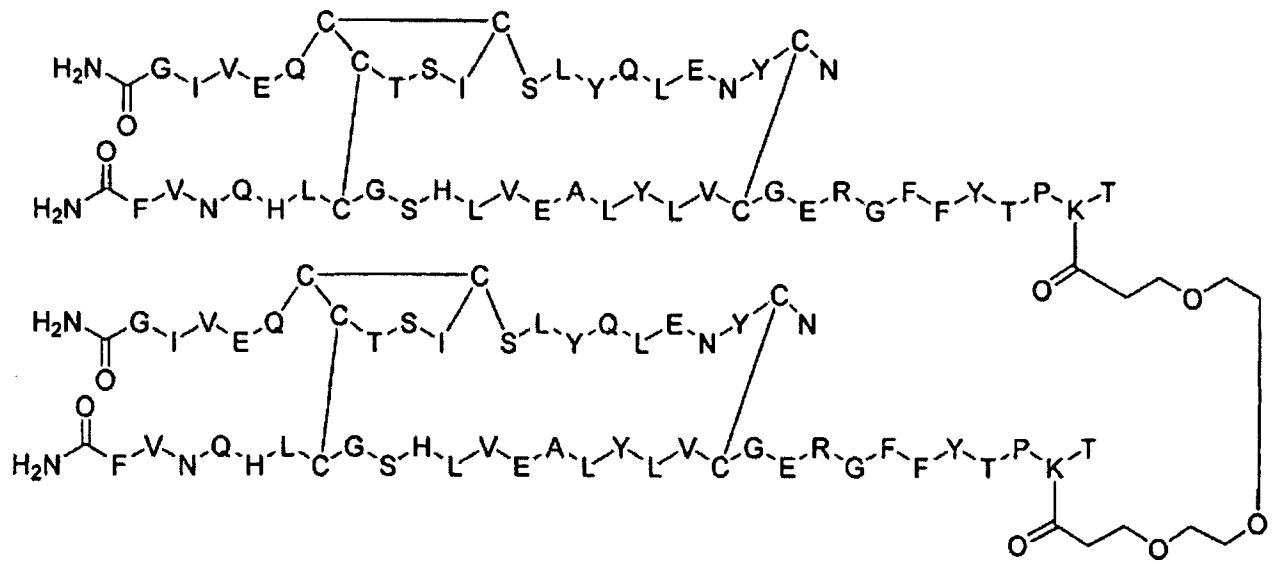
二聚體 7 ;



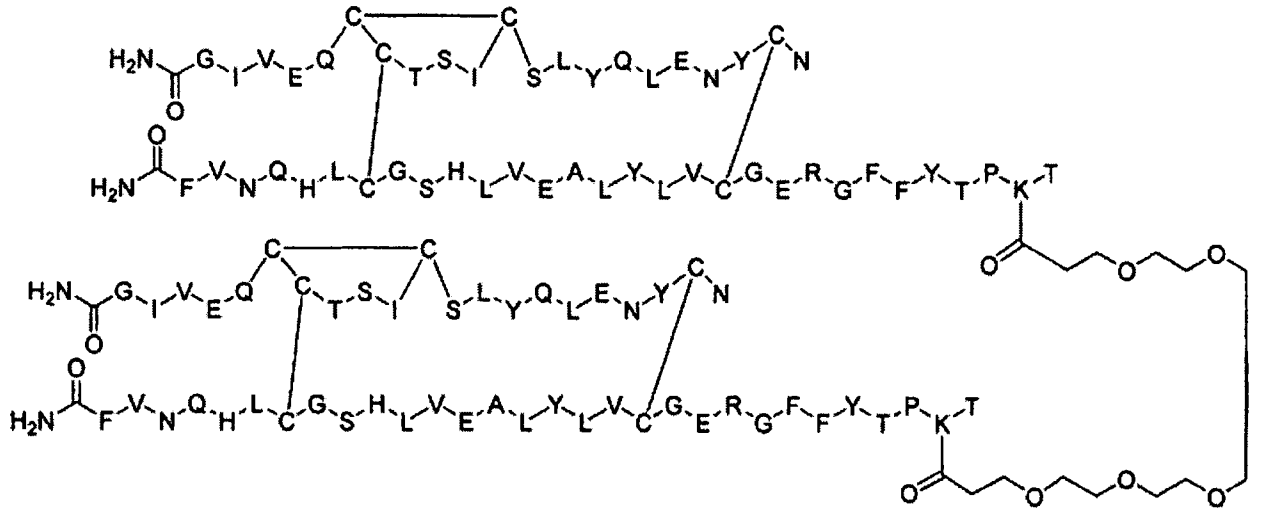
二聚體 8 ;



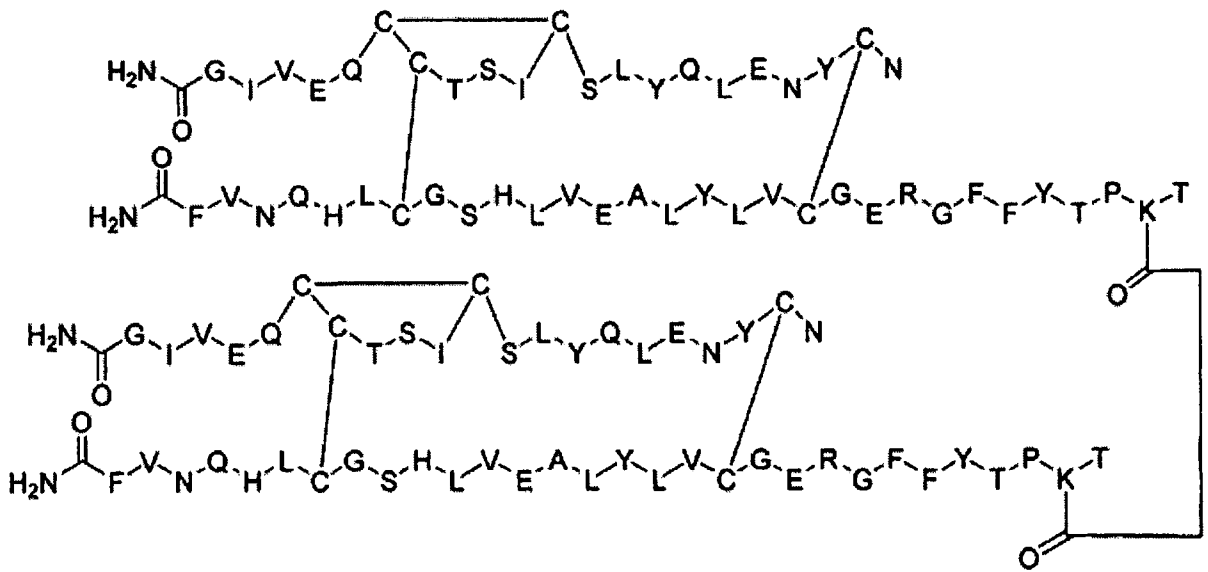
二聚體9；



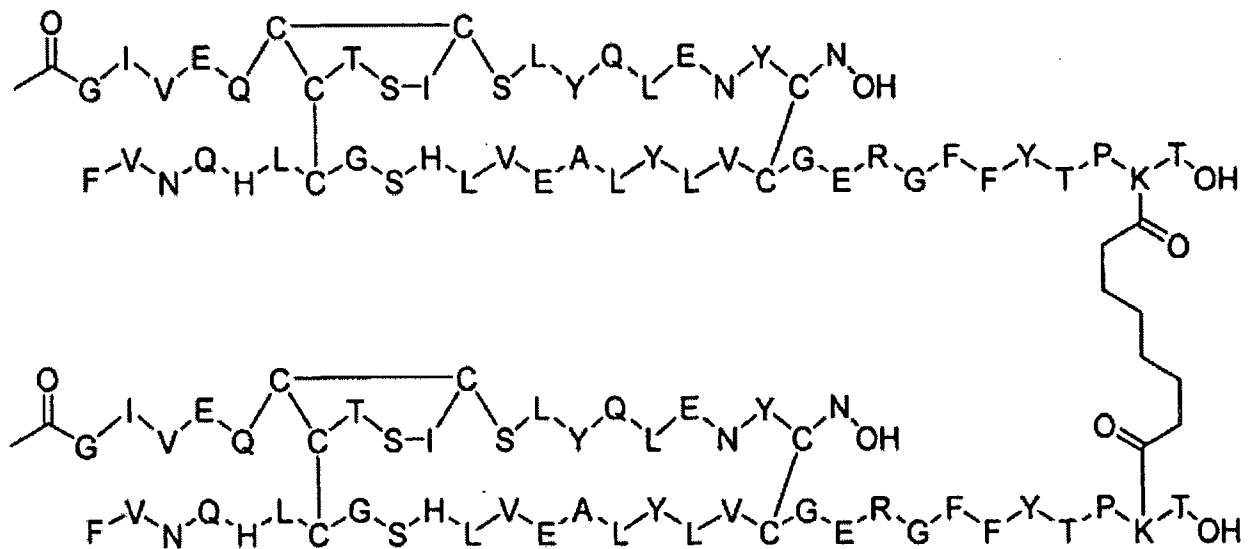
二聚體10；



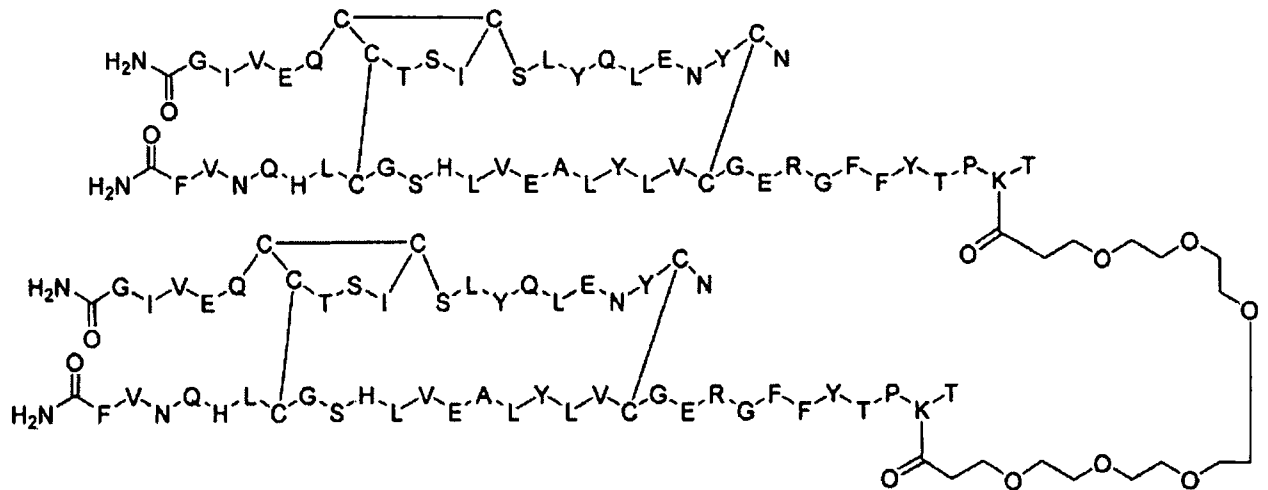
二聚體 11；



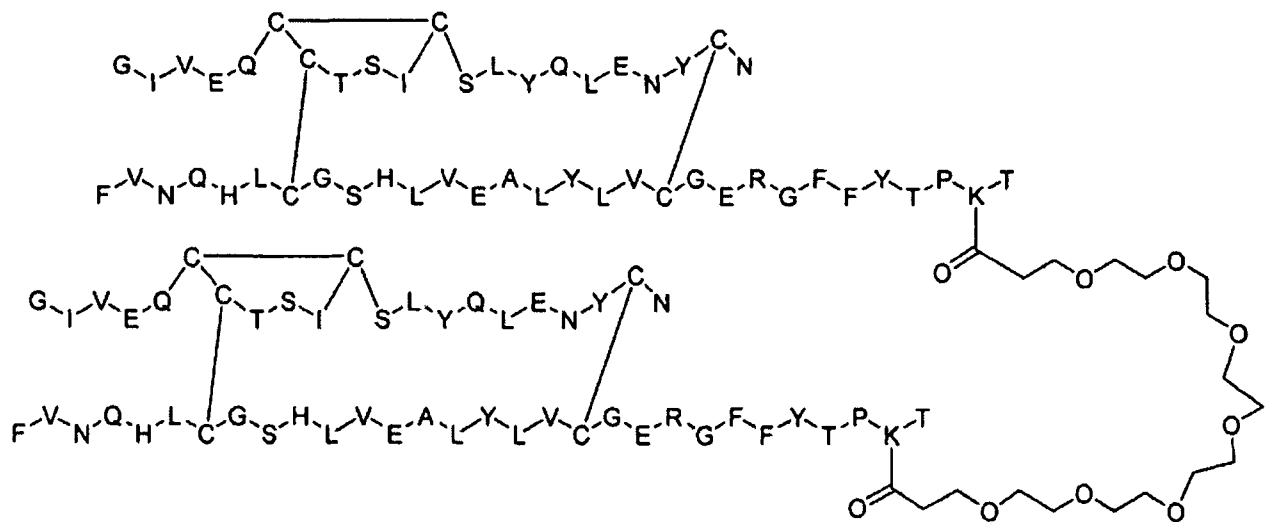
二聚體 12；



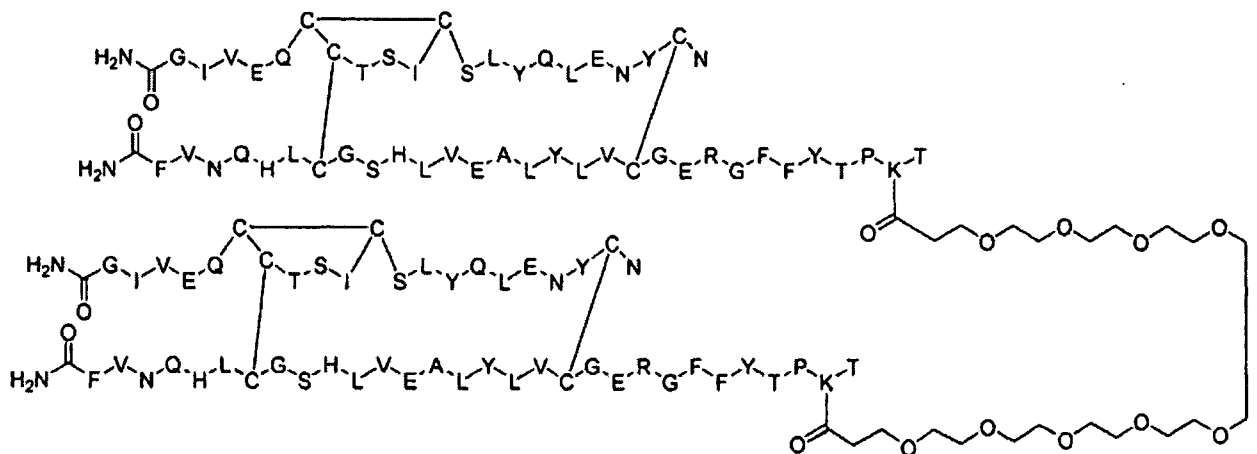
## 二聚體 13 ;



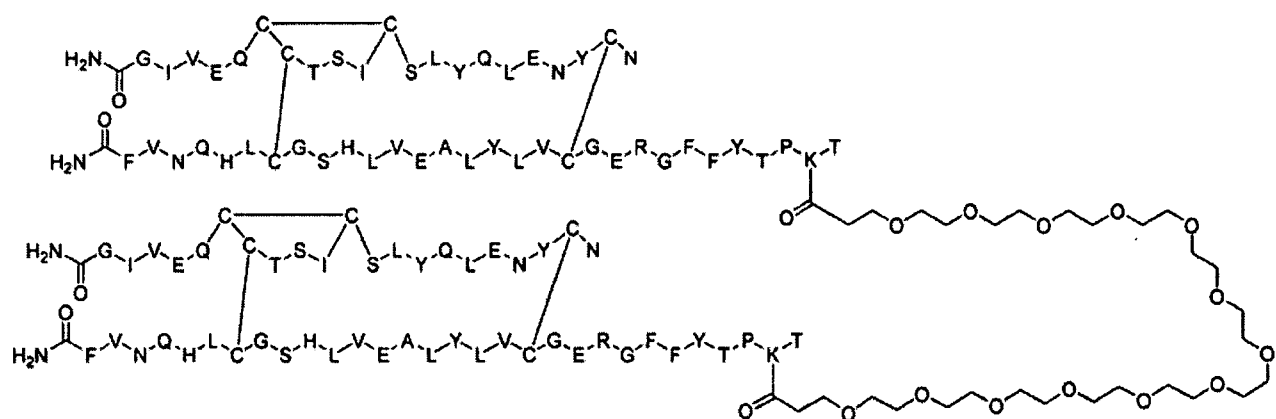
## 二聚體 14 ;



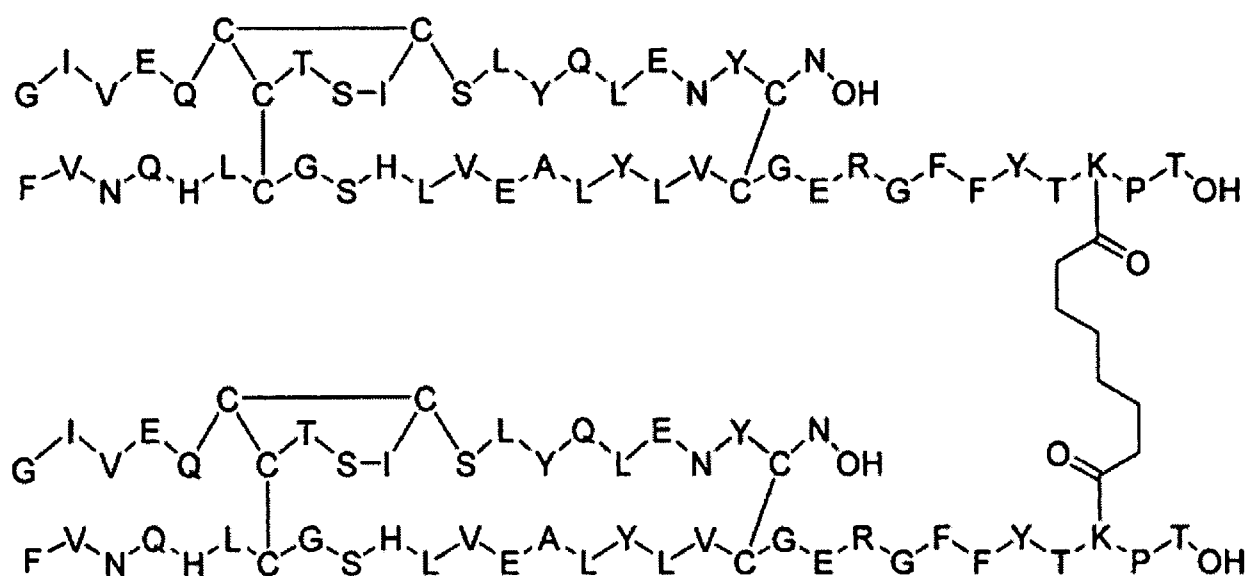
## 二聚體 15 ;



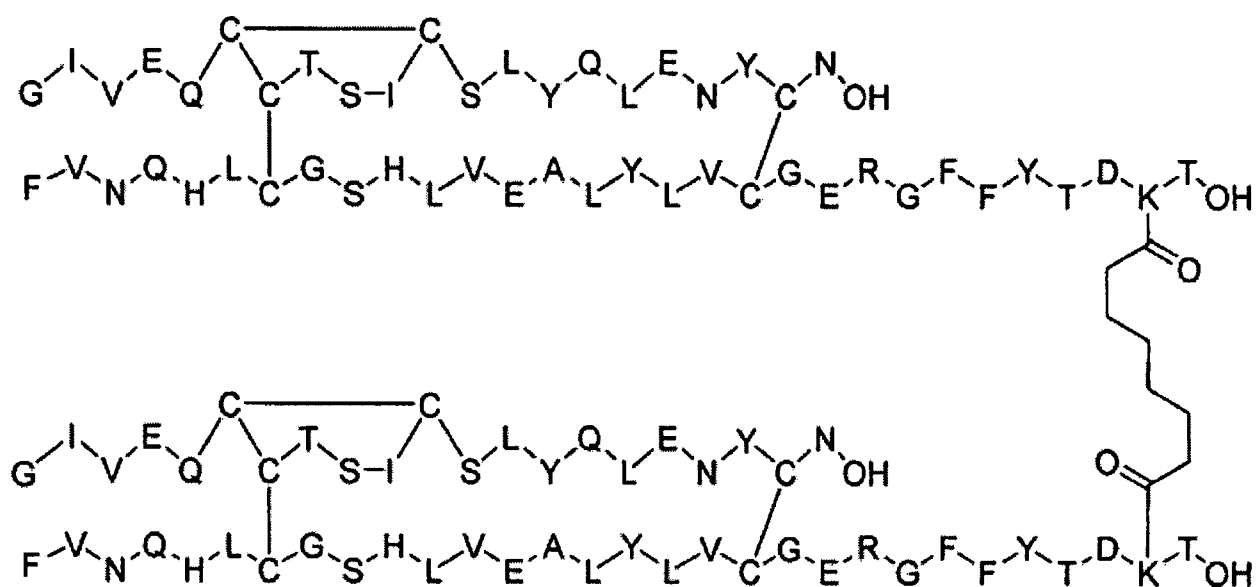
## 二聚體 16 ;



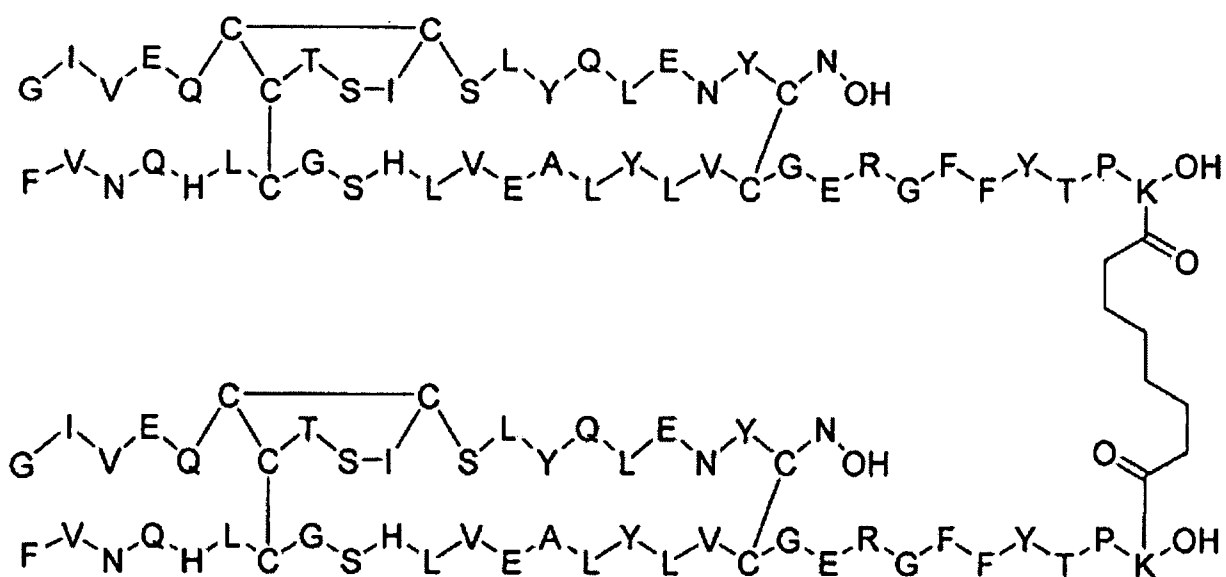
二聚體 17 ;



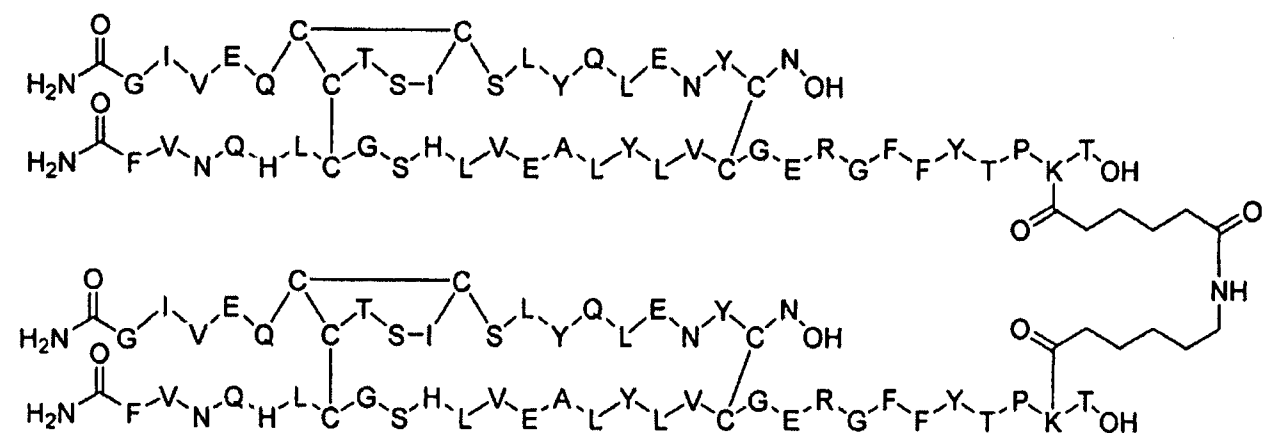
二聚體 18 ;



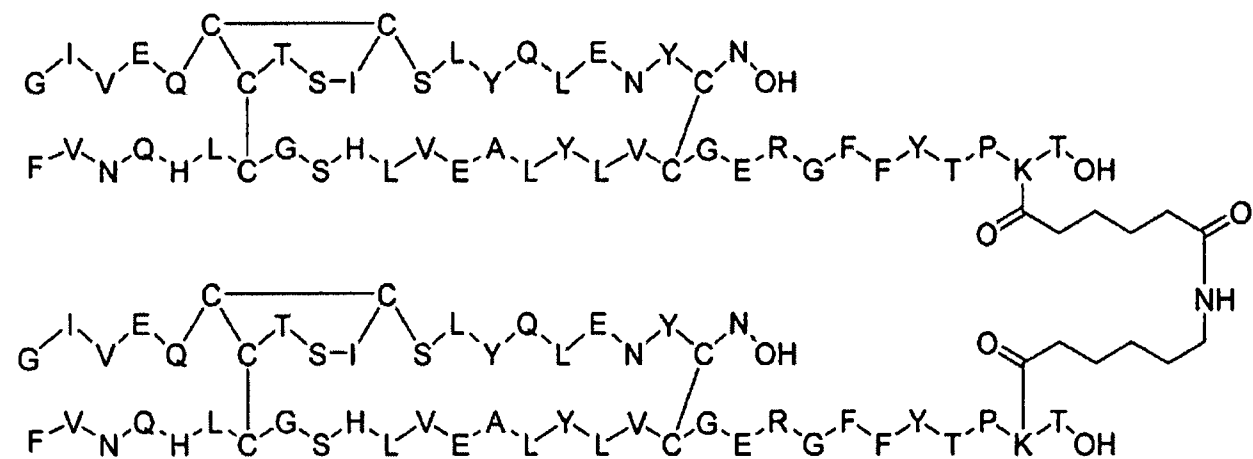
二聚體 19 ;



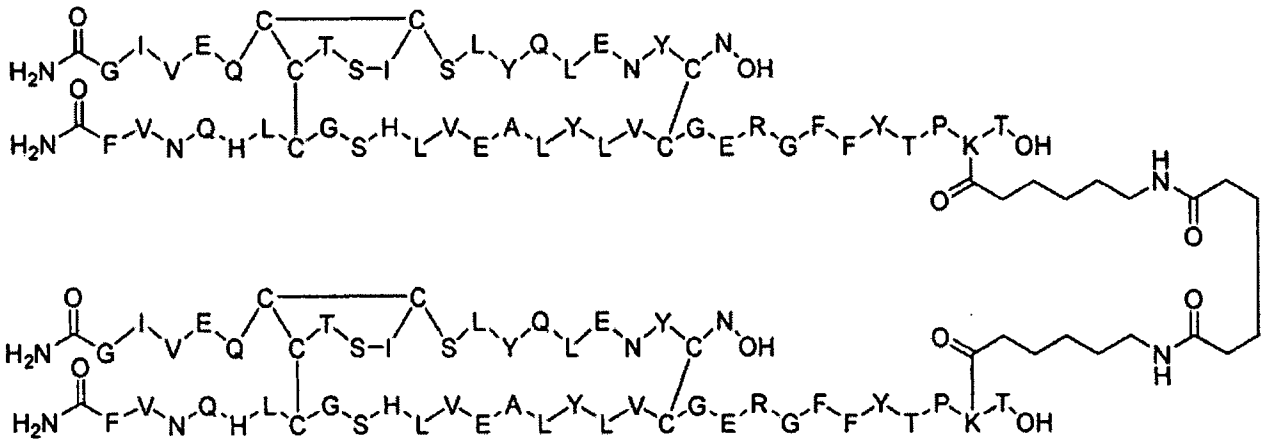
二聚體 20 ;



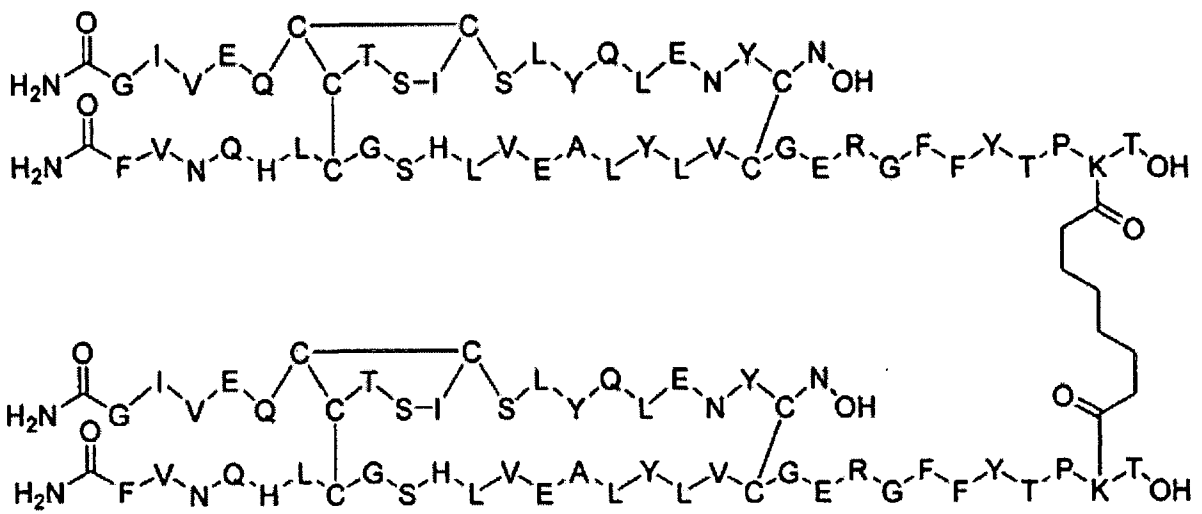
二聚體 21 ;



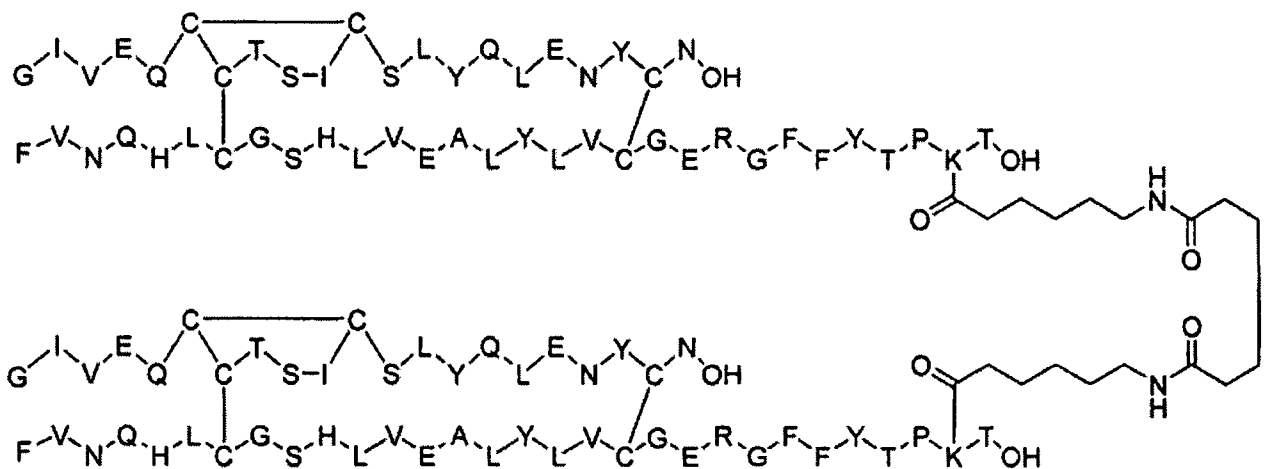
二聚體 22 ;



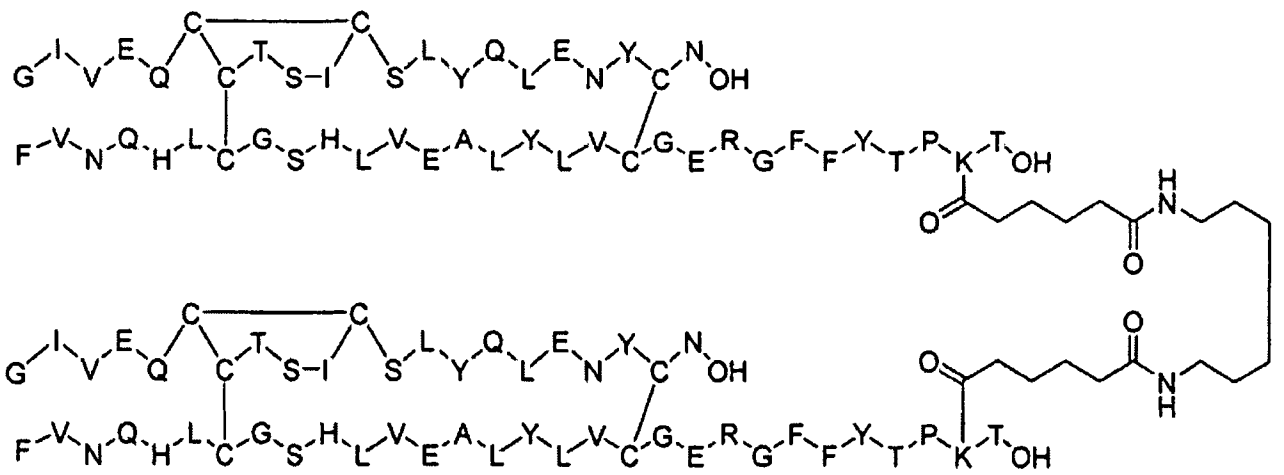
二聚體 23 ;



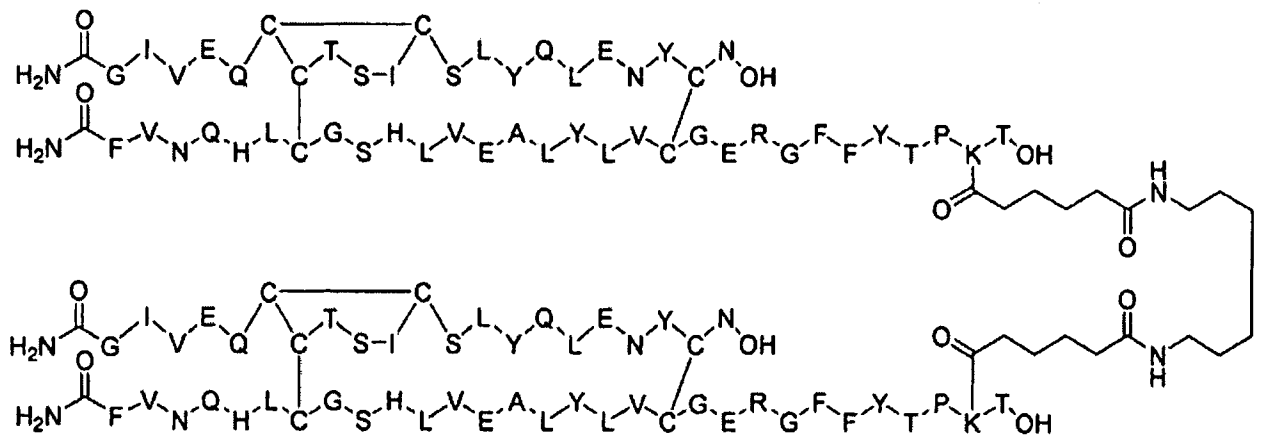
二聚體 24 ;



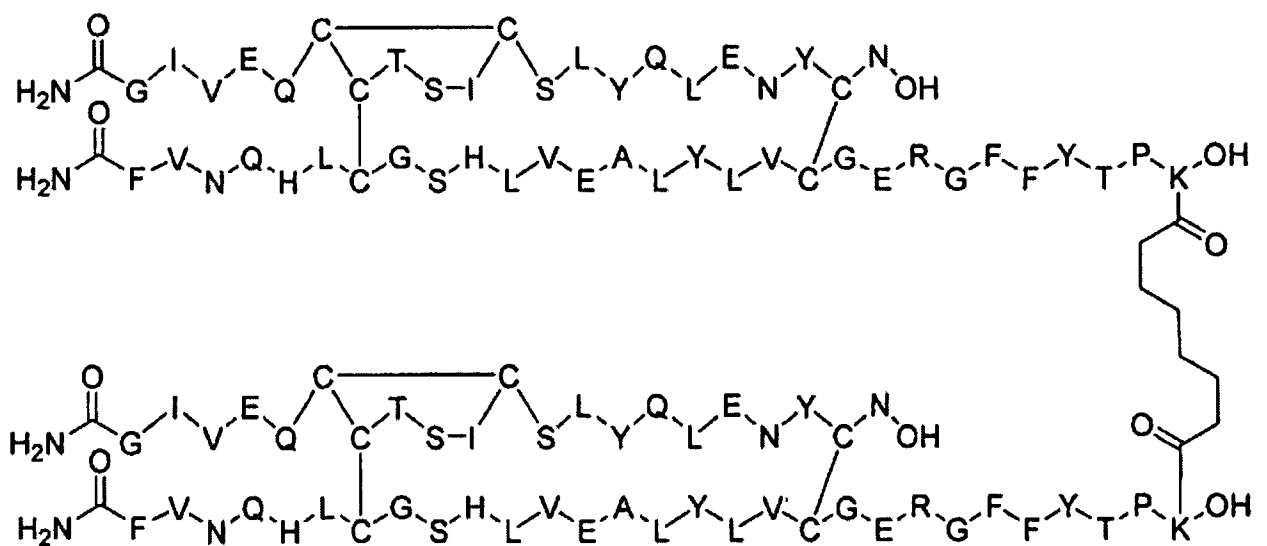
二聚體 25 ;



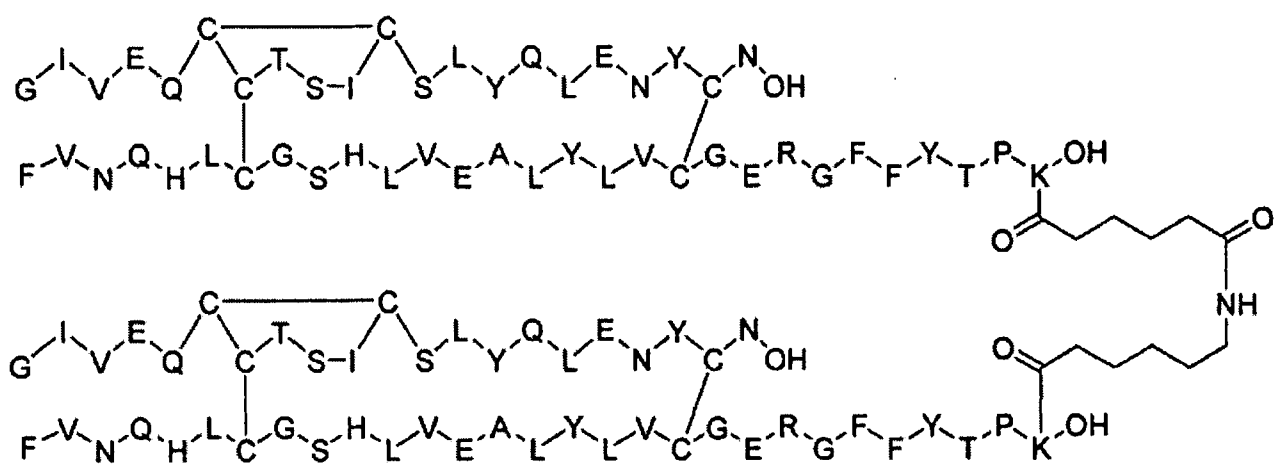
二聚體 26 ;



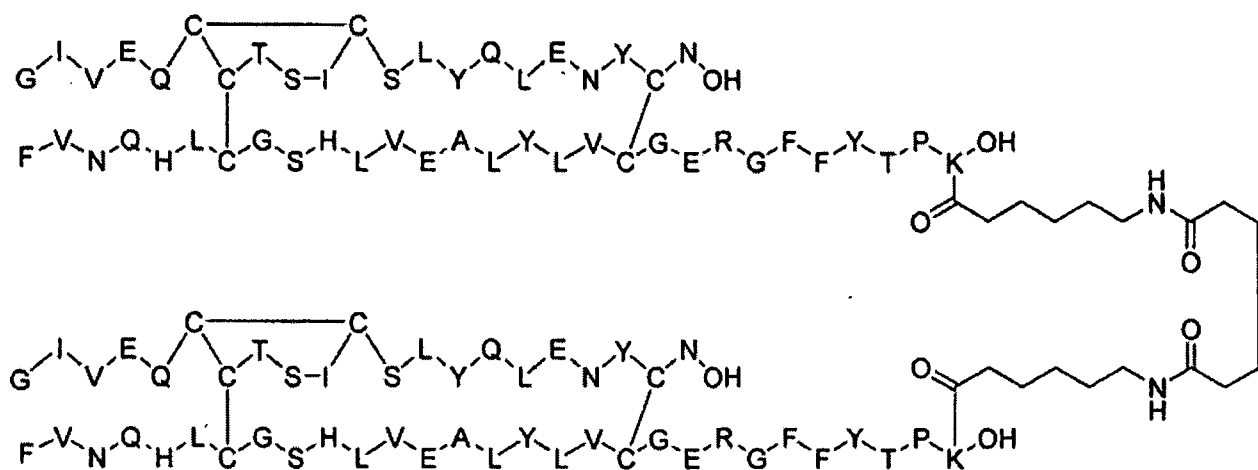
二聚體 27 ;



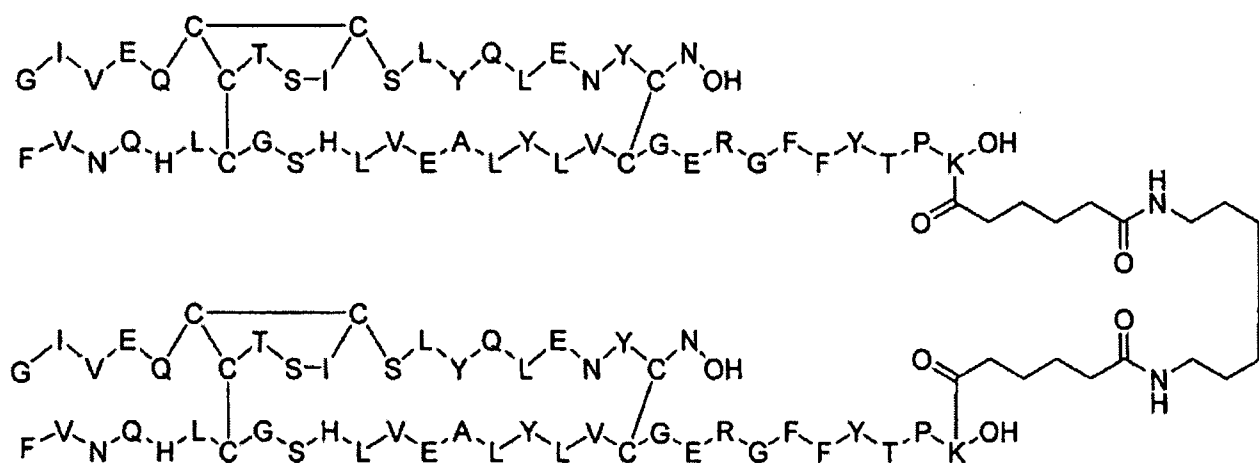
二聚體 28 ;



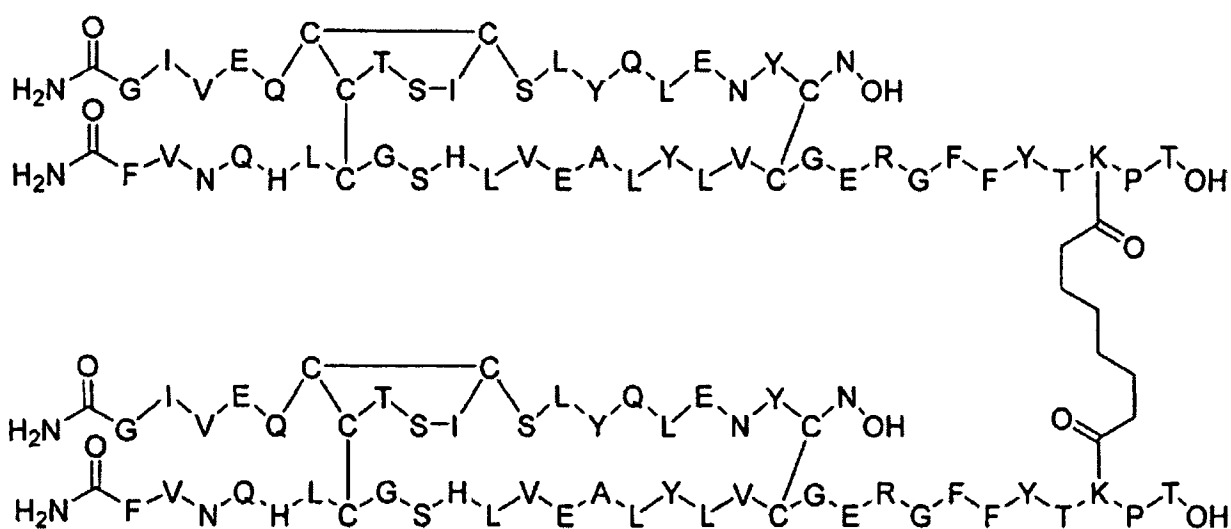
二聚體 29 ;



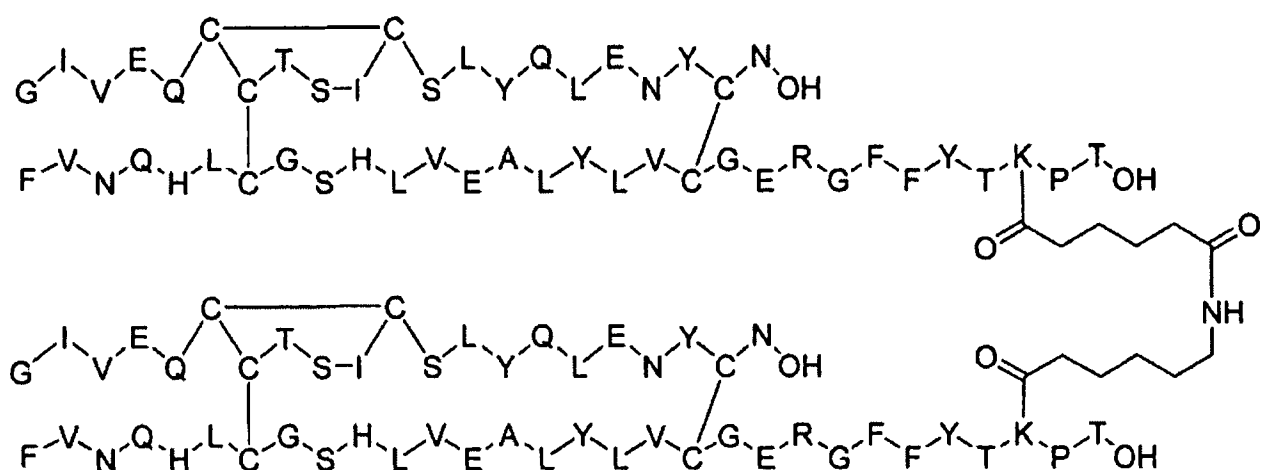
二聚體 30 ;



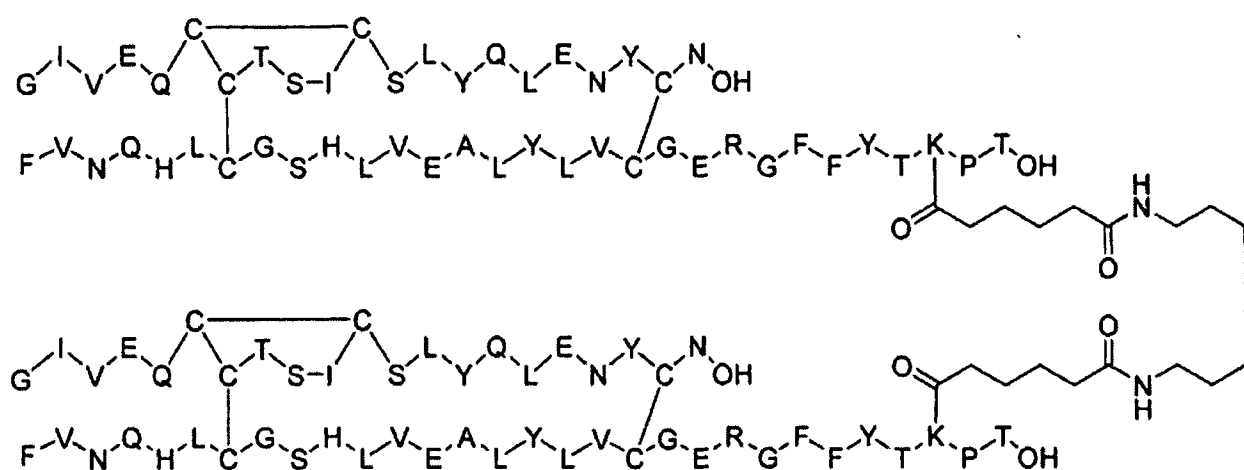
二聚體 31 ;



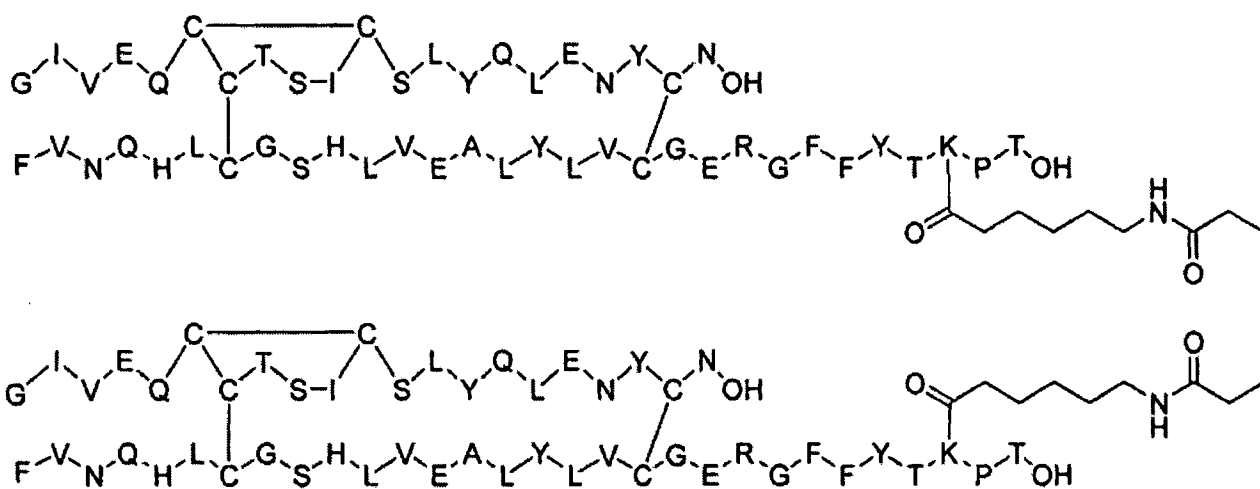
二聚體 32 ;



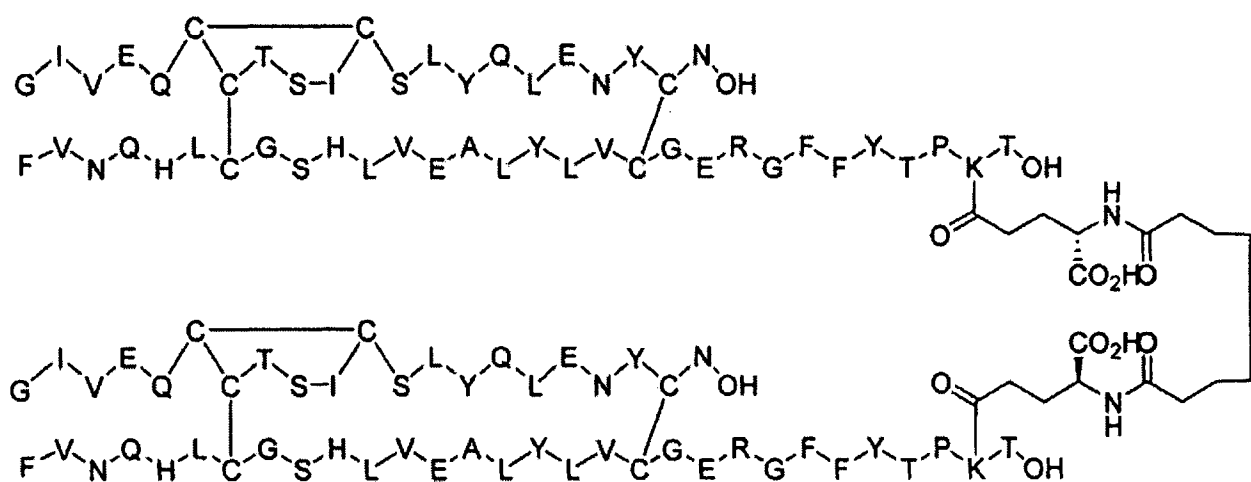
二聚體 33 ;



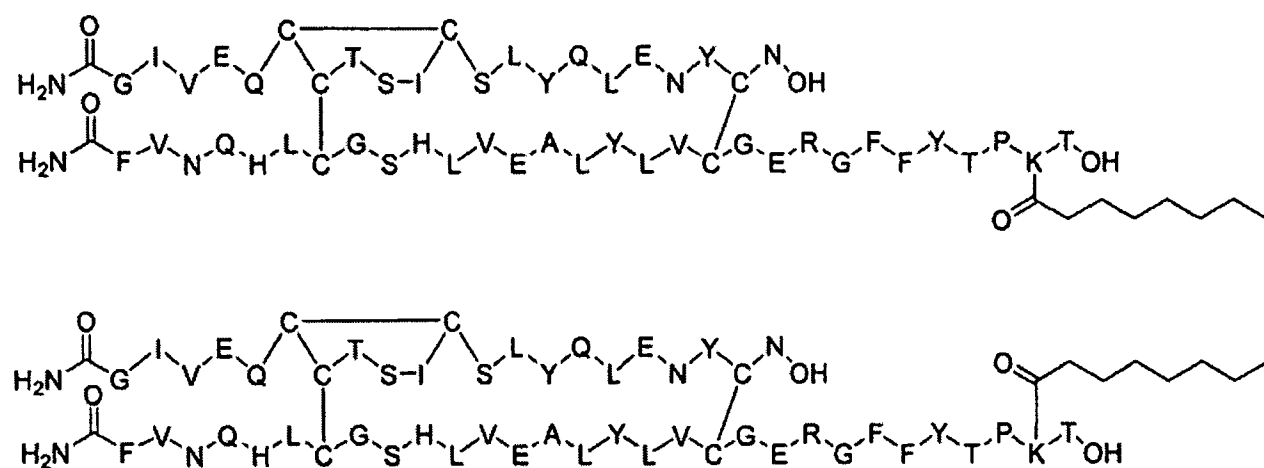
二聚體 34 ;



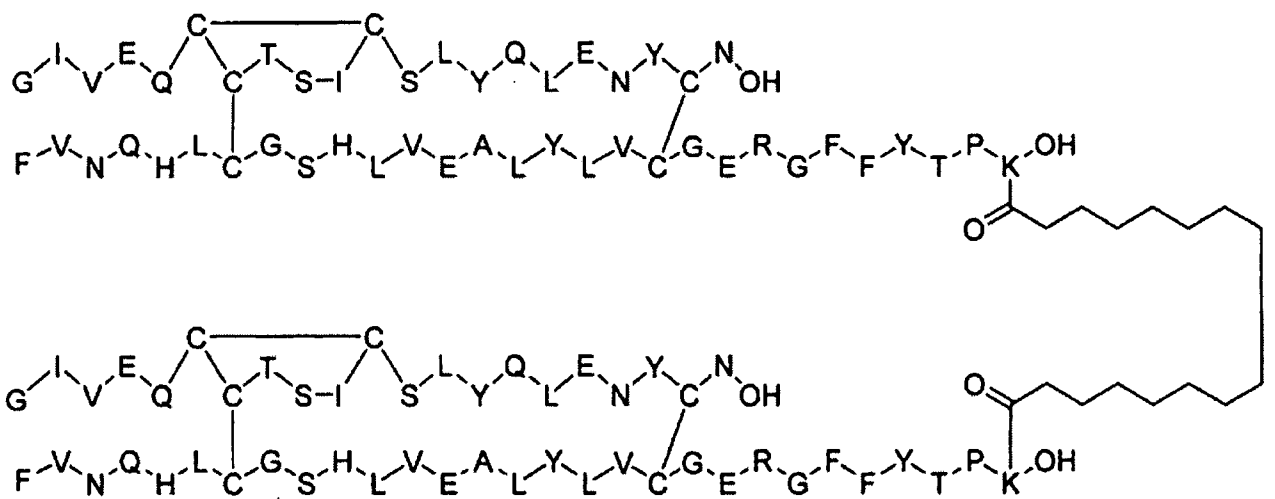
## 二聚體 35 ;



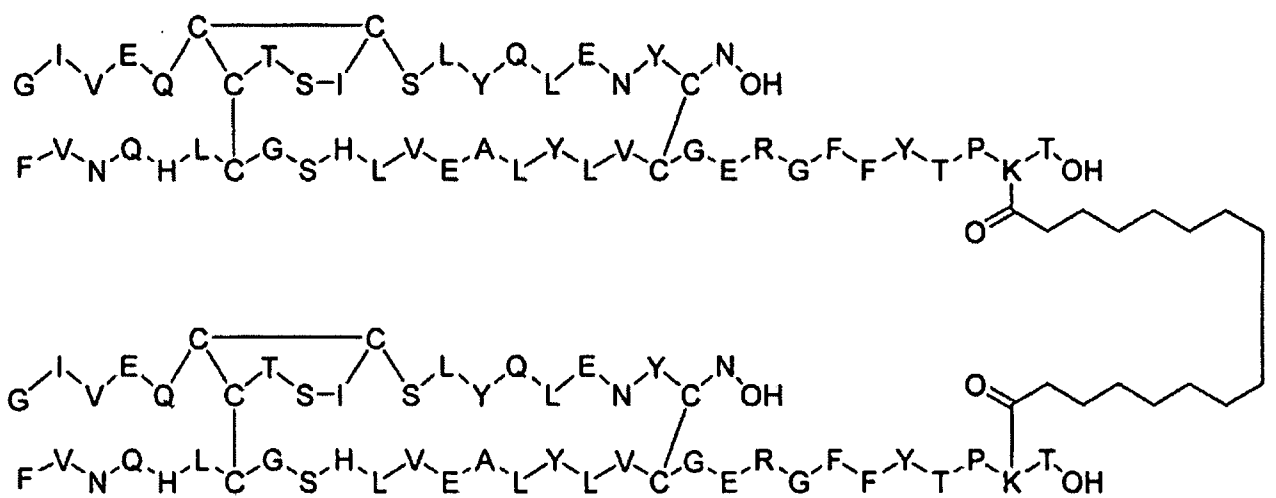
## 二聚體 36 ;



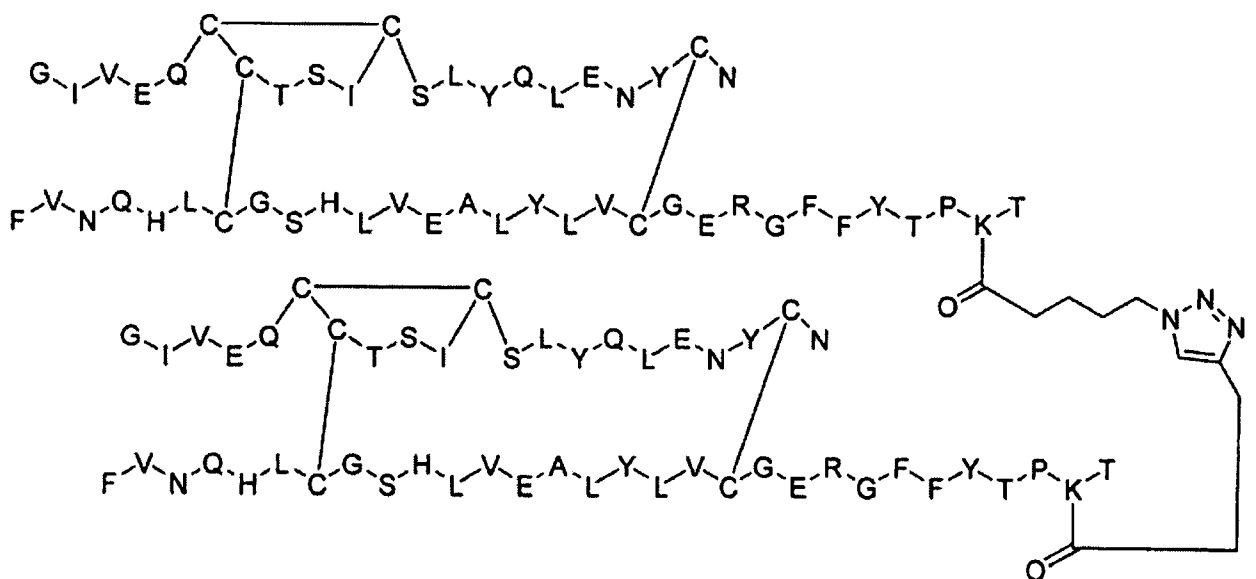
## 二聚體 37 ;



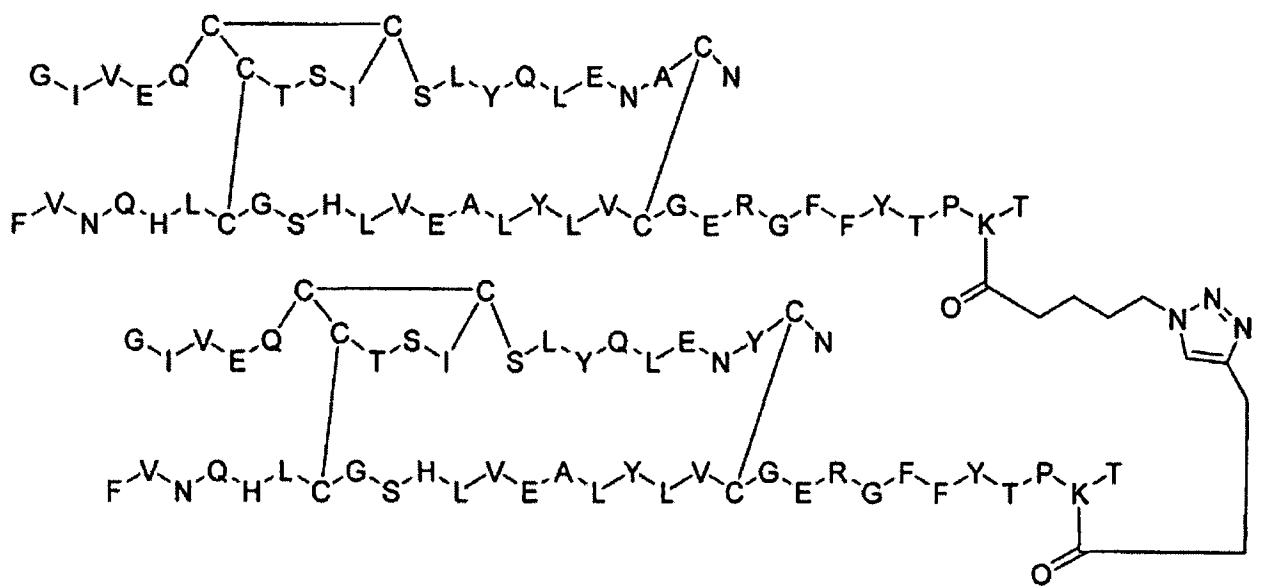
二聚體38；



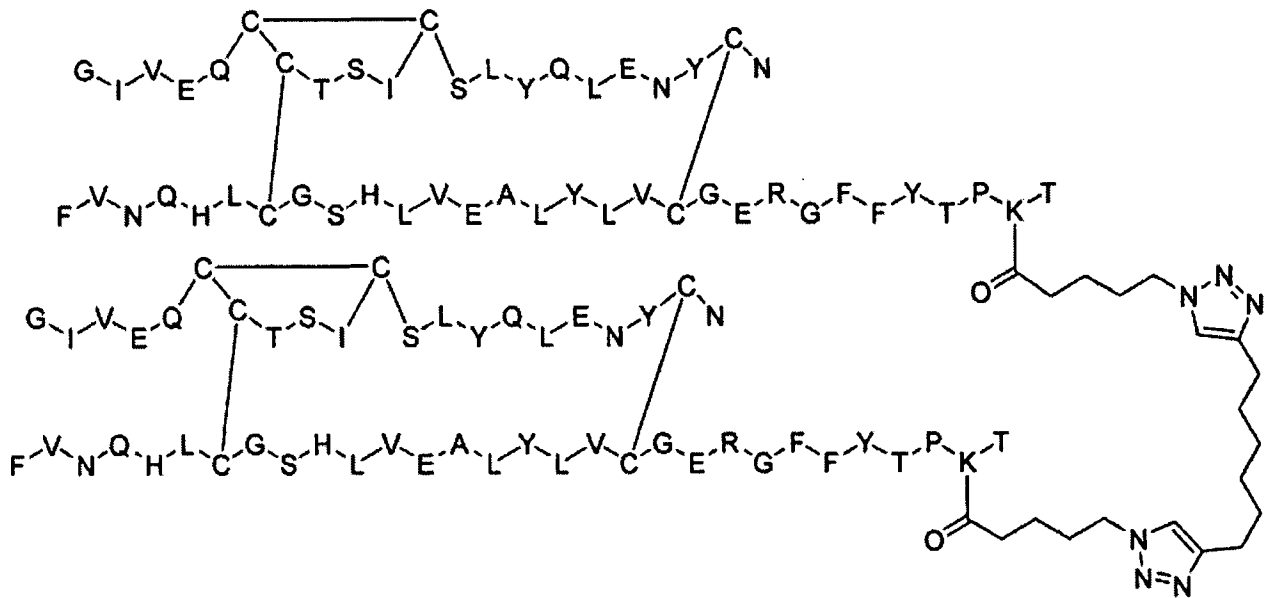
二聚體39；



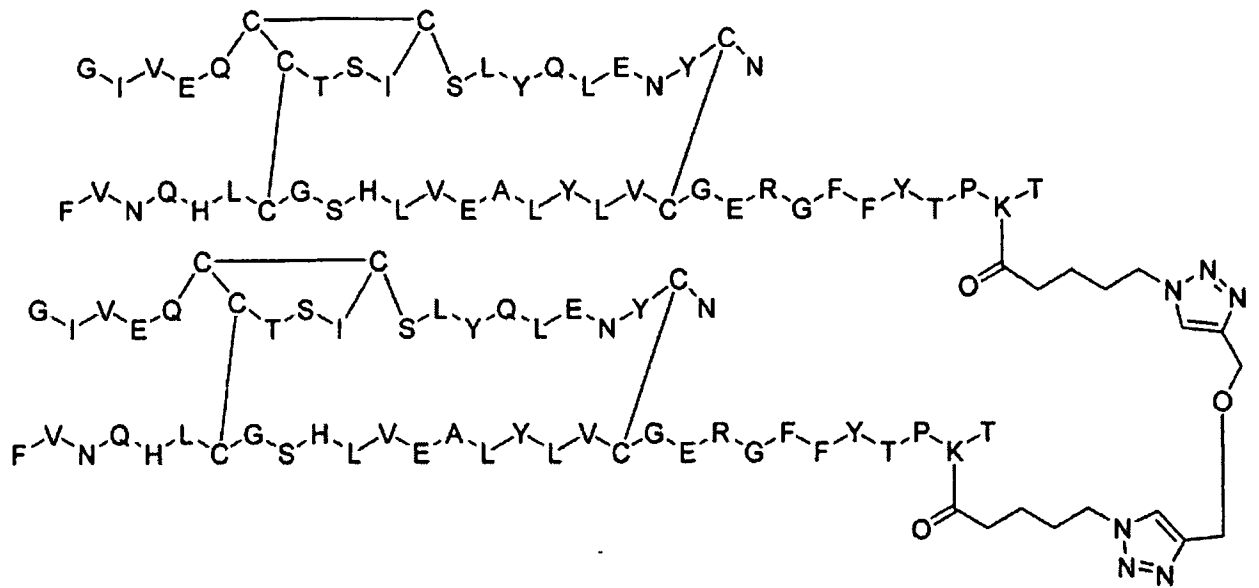
二聚體40；



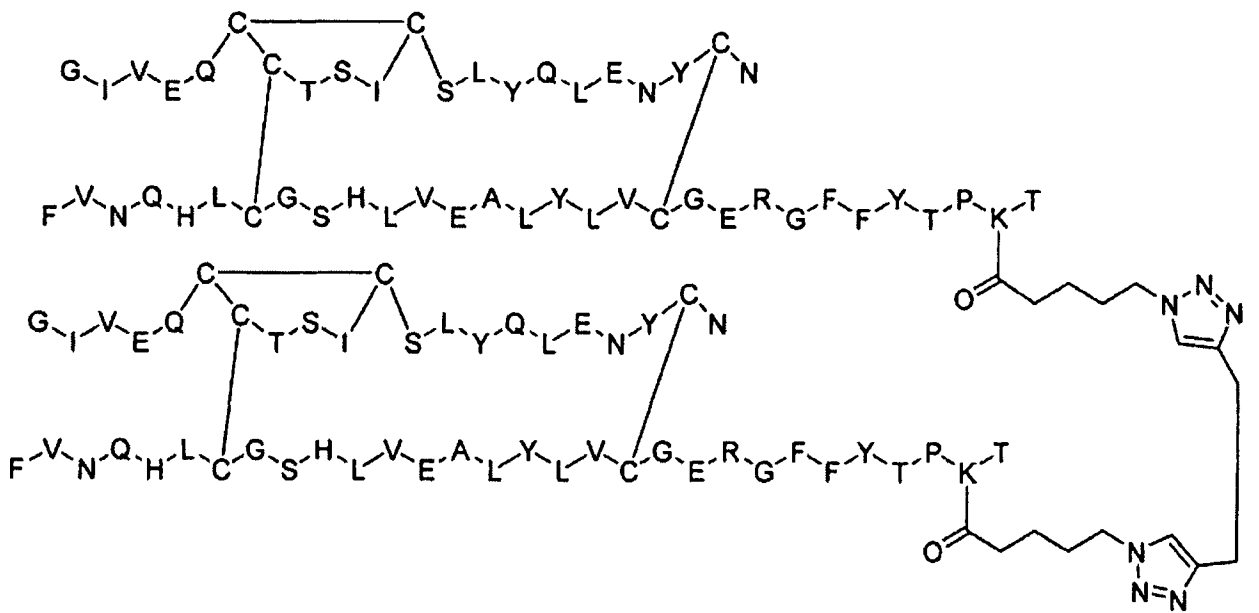
二聚體 41 ;



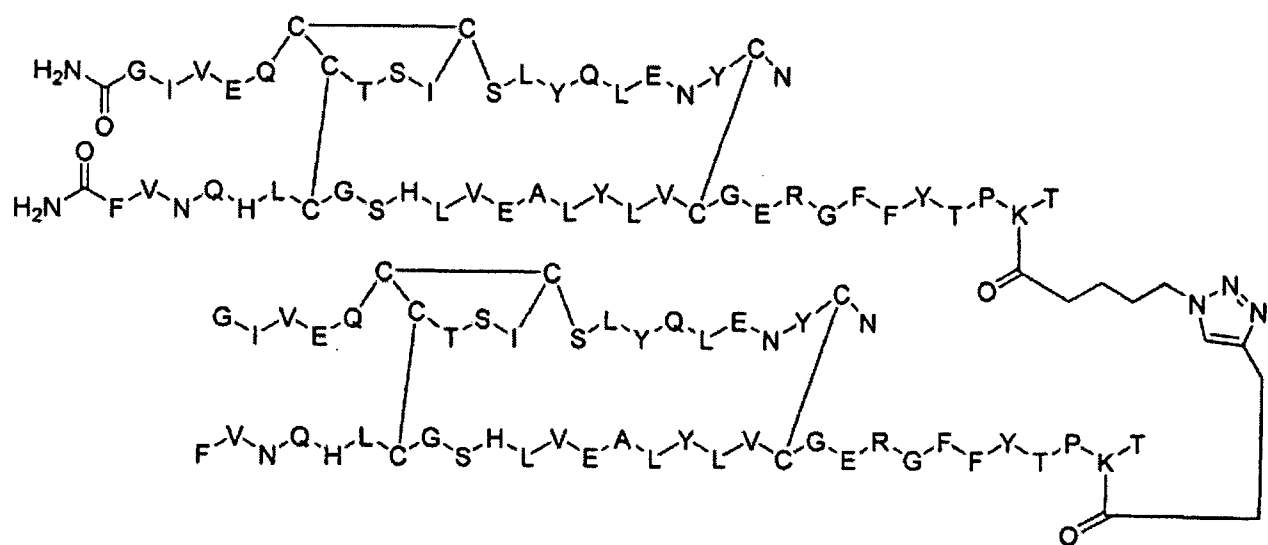
二聚體 42 ;



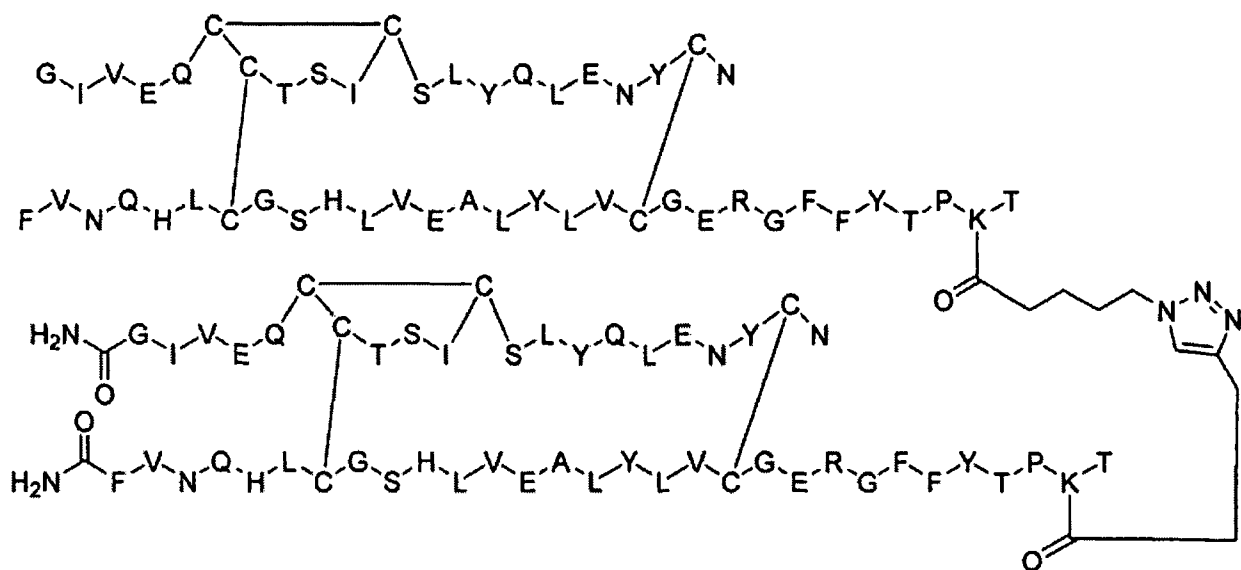
二聚體 43 ;



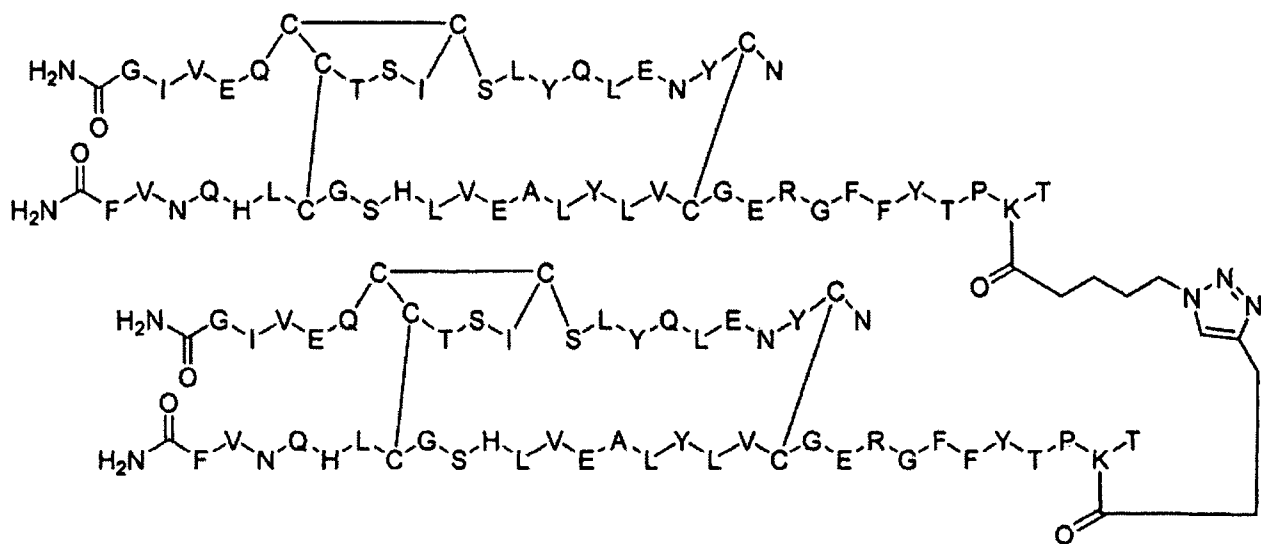
二聚體 44 ;



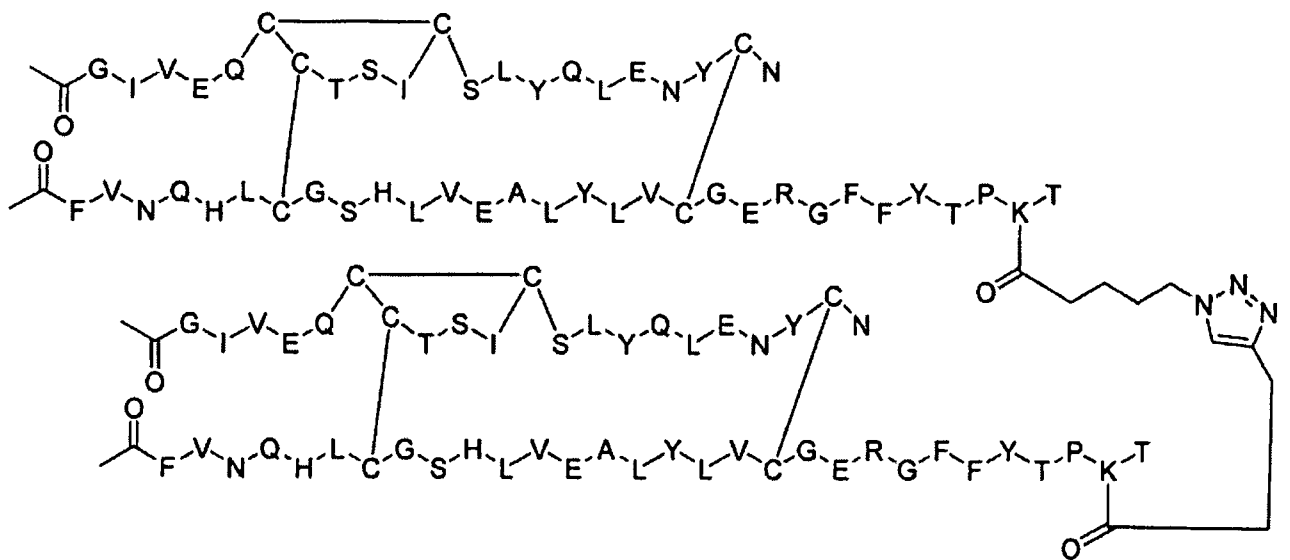
二聚體 45 ;



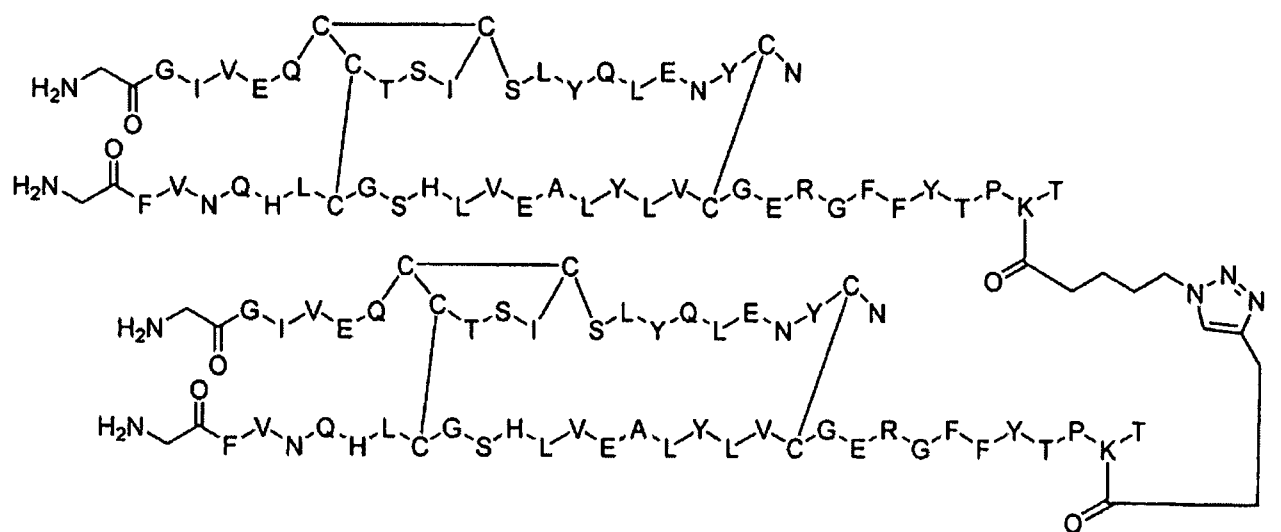
二聚體 46 ;



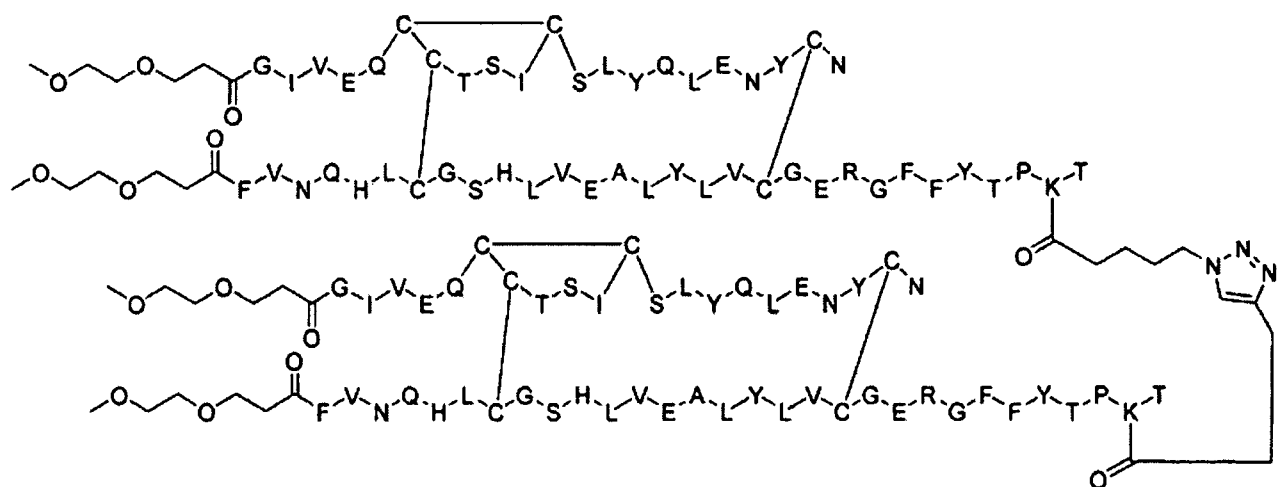
二聚體 47 ;



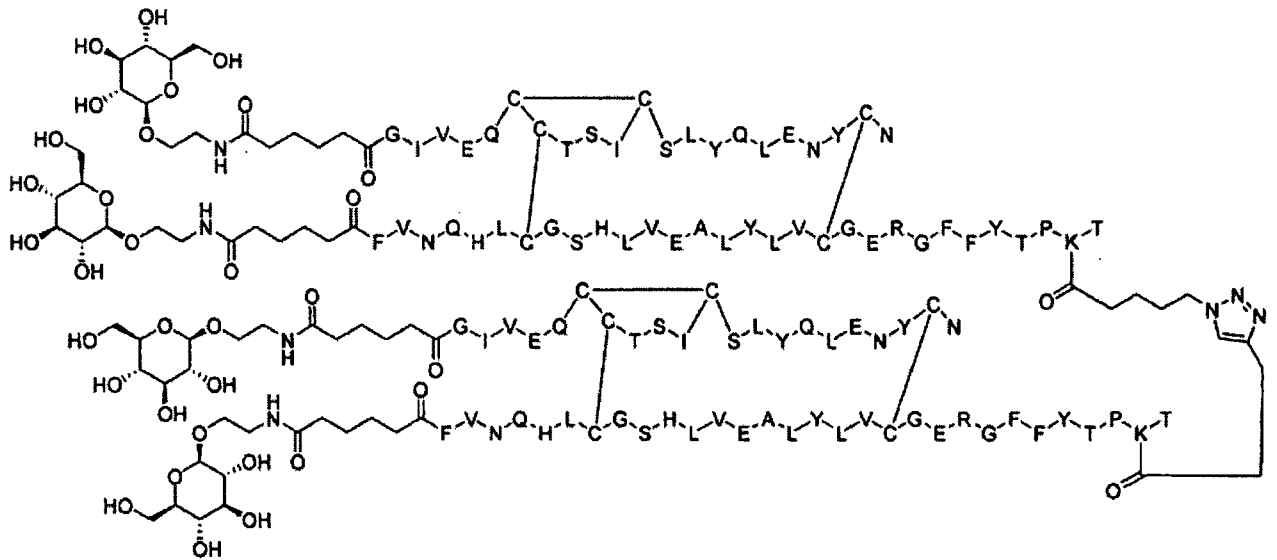
二聚體 48 ;



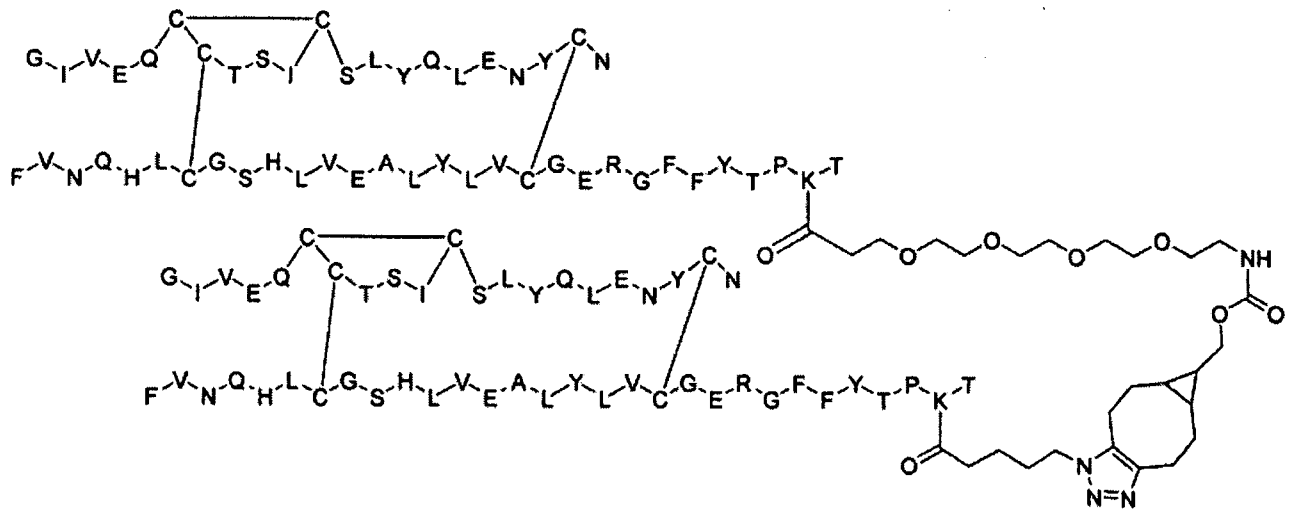
二聚體 49 ;



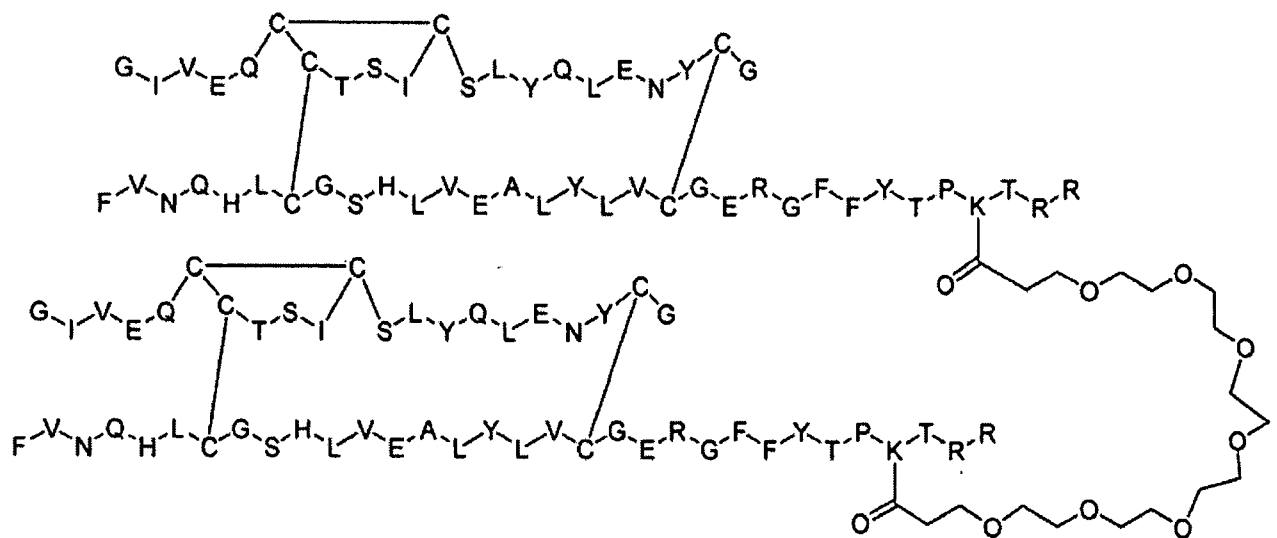
二聚體 50 ;



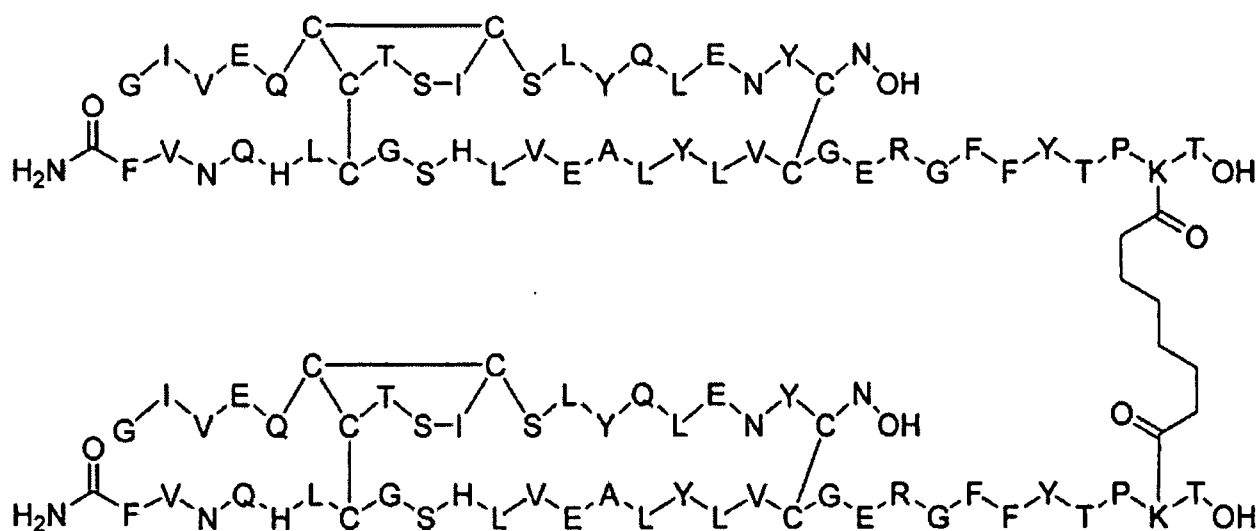
二聚體 51；



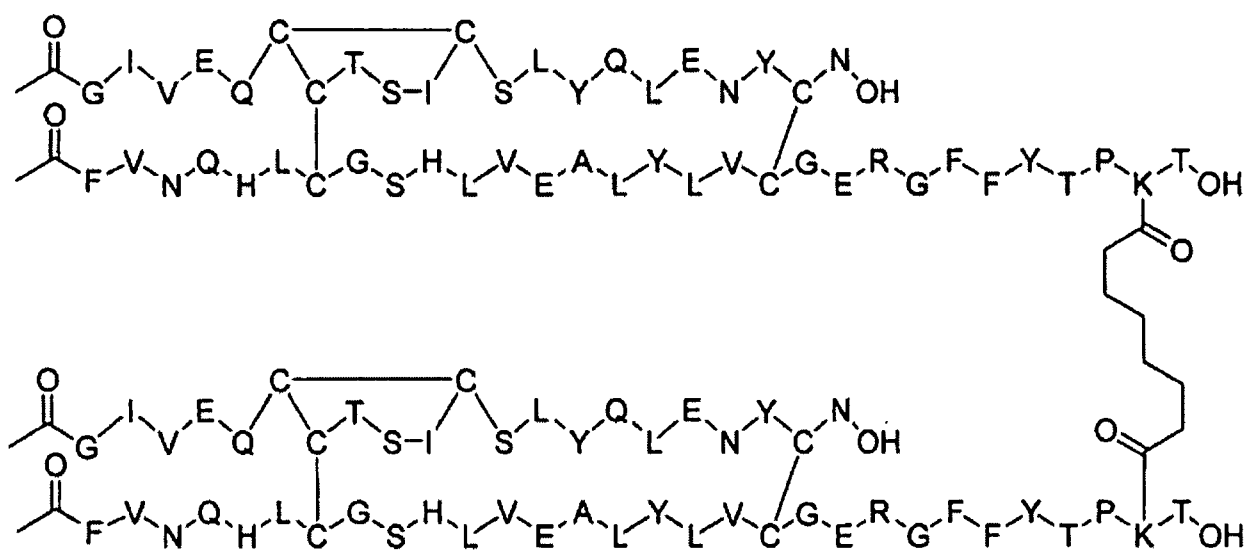
二聚體 52；



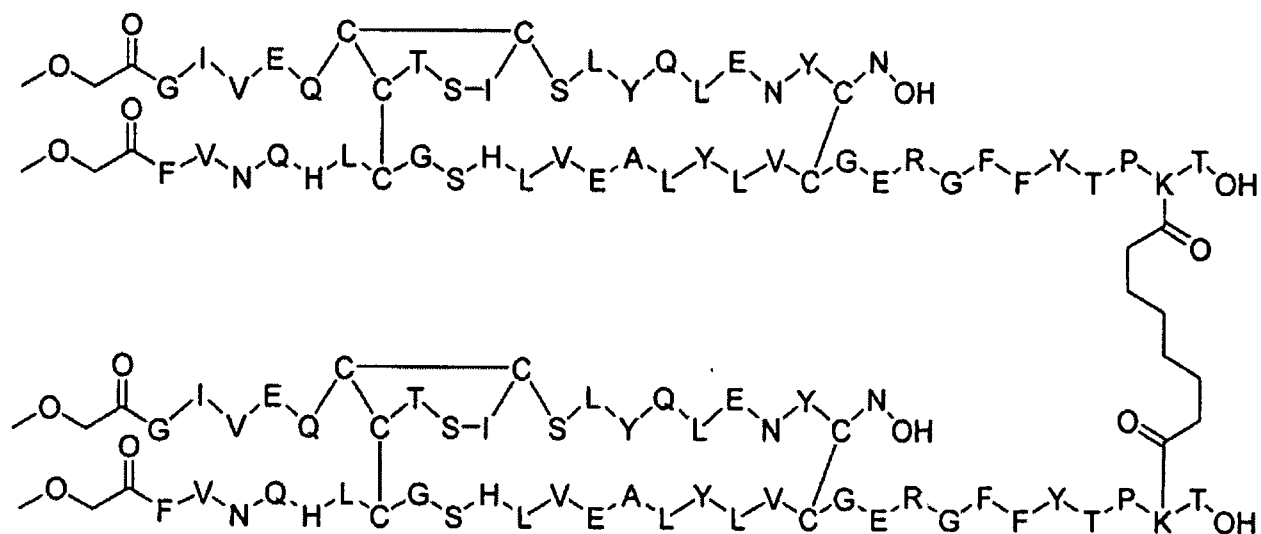
二聚體 53；



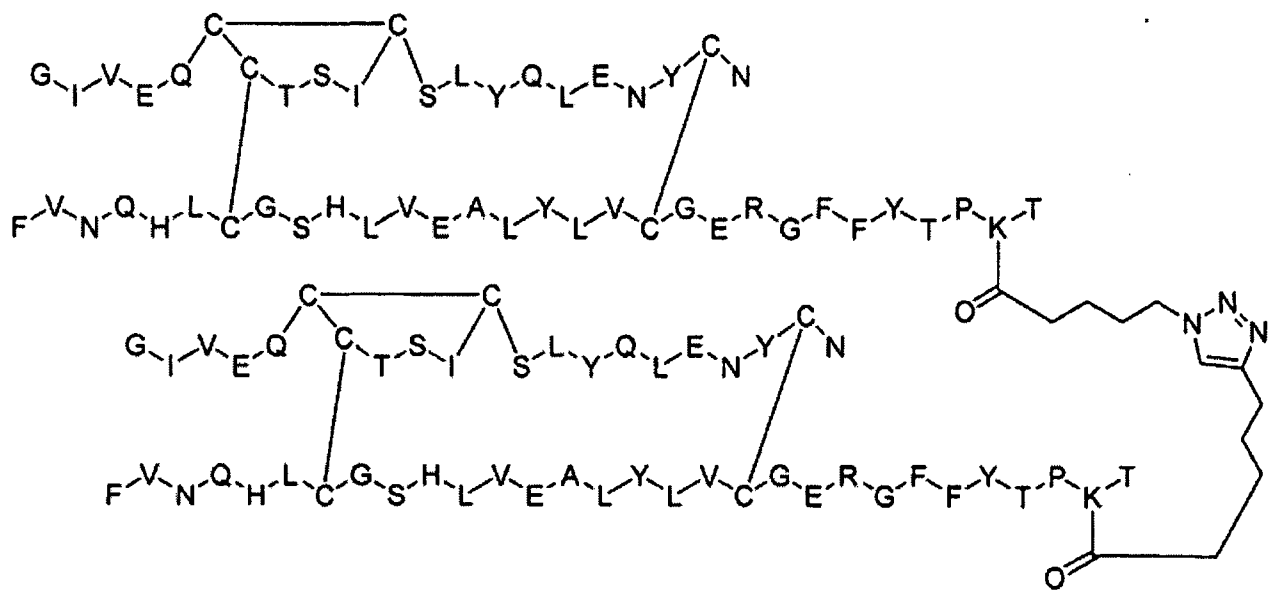
二聚體 54 ;



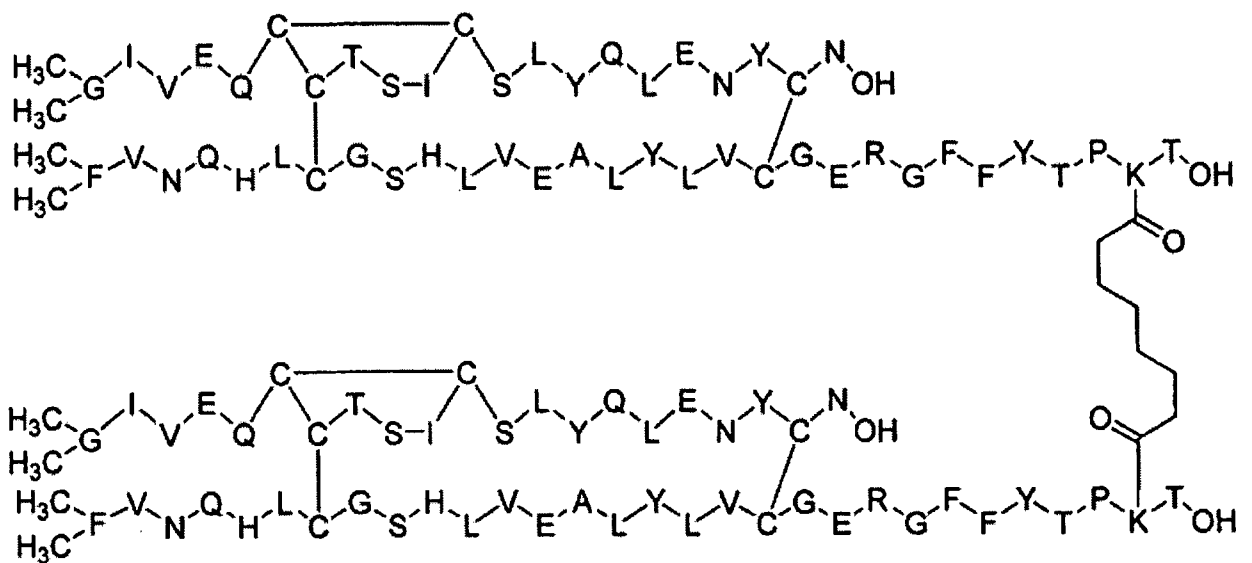
二聚體 55 ;



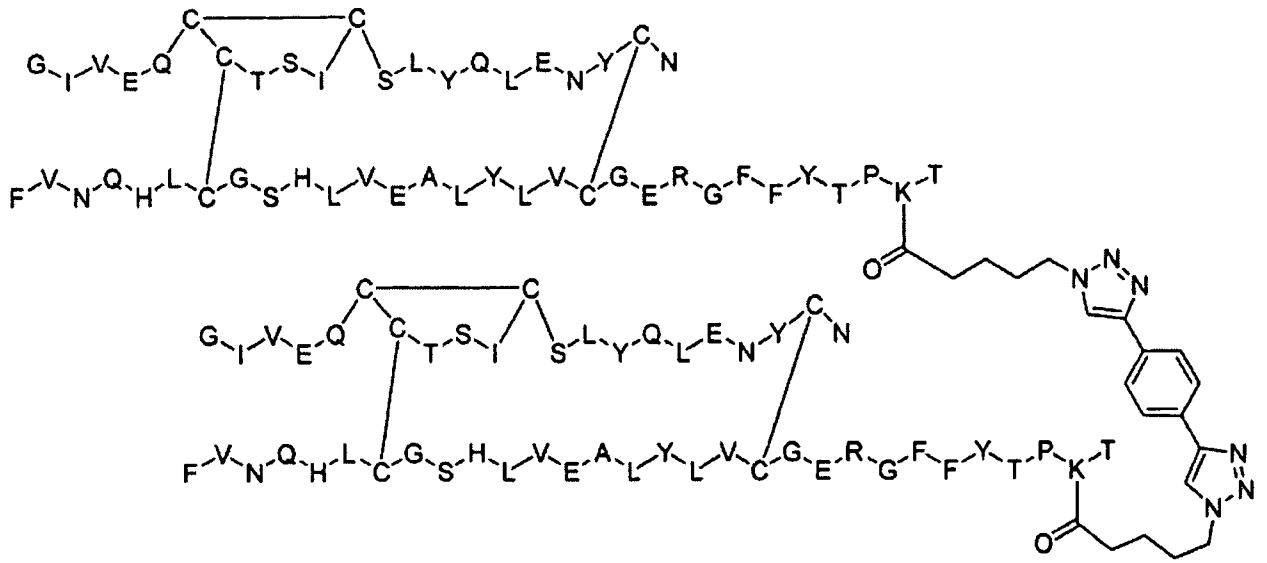
## 二聚體 56 :



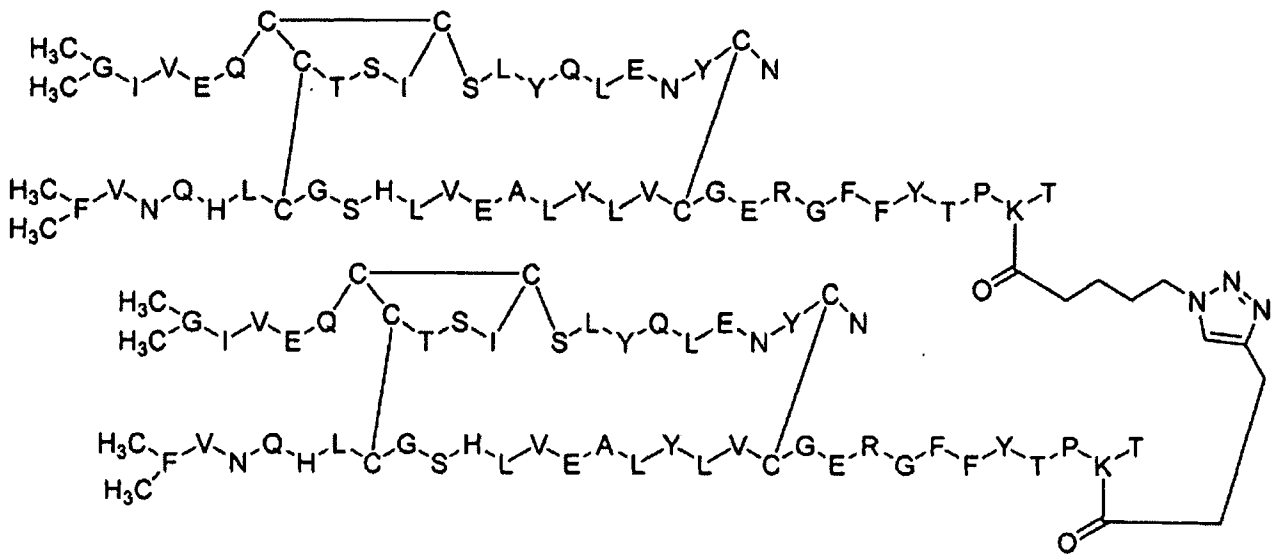
## 二聚體 57 :



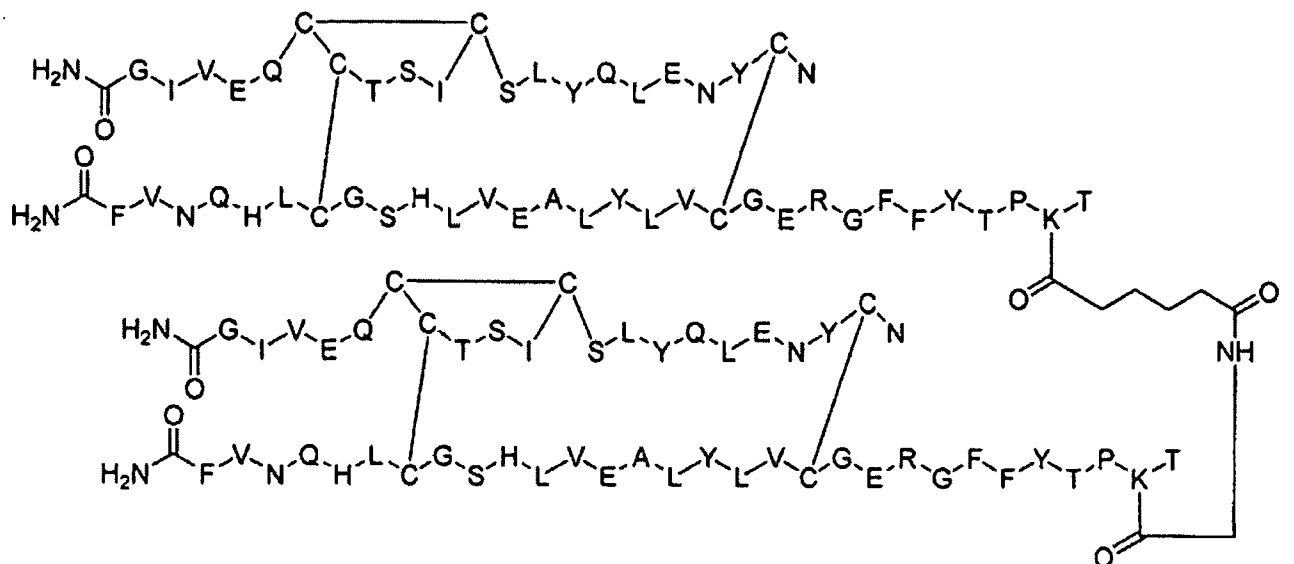
## 二聚體 58 :



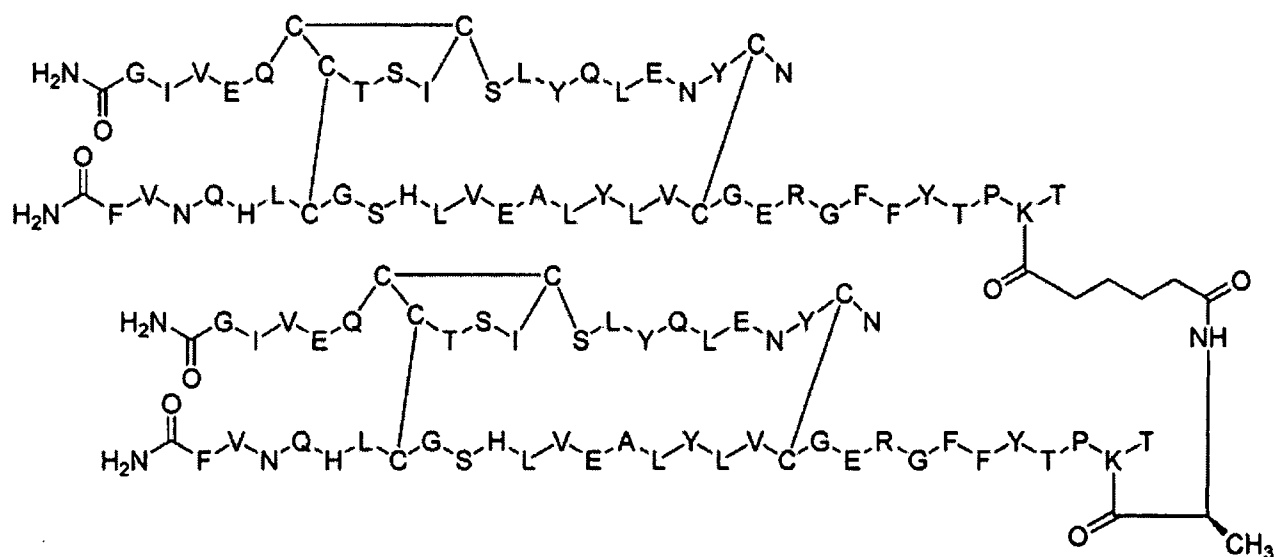
二聚體 59 :



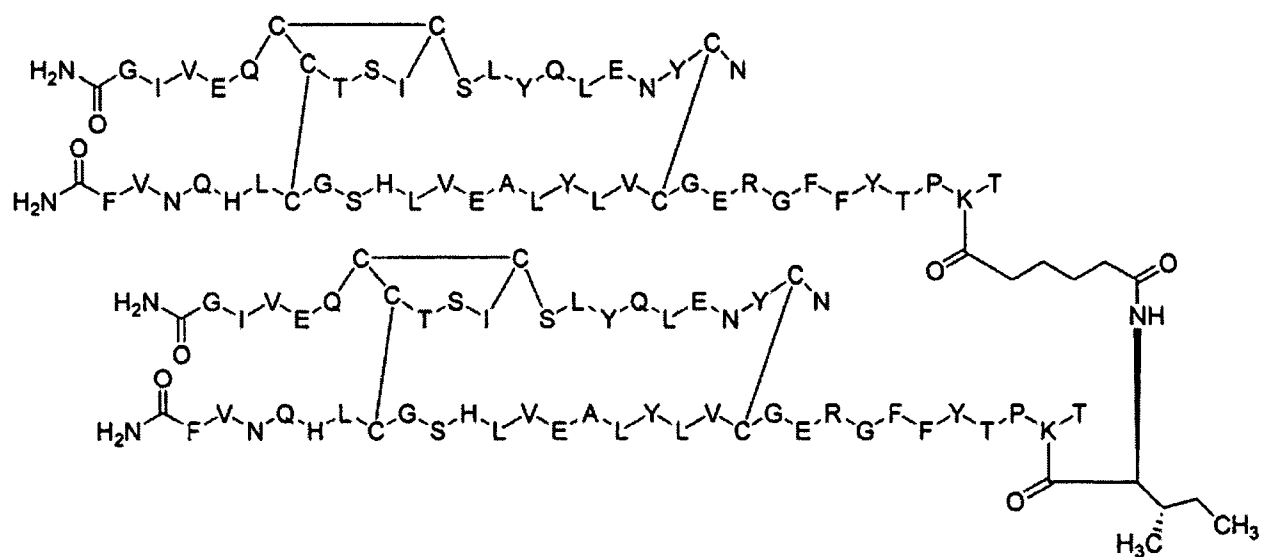
二聚體 60 :



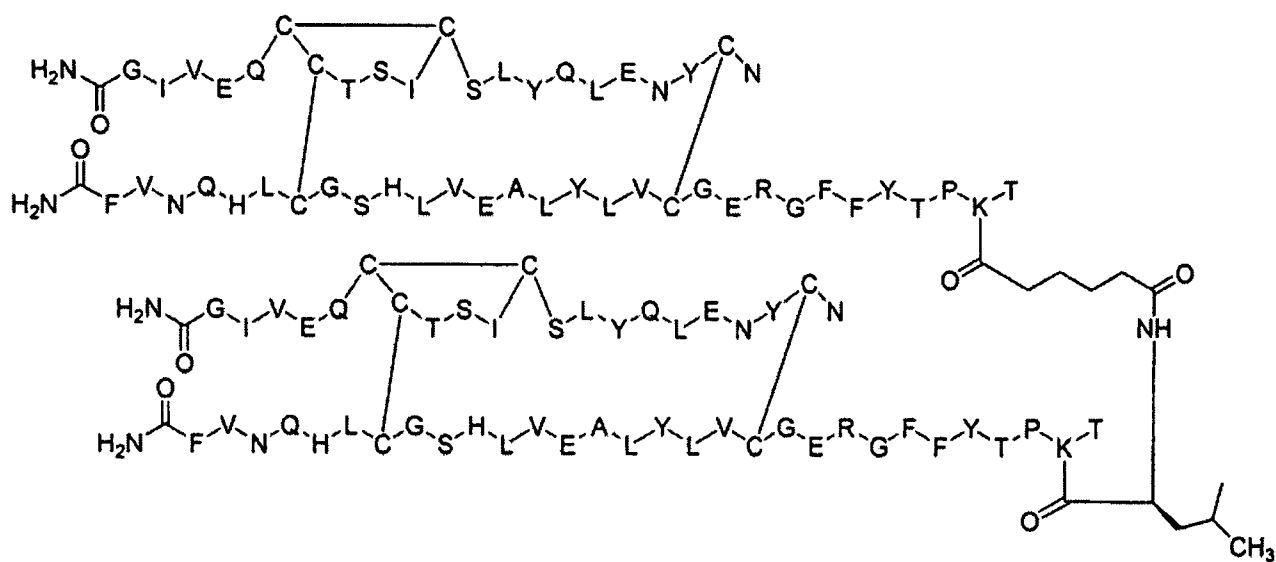
## 二聚體 61 ;



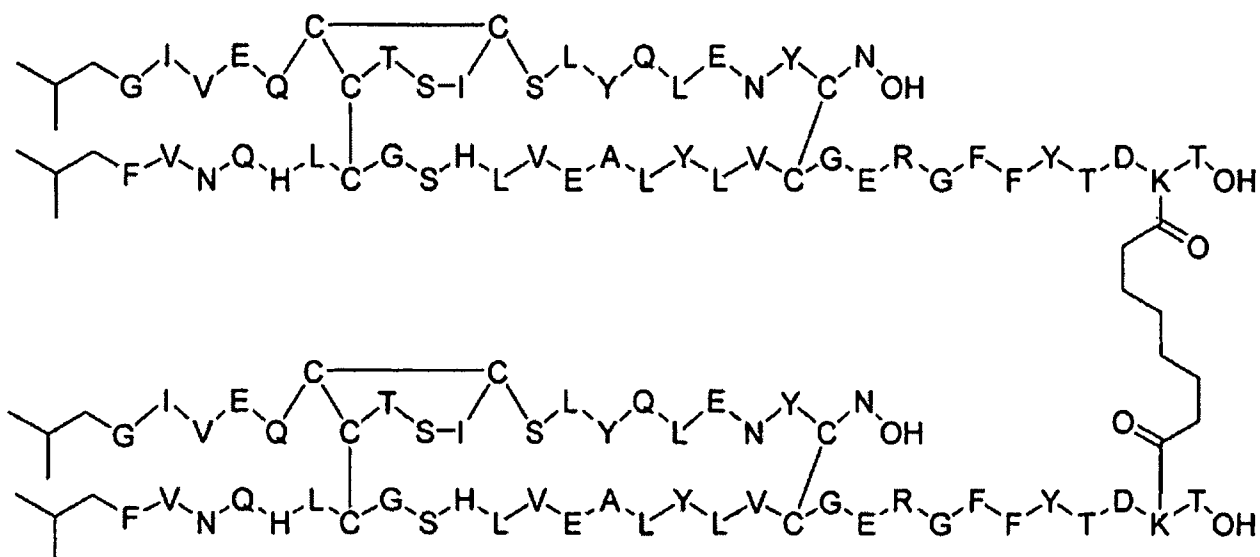
## 二聚體 62 ;



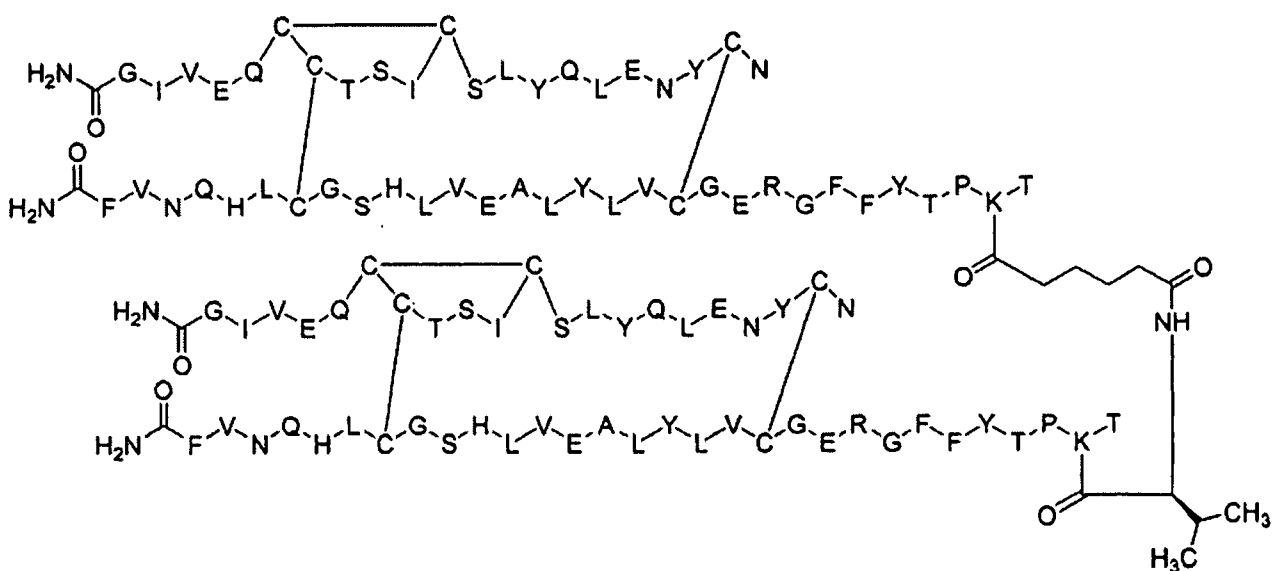
## 二聚體 63 ;



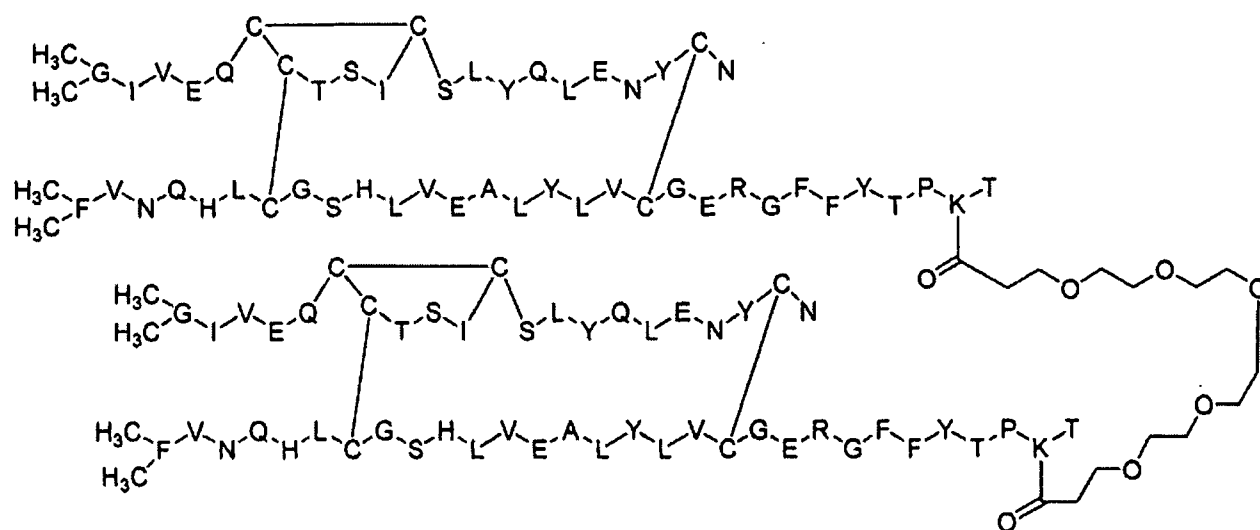
## 二聚體 64 ;



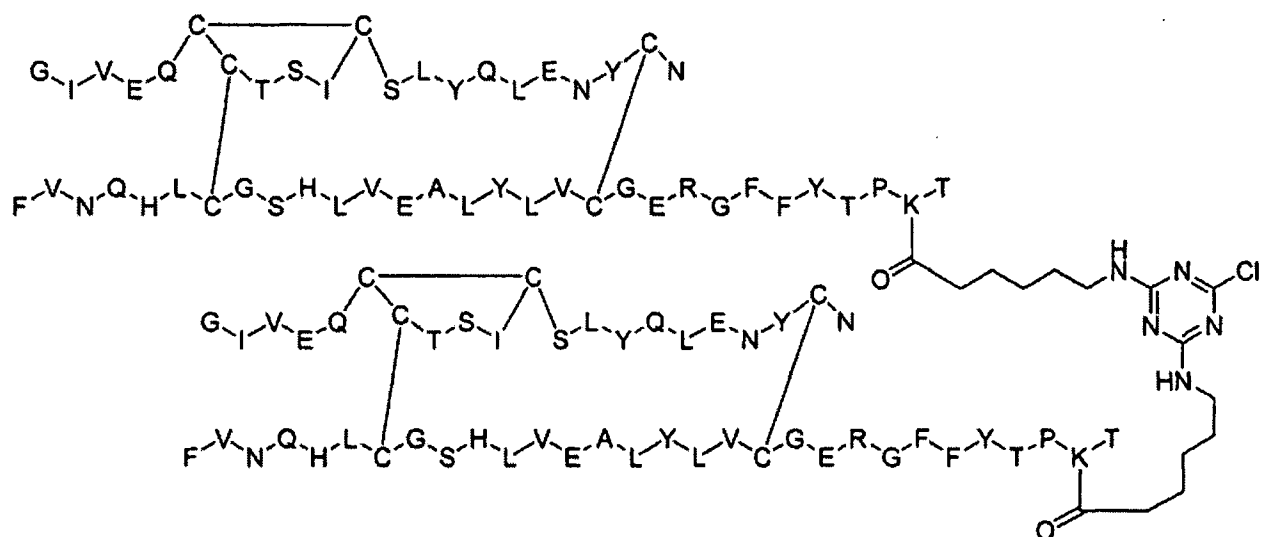
## 二聚體 65 ;



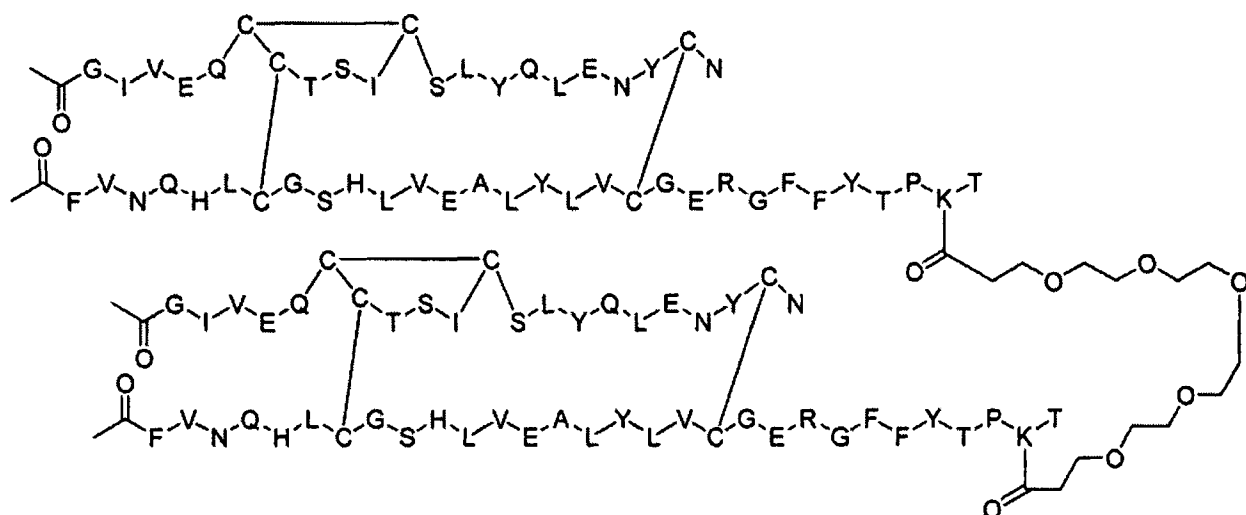
## 二聚體 66 ;



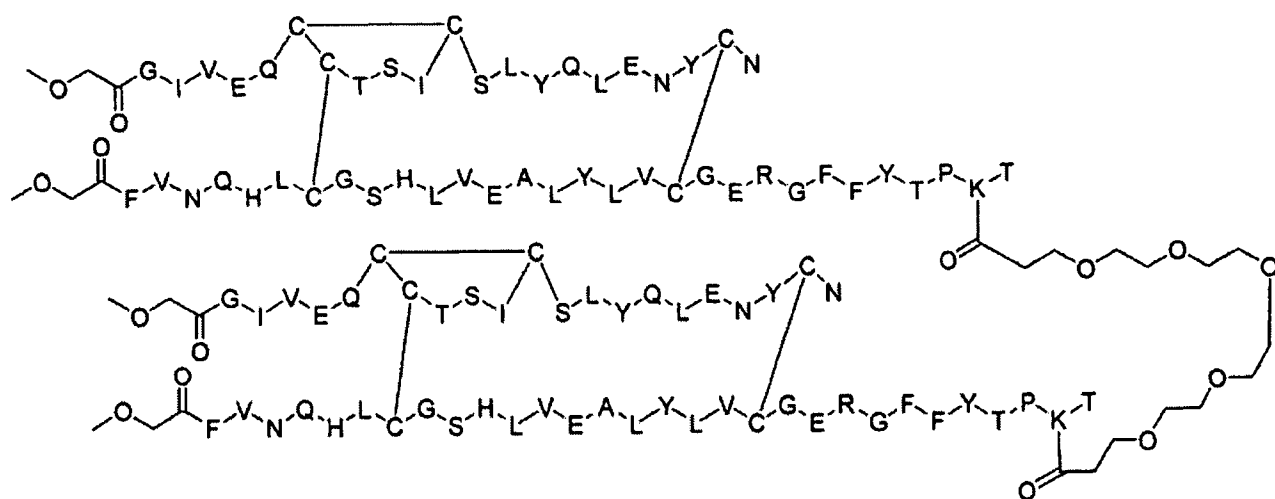
二聚體 67 ;



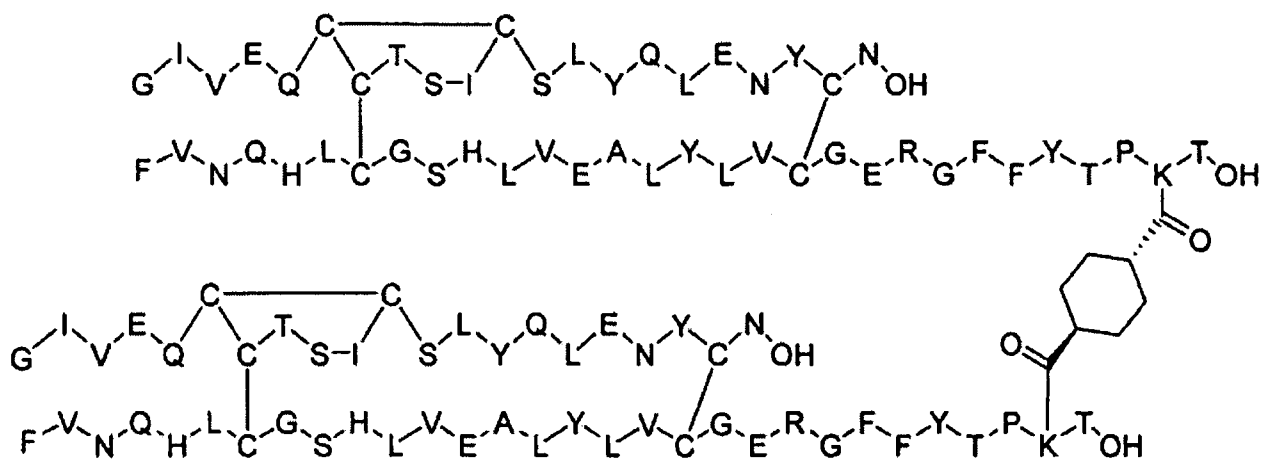
二聚體 68 ;



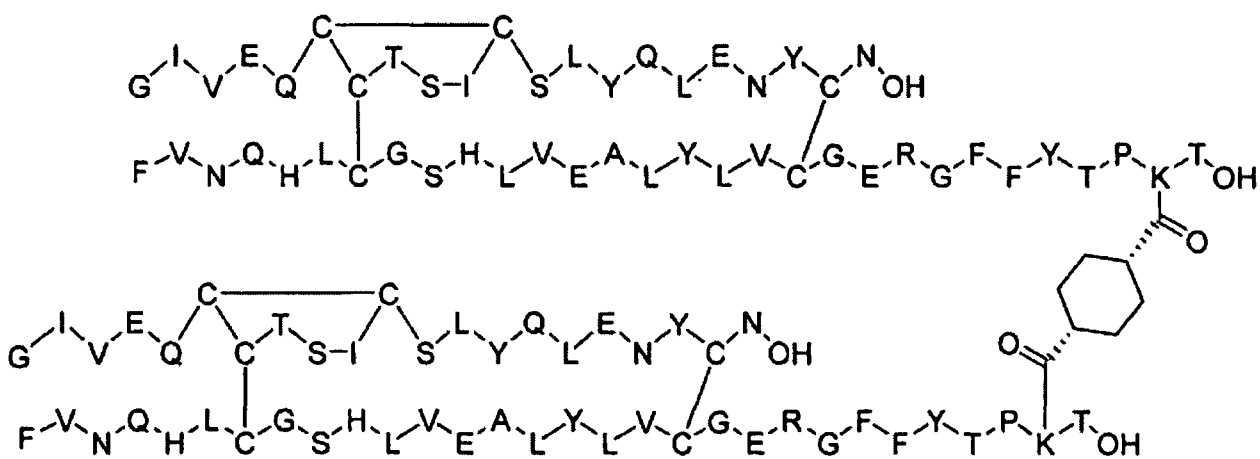
二聚體 69 ;



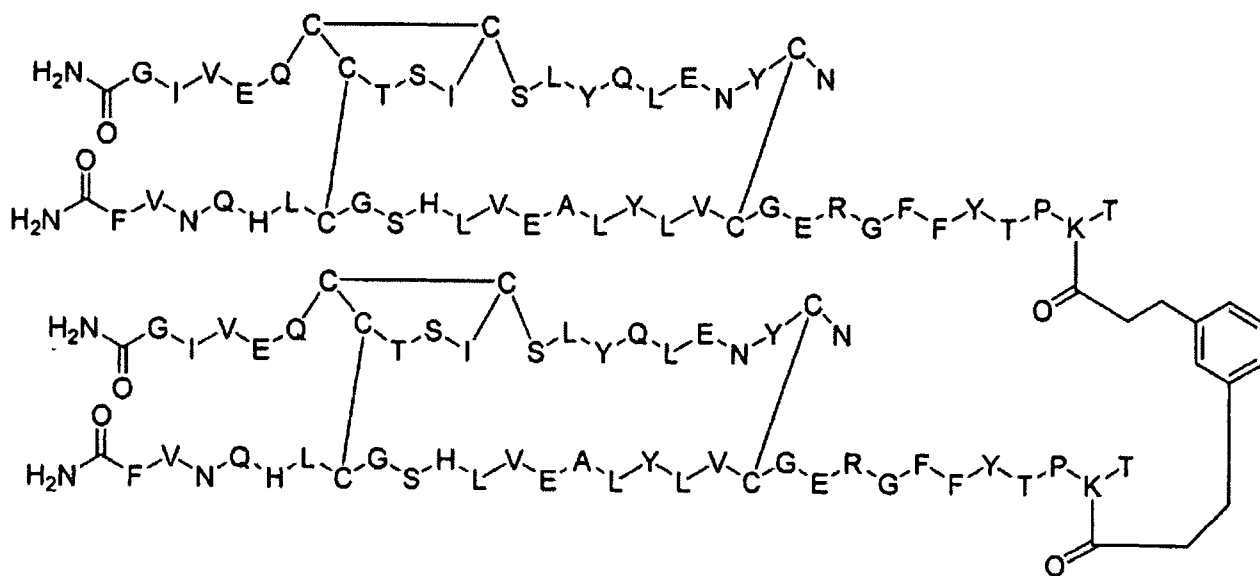
二聚體 70 ;



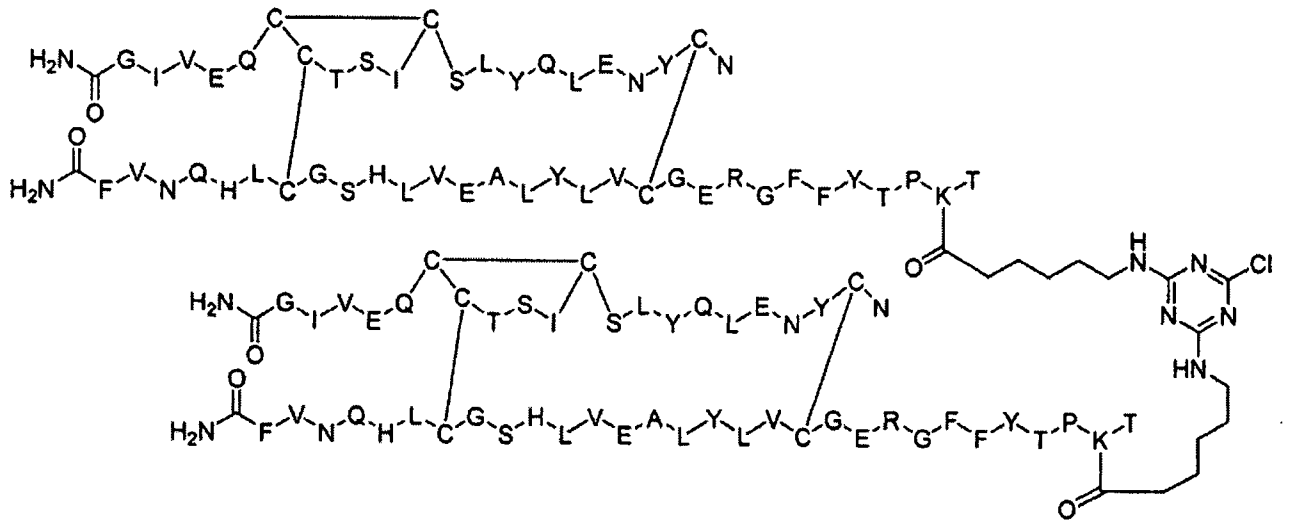
二聚體 71 ;



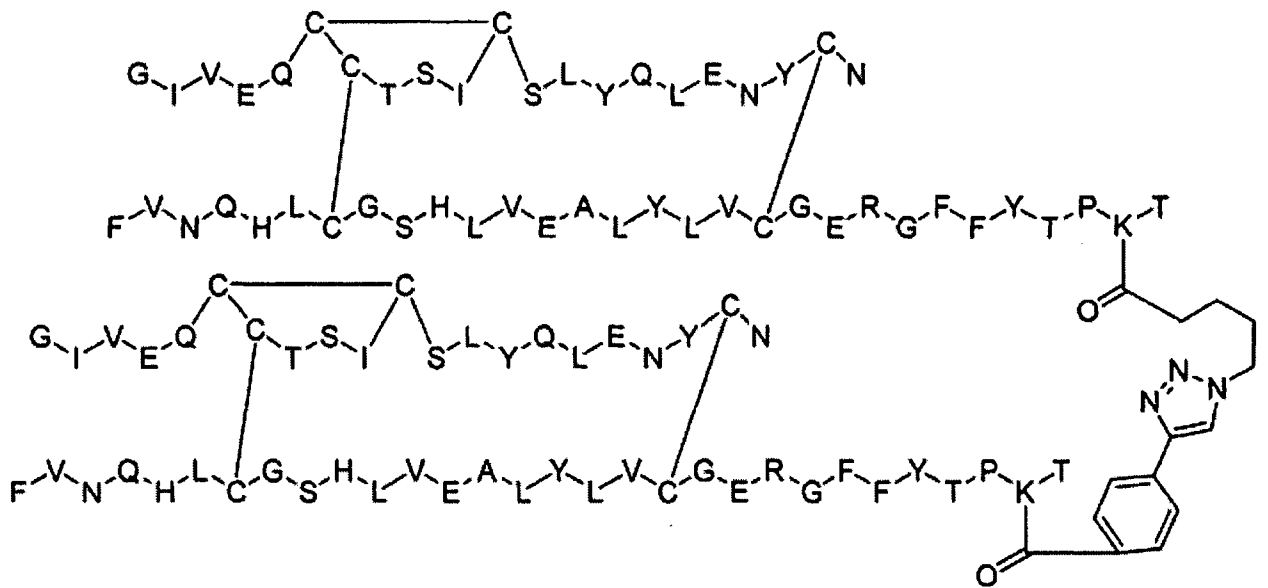
二聚體 72 ;



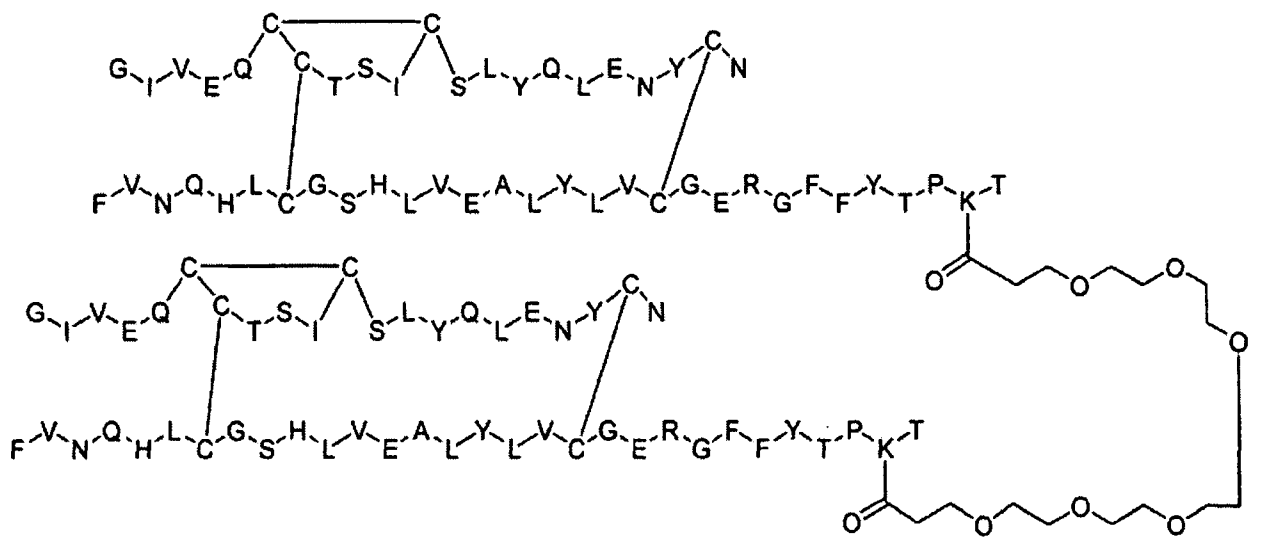
二聚體 73 ;



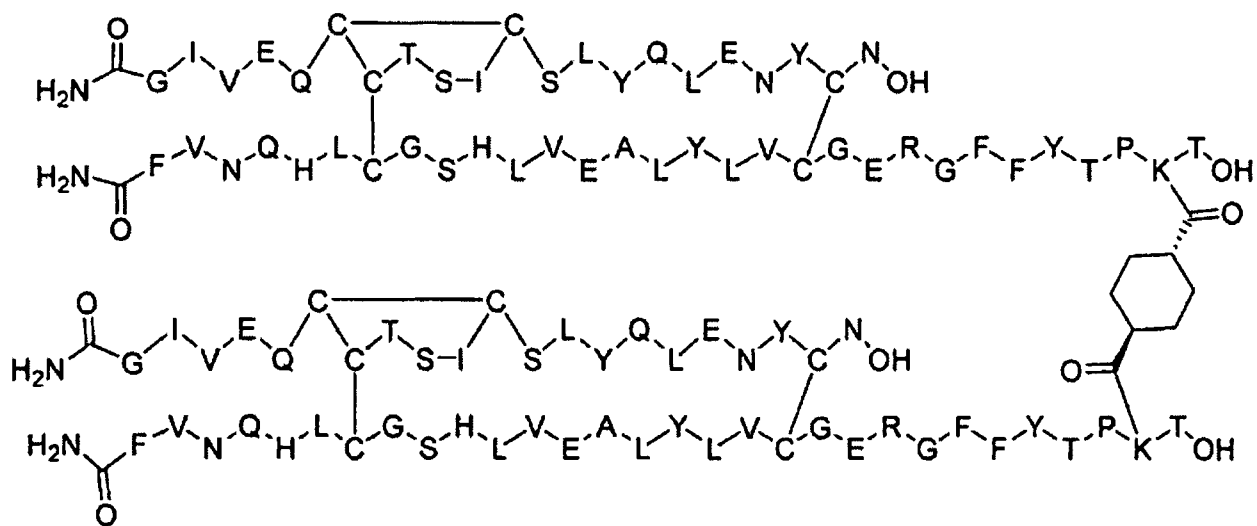
二聚體 74 ;



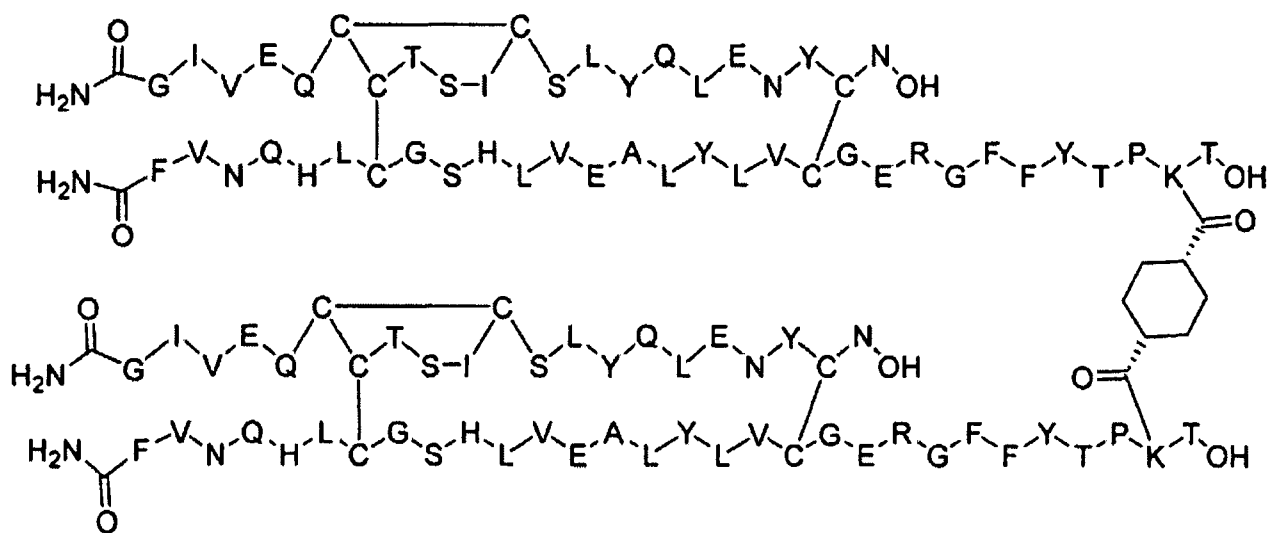
二聚體 75 ;



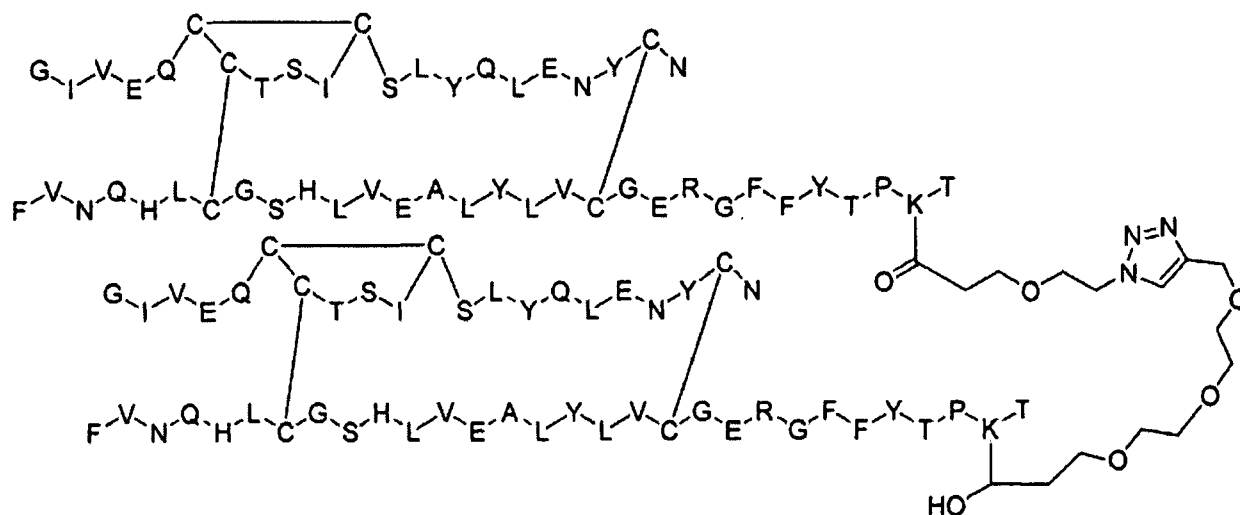
二聚體 76 ;



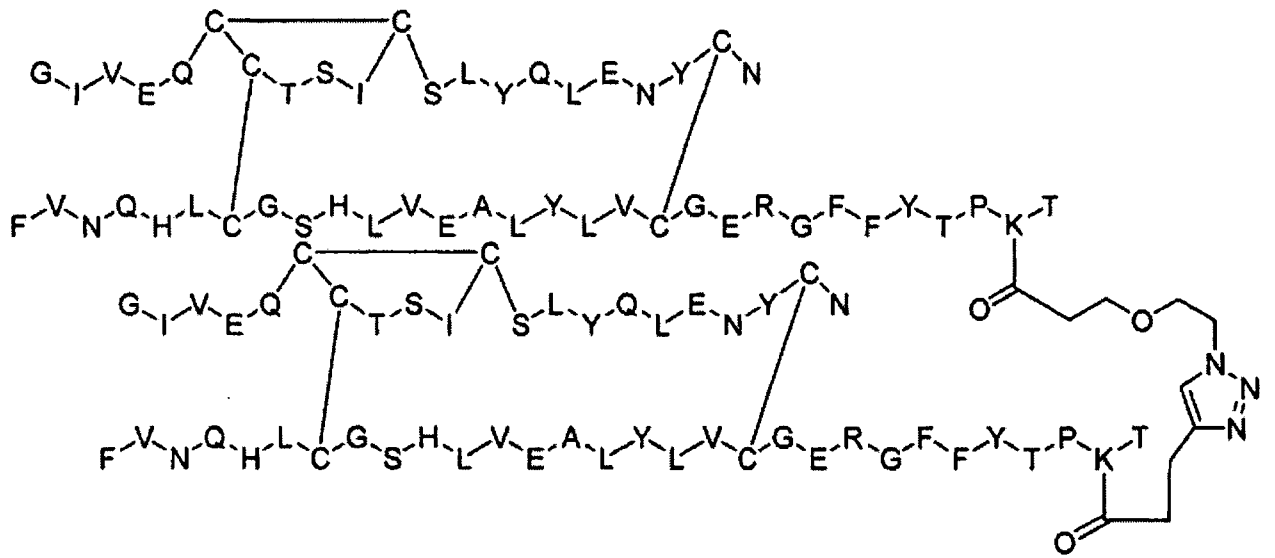
二聚體 77 ;



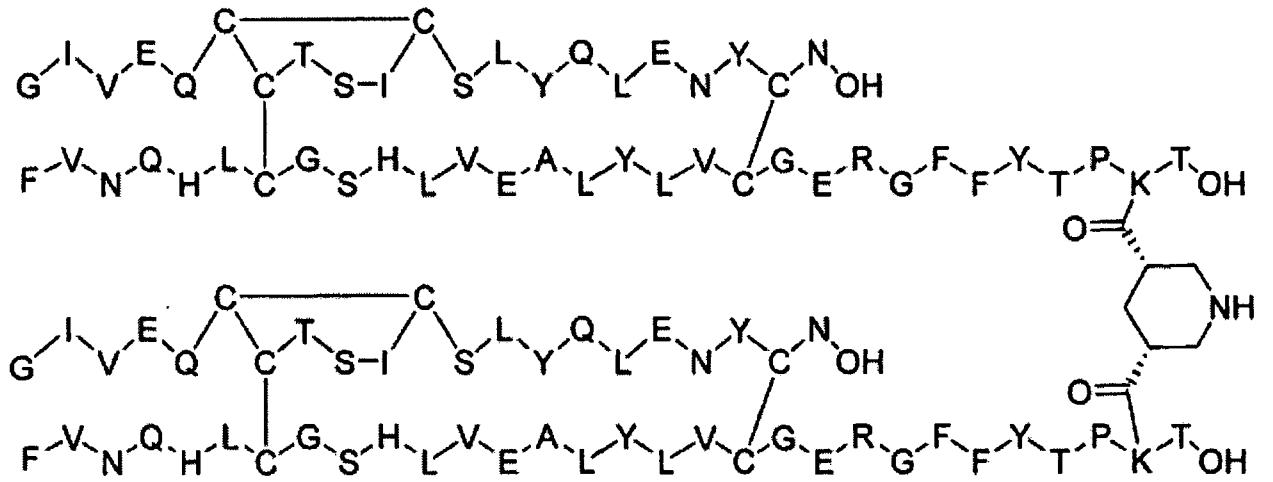
二聚體 78 ;



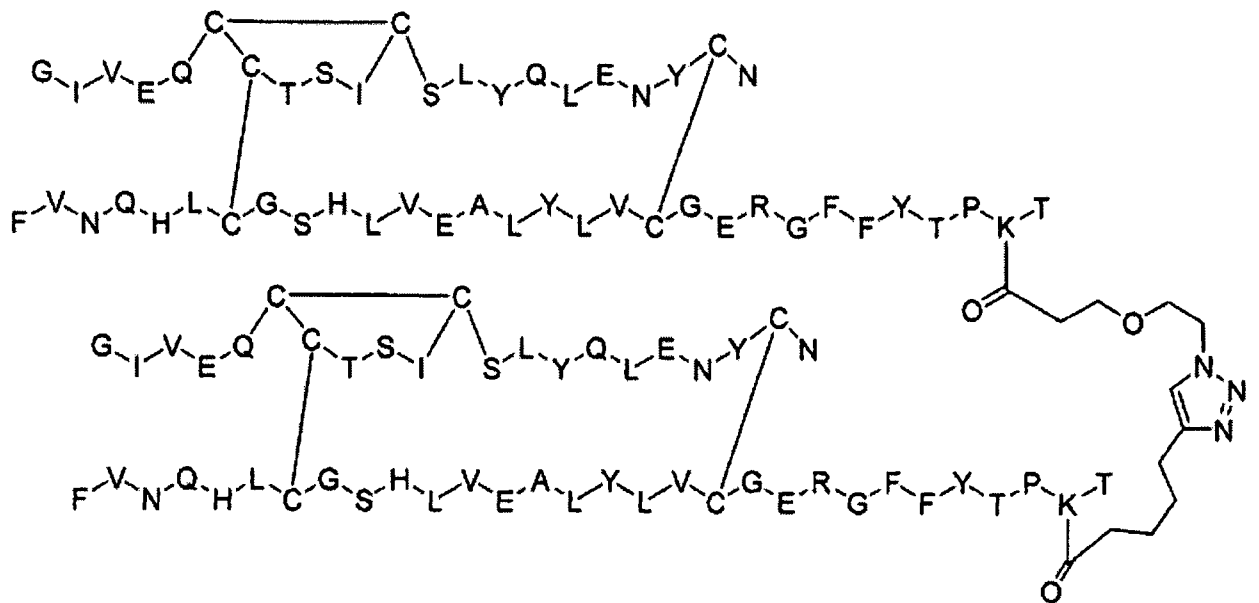
二聚體 79 ;



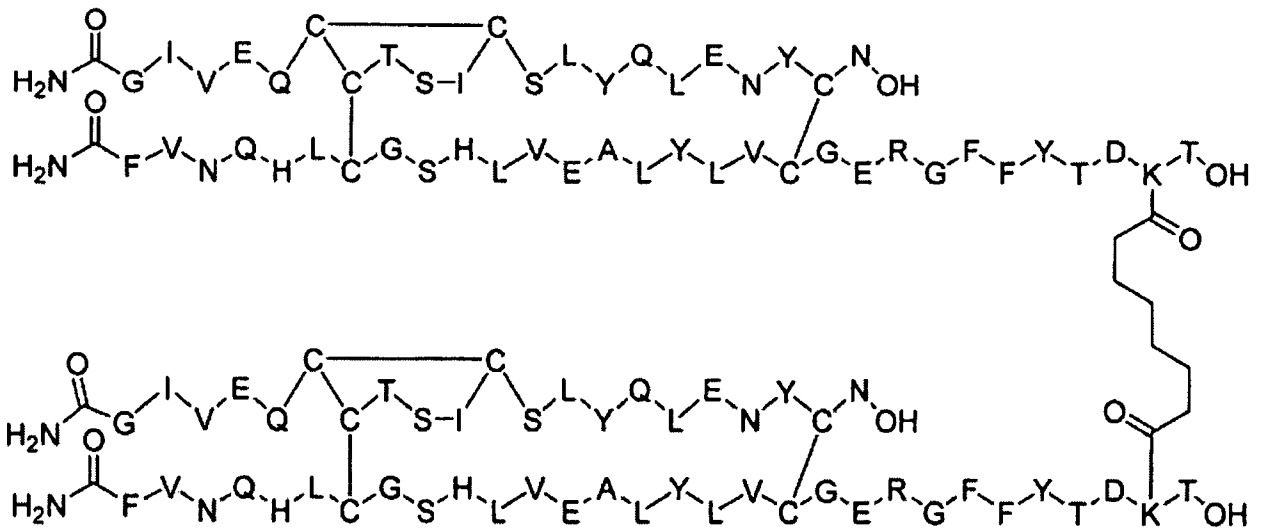
二聚體 80；



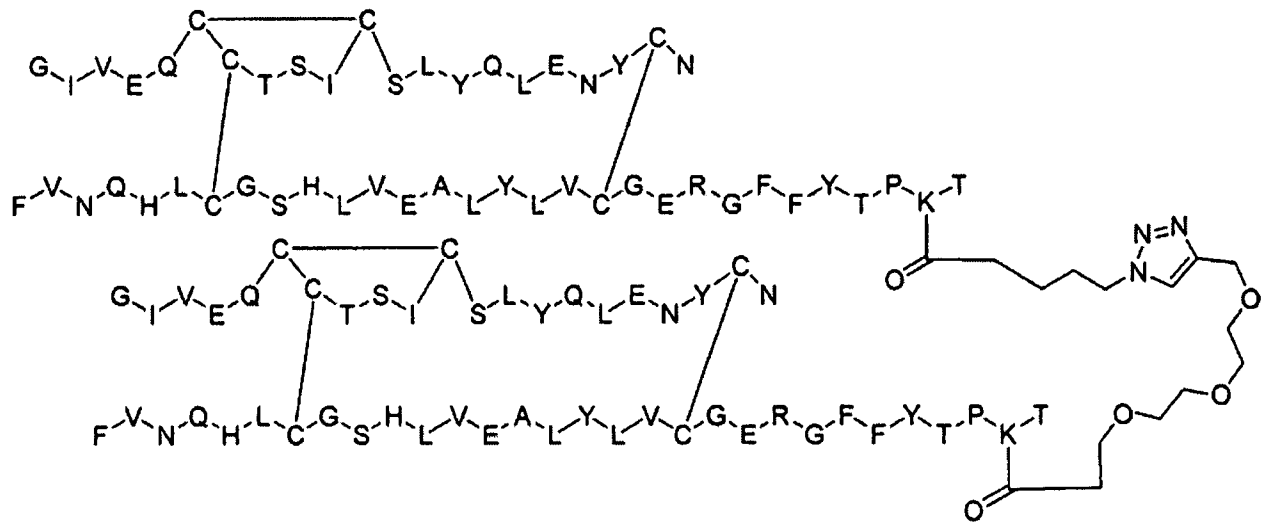
二聚體 81；



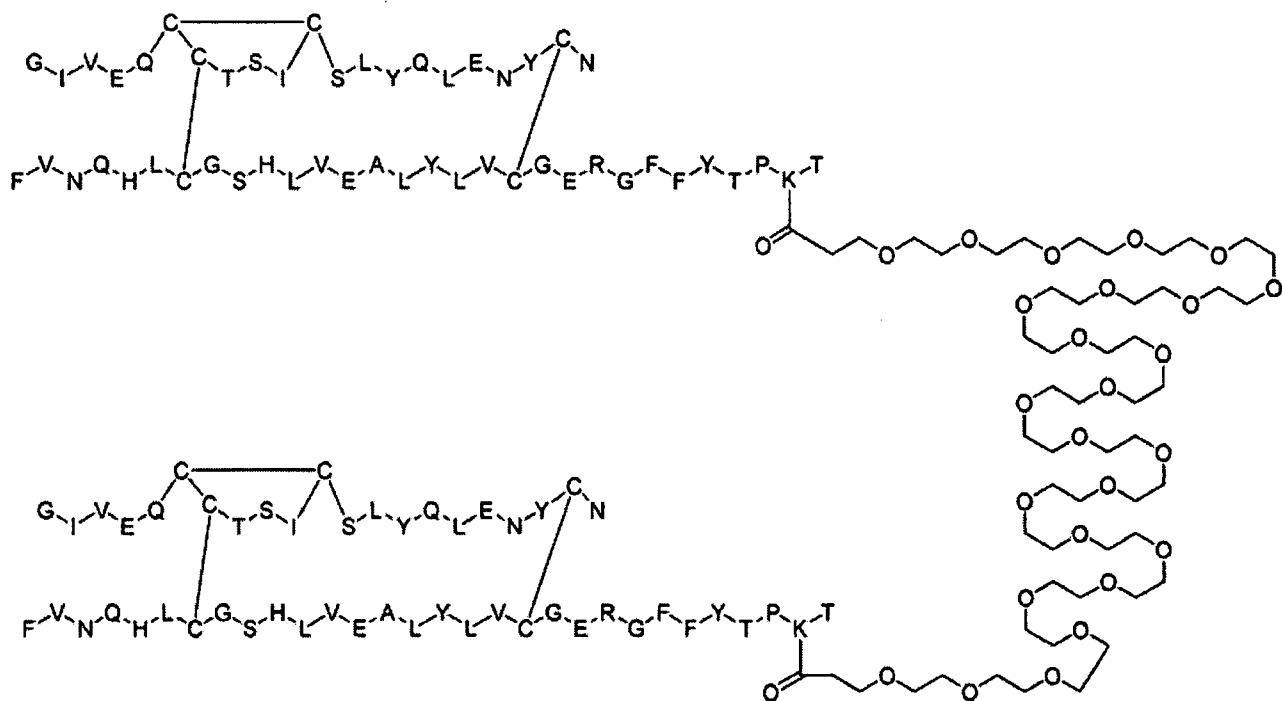
二聚體 82；



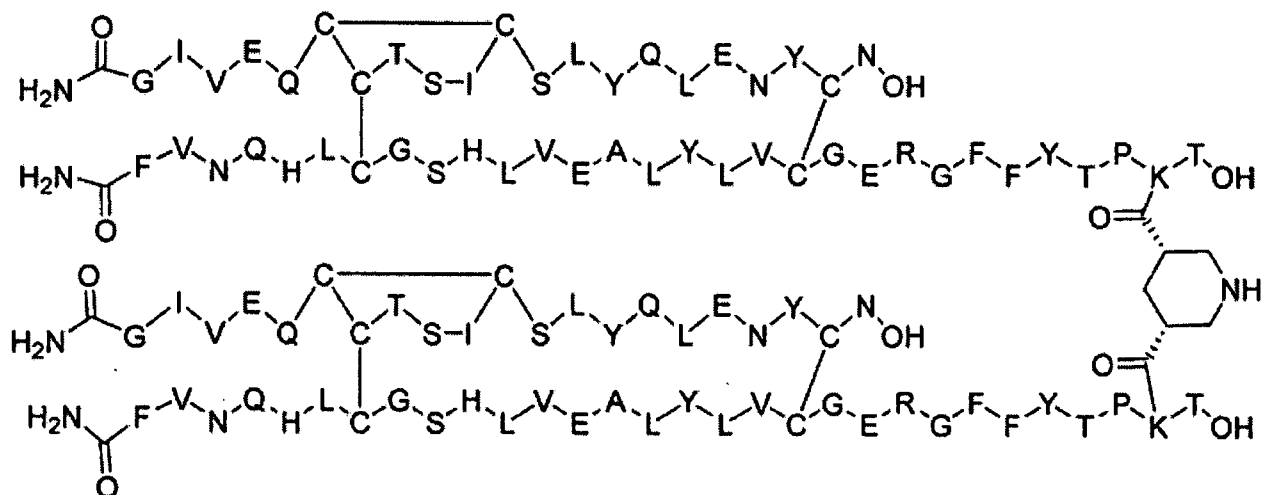
二聚體 83 ;



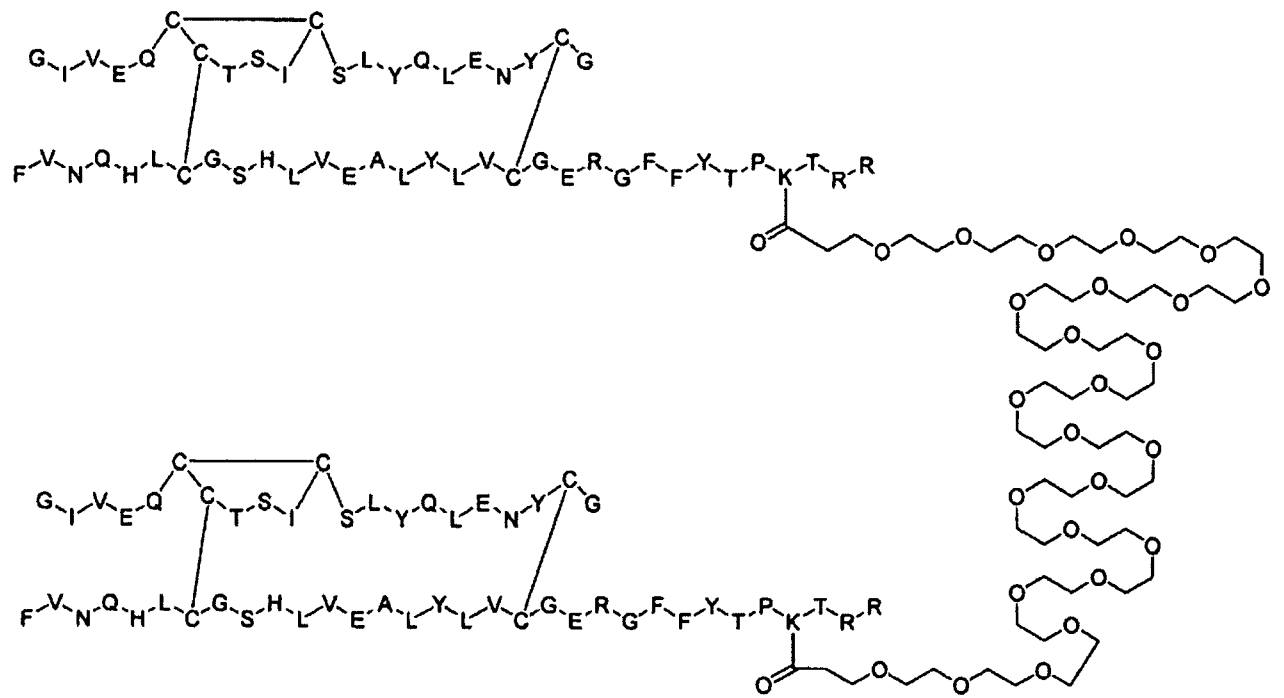
二聚體 84 ;



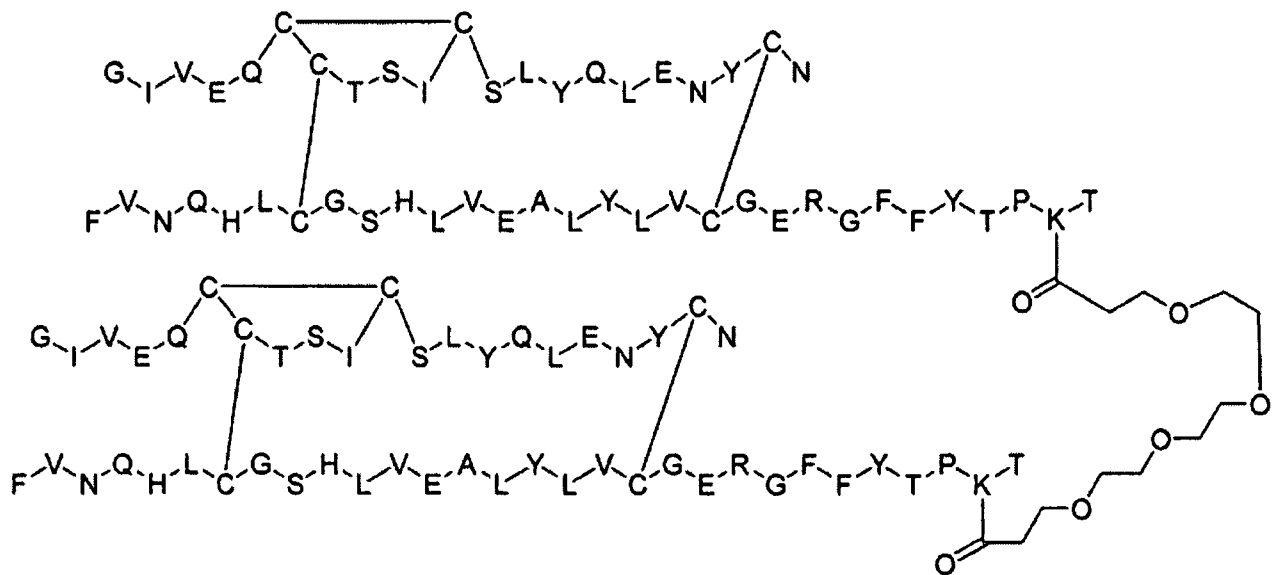
二聚體 85 ;



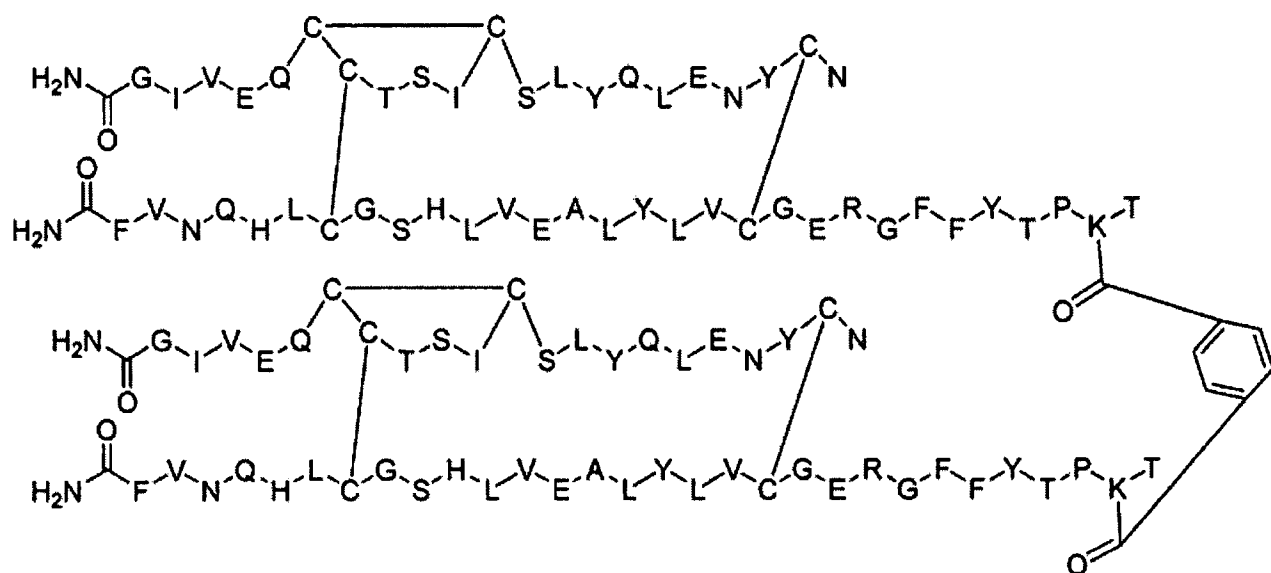
二聚體 86 ;



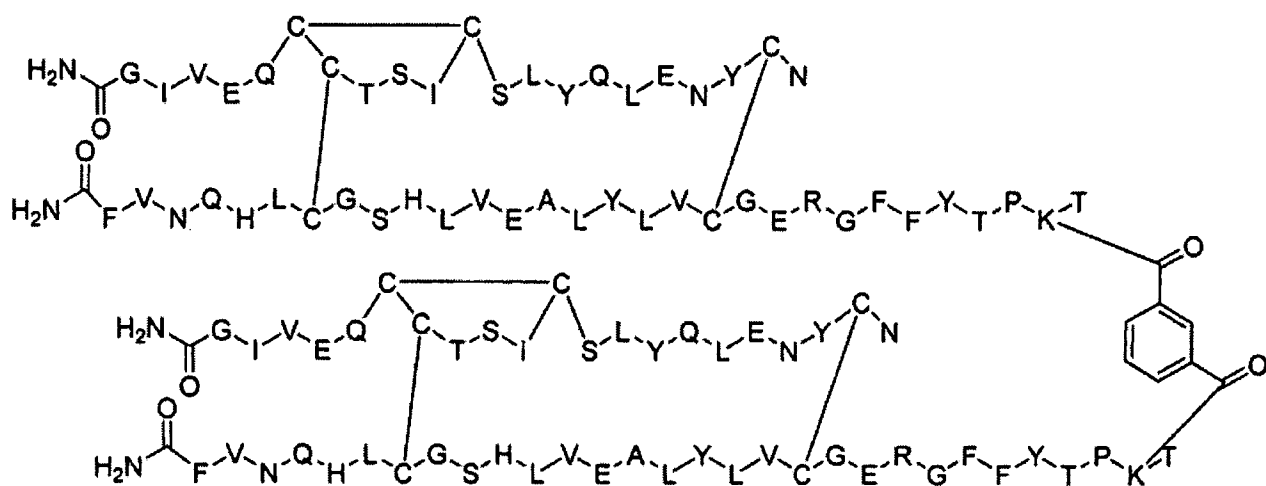
二聚體 87 ;



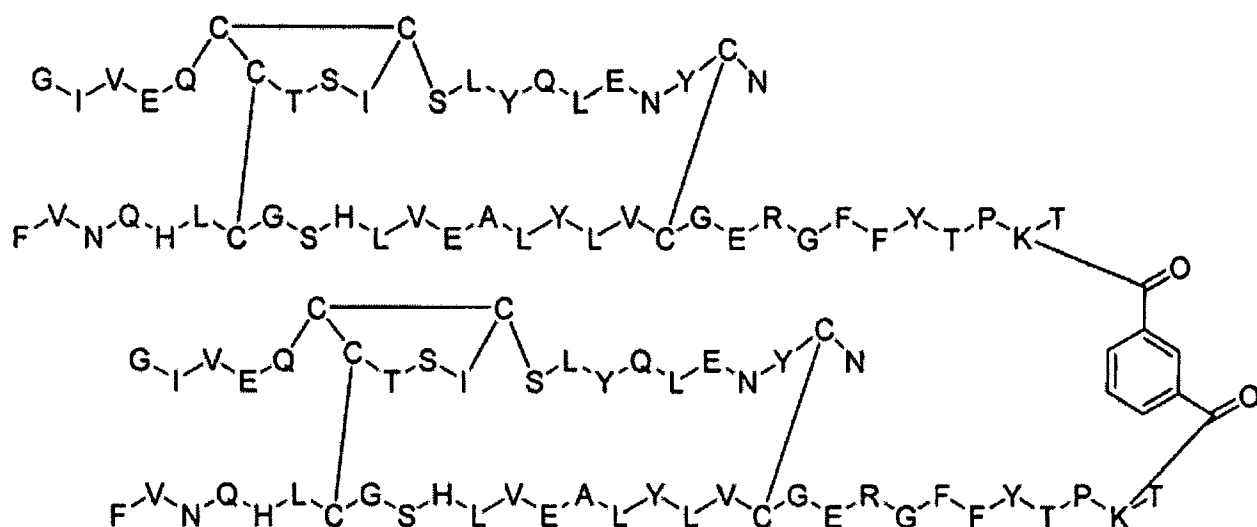
二聚體 88 ;



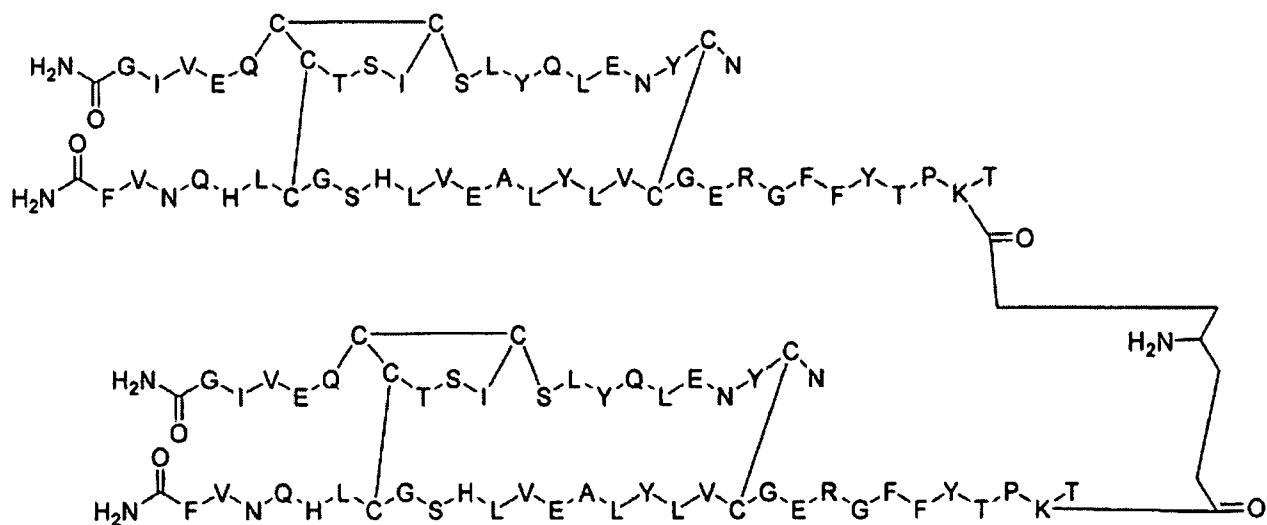
二聚體 89 ;



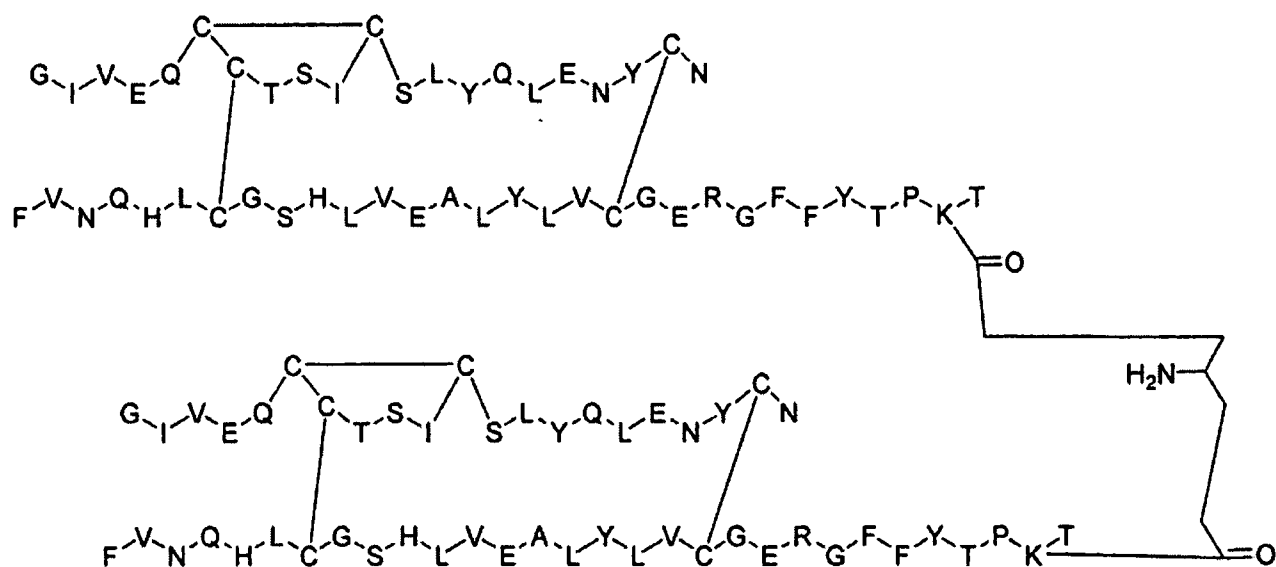
二聚體 90 ;



二聚體 91 ;



二聚體 93；及



二聚體 94

其中在A鏈多肽之Cys<sub>6</sub>與Cys<sub>11</sub>殘基之間之二硫鍵聯及在A鏈多肽之Cys<sub>7</sub>及Cys<sub>20</sub>至B鏈多肽之Cys<sub>7</sub>及Cys<sub>19</sub>之間之二硫鍵聯分別由於其間之實線表示；其中該等連接部分係共價連接至所示離胺酸殘基之ε胺基酸，其中二聚體1-40、42-52、54-86及88-94之A鏈多肽具有SEQ ID NO:1中所示之胺基酸序列；二聚體56之A鏈多肽具有SEQ ID NO:11中所示之胺基酸序列；二聚體1-17、21-27、36、37、39-40及42-52、54-82、84-86及88-94之B鏈多肽具有SEQ ID NO:2中所示之胺基酸序列；二聚體18及32-35之B鏈多肽具有SEQ ID NO:6中所示之胺基酸序列；二聚體19及83之B鏈多肽具有SEQ ID NO:9中所示之胺基酸序

列；二聚體**20**、**28-31**及**38**之B鏈多肽具有SEQ ID NO:10中所示之胺基酸序列；及二聚體**53**及**87**之A鏈多肽及B鏈多肽分別係SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8。

### 醫藥組合物

根據一個實施例，提供一種醫藥組合物，其包含較佳至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%純度水平之本文揭示之新穎胰島素二聚體中之任何一者及醫藥可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。此類組合物可含有至少0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml、5 mg/ml、6 mg/ml、7 mg/ml、8 mg/ml、9 mg/ml、10 mg/ml、11 mg/ml、12 mg/ml、13 mg/ml、14 mg/ml、15 mg/ml、16 mg/ml、17 mg/ml、18 mg/ml、19 mg/ml、20 mg/ml、21 mg/ml、22 mg/ml、23 mg/ml、24 mg/ml、25 mg/ml或更高濃度之如本文揭示之胰島素二聚體。在一個實施例中，該等醫藥組合物包含無菌及視需要儲存於各種包裝容器內之水溶液。在其他實施例中，該等醫藥組合物包含凍乾粉。該等醫藥組合物可進一步包裝為套組之一部分，該套組包括用於向病患投與該組合物之可棄式裝置。該等容器或套組可經標記以在周圍室溫下或在冷藏溫度下儲存。

據信所揭示之胰島素二聚體適用於先前已針對胰島素肽描述之任何用途。因此，本文所揭示之胰島素二聚體可用於治療高血糖症或治療由高血液葡萄糖水平引起之其他新陳代謝疾病。因此，本發明涵蓋包含如本文所揭示之胰島素二聚體及醫藥上可接受之載劑之用於治療罹患高血液葡萄糖水平之病患之醫藥組合物。根據一個實施例，待使用本文所揭示之胰島素二聚體進行治療之病患係家養動物及在另一實施例中待治療之病患係人類。

一種根據本發明治療高血糖症之方法包括以下步驟：使用任何標準投與途徑向病患投與本發明所揭示之胰島素二聚體，該等投與途

徑包括非經腸，諸如靜脈內注射；腹腔內注射；皮下或肌內注射；鞘內注射；透皮注射；經直腸；經口；經鼻或藉由吸入。在一個實施例中，該組合物係皮下注射或肌內注射投與。在一個實施例中，該組合物係非經腸投與及該胰島素多肽或其前藥衍生物係預包裝於注射器中。

本文所揭示之胰島素二聚體可單獨投與或與其他抗糖尿病藥劑組合投與。此項技術中已知或正待研究之抗糖尿病藥劑包括天然胰島素；天然升糖素及其功能類似物；磺醯基脲，諸如甲苯磺丁脲 (tolbutamide) (Orinase)、乙醯苯磺醯環己脲 (acetohexamide) (Dymelor)、妥拉磺脲 (tolazamide) (Tolinase)、氯磺丙脲 (chlorpropamide) (Diabinese)、格列吡嗪 (glipizide) (Glucotrol)、格列苯脲 (glyburide) (Diabeta、Micronase、Glynase)、格列美脲 (glimepiride) (Amaryl) 或格列齊特 (gliclazide) (Diamicron)；美格替耐 (meglitinides)，諸如瑞格列奈 (repaglinide) (Prandin) 或那格列奈 (nateglinide) (Starlix)；雙胍 (biguanides)，諸如二甲雙胍 (metformin) (Glucophage) 或苯乙雙胍 (phenformin)；噻唑烷二酮 (thiazolidinediones)，諸如羅格列酮 (rosiglitazone) (Avandia)、匹格列酮 (pioglitazone) (Actos) 或曲格列酮 (troglitazone) (Rezulin) 或其他 PPAR $\gamma$  抑制劑；抑制碳水化合物消化之  $\alpha$  葡萄糖苷酶抑制劑，諸如米格列醇 (miglitol) (Glyset)、阿卡波糖 (acarbose) (Precose/Glucobay)；艾塞那肽 (exenatide) (Byetta) 或普蘭林肽 (pramlintide)；二肽基肽酶-4 (DPP-4) 抑制劑，諸如維達列汀 (vildagliptin) 或西他列汀 (sitagliptin)；SGLT (鈉依賴性葡萄糖運輸蛋白 1) 抑制劑；或 FBPase (果糖 1,6-雙磷酸酶) 抑制劑。

包含本文所揭示之胰島素二聚體之醫藥組合物可使用標準之醫藥上可接受之載劑調配及使用熟悉此項技術者已知的投與途徑向病患

投與。因此，本發明亦涵蓋包含本文所揭示之胰島素二聚體中之一或多者或其醫藥上可接受之鹽及醫藥上可接受之載劑之組合之醫藥組合物。例如，包含本文所揭示之胰島素二聚體之醫藥組合物可視需要含有鋅離子、防腐劑(例如，苯酚、甲酚、對羥基苯甲酸酯)、等滲劑(例如，甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、右旋糖、海藻糖、氯化鈉、甘油)、緩衝物質、鹽、酸及鹼及亦含有其他賦形劑。此等物質在各情況下可個別存在或另一選擇作為混合物存在。甘油、右旋糖、乳糖、山梨糖醇及甘露糖醇通常以100-250 mM濃度，NaCl以高達150 mM濃度存在於該醫藥製劑中。緩衝物質(諸如例如磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、精胺酸、甘胺醯基甘胺酸或TRIS (即，2-胺基-2-羥基甲基-1,3-丙二醇)緩衝液)及相應之鹽以5-250 mM (通常約10至100 mM)之濃度存在。其他賦形劑可特別係鹽或精胺酸。

在一個實施例中，該醫藥組合物包含約4.0至約7.0 pH之1 mg/mL濃度之胰島素二聚體於磷酸鹽緩衝系統中。該等醫藥組合物可包含該胰島素二聚體作為唯一醫藥活性組分或該胰島素二聚體可與一或多種其他活性劑組合。

本文描述之所有治療方法、醫藥組合物、套組及其他類似實施例預期胰島素二聚體包括所有其醫藥上可接受之鹽。

在一個實施例中，該套組配備用於向病患投與該等胰島素二聚體組合物之裝置。該套組可進一步包括各種容器，例如，小瓶、管、瓶子及類似物。較佳地，該等套組亦將包括使用說明書。根據一個實施例，該套組之裝置係氣溶膠分配裝置，其中該組合物係預包裝於該氣溶膠裝置內。在另一實施例中，該套組包含注射器及針，及在一個實施例中，該胰島素二聚體組合物預係包裝於注射器內。

本發明化合物可藉由標準合成方法、重組DNA技術或任何其他製備肽及融合蛋白之方法來製備。儘管某些非天然胺基酸無法藉由標

準重組DNA技術表現，但其等製備技術係此項技術中已知。涵蓋非肽部分之本發明化合物可藉由當適用時，除標準肽化學反應外之標準有機化學反應來合成。

下列實例旨在促進進一步瞭解本發明。

## 實例

### 一般製程

除非另有說明，否則所有化學物質皆購買自商業來源。除非另有說明，否則反應通常在周圍溫度或在室溫下進行。對濕度或空氣敏感之反應係在氮或氬下使用無水溶劑及試劑進行。反應進程係藉由分析型薄層層析(TLC)及超高效液相層析-質譜法(UPLC-MS)監測。TLC係在經矽膠60F-254(層厚度0.25 mm)預塗覆之E. Merck TLC板上進行。該等板係使用254 nm UV及/或藉由曝露於鉬酸鈾銨(CAM)或對甲氧苯甲醛染色溶液接著炭化而可視化。超高效液相層析(UPLC)係在Waters Acquity™ UPLC®系統上進行。

UPLC-MS方法A：Waters Acquity™ UPLC® BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$  1.0x50 mm管柱以梯度10:90-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時2.0分鐘；流動速率0.3 mL/min，UV波長215 nm；UPLC-MS；

方法B：Waters Acquity™ UPLC® BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$  2.1x100 mm管柱以梯度60:40-100:0 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時4.0分鐘及100:0-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時40 sec；流動速率0.3 mL/min，UV波長200-300 nm；UPLC-MS；

方法C：Waters Acquity™ UPLC® BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$  2.1x100 mm管柱以梯度20:80-90:10 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時4.0分鐘及90:10-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時0.5分鐘；流動速率0.3 mL/min，UV波長200-300 nm；UPLC-MS；

方法D：Waters Acquity™ UPLC® BEH C8 1.7  $\mu\text{m}$  2.1x100 mm管

柱以梯度10:90-55:45 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時4.0分鐘及55:45-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時40 sec；流動速率0.3 mL/min，UV波長200-300 nm；UPLC-MS；

方法E：Waters Acquity™ UPLC® BEH300 C4 1.7 μm 2.1x100 mm管柱以梯度10:90-50:50 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時4.3分鐘及50:50-70:30 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時0.5分鐘；流動速率0.3 mL/min，UV波長200-300 nm；UPLC-MS；

方法F：Waters Acquity™ UPLC® BEH C8 1.7 μm 2.1x100 mm管柱以梯度20:80-72.5:27.5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時4.3分鐘及72.5:27.5-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05% TFA歷時0.5分鐘；流動速率0.3 mL/min，UV波長200-300 nm，及UPLC-MS；

方法G：Waters Acquity™ UPLC® BEH C8 1.7 μm 2.1x100 mm管柱以梯度20:80-90:10 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.1% TFA歷時4.0分鐘及90:10-95:5 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.1% TFA歷時0.4分鐘；流動速率0.3 mL/min，UV波長200-300 nm。

質量分析係在具有陽離子偵測模式下之電噴霧電離及質荷比之掃描範圍係170-900之Waters SQ偵測器或具有陽離子偵測模式下之電噴霧電離及質荷比之掃描範圍係300-2000之Waters Micromass® LCT Premier™ XE上進行。所產生之胰島素結合物或IRPA之識別係藉由比較理論分子量與使用UPLC-MS測得之實驗值來證實。就連接部分之測定而言，具體言之，使胰島素二聚體經受DTT處理(針對a/b鏈)或Glu-C消化(有或無還原及烷基化)，及然後所得之肽藉由LC-MS分析。基於測得之質量，推導連接部分。

急驟層析係使用 Biotage 急驟層析設備 (Dyax Corp.) 或 CombiFlash®Rf儀器 (Teledyne Isco) 進行。正相層析係在具有指定尺寸之經預包裝之濾筒中之矽膠(20-70 μm，60 Å孔徑)上進行。離子交換

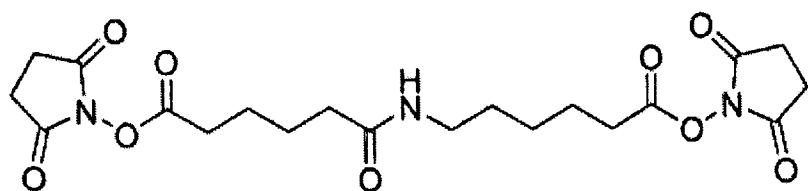
層析係在具有親水性、陰離子性聚(2-磺乙基天冬醯胺)結合塗層之基於矽石之材料(PolySULFOETHYL A管柱, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 1000 Å孔徑)上進行。反相層析係在具有指定尺寸之經預包裝之濾筒中之C18結合之矽膠(20-60  $\mu\text{m}$ , 60-100 Å孔徑)上進行。製備級HPLC係在Gilson 333-334二元系統上使用Waters DELTA PAK C4 15  $\mu\text{m}$ , 300 Å, 50x250 mm管柱或KROMASIL® C8 10  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 50x250 mm管柱, 流動速率85 mL/min, 以指定梯度進行。溶液之濃縮係在旋轉蒸發器上在減壓下進行或冷凍乾燥係在VirTis Freezemobile冷凍乾燥機(SP Scientific)上進行。

縮寫：乙腈(AcCN)；水性(aq)；N,N-二異丙基乙胺或Hünig氏鹼(DIPEA)；N,N-二甲基甲醯胺(DMF)；二甲基亞砷(DMSO)；乙酸乙酯(EtOAc)；N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)；公克(g)；1-羥基苯并三唑水合物(HOBt)；小時(h或hr)；質譜(ms或MS)；微克( $\mu\text{g}$ )；微升( $\mu\text{L}$ )；微莫耳( $\mu\text{mol}$ )；毫克(mg)；毫升(mL)；毫莫耳(mmol)；分鐘(min)；滯留時間( $R_t$ )；室溫(rt)；飽和(sat.或sat'd)；飽和水性氯化鈉溶液(鹽水)；三乙胺(TEA)；三氟乙酸(TFA)及四氟硼酸N,N,N',N'-四甲基-O-(N-琥珀醯亞胺基)脲鎗(TSTU)。

術語「RHI」係指重組人類胰島素且用於指示該胰島素具有天然野生型人類胰島素之胺基酸序列特性。如本文使用於表中, 該術語指示包含該二聚體之胰島素之胺基酸序列係具有天然野生型人類胰島素之胺基酸序列。

#### 實例1

描述6-((6-((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)-6-側氧基己基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯(連接子1; C6+NC6)之合成。



步驟1：6-((6-(苄基氧基)-6-側氧基己基)胺基)-6-側氧基己酸苄酯

向己二酸單苄酯(600 mg, 2.54 mmol)及4-甲基苯磺酸6-(苄基氧基)-6-側氧基己-1-銨(1.0 g, 2.54 mmol)於DMF (12.71 mL)中之混合物中添加HOBt (584 mg, 3.81 mmol)、Hunig氏鹼(888  $\mu$ L, 5.08 mmol)及EDC (731 mg, 3.81 mmol)。攪拌過夜後，該反應混合物分配在飽和 $\text{NaHCO}_3$ 與EtOAc之間。分離有機相，用1.0 M HCl及鹽水清洗，在 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上乾燥並濃縮以產生呈半固體之標題化合物且無需進一步純化即可用於下一步驟中。UPLC-MS方法A： $R_t = 1.26$  min,  $m/z = 440.3$  [M+1]。

步驟2：6-((5-羧基戊基)胺基)-6-側氧基己酸

在50 psi  $\text{H}_2$ 下攪拌步驟1之產物(1.08 g, 2.457 mmol)及Pearlman氏觸媒(20重量%碳載, 173 mg, 0.246 mmol)於MeOH (50 mL)中之懸浮液過夜。過濾掉該觸媒及使濾液在C8相上經受反相層析(Kromasil, C8 10  $\mu$ m 100  $\text{\AA}$ , 250 x 50mm; 溶劑A=水/0.05%TFA, 溶劑B=AcCN/0.05%TFA), 流動速率=85 mL/min, 30分鐘內B於A中之5-30%梯度。UPLC-MS方法A： $R_t=0.40$  min,  $m/z = 260.15$  [M+1]。

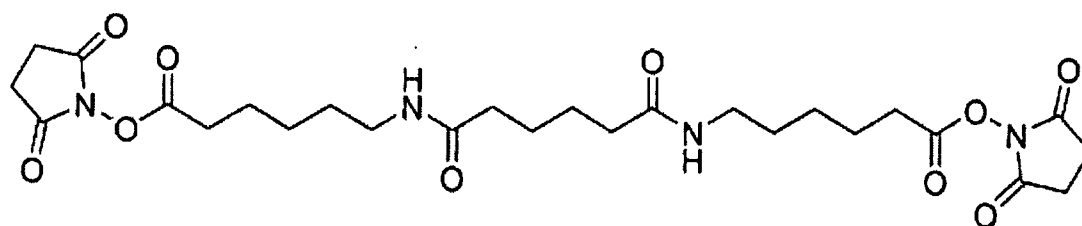
步驟3：6-((6-((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)-6-側氧基己基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-酯

向步驟2之產物(50 mg, 0.193 mmol)於DMF (964  $\mu$ L)中之溶液中添加TSTU (116 mg, 0.386 mmol)。冷卻至 $0^\circ\text{C}$ 後，向該混合物中添加三乙胺(53.8  $\mu$ L, 0.386 mmol)。攪拌45分鐘後，觀察到所需化合物之形成：UPLC-MS方法A： $R_t = 0.71$  min,  $m/z = 453.4$  [M+1]。所得之6-((6-((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)-6-側氧基己基)胺基)-6-側氧基

己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯作為DMF中之0.2 M溶液使用而無需純化。

### 實例2

描述6,6'-(己二醯基雙(氮二基))二己酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(連接子2； C<sub>6</sub>N+C<sub>6</sub>+NC<sub>6</sub>)之合成。



#### 步驟1：6,6'-(己二醯基雙(氮二基))二己酸二苄酯

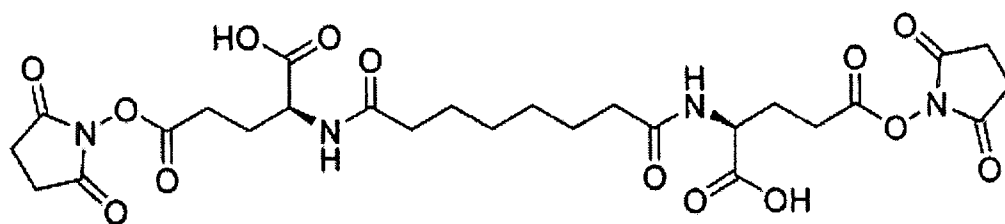
向4-甲基苯磺酸6-(苄基氧基)-6-側氧基己-1-胺(2.693 g, 6.84 mmol)及己二酸(500 mg, 3.42 mmol)於DMF (17.1 mL)中之溶液中添加Hunig氏鹼(1.793 mL, 10.26 mmol)、HOBt (1.572 g, 10.26 mmol)及EDC (1.968 g, 10.26 mmol)。攪拌過夜後，將該反應混合物倒入水(500 mL)中並攪拌30分鐘。透過過濾收集呈固體之標題化合物並藉由空氣吸入乾燥。UPLC-MS方法A：R<sub>t</sub>=1.23 min, m/z=553.5 [M+1]。

步驟2：6,6'-(己二醯基雙(氮二基))二己酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)

使用類似於彼等針對實例1描述之製程者，在步驟2中以6,6'-(己二醯基雙(氮二基))二己酸二苄酯取代6-((6-(苄基氧基)-6-側氧基己基)胺基)-6-側氧基己酸苄酯以製備標題化合物。UPLC-MS方法A：R<sub>t</sub> = 0.74 min, m/z = 567.4 [M+1]。

### 實例3

描述(2S,2'S)-2,2'-(辛二醯基雙(氮二基))雙(5-((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)-5-側氧基戊酸)(連接子3；γ-Glu-辛二酸-γ-Glu)之合成。



步驟1：(S)-5-(苄基氧基)-4-(8-(((S)-1-(苄基氧基)-4-羧基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-8-側氧基辛醯胺基)-5-側氧基戊酸

向H-GLU-OBZL (1.00 g, 4.21 mmol)於DMF (10.5 mL)中之溶液中添加三乙胺(5.875 mL, 42.1 mmol)，接著添加辛二酸二琥珀醯亞胺酯(776 mg, 2.107 mmol)。攪拌1小時後，濃縮該反應混合物並在C18管柱(ISCO 44 g)上純化所得殘餘物，流速=37 mL/min；在20分鐘內於含0.05%TFA之水中之AcCN梯度：2%-20%，接著保持。凍乾後，獲得中間物雙-羧酸。UPLC-MS方法B:  $R_t = 2.66$  min,  $m/z = 613.3$  [M+1]。

步驟2：(S)-5-(苄基氧基)-4-(8-(((S)-1-(苄基氧基)-4-羧基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-8-側氧基辛醯胺基)-5-側氧基戊酸之雙-N-羥基琥珀醯亞胺酯

向步驟1之產物(455 mg, 0.743 mmol)於乙腈(7.4 mL)中之懸浮液中添加固體TSTU (492 mg, 1.634 mmol)，接著添加三乙胺(228  $\mu$ L, 1.634 mmol)，此時懸浮液溶解。攪拌該反應混合物1.5小時並在室溫下於旋轉蒸發器上濃縮。藉由反相層析於C-8相(管柱Kromasil, C8 10  $\mu$ m 100A, 尺寸250 x 50 mm；溶劑A=水/0.05%TFA, 溶劑B=AcCN/0.05%TFA)上純化該產物，流速=85 mL/min, 在30分鐘內B於A中之10-80%梯度。溶離份凍乾後，獲得雙-NHS酯。UPLC-MS方法B:  $R_t = 2.77$  min,  $m/z = 807$  [M+1]。

步驟3：(2S,2'S)-2,2'-(辛二醯基雙(氮二基))雙(5-((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)-5-側氧基戊酸)

使用碳載鈀(66.0 mg, 0.031 mmol)作為觸媒及含有0.1% TFA之丙酮作為溶劑(6.2 mL)在1 atm之氬下氫化步驟2之產物(250 mg, 0.310 mmol)過夜。過濾掉觸媒並濃縮該濾液以產生標題化合物。在高真空下泵抽過夜。UPLC-MS方法C:  $R_t = 3.61$  min,  $m/z = 627.3$  [M+1]。

#### 實例4

一般方法A: N<sup>6</sup>,B<sup>29</sup>胰島素結合物(類似物)之合成

在適當尺寸之容器中，在室溫下輕輕攪拌地使胰島素或胰島素類似物溶解於混合溶劑：2:3 v/v 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:AcCN中。該混合物澄清後，使用鹼性溶液(例如，0.1 N NaOH)將該pH調整至10.5-10.8之值。在不同之小瓶中，使經活化之酯中間物(連接部分)在室溫下溶解於有機溶劑(例如，DMSO)中。在一段時間內將經活化之酯(連接子)之溶液之分液添加至含有胰島素之溶液中直至UPLC層析圖顯示大部分未經修飾之胰島素已反應且大量該反應混合物已轉化為B29-結合之胰島素。藉由添加胺親核試劑(例如，2-胺基乙醇)中止該反應。在室溫下攪拌該反應溶液30分鐘。用冷H<sub>2</sub>O (20x)在0°C下小心稀釋所得溶液並使用1 N HCl (及若需要，使用0.1 N NaOH)將其pH調整至2.5之最終pH。首先藉由超濾(透過切向流過濾(TFF)系統或使用Amicon Ultra-15離心單元)以1K、3K或10K MWCO膜濃縮該溶液。使經濃縮之溶液通常首先經受離子交換層析(PolySULFOETHYL A管柱，PolyLC Inc.，250x21 mm，5 μm，1000 Å；緩衝液A：0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN；緩衝液B：0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl)。合併含有具有所需純度之B29-結合物之溶離份並使用TFF系統或Amicon Ultra-15濃縮。然後所得溶液藉由反相HPLC (Waters C4 250x50 mm管柱，10 μm，1000 Å管柱或Kromasil C8 250x50 mm，10 μm，100Å管柱；緩衝液A：0.05-0.1% TFA於水中；緩衝液B：0.05-0.1% TFA於AcCN中)進一步純化。合併含有標題結合物之溶離份

及凍乾或使用TFF系統及/或Amicon Ultra-15進行緩衝液交換以產生標題產物。

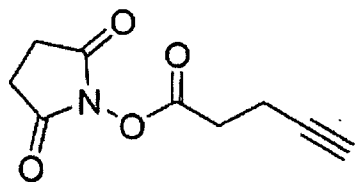
#### 實例5

描述 $N^{6,29B}$ -5-疊氮基-戊醯基desB30胰島素(A:Y19A) (類似物1)之合成。

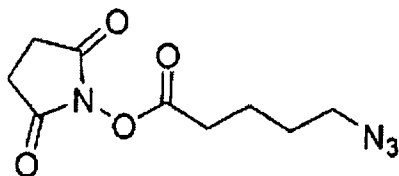
在20 mL閃爍小瓶中，在室溫下輕輕攪拌地使desB30 A:Y19A胰島素(112 mg, 0.020 mmol)溶解於混合溶劑(2 mL, 2:3 v/v 0.1 M  $Na_2CO_3$ :AcCN)中。該混合物澄清後，使用鹼性溶液(例如，0.1 N NaOH)將該pH調整至10.5-10.8之值。在不同之8 mL閃爍小瓶中，使5-疊氮基戊酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-酯(連接子5；參見實例6) (4.79 mg, 0.020 mmol)在室溫下溶解於DMSO (500  $\mu$ L)中。在一段時間內將經活化之酯之溶液之分液添加至含有胰島素之溶液中直至UPLC層析圖顯示大部分未經修飾之胰島素已反應及大量該反應混合物已轉化為B29-結合之胰島素。藉由添加胺親核試劑(例如，2-胺基乙醇)中止該反應。在室溫下攪拌該反應溶液30分鐘。用冷 $H_2O$  (20x)在 $0^\circ C$ 下小心稀釋所得溶液並使用1.0 N HCl (及若需要，使用0.1 N NaOH)將其pH調整至2.5之最終pH。首先藉由超濾使用Amicon Ultra-15離心單元以3K或10K MWCO膜濃縮該溶液。使經濃縮之溶液經受反相HPLC (KROMASIL C8 250x50 mm, 10  $\mu$ m, 100Å管柱，25-35%緩衝液B於緩衝液A中歷時20分鐘；緩衝液A：0.05% TFA溶於水中；緩衝液B：0.05% TFA溶於AcCN中)。合併含有類似物1之溶離份及然後凍乾。UPLC-MS方法D：Rt = 3.91 min, m/z = 1435.86 [(M+4)/4]。

#### 實例6

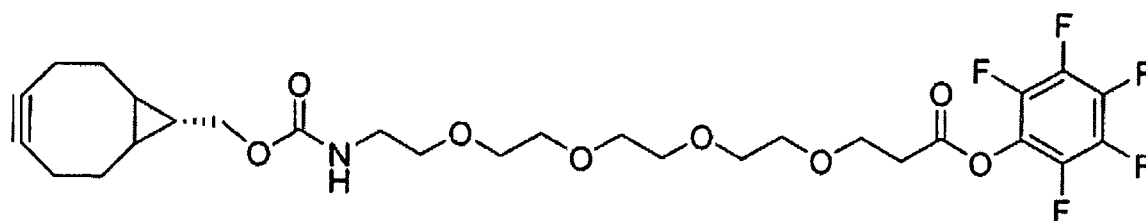
$N^{6,29B}$ 經醯化之RHI類似物2、類似物3及類似物4係經製備以用於使用「點擊」化學構築二聚體及使用一般方法A或類似於彼等針對實例4描述之製程但取代重組人類胰島素及以下中之任何一者：



(戊-4-炔酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯；連接子4)；



(疊氮基戊酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯；連接子5)；或



(1-(雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基)-3-側氧基-2,7,10,13,16-五氧雜-4-氮雜十九-19-酸全氟苯酯)(連接子6)以分別製造類似物2、類似物3或類似物4來製備。除類似物5使用UPLC-MS方法F表徵外，該等類似物使用UPLC-MS方法D表徵。

表1

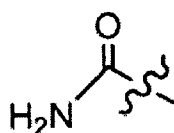
| 類似物 | 連接部分 | Rt (min) | (M+4)/4 |
|-----|------|----------|---------|
| 2   |      | 4.08     | 1472.56 |
| 3   |      | 4.10     | 1483.89 |
| 4   |      | 3.94     | 1558.58 |

波浪線指示與該胰島素分子之B29 Lys之 $\epsilon$ 胺基間的鍵。

實例7

描述 $N^{2,1A},N^{2,1B}$ -雙(胺甲醯基)人類胰島素(類似物5)之合成。

向RHI (1g, 0.172 mmol)於水(50 mL)中之懸浮液中添加磷酸二氫鉀(0.249 g, 1.429 mmol)於水(5.0 mL)中之溶液。在室溫下攪拌30分鐘後，向所得混合物中添加氰酸鉀(0.279 g, 3.44 mmol)。該反應混合物容許攪拌16小時。為停止該反應，藉由TFF使用MWCO 3K透濾裝置移除未反應之氰酸鉀，及藉由凍乾以固體形式分離該產物。該產物含有約10-35%之A1/B1/B29-參-脲-RHI，其可視需要藉由反相層析在C8相(管柱KROMASIL, C8 10  $\mu\text{m}$  100Å, 250 x 50 mm; 溶劑A=水/0.05%TFA, 溶劑B=AcCN/0.05%TFA, 流動速率=85 mL/min, 在30分鐘內B於A中之26-34%梯度)上移除。UPLC-MS方法D:  $R_t=4.29$  min,  $m/z=1474.6$  ( $z=4$ )。該N端取代基具有以下結構：

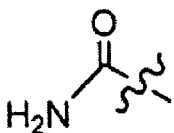


(胺甲醯基)，其中波浪線指示在該取代基與該N端胺基酸之N2氮間之鍵。

#### 實例8

描述 $N^{2,1A},N^{2,1B}$ -雙(胺甲醯基)desB30人類胰島素(類似物6)之合成。

使用類似於彼等針對實例7描述者之製程以desB30胰島素取代RHI製備標題化合物。UPLC-MS方法D:  $R_t = 4.10$  min,  $m/z = 1448.9$  ( $z = 4$ )。該N端取代基具有以下結構：

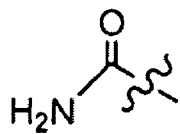


(胺甲醯基)，其中波浪線指示在該取代基與該N端胺基酸之N2氮間之鍵。

#### 實例9

描述 $N^{2,1A},N^{2,1B}$ -雙(胺甲醯基)離脯胰島素(類似物7)之合成。

使用類似於彼等針對實例7描述者之製程以離脯胰島素取代RHI製備標題化合物。UPLC-MS方法D：Rt = 4.07 min，m/z = 1473.6 (z = 4)。該N端取代基具有以下結構：

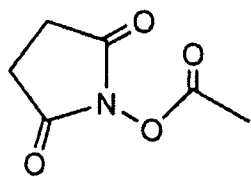


(胺甲醯基)，其中波浪線指示在該取代基與該N端胺基酸之N2氮間之鍵。

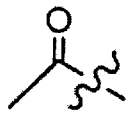
#### 實例10

描述N<sup>2,1A</sup>-乙醯基人類胰島素(類似物8)之合成。

向RHI (400 mg，0.069 mmol)於DMSO (4.6 mL)中之溶液中滴加乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯



(10.82 mg，0.069 mmol)於100  $\mu$ L DMSO中之溶液。攪拌3小時後，用水(95 mL)稀釋該反應混合物，將其酸化至約3之pH，及然後透過Amicon Ultra-15離心單元以3或10K MWCO膜透濾以移除大部分DMSO。使所得溶液首先經受使用在24分鐘內緩衝液B於緩衝液A中之10-40%梯度的離子交換層析(PolySULFOETHYL A管柱，PolyLC Inc.，250x21 mm，5  $\mu$ m，1000 Å，流動速率15 mL/min；緩衝液A：0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN；緩衝液B：0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5M NaCl)。合併含有所需N<sup>2,1A</sup>-乙醯基-RHI之溶離份及濃縮，且然後經受反相層析(KROMASIL，C8 10 $\mu$ m 100 Å，250 x 50mm；溶劑A = 水 /0.05%TFA，溶劑B=AcCN/0.05%TFA，B於A中之26-30%梯度)。使用DTT證實修飾位置。UPLC-MS方法D：Rt=3.5 min及m/z = 1463.5 (z = 4)。該N端取代基具有以下結構：



(乙醯基)，其中波浪線指示在該取代基與該N端胺基酸之

N2氮間之鍵。

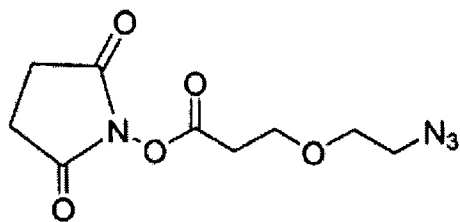
### 實例11

描述 $N^{2,1A}, N^{2,1B}$ -雙(胺甲醯基)  $N^{6,29B}$ -經醯化之RHI。

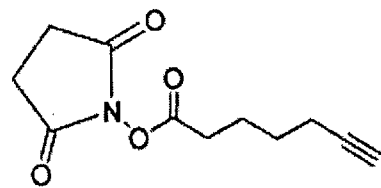
使用一般方法A或類似於彼等針對實例4描述者之製程製備結合至疊氨基戊酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯(連接子5)以構築類似物9或結合至戊-4-炔酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯(連接子4)以構築類似物10之類似物5。

### 實例12

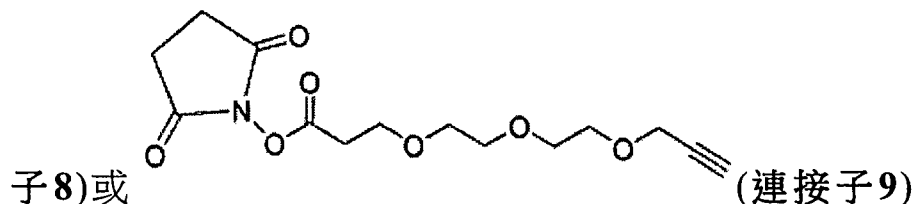
下列 $N^{6,29B}$ 經醯化之RHI類似物(類似物11、類似物12及類似物13)係經製備以用於使用「點擊」化學構築二聚體。該等類似物係使用一般方法A或類似於彼等針對實例4描述者之製程但取代重組人類胰島素(RHI)及選自由以下組成之群之適當之連接部分



(連接子7)、



(連接

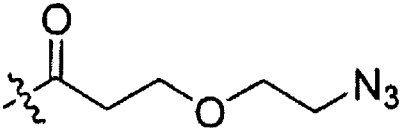
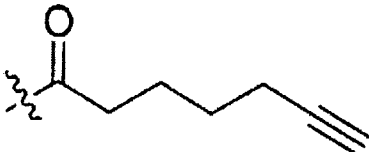
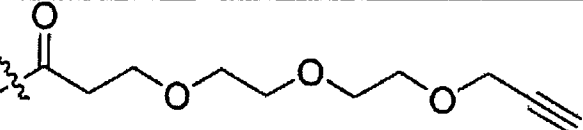


子8)或

(連接子9)

以分別製造類似物11、類似物12或類似物13來製備。除類似物12使用UPLC-MS方法F表徵外，該等類似物使用UPLC-MS方法D表徵。

表2

| 類似物 | 連接部分  | Rt    | (M+4)/4 |
|-----|---|-------|---------|
|     |   | (min) |         |
| 11  |  | 3.26  | 1488.11 |
| 12  |  | 3.97  | 1479.30 |
| 13  |  | 3.27  | 1502.26 |

波浪線指示與該胰島素分子之B29 Lys之ε胺基間的鍵。

## 實例13

一般方法B：使用有機鹼條件合成 $N^{6,29B}, N^{6,29B'}$ -胰島素二聚體

在適當尺寸之容器中，使胰島素或胰島素類似物在室溫下在鹼（例如，TEA）之存在下懸浮於有機溶劑或混合水性(aq)/有機溶劑（例如，DMSO）中。容許輕輕攪拌該混合物直至胰島素完全溶解。向所得溶液中添加在有機溶劑（諸如DMSO或DMF）中之經活化之酯中間物（連接子）。UPLC後，層析圖顯示大部分該反應混合物已轉化為 $N^{6,29B}, N^{6,29B'}$ -胰島素二聚體（或 $N^{6,28B}, N^{6,28B'}$ -離脯胰島素二聚體）。該反應混合物可直接經受反相HPLC純化（Waters C4 250x50 mm管柱，10  $\mu\text{m}$ ，1000 Å管柱或KROMASIL C8 250x50 mm，10  $\mu\text{m}$ ，100Å管柱；緩衝液A：0.05-0.1% TFA於去離子水中；緩衝液B：0.05-0.1% TFA於AcCN中），或該反應可藉由用冷酸性 $\text{H}_2\text{O}$ （20x，pH約3.0）在0°C下小心稀釋來中止並使用1 N HCl（及若需要，使用0.1 N NaOH）將其pH調整至2.5之最終pH。該溶液可首先藉由超濾（透過切向流過濾（TFF）系統或使用Amicon Ultra-15離心單元）以1K、3K或10K MWCO膜濃縮。使經濃縮之溶液通常首先經受離子交換層析（PolySULFOETHYL A管

柱，PolyLC Inc.，250x21 mm，5  $\mu\text{m}$ ，1000  $\text{\AA}$ ；緩衝液A：0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN；緩衝液B：0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl)。合併含有具有所需純度之B29-結合物之溶離份並使用TFF系統或Amicon Ultra-15濃縮。然後使該經濃縮之溶液經受反相HPLC純化(Waters C4 250x50 mm管柱，10  $\mu\text{m}$ ，1000  $\text{\AA}$ 管柱或KROMASIL C8 250x50 mm，10  $\mu\text{m}$ ，100 $\text{\AA}$ 管柱；緩衝液A：0.05-0.1% TFA溶於去離子水中；緩衝液B：0.05-0.1% TFA溶於AcCN中)。合併含有所需之胰島素二聚體之溶離份及凍乾並使用TFF系統及/或Amicon Ultra-15進行緩衝液交換以產生N<sup>6,29B</sup>、N<sup>6,29B'</sup>-胰島素二聚體。

#### 實例14

一般方法C：使用水性鹼條件合成N<sup>6,29B</sup>、N<sup>6,29B'</sup>-胰島素二聚體。

在適當尺寸之容器中，在室溫下輕輕攪拌地使胰島素或胰島素類似物溶解於混合溶劑：2:3 v/v 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:AcCN中。該混合物澄清後，使用鹼性溶液(例如，0.1 N NaOH)將pH調整至10.5-10.8之值。在不同之小瓶中，使經活化之酯中間物(連接子)在室溫下溶解於有機溶劑(例如，DMSO)中。在一段時間內將經活化之酯之溶液之分液添加至含有胰島素之溶液中直至UPLC層析圖顯示大部分未經修飾之胰島素已反應及大部分該反應混合物已轉化為N<sup>6,B29</sup>,N<sup>6,B29'</sup>-胰島素二聚體(或N<sup>6,28B</sup>,N<sup>6,28B'</sup>-離脯胰島素二聚體)。藉由添加胺親核試劑(例如，2-胺基乙醇)中止該反應。在rt下攪拌該反應溶液30分鐘。用冷H<sub>2</sub>O(20x)在0°C下小心稀釋所得溶液並使用1 N HCl(及若需要，使用0.1 N NaOH)將其pH調整至2.5之最終pH。該溶液首先藉由超濾(透過切向流過濾(TFF)系統或使用Amicon Ultra-15離心單元)以1K、3K或10K MWCO膜濃縮。使該經濃縮之溶液通常首先經受離子交換層析(PolySULFOETHYL A管柱，PolyLC Inc.，250x21 mm，5  $\mu\text{m}$ ，1000

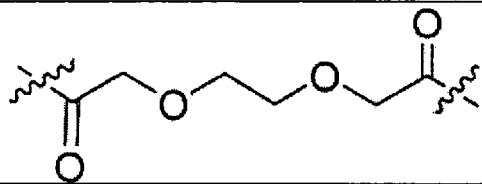
Å ; 緩衝液 A : 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN ; 緩衝液 B : 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl)。合併含有具有所需純度之 B29-結合物之溶離份並使用TFF系統或Amicon Ultra-15濃縮。所得溶液然後藉由反相HPLC (Waters C4 250x50 mm管柱, 10 μm, 1000 Å管柱或KROMASIL C8 250x50 mm, 10 μm, 100Å管柱; 緩衝液A: 0.05-0.1% TFA於水中; 緩衝液B: 0.05-0.1% TFA於AcCN中)進一步純化。合併含有標題胰島素二聚體之溶離份及凍乾或使用TFF系統及/或Amicon Ultra-15進行緩衝液交換以產生N<sup>6,29B</sup>,N<sup>6,29B'</sup>-胰島素二聚體。

### 實例15

此實例闡述N<sup>6,B29</sup>、N<sup>6,B29'</sup>-(2,2'-(乙烷-1,2-二基雙(氧基))二乙醯基)雙[人類胰島素](二聚體1)之合成。

將RHI (2.6 g, 0.448 mmol)溶解於Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.1 M) (15.8 mL)及AcCN (10.5 mL)之混合物中並添加0.895 mL (0.179 mmol) 2,2'-(乙烷-1,2-二基雙(氧基))二乙酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(連接子8)之0.2M DMF溶液。攪拌該反應混合物30分鐘並添加額外部分之0.895 mL (0.179 mmol) 2,2'-(乙烷-1,2-二基雙(氧基))二乙酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)之0.2M DMF溶液及再攪拌該反應混合物30分鐘。將該反應混合物倒入60 mL 20%AcCN/0.1%TFA/水中, 將pH調整至2.5, 及使用Amicon Ultra-15以10K MWCO膜透濾以濃縮直至所得體積係約10 mL。使所得溶液經受離子交換層析(PolySULFOETHYL A管柱, 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å, 在30分鐘內緩衝液B於緩衝液A中之10-80%梯度; 緩衝液 A : 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN ; 緩衝液 B : 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5M NaCl)。合併含有標題化合物之溶離份及濃縮。使所得溶液然後經受反相層析(KROMASIL C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å管柱; 含0.05% TFA之AcCN於含0.05% TFA之水中之27-35%梯度)。UPLC-MS方法E: Rt =2.75 min, m/z=1960.4 (z =

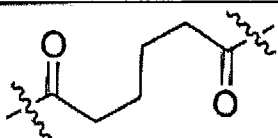
6), 1680.4(z = 7)。

| 二聚體編號                            | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構  | 胰島素類型；<br>胰島素N端             | Rt<br>(min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
|----------------------------------|---|-----------------------------|-------------|-------------------------|
| 1                                |  | RHI；<br>A1,A1',<br>B1,B1'=H | 2.75        | 1960.4                  |
| 波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。 |   |                             |             |                         |

## 實例16

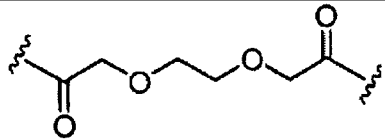
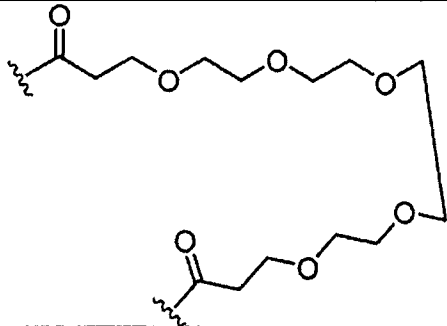
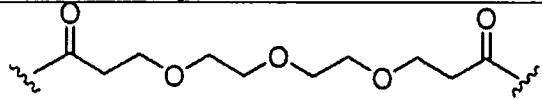
此實例闡述 $N^{2,1A}, N^{2,1A'}, N^{2,1B}, N^{2,1B'}$ -肆(胺甲醯基)- $N^{6,B29}, N^{6,B29'}$ -(己二醯基)雙[人類胰島素](二聚體2)之合成。

將 $N^{2,1A}, N^{2,1B}$ -雙(胺甲醯基) RHI (150 mg, 0.025 mmol)溶解於DMSO (1 mL)中並添加三乙胺(0.106 mL, 0.764 mmol)，接著滴加溶解於100  $\mu$ L DMSO中之己二酸二(N-琥珀醯亞胺酯)(連接子12) (4.33 mg, 0.013 mmol)。攪拌1小時並將該反應混合物倒入20 mL水中。酸化至pH=2並使用10K Amicon Ultra 15透濾。藉由離子交換層析使用在24分鐘內溶劑B於溶劑A中之10-40%梯度純化該產物，及藉由反相層析於C-8相上以30分鐘內B於A中之26-36%梯度再純化。UPLC-MS方法E：Rt = 3.75 min, m/z = 1983.9, (z = 6)。

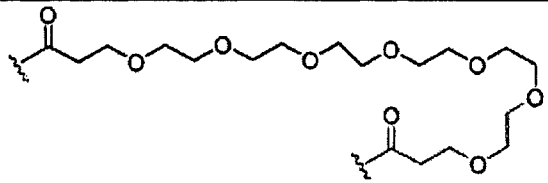
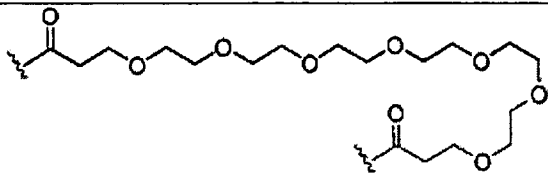
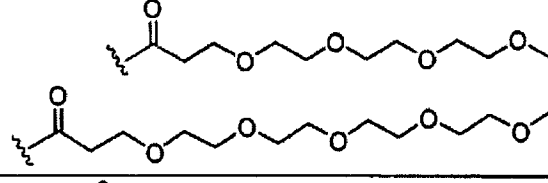
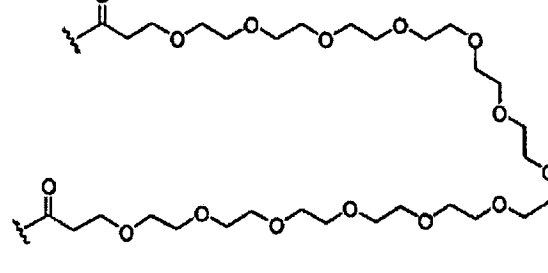
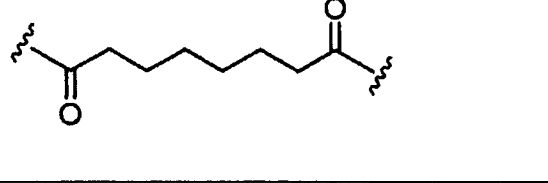
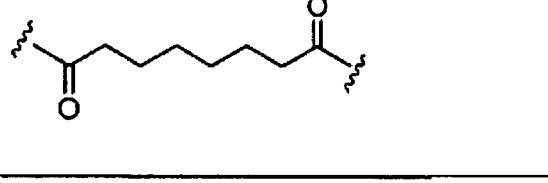
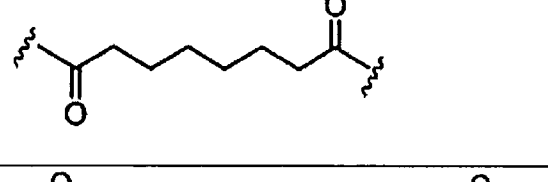
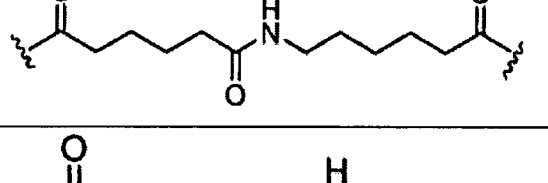
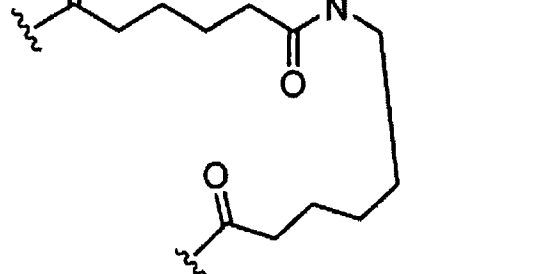
| 二聚體編號                            | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構  | 胰島素類型；<br>胰島素N端                     | Rt<br>(min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
|----------------------------------|---|-------------------------------------|-------------|-------------------------|
| 2                                |  | RHI；<br>A1,A1',<br>B1,B1'<br>= 胺甲醯基 | 3.75        | 1983.9                  |
| 波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。 |   |                                     |             |                         |

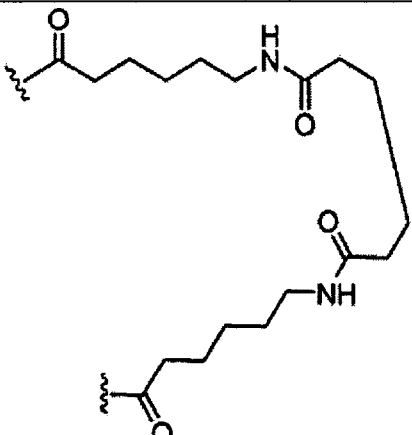
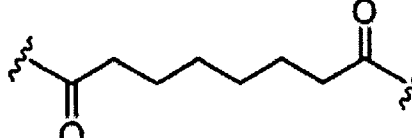
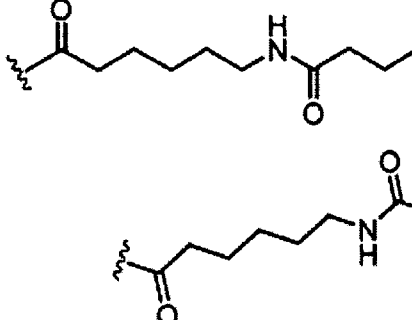
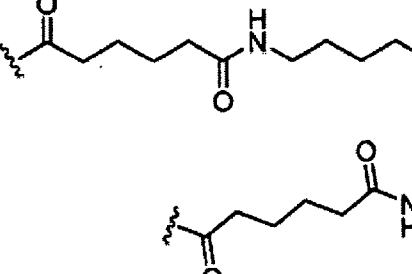
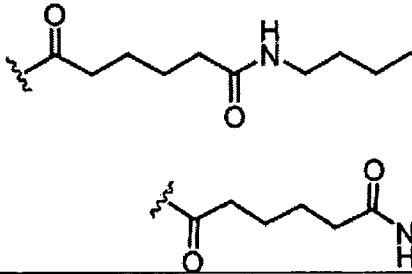
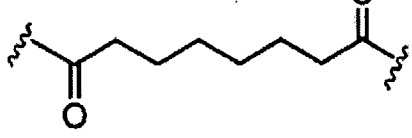
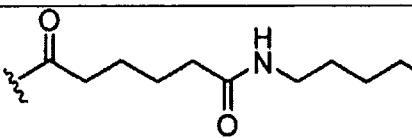
## 實例17

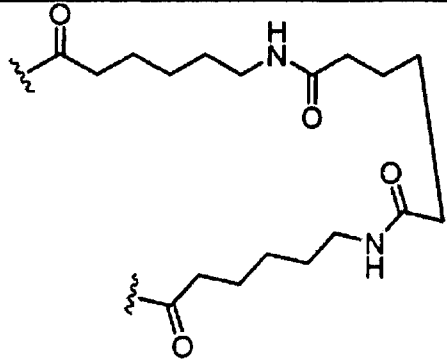
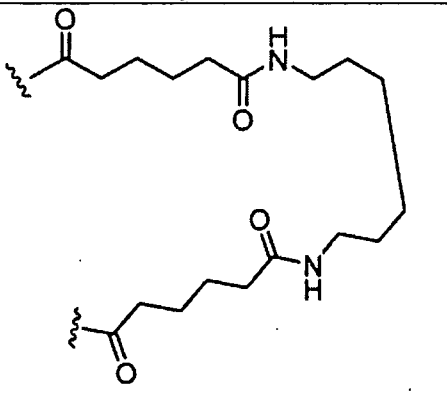
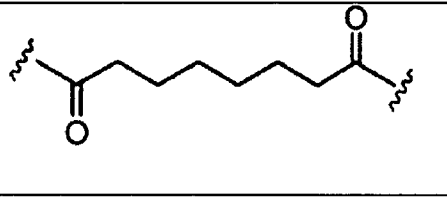
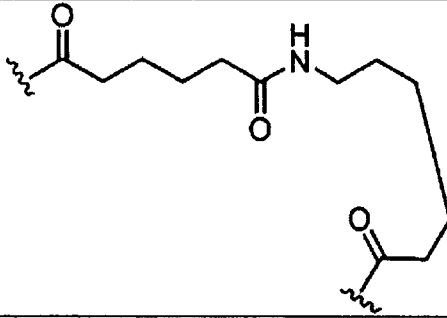
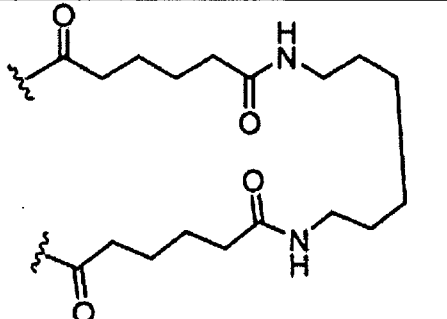
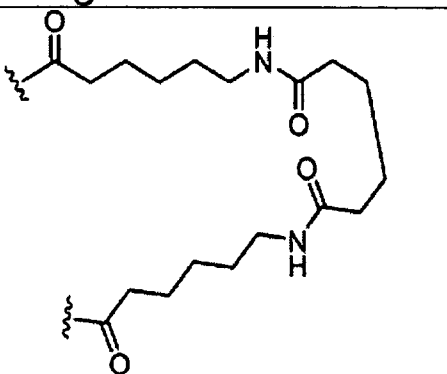
表3顯示遵循如指定之一般方法B或一般方法C使用RHI、DesB30 RHI、離脯胰島素、天冬胰島素、甘精胰島素或適當之類似物使用適當中間物(連接子)製得之二聚體。例如，就具有經胺甲醯化之N-端之二聚體而言，使用類似物5或類似物6 (DesB30)；就具有經乙醯化之A1 N-端之二聚體而言，使用類似物8。使用UPLC-MS方法D或UPLC-MS方法E表徵二聚體，在某些滯留時間(Rt)下，顯示帶六個電荷(即， $[(M+6)/6]$ )，(或帶七個電荷，即 $[(M+7)/7]$ )種類之親代化合物。藉由連接部分連接在一起之胰島素及胰島素分子就顯示於表3中之各二聚體而言係相同的。

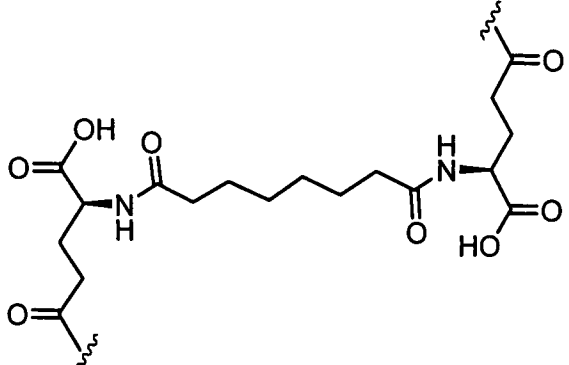
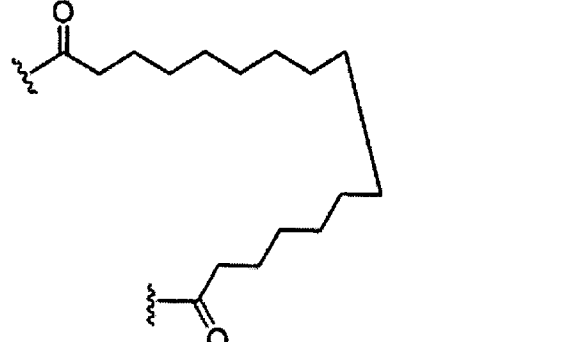
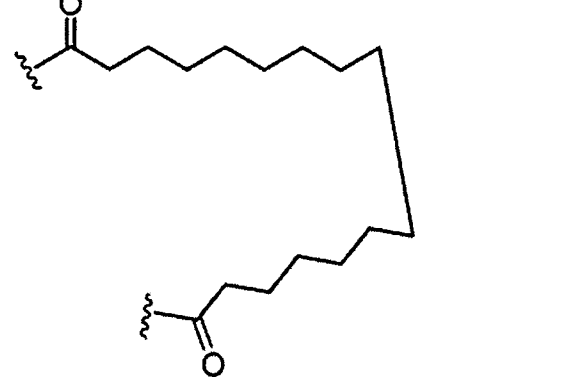
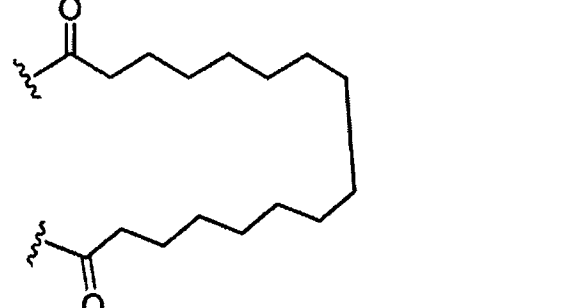
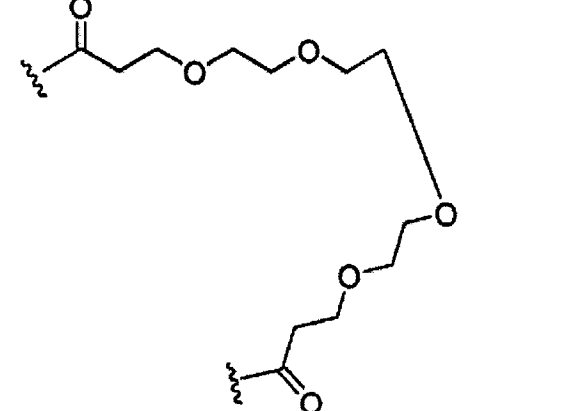
| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構  | 胰島素類型；胰島素N端                    | 製備方法 | Rt (min) | (M+6)/6 或 (M+7)/7 |
|-------|---|--------------------------------|------|----------|-------------------|
| 3     |  | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | B    | 4.41     | 1988.745          |
| 4     |  | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H   | C    | 3.76     | 1986.88           |
| 5     |  | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H   | C    | 3.74     | 1972.6            |

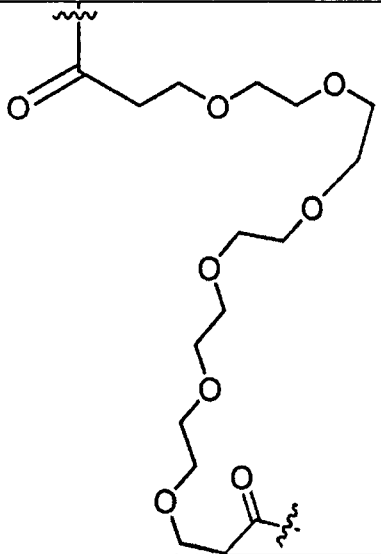
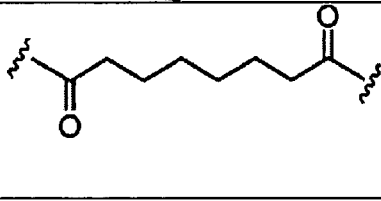
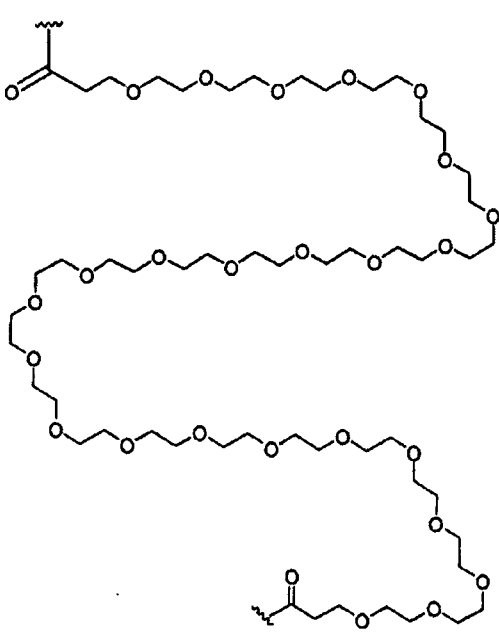
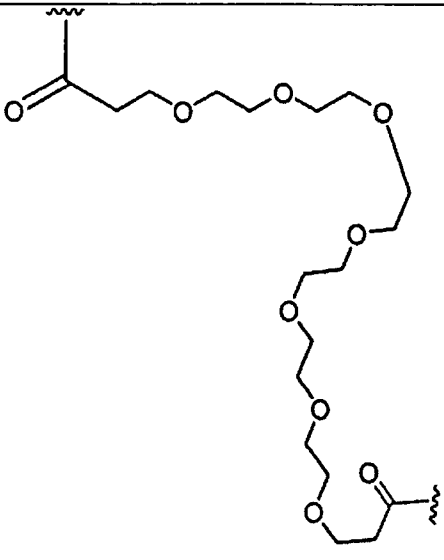
|    |  |                                      |   |      |         |
|----|--|--------------------------------------|---|------|---------|
| 6  |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H        | C | 3.80 | 1754.2  |
| 7  |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H        | C | 3.87 | 1728.8  |
| 8  |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H        | C | 3.70 | 1950.65 |
| 9  |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H        | C | 3.70 | 1954.9  |
| 10 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲醯基     | B | 3.97 | 1715.3  |
| 11 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲醯基     | B | 3.98 | 1727.9  |
| 12 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲醯基     | B | 3.73 | 1978.8  |
| 13 |  | RHI ;<br>A1,A1' = 乙醯基、<br>B1,B1' = H | B | 3.83 | 1973.8  |

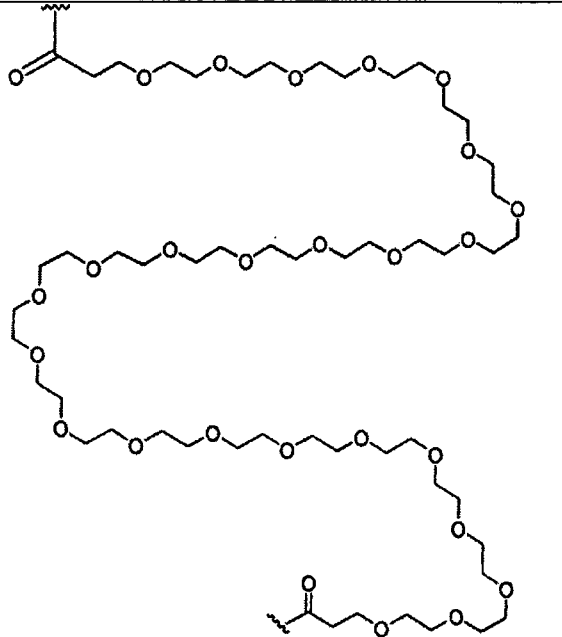
|    |   |   |   |      |         |
|----|---|---|---|------|---------|
| 14 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基         | B | 4.10 | 1740.5  |
| 15 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H           | C | 3.97 | 1716.0  |
| 16 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基         | B | 3.80 | 1752.4  |
| 17 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基         | B | 4.13 | 1778.7  |
| 18 |   | 離 脯 胰 島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H  | C | 3.74 | 1960.54 |
| 19 |  | 天 冬 胰 島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H  | C | 3.74 | 1966.13 |
| 20 |  | RHI<br>desB30 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H | C | 4.57 | 1926.04 |
| 21 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基         | B | 4.48 | 1716.7  |
| 22 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H           | C | 4.32 | 1974.06 |

|    |   |   |   |      |         |
|----|---|---|---|------|---------|
| 23 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基           | B | 3.38 | 1733.11 |
| 24 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基           | B | 3.59 | 1988.4  |
| 25 |   | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H             | C | 4.31 | 1708.35 |
| 26 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H             | C | 4.08 | 1993.02 |
| 27 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基           | B | 4.18 | 1732.48 |
| 28 |  | RHI<br>desB30 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | B | 3.86 | 1954.9  |
| 29 |  | RHI<br>desB30 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H   | C | 3.75 | 1940.76 |

|    |   |  |   |      |         |
|----|---|--|---|------|---------|
| 30 |    | RHI<br>desB30 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H      | C | 3.77 | 1959.02 |
| 31 |    | RHI<br>desB30 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H      | C | 4.00 | 1959.4  |
| 32 |   | 離 脯 胰 島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺 甲 醯 基 | B | 3.81 | 1988.42 |
| 33 |  | 離 脯 胰 島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H       | C | 3.70 | 1974.04 |
| 34 |  | 離 脯 胰 島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H       | C | 3.80 | 1992.89 |
| 35 |  | 離 脯 胰 島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H       | C | 3.76 | 1992.86 |

|    |   |   |   |      |         |
|----|---|---|---|------|---------|
| 36 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H           | C | 4.29 | 1717.28 |
| 37 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲酰基        | B | 4.01 | 1720.6  |
| 38 |   | RHI<br>desB30 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H | C | 3.88 | 1944.96 |
| 39 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H           | C | 3.87 | 1978.88 |
| 88 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H           | D | 3.39 | 1697.36 |

|    |   |  |   |      |         |
|----|---|--|---|------|---------|
| 76 |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H          | D | 3.50 | 1709.73 |
| 83 |    | 天冬胰島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲醯基 | B | 3.50 | 1994.39 |
| 85 |   | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H          | D | 3.46 | 1829.31 |
| 53 |  | 甘精胰島<br>素 ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H    | D | 3.37 | 1788.87 |

|   |   |                                       |   |      |         |
|---|---|---------------------------------------|---|------|---------|
| 87  |  | 甘精胰島素；<br>$A1, B1, A1', B1'$<br>$= H$ | D | 3.43 | 1902.16 |
| 波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之 $\epsilon$ 胺基間的鍵。 |   |                                       |   |      |         |

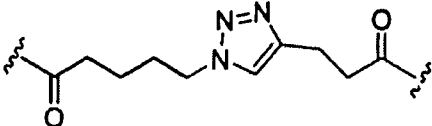
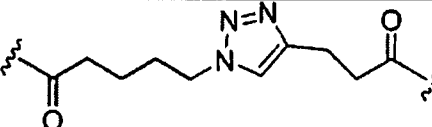
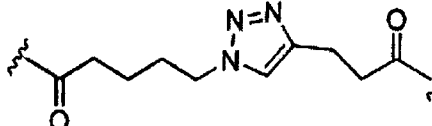
## 實例18

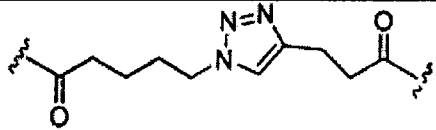
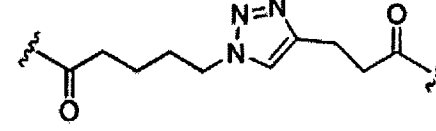
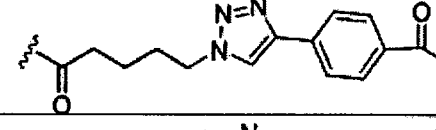
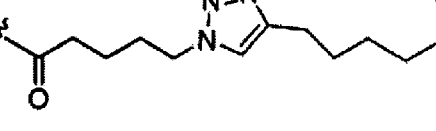
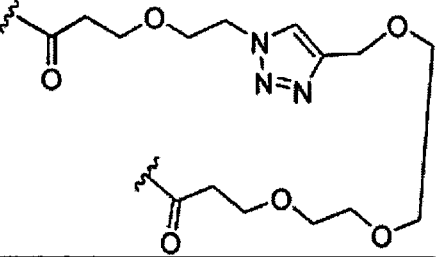
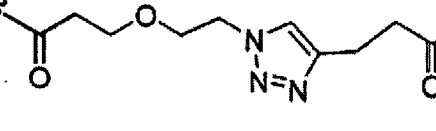
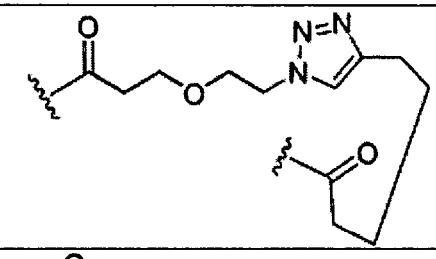
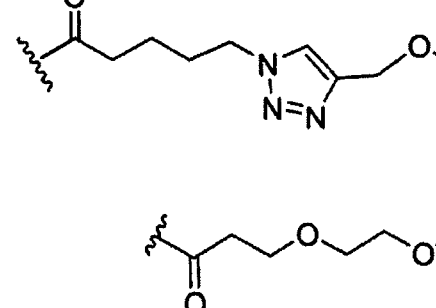
一般方法D：使用經 $Cu^{2+}$ 催化之點擊化學合成 $N^{6,29B}$ 、 $N^{6,29B'}$ -胰島素二聚體。

在適當尺寸之容器中，在室溫下輕輕攪拌地使含有適當乙炔之胰島素中間物(類似物)溶解於DMSO及水性乙酸三乙基銨緩衝液(pH 7.0，最終濃度0.2 mM)之混合溶劑中。在另一適當尺寸之容器中，在rt下輕輕攪拌地使含有適當疊氮基之胰島素中間物(類似物)溶解於DMSO及水之混合溶劑中。合併兩種溶液，徹底混合，由輕輕通入鼓泡 $N_2$ 脫氣。向所得溶液中添加新鮮製備之抗壞血酸鈉或抗壞血酸溶液(最終濃度係0.5 mM)，及徹底混合後，添加10 mM  $CuSO_4$ 及參[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺(即，TBTA配體)於55% DMSO中之溶液。由輕輕通入鼓泡 $N_2$ 及徹底混合後，該混合物憑藉臨時混合在rt下儲存過夜。用混合溶劑(v/v 7:3 AcCN/水及0.05% TFA)在 $0^\circ C$ 下小心稀釋該反應混合物並使用0.1、1.0 N HCl (及若需要，使用0.1 N NaOH)將pH調整至2.50。該溶液首先藉由超濾(透過切向流過濾(TFF)系統或使用Amicon Ultra-15離心單元)以1K、3K或10K MWCO膜濃

縮。使該經濃縮之溶液通常首先經受離子交換層析 (PolySULFOETHYL A管柱, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5  $\mu$ m, 1000 Å ; 緩衝液 A : 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN ; 緩衝液 B : 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl)。合併含有具有所需純度之所需產物之溶離份及使用TFF系統或Amicon Ultra-15濃縮。然後所得溶液藉由反相HPLC (Waters C4 250x50 mm管柱, 10  $\mu$ m, 1000 Å管柱或 KROMASIL C8 250x50 mm, 10  $\mu$ m, 100Å管柱 ; 緩衝液 A : 0.05-0.1% TFA於水中 ; 緩衝液 B : 0.05-0.1% TFA於AcCN中)進一步純化。合併含有具有所需純度之所需產物之溶離份及凍乾或使用TFF系統及/或Amicon Ultra-15進行緩衝液交換以產生胰島素二聚體。

表4列舉使用適當中間物遵循一般方法D製得之二聚體**40**、**41**、**45**、**46**、**47**、**59**、**57**、**79**、**80**、**82**及**84**。使用UPLC-MS方法D或UPLC-MS方法E或UPLC-MS方法G表徵此等二聚體，在某些滯留時間(Rt)下，顯示帶六個電荷(即，[(M+6)/6])，(或帶七個電荷，即[(M+7)/7])種類之親代化合物。

| 表4    |         |            |   |          |                   |
|-------|---------|------------|---|----------|-------------------|
| 二聚體編號 | 第一胰島素主鏈 | 第二胰島素(')主鏈 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構  | Rt (min) | (M+6)/6 或 (M+7)/7 |
| 40    | 類似物 3   | 類似物 2      |  | 3.83     | 1970.38           |
| 41    | 類似物 1   | 類似物 2      |  | 3.88     | 1938.84           |
| 45    | 類似物 9   | 類似物 2      |  | 4.28     | 1985.30           |

|    |           |           |   |      |         |
|----|-----------|-----------|---|------|---------|
| 46 | 類似物<br>3  | 類似物<br>10 |    | 4.50 | 1985.43 |
| 47 | 類似物<br>9  | 類似物<br>10 |    | 4.59 | 1714.34 |
| 75 | 類似物<br>3  | 類似物<br>2  |    | 3.40 | 1696.35 |
| 57 | 類似物<br>3  | 類似物<br>12 |    | 3.57 | 1975.90 |
| 79 | 類似物<br>11 | 類似物<br>13 |    | 3.38 | 1993.39 |
| 80 | 類似物<br>11 | 類似物<br>2  |   | 3.37 | 1973.83 |
| 82 | 類似物<br>11 | 類似物<br>12 |  | 3.34 | 1978.33 |
| 84 | 類似物<br>3  | 類似物<br>13 |  | 3.40 | 1990.54 |

波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之 $\epsilon$ 胺基間的鍵。

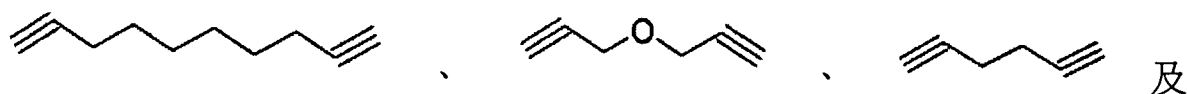
### 實例19

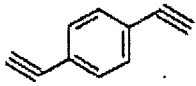
一般方法E：使用經 $\text{Cu}^{2+}$ -催化之雙重點擊化學合成 $\text{N}^{6,29\text{B}}$ 、 $\text{N}^{6,29\text{B}'}$ -胰島素二聚體。

在適當尺寸之容器中，在室溫下輕輕攪拌地使含有適當疊氮基

之胰島素中間物(類似物)溶解於DMSO及水性乙酸三乙基銨緩衝液(pH 7.0, 最終濃度0.2 mM)之混合溶劑中。在另一適當尺寸之容器中, 在室溫下輕輕攪拌地使含有適當雙-乙炔之橋接或中間物連接子溶解於DMSO及水之混合溶劑中。合併兩種溶液, 徹底混合, 由輕輕通入鼓泡N<sub>2</sub>脫氣。向所得溶液中添加新鮮製備之抗壞血酸鈉或抗壞血酸溶液(最終濃度係0.5 mM), 及徹底混合後, 添加10 mM CuSO<sub>4</sub>及參[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺(即, TBTA配體)於55% DMSO中之溶液。由輕輕通入鼓泡N<sub>2</sub>及徹底混合後, 該混合物憑藉臨時混合在室溫下儲存過夜。用混合溶劑(v/v 7:3 AcCN/水及0.05% TFA)在0°C下小心稀釋該反應混合物並使用0.1、1.0 N HCl (及若需要, 使用0.1 N NaOH)將pH調整至2.50。該溶液首先藉由超濾(透過切向流過濾(TFF)系統或使用Amicon Ultra-15離心單元)以1K、3K或10K MWCO膜濃縮。使該經濃縮之溶液通常首先經受離子交換層析(PolySULFOETHYL A管柱, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å; 緩衝液A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 緩衝液B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl)。合併含有具有所需純度之所需產物之溶離份及使用TFF系統或Amicon Ultra-15濃縮。所得溶液藉由反相HPLC (Waters C4 250x50 mm管柱, 10 μm, 1000 Å管柱或KROMASIL C8 250x50 mm, 10 μm, 100Å管柱; 緩衝液A: 0.05-0.1% TFA於水中; 緩衝液B: 0.05-0.1% TFA於AcCN中)進一步純化。合併含有具有所需純度之所需產物之溶離份及凍乾或使用TFF系統及/或Amicon Ultra-15進行緩衝液交換以產生胰島素二聚體。

表5列舉使用適當中間物遵循一般方法E製得之二聚體**42-44**及**54**。該等雙-乙炔橋接或中間物連接子係





使用UPLC-MS方法D或UPLC-MS方法E表徵此等二聚體，在某些滯留時間(Rt)下，顯示帶六個電荷(即， $[(M+6)/6]$ )，(或帶七個電荷，即 $[(M+7)/7]$ )種類之親代化合物。

表5

| 二聚體編號 | 第一胰島素主鏈 | 第二胰島素(')主鏈 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構 | Rt (min) | (M+6)/6 或 (M+7)/7 |
|-------|---------|------------|--------------------------------|----------|-------------------|
| 42    | 類似物3    | 類似物3       |                                | 4.07     | 1501.00           |
| 43    | 類似物3    | 類似物3       |                                | 4.47     | 1993.95           |
| 44    | 類似物3    | 類似物3       |                                | 4.22     | 1494.14           |
| 59    | 類似物3    | 類似物3       |                                | 3.78     | 1714.17           |

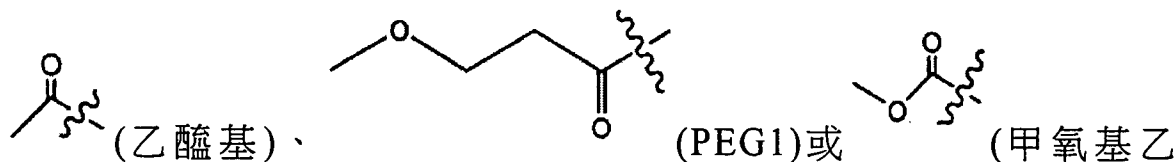
波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。

## 實例20

此實例闡述 $N^{2,1A}, N^{2,1A'}, N^{2,1B}, N^{2,1B'}$ -肆(乙醯基或PEG1或甲氧基乙醯基)-二聚體(二聚體48、55、56、69及70)之合成。

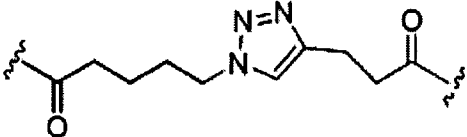
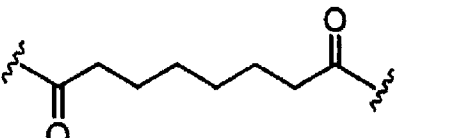
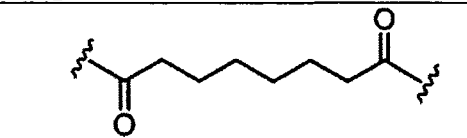
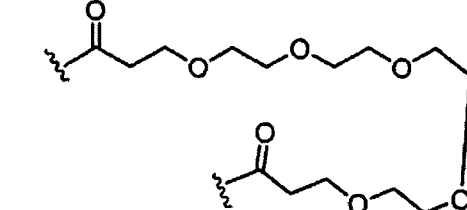
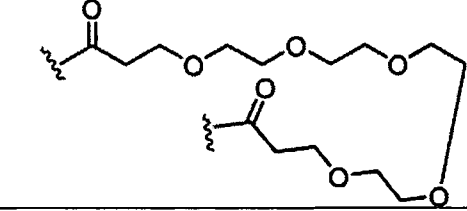
在室溫下向二聚體40、19或4 (21 mg, 1.777  $\mu\text{mol}$ )於DMSO (2 mL)中之溶液添加TEA (3.96  $\mu\text{L}$ , 0.028 mmol)及然後添加乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯(2.23 mg, 0.014 mmol)於DMSO (100  $\mu\text{L}$ )或其他適當之經N-羥基琥珀醯亞胺活化之酯(甲氧基乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯或PEG1乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)於DMSO (100  $\mu\text{L}$ )中之溶液。3小時後，用12 mL水/AcCN=7/3及0.1%TFA之混合物稀釋該反應混合物，並將pH調整至2.5。藉由具有10K MWCO膜之Amicon Ultra 15離心過濾器濃縮該所得澄清溶液。使所得溶液首先經受離子交換層析(PolySULFOETHYL A, 250x21 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 1000  $\text{\AA}$ , 15 mL/min, 30分鐘內梯度5%至45%；緩衝液A：0.1% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /25%乙腈於水中；緩衝液B：0.1% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /25%乙腈/ 0.5 M NaCl於水中)。合併含有具有所需純度之所需產物之溶離份及使用具有10K MWCO膜之Amicon Ultra-15濃縮。然後使所得溶液經受反相HPLC (KROMASIL C8 250x50 mm, 10  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ 管柱；緩衝液A：0.05%TFA於AcCN/ $\text{H}_2\text{O}$ 中；緩衝液B：0.05% AcCN；流動速率85 mL/min)。合併所需之溶離份及凍乾以產生如顯示於表6中之二聚體48、55、56、69或70。使用UPLC-MS方法F或G。

該等N端取代基具有以下結構：



，其中波浪線指示在該取代基與該N端胺基酸之 $N_2$ 氮間之鍵。

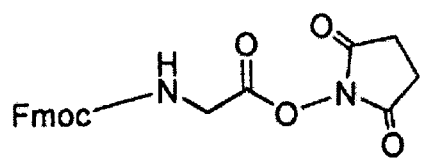
表6

| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構  | 胰島素類型；胰島素N端                       | Rt (min) | (M+6)/6 或 (M+7)/7 |
|-------|---|-----------------------------------|----------|-------------------|
| 48    |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B'<br>=乙醯基     | 4.71     | 1998.93           |
| 55    |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B'<br>=乙醯基     | 3.61     | 1987.97           |
| 56    |    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B'<br>= PEG1   | 3.53     | 1729.22           |
| 69    |   | RHI ;<br>A1,B1,A1',B'<br>=乙醯基     | 3.55     | 1727.31           |
| 70    |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B'<br>= 甲氧基乙醯基 | 3.67     | 1744.71           |

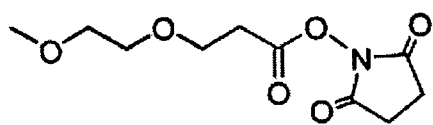
波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之 $\epsilon$ 胺基間的鍵。

## 實例21

表7顯示二聚體49、50及51並顯示連接至 $N^{2,A1}$ 、 $N^{2,B1}$ 、 $N^{2,A1'}$ 及 $N^{2,B1'}$ 之胺基之醯基。此等二聚體係自二聚體40來製備，使用類似於針對製造二聚體48描述之製程但以適當之經N-羥基琥珀醯亞胺活化之酯取代乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯以製造二聚體49、50及51。經活化之酯係Fmoc-甘胺酸乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯

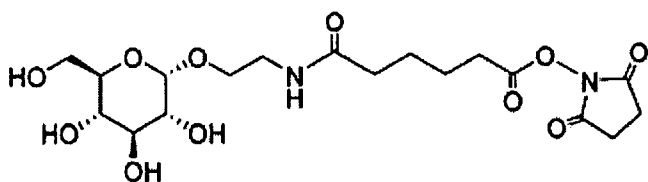


、PEG2 乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯



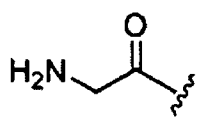
、及AEG-C6 乙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯，

其中AEG係胺基乙基葡萄糖

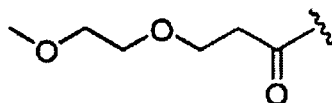


使用UPLC-MS方法F (二聚體**50**及**51**)或UPLC-MS方法G (二聚體**49**)表徵此等二聚體，在某些滯留時間(Rt)下，顯示帶六個電荷(即， $[(M+6)/6]$ )，(或帶七個電荷，即 $[(M+7)/7]$ )種類之親代化合物。該等二聚體顯示於表7中。

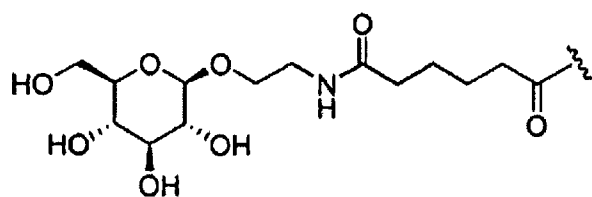
該等N端取代基具有以下結構：



(甘胺酸)、



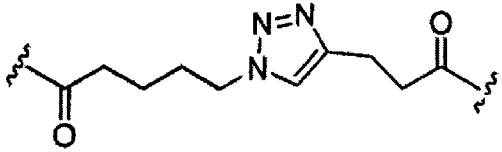
(PEG2) 或



(AEG-C6)

表7

| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構 | 胰島素類型；<br>胰島素N端                      | Rt (min) | $(M+6)/6$<br>或<br>$(M+7)/7$ |
|-------|--------------------------------|--------------------------------------|----------|-----------------------------|
| 49    |                                | RHI ;<br>A1,A1',<br>B1,B1'<br>= 甘胺酸  | 3.62     | 1722.06                     |
| 50    |                                | RHI ;<br>A1,A1',<br>B1,B1'<br>= PEG2 | 4.85     | 1764.16                     |

|                                  |   |  |      |         |
|----------------------------------|---|--|------|---------|
| 51                               |  | RHI ;<br>A1,A1',<br>B1,B1'<br>= AEM-<br>C6 | 4.06 | 1880.19 |
| 波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。 |   |  |      |         |

## 實例22

此實例闡述使用無銅點擊化學合成二聚體**52**。

在室溫下向類似物**3** (10 mg, 1.686 μmol)於1.0 mL 3:2 v/v H<sub>2</sub>O/AcCN中之溶液添加類似物**4** (10.5 mg, 1.686 μmol)於1.0 mL 3:2 v/v H<sub>2</sub>O/AcCN中之溶液。在室溫下攪拌2小時後，使該反應混合物首先經受離子交換層析(PolySULFOETHYL A, 250x21 mm, 5 μm, 1000 Å, 15 mL/min, 30分鐘內5%-45%梯度；緩衝液A：0.1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%乙腈於水中；緩衝液B：0.1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%乙腈/ 0.5 M NaCl於水中)。合併具有含有所需純度之所需產物之溶離份並使用具有3K或10K MWCO膜之Amicon Ultra-15濃縮。然後使所得溶液經受反相HPLC (KROMASIL C8 250x50 mm, 10 μm, 100 Å管柱；緩衝液A：0.05%TFA於AcCN/H<sub>2</sub>O中；緩衝液B：0.05% AcCN；流動速率85 mL/min)。合併所需溶離份及凍乾以產生二聚體**52**。UPLC-MS方法F：Rt = 3.73 min, m/z=1738.59 [(M+7)/7 +1]。該等結果顯示於表8中。

表8

| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構 | 胰島素類型；<br>胰島素N端                       | Rt (min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
|-------|--------------------------------|---------------------------------------|----------|-------------------------|
| 52    |                                | RHI；<br>A1,A1'=H,<br>B1,B1'= 胺<br>甲醯基 | 3.73     | 1738.59                 |

波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之 $\epsilon$ 胺基間的鍵。

## 實例23

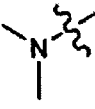
此實例闡述 $N^{2,1A}, N^{2,1A'}, N^{2,1B}, N^{2,1B'}$ -肆(二甲基或異丁基)-二聚體(二聚體60、58、65及67)之合成。

將二聚體40、19或4 (100 mg, 8.46  $\mu$ mol)溶解(懸浮)於水(10 ml)中並由乙酸溶液調整至pH=4.0，然後添加甲醛(0.013 mL, 0.169 mmol)或異丁醛(0.025 mL, 0.272 mmol)，接著添加氰基硼氫化鈉(10.63 mg, 0.169 mmol)於水(500  $\mu$ L)中之新製備溶液。形成沉澱。輕輕攪拌該混合物。反應完成約1小時後，藉由滴加1N HCl將該混合物小心酸化至pH 2.9。該懸浮液變為澄清溶液。藉由反相製備型HPLC(C-8管柱，50X250 cm，85 ml/min，25分鐘內29%-36%梯度)純化該混合物。(含0.1% TFA之水及含0.05%TFA之MeCN)。凍乾所需溶離份以產生二聚體(19.9 mg, 1.506  $\mu$ mol，產率17.80%)。UPLC-MS方法D：Rt = 3.31 min，m/z = 1989.44 [(M+6)/6 + 1]。

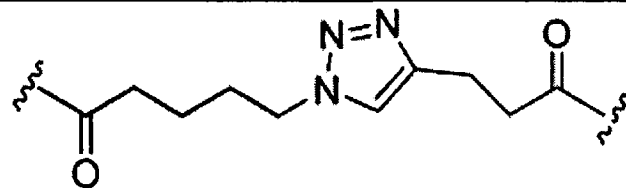
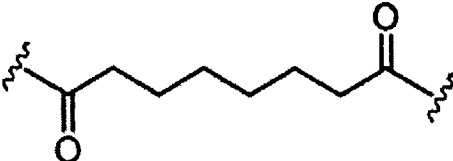
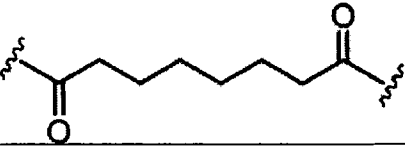
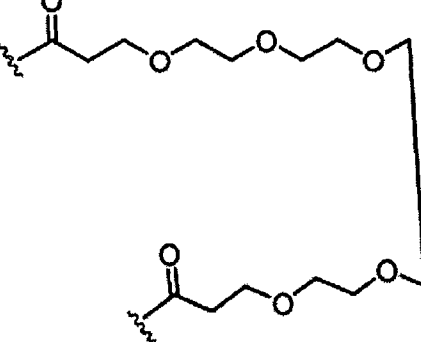
該等N端取代基具有結構



(異丁基)，其中波浪線指示在

該取代基與該N端胺基酸之N2氮間之鍵，或  (N-二甲基；Me<sub>2</sub>)，其中波浪線指示N端胺基酸之N2氮與C2碳間之鍵。

該等二聚體顯示於表9中。

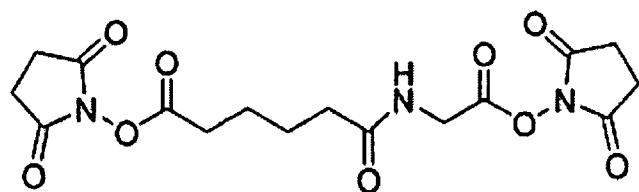
| 表9    |   |   |          |                         |
|-------|---|---|----------|-------------------------|
| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構  | 胰島素類型；<br>胰島素N端                           | Rt (min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
| 60    |    | RHI；<br>A1,B1,A1',B'<br>= Me <sub>2</sub> | 3.31     | 1989.44                 |
| 58    |   | RHI；<br>A1,B1,A1',B'<br>= Me <sub>2</sub> | 3.42     | 1978.48                 |
| 65    |  | RHI；<br>A1,B1,A1',B'<br>= 異丁基             | 4.13     | 1997.04                 |
| 67    |  | RHI；<br>A1,B1,A1',B'<br>= Me <sub>2</sub> | 3.42     | 1719.39                 |

波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。

#### 實例24

二聚體61、62、63、64及66之合成如下所示。

描述6-((2-((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)-2-側氧基乙基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-酯(C6-甘胺酸連接子；連接子24)之合成。



### 步驟1：(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)己二酸苄酯

在0°C下向6-(苄基氧基)-6-側氧基己酸(5g, 21.16 mmol)於DMF (10 mL)中之溶液中添加N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(4.44 mL, 25.4 mmol), 接着添加TSTU (7.01g, 23.28 mmol)。在0°C下攪拌該反應1小時並在室溫下攪拌1小時。將該混合物倒入冰-水/乙醚混合物(1/1, 100 mL)中。該混合物用乙醚(3 x 50 mL)萃取, 用水(2x 10 mL)及鹽水(10 mL)清洗。有機層在MgSO<sub>4</sub>上乾燥, 透過矽藻土墊過濾並濃縮以產生呈無色糖漿之標題化合物(5.2 g, 15.6 mmol, 74%)。LC-MS 2min: Rt = 1.05 min, m/z = 334.1 [M+1]。

### 步驟2-((羧甲基)胺基)-6-側氧基己酸

向甘胺酸(225 mg, 3.0 mmol)於DMF (2.5 mL)中之溶液中添加含於DMF (2.5 mL)中之步驟1產物(1.0 g, 3.0 mmol), 接著添加TEA (418 μL, 3.0 mmol)。在室溫下攪拌該反應18小時。減壓下移除DMF。藉由C18反相層析(以16管柱體積(CV)用0-40% AcCN/水洗脫)純化該粗產物。合併含有所需產物之溶離份, 濃縮及凍乾以產生中間物(6-(苄基氧基)-6-側氧基己醯基)甘胺酸。向上述中間物之水(3 mL)溶液中添加Pd/C (10%, 160 mg, 0.15 mmol)。在室溫下在氫氣球下攪拌該反應18小時。該混合物透過矽藻土墊過濾, 用MeOH/水(1/1, 10 mL)清洗。濃縮該濾液並凍乾以產生標題化合物(400 mg, 2.2 mmol, 66%)。LC-MS 2min: Rt = 0.28 min, m/z = 204.03 [M+1]。

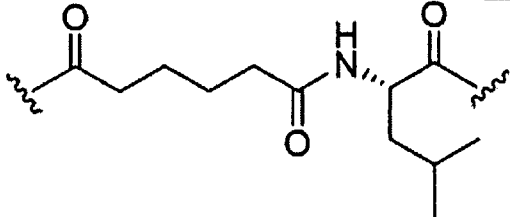
步驟3：6-((2-((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)-2-氧乙基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯

在 0°C 下向於 DMF (0.5 mL) 中之步驟 2 之產物 (10 mg, 0.049 mmol) 中添加 TEA (0.015 mL, 0.108 mmol), 接著添加 TSTU (31.1 mg, 0.103 mmol)。將該反應升溫至室溫且在該溫度下攪拌 1 小時。TLC (EtOAc/MeOH/水/AcCN: 2:1:1:1 (v:v:v:v)) 顯示所需產物 (Rf: 0.25) 之形成且無初始材料剩餘。該粗材料無需純化即可用於構築二聚體。

以類似上文所示之製程合成其中該包含 C6-胺基酸連接子之胺基酸分別係丙胺酸、異白胺酸、白胺酸及纈胺酸之連接子 **25** (C6-丙胺酸)、連接子 **26** (C6-異白胺酸)、連接子 **27** (C6-白胺酸) 及連接子 **28** (C6-纈胺酸)。使用上文之連接子使用製備型方法 D 構築二聚體。該等結果顯示於表 10 中。

表 10

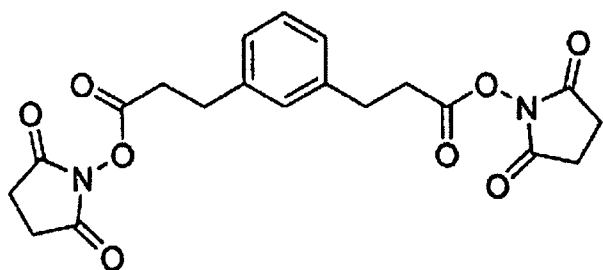
| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在 B29 與 B29' 離胺酸殘基之間之連接部分之結構 | 胰島素類型；<br>胰島素 N 端               | Rt (min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
|-------|------------------------------------|---------------------------------|----------|-------------------------|
| 61    |                                    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 3.90     | 1993.24                 |
| 62    |                                    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 3.91     | 1995.62                 |
| 63    |                                    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 4.02     | 1714.70                 |
| 64    |                                    | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 3.80     | 1716.61                 |

|                                  |   |                                 |      |         |
|----------------------------------|---|---------------------------------|------|---------|
| 66                               |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 3.73 | 1716.93 |
| 波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。 |   |                                 |      |         |

## 實例25

二聚體73、89、90、91、92及93之合成如下所示。

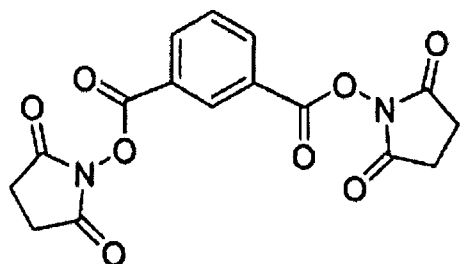
描述3,3'-(1,3-伸苯基)二丙酸雙2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯(二丙基苯基；連接子29)之合成。



步驟1：3,3'-(1,3-伸苯基)二丙酸雙2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯

在0°C下向3,3'-(1,3-伸苯基)二丙酸(21.8 mg, 0.098 mmol)於DMF (0.6 mL)中之溶液中添加TEA (29 mL, 0.206 mmol)，接著添加TSTU (62.0 mg, 0.206 mmol)。將該反應升溫至室溫並在該溫度下攪拌1小時。TLC (EtOAc/MeOH/水/AcCN: 2/1/1/1)顯示所需產物(R<sub>f</sub>: 0.25)之形成且無初始材料剩餘。UPLC-MS方法B：R<sub>t</sub>=3.47 min, m/z=417.19 [M+1]。該產物無需進一步純化即可用於使用類似物5使用方法D構築二聚體73。

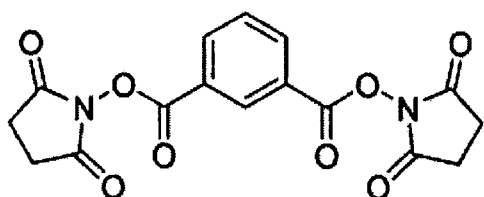
描述苯-1,3-二羧酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(對苯二甲酸酯；連接子34)之合成。



步驟1：雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)苯-1,3-二羧酸鹽

在0°C下，向對苯二甲酸(100 mg, 0.602 mmol)於THF (2 ml)中之溶液中添加四氟硼酸2-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)-1,1,3,3-四甲基異脲鎘(371 mg, 1.234 mmol)，接著添加N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(0.222 mL, 1.234 mmol)。30分鐘後，移除冰浴。在室溫下攪拌該溶液1小時。添加額外之25 mL THF且該反應留在室溫下進行過夜。將產物濃縮至約5 mL及一部分無需進一步純化即可用於使用RHI使用方法D以構築二聚體**89**。剩餘材料用乙酸乙酯(200 mL)稀釋並用鹽水(10 mL)清洗，有機層用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥，過濾並濃縮。

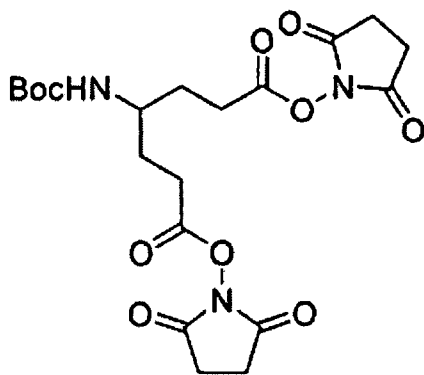
描述間苯二甲酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(間苯二甲酸酯；連接子**35**)之合成



步驟1：間苯二甲酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)

向含於DMSO (1 mL)中之間苯二甲酸(54 mg, 0.325 mmol)中添加TSTU (215 mg, 0.715 mmol)，接著添加TEA (0.137 mL, 0.975 mmol)。LC-MS 2min: Rt = 0.79 min, m/z = 721.28 [2M+1]。該產物無需進一步純化即可用於使用類似物**5**及二聚體**91**使用方法E中之RHI構築二聚體**90**。

描述4-((第三丁氧基羰基)胺基)庚二酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(庚二酸酯；連接子**36**)之合成。

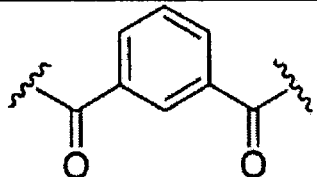
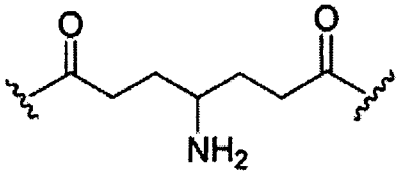
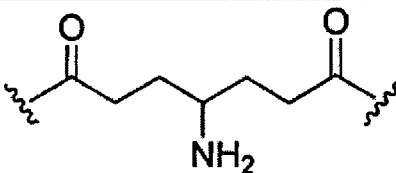


步驟1：4-((第三丁氧基羰基)胺基)庚二酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)

向含於DMSO (0.5 mL)中之4-((第三丁氧基羰基)胺基)庚二酸 (16.5 mg, 0.06 mmol)中添加TSTU (39.7 mg, 0.132 mmol)，接著添加TEA (0.025 mL, 0.180 mmol)。LC-MS 2min: Rt = 0.90 min, m/z = 470.34 [M+1]。該產物無需進一步純化即可用於使用類似物5及二聚體93使用方法E中之RHI構築二聚體92。

該等結果顯示於表11中。

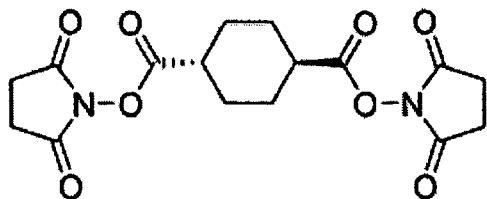
| 表11   |                                |                                |          |                         |
|-------|--------------------------------|--------------------------------|----------|-------------------------|
| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構 | 胰島素類型；<br>胰島素N端                | Rt (min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
| 73    |                                | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 3.55     | 1711.57                 |
| 89    |                                | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H   | 3.43     | 1678.64                 |
| 90    |                                | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 3.67     | 1703.20                 |

|    |   |                                  |      |         |
|----|---|----------------------------------|------|---------|
| 91 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H    | 3.52 | 1678.69 |
| 92 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲醯基 | 3.56 | 1704.64 |
| 93 |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H    | 3.33 | 1680.18 |

波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。

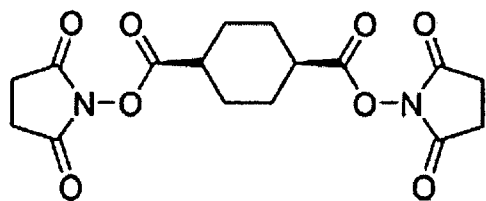
### 實例26

二聚體 71、72、77、78、81 及 87 之合成如下所示。描述 (1S,4S)-環己烷-1,4-二羧酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(連接子 30；反式環己烷1,4-二酸)之合成。



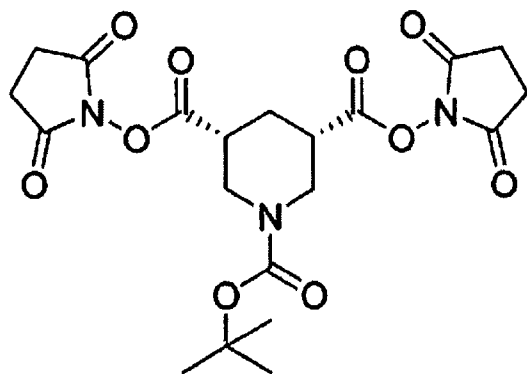
在 0°C 下向 (1S,4S)-環己烷-1,4-二羧酸 (200 mg, 1.162 mmol) 於 DCM (11mL) 中之溶液中添加 TSTU (734 mg, 2.439 mmol) 及 DIPEA (0.5mL, 2.86mmol)。在室溫下攪拌所得反應混合物 1 小時。該產物作為白色固體壓碎於反應溶液中；過濾並用 DCM (2x5 ml) 清洗；及真空中乾燥以獲得標題化合物。C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 的 UPLC-MS 計算值為 366.11，觀測值 m/e : 367.16 (M+H)<sup>+</sup>，(Rt:3.20 / 5.00 分鐘)。UPLC-MS 方法 A。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO): δ 2.81-2.89 (m; 2 H) ; 2.80 (s; 8 H) ; 2.02-2.10 (m; 4 H) ; 1.57-1.63 (m; 4 H)。

描述 (1R,4R)-環己烷-1,4-二羧酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(連接子 31；順式環己烷1,4-二酸)之合成。



在0°C下向(1R,4R)-環己烷-1,4-二羧酸(200 mg, 1.162 mmol)於DCM (11mL)中之溶液中添加TSTU (734 mg, 2.439 mmol)及DIPEA (0.5mL, 2.86 mmol)。在室溫下攪拌所得反應混合物1小時。藉由矽膠層析(0-100% EtOAc/己烷)純化該殘餘物以提供標題化合物。 $C_{16}H_{18}N_2O_8$ 的UPLC-MS計算值為366.11, 觀測值 $m/z$ :367.17 (M+H)<sup>+</sup>, (Rt:3.17 / 5.00分鐘)。UPLC-MS方法A. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  3.02-3.08 (m; 2 H); 2.80 (s; 8 H); 1.80-1.90 (m; 8 H)。

描述(3R,5S)-吡啶-1,3,5-三羧酸1-(第三丁酯) 3,5-雙(2,5-二側氧基吡咯啶-1-酯) (連接子32)之合成。



在0°C下向(3R,5S)-1-(第三丁氧基羰基)吡啶-3,5-二羧酸(200 mg, 0.734 mmol)於DMF (7 mL)中之溶液中添加TSTU (485 mg, 1.611 mmol)及DIPEA (0.3 mL, 1.718 mmol)。在室溫下攪拌該所得反應混合物2小時。藉由矽石層析(0-100% EtOAc/己烷)純化該殘餘物以提供標題化合物。 $C_{20}H_{25}N_3O_{10}$ 的UPLC-MS計算值為467.15, 觀測值 $m/z$ : 468.30(M+H)<sup>+</sup>, (Rt:0.98 / 2.00分鐘)。UPLC-MS方法A。

一般方法F：使用有機鹼條件合成 $N^{6,29B}, N^{6,29B'}$ -胰島素二聚體

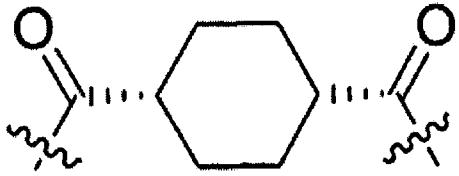
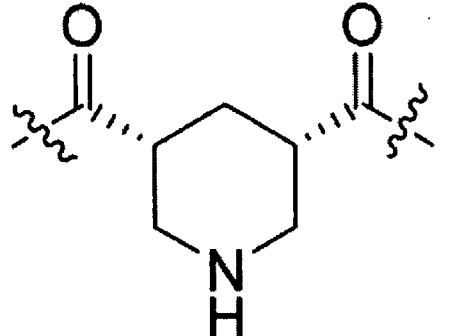
在適當尺寸之容器中，將胰島素或胰島素類似物在室溫下在鹼

(例如，TEA或1,1,3,3-四甲基胍(TMG))之存在下懸浮於有機溶劑或混合水性/有機溶劑(例如，DMSO)中。該混合物容許輕輕攪拌直至胰島素完全溶解。向所得溶液添加於有機溶劑(諸如DMSO或DMF)之溶液中經活化之酯中間物。UPLC後，層析圖顯示大部分該反應混合物已轉化為 $N^{6,29B},N^{6,B29B'}$ -胰島素二聚體(或 $N^{6,28B},N^{6,28B'}$ -離脯胰島素二聚體)，該反應溶液經由自動移液管轉移至含有IPAc/MTBE (v/v 4:1) (45 mL)之50 mL離心管中。該添加逐滴完成。離心(在4°C下，3000 rpm，15分鐘)所得白色懸浮液以產生澄清上清液及白色丸粒。抽淨上清液並在真空中乾燥白色丸粒。然後使含有白色丸粒之粗中間物在0°C下溶解於2mL TFA中並在相同溫度下攪拌10分鐘。去boc反應一經完成，該反應溶液經由自動移液管轉移至含有MTBE (45 mL)之50 mL離心管中。該添加逐滴完成。離心(在4°C下，3000 rpm，15分鐘)所得白色懸浮液以產生澄清上清液及白色丸粒。抽淨上清液並在真空中乾燥白色丸粒，並再溶解於 $CH_3CN/H_2O$  (v/v 1:4)溶液中。反應混合物可直接經受反相HPLC純化(Waters C4 250x50 mm管柱，10  $\mu$ m，1000 Å管柱或KROMASIL C8 250x50 mm，10  $\mu$ m，100Å管柱；緩衝液A：0.05-0.1% TFA於去離子水中；緩衝液B：0.05-0.1% TFA於AcCN中)，或該反應可藉由在0°C用冷酸性 $H_2O$  (20x，pH ~ 3.0)小心稀釋中止並使用1 N HCl (及若需要，使用0.1 N NaOH)將其pH調整至2.5之最終pH。該溶液可首先藉由超濾(透過切向流過濾(TFF)系統或使用Amicon Ultra-15離心單元)以1K、3K或10K MWCO膜濃縮。該經濃縮之溶液通常首先經受離子交換層析(PolySULFOETHYL A管柱，PolyLC Inc.，250x21 mm，5  $\mu$ m，1000 Å；緩衝液A：0.1%(v/v) $H_3PO_4$ /25%AcCN；緩衝液B：0.1%(v/v) $H_3PO_4$ /25%AcCN/0.5 M NaCl)。合併含有具有所需純度之B29-結合物之溶離份及使用TFF系統或Amicon Ultra-15濃縮。然後該經濃縮之溶液經受反相HPLC純化(Waters C4 250x50 mm管

柱，10  $\mu\text{m}$ ，1000  $\text{\AA}$ 管柱或KROMASIL C8 250x50 mm，10  $\mu\text{m}$ ，100 $\text{\AA}$ 管柱；緩衝液A：0.05-0.1% TFA於去離子水中；緩衝液B：0.05-0.1% TFA於AcCN中)。合併含有所需之胰島素二聚體之溶離份及凍乾或使用TFF系統及/或Amicon Ultra-15進行緩衝液交換以產生 $\text{N}^{6,29\text{B}}$ 、 $\text{N}^{6,29\text{B}'}$ -胰島素二聚體。

表12列舉使用適當連接子遵循一般方法B (二聚體77及78)、一般方法C (二聚體71及72)或一般方法F (二聚體81及87)製得之二聚體71、72、77、78、81及87。使用UPLC-MS方法D或UPLC-MS方法E表徵此等二聚體，在某些滯留時間( $R_t$ )下，顯示帶六個電荷(即， $[(M+6)/6]$ )，(或帶七個電荷，即 $[(M+7)/7]$ )種類之親代化合物。

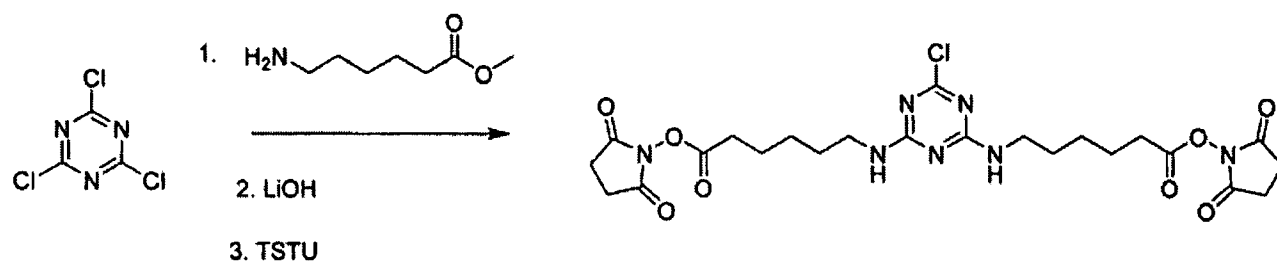
| 表12   |                                |                                 |                |                             |
|-------|--------------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構 | 胰島素類型；<br>胰島素N端                 | $R_t$<br>(min) | $(M+6)/6$<br>或<br>$(M+7)/7$ |
| 71    |                                | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H    | 3.05           | 1959.33<br>1679.86          |
| 72    |                                | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H    | 3.07           | 1959.33<br>1679.86          |
| 81    |                                | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>= H    | 3.37           | 1959.48<br>1679.74          |
| 77    |                                | RHI；<br>A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲醯基 | 3.50           | 1988.07<br>1704.29          |

|                                  |   |                                 |      |                    |
|----------------------------------|---|---------------------------------|------|--------------------|
| 78                               |  | RHI ;<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基 | 3.52 | 1988.08<br>1704.35 |
| 86                               |  | RHI:<br>A1,B1,A1',B1'<br>=胺甲醯基  | 3.48 | 1988.18<br>1704.24 |
| 波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之ε胺基間的鍵。 |   |                                 |      |                    |

## 實例26

二聚體68及二聚體74之合成如下所示。

描述6,6'-((6-氯-1,3,5-三嗪-2,4-二基)雙(氮二基))二己酸雙(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)(連接子33；C6N-氯-1,3,5-三嗪-NC6)之合成。



將2,4,6-三氯-1,3,5-三嗪(80 mg, 0.434 mmol)及6-胺基己酸甲酯(129 mg, 0.889 mmol) HCl鹽於CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL)中之溶液冷卻至-30°C。滴加DIPEA (0.379 mL, 2.169 mmol)於CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL)中之溶液。在-30°C至室溫下攪拌該混合物5小時。然後添加CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL)並用水性HCl(1 M) (2X10 mL)、水性NaHCO<sub>3</sub> (10 mL)及鹽水(10 mL)清洗。該有機層在硫酸鈉上乾燥並過濾，真空濃縮以提供6,6'-((6-氯-1,3,5-三嗪-2,4-二基)雙(氮二基))二己酸二甲酯(135 mg, 0.336 mmol)。

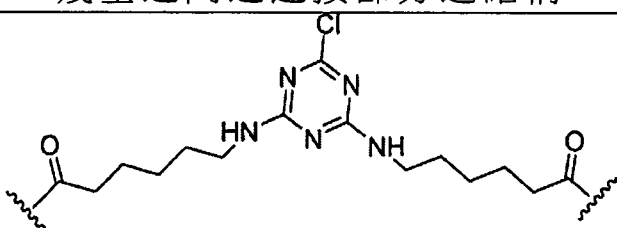
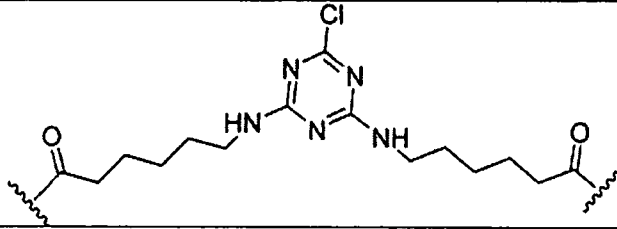
向6,6'-((6-氯-1,3,5-三嗪-2,4-二基)雙(氮二基))二己酸二甲酯(135 mg, 0.336 mmol)於THF (0.5 mL)及甲醇 (0.5 mL)中之溶液中添加水性

(2M) LiOH (504  $\mu$ L, 1.008 mmol)。該混合物在室溫下攪拌1小時及然後真空中濃縮以產生乾燥殘餘物。將殘餘物溶解於水中並用水性HCl中和。藉由過濾收集沉澱並用水清洗。於真空中乾燥該固體以提供6,6'-((6-氯-1,3,5-三嗪-2,4-二基)雙(氮二基))二己酸。

向6,6'-((6-氯-1,3,5-三嗪-2,4-二基)雙(氮二基))二己酸(108 mg, 0.289 mmol)於DMF (2889  $\mu$ l)中之溶液中添加TSTU(174 mg, 0.578 mmol)，接著添加三乙胺(81  $\mu$ L, 0.578 mmol)。攪拌該反應1小時。UPLC指示所需材料之形成，UPLC-MS方法C：Rt=0.99 min，m/z=568.2 [M+1]。此試劑(0.1M/DMF)無需進一步純化即可使用。

使用一般方法B(二聚體74)或一般方法C (二聚體68)製備該等二聚體。使用UPLC-MS方法D或UPLC-MS方法E表徵此等二聚體，在某些滯留時間(Rt)下，顯示帶六個電荷(即，[(M+6)/6])，(或帶七個電荷，即[(M+7)/7])種類之親代化合物。使用連接子33及RHI構築二聚體68。使用連接子33及類似物5構築二聚體74。該等結果顯示於表13中。

表13

| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構  | 胰島素類型；<br>胰島素<br>N端     | Rt<br>(min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
|-------|---|-------------------------|-------------|-------------------------|
| 68    |  | A1,B1,A1',B1'<br>= H    | 3.48        | 1993.09                 |
| 74    |  | A1,B1,A1',B1'<br>= 胺甲醯基 | 3.56        | 1733.20                 |

波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之 $\epsilon$ 胺基間的鍵。

## 實例27

二聚體**54**之合成如下所示。

將A1-TFA-RHI (D. Liu等人, *Journal of Peptide Sci.*, 2012, 18, 336-341) (100 mg, 0.017 mmol)溶解於含有水(5mL)及磷酸二氫鉀(24.49 mg, 0.141 mmol)之預混合物中(所得溶液之pH係約4)。添加氰酸鉀(27.5 mg, 0.339 mmol)並攪拌過夜。藉由反相層析於C-8相(管柱KROMASIL, C8 10 $\mu$ M 100A, 尺寸250 x 50mm; 溶劑A=水/0.05%TFA, 溶劑B=AcCN/0.05%TFA)上純化該產物, 流速=85 mL/min, 30分鐘內B於A中之26-34%梯度。UPLC-MS方法F: Rt = 4.48 min, m/z = 1486.9 [(M+4)/4 +1]。

使上述產物(60 mg, 10.09  $\mu$ mol)溶解於DMSO (594  $\mu$ l)中並添加三乙胺(28.1  $\mu$ L, 0.202 mmol), 接著添加溶解於100  $\mu$ L DMSO中之連接子辛二酸二琥珀醯亞胺酯(1.858 mg, 5.04  $\mu$ mol)之溶液。攪拌3小時。UPLC指示反應完成。將全部之反應混合物添加至氫氧化銨(2105  $\mu$ L, 15.13 mmol)中(逐滴, 預期放熱)。輕輕攪拌2小時並證實TFA基團之去保護。藉由20 mL水稀釋該混合物並藉由使用10K Amicon管之透濾移除大部分氫氧化銨。將pH調整至約3並藉由透濾移除鹽。藉由離子交換層析(PolySULFOETHYL A管柱, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5  $\mu$ m, 1000 Å; 緩衝液A: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN; 緩衝液B: 0.1%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/25%AcCN/0.5 M NaCl)純化該產物。藉由反相層析於C-8相(管柱KROMASIL, C8 10  $\mu$ M 100A, 尺寸250 x 50mm; 溶劑A=水/0.05%TFA, 溶劑B=AcCN/0.05%TFA)上再純化該產物。該結果顯示於下文中。結果顯示於表**14**中。

表14

| 二聚體編號 | 二聚體之顯示在B29與B29'離胺酸殘基之間之連接部分之結構 | 胰島素類型；<br>胰島素N端                       | Rt<br>(min) | (M+6)/6<br>或<br>(M+7)/7 |
|-------|--------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------|
| 54    |                                | RHI；<br>A1,A1'=H,<br>B1,B1'= 胺<br>甲醯基 | 4.57        | 1974.45                 |

波浪線分別指示與B29 Lys及B29' Lys之 $\epsilon$ 胺基間的鍵。

#### 實例28

如下進行胰島素受體結合分析。

在閃爍接近分析(SPA)中於384孔格式中使用自生長於含有10% FBS及抗生素(G418，盤尼西林(Penicillin)/鏈黴親和素)之F12培養基中之過表現人類IR(B)之CHO細胞製得的細胞膜進行IR結合分析。細胞膜係於50 mM含有5 mM  $MgCl_2$ 之pH為7.8之Tris緩衝液中製得。該分析緩衝液含有50 mM Tris緩衝液(pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM  $CaCl_2$ 、5 mM  $MgCl_2$ 、0.1% BSA及蛋白酶抑制劑(Complete-Mini-Roche)。將細胞膜添加至WGA PVT PEI SPA珠(5 mg/mL最終濃度)，接著添加適當濃度之胰島素二聚體分子。在室溫下培養5-15分鐘後，以0.015 nM最終濃度添加 $^{125}I$ -胰島素，以達成50  $\mu$ L最終總體積。在室溫下振盪培養該混合物1至12小時，接著藉由閃爍計數測定結合至IR之 $^{125}I$ -胰島素及胰島素二聚體分子對此相互作用之滴定效應。

#### 實例29

如下進行胰島素受體(IR) AKT-磷酸化分析。

IR AKT-磷酸化分析：可藉由量測Akt蛋白之磷酸化(胰島素受體訊號傳遞級聯中之關鍵步驟)評定胰島素受體活化。過表現人類IR之CHO細胞係用於HTRF夾心ELISA分析套組(Cisbio「磷酸化-AKT(Ser473)及磷酸化-AKT(Thr308)細胞分析套組」)中。細胞生長於以10% FBS、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418及10 mM HEPES補充之F12培養基中。分析前，將該等細胞於無血清培養基中培養2至4小時。或者，該等細胞可提前冷凍並等分於含有20% DMSO之培養基中，並在經解凍、快速離心及再懸浮後即用於分析中。將細胞以每孔10,000個細胞接種於384孔板中之20  $\mu\text{L}$ 無血清F12培養基中。在測試化合物之各板上進行蛇麻素及甘精胰島素對照組。將經滴定之化合物添加至細胞(每孔2  $\mu\text{L}$ ，最終濃度=以1:5倍稀釋，1000 nM經滴定降至0.512 pM)中並在37  $^{\circ}\text{C}$ 下培養30分鐘。用提供於CisBio套組中之8  $\mu\text{L}$ 已製備之細胞溶解緩衝液細胞溶解該等細胞並在25  $^{\circ}\text{C}$ 下培養1小時。根據套組說明書製備經稀釋之抗體試劑(抗AKT-d2及抗pAKT-Eu3/穴狀化合物)及然後將10  $\mu\text{L}$ 添加至各孔細胞溶解產物中，接著在25  $^{\circ}\text{C}$ 下培養3.5至5小時。藉由於Envision板讀數器(激發=320 nm；發射=665 nm)中讀出該板以測定關於各化合物之效能及最大反應之IR pAkt促效劑活性。或者，在1.6 nM蛇麻素之存在下以相同方式測試該等化合物以判定各化合物如何可競爭對抗胰島素之完整促效劑活性。

### 實例30

表15顯示胰島素二聚體對胰島素受體(IR)之活體外生物活性。該等活性係藉由如描述於實例28中之配體競爭分析或如描述於實例29中之功能性Akt-磷酸化分析來量測。

表15

| 二聚體<br>編號 | IR結合<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) | IR pAkt<br>%最大 | 二聚體<br>編號 | IR結合<br>IC <sub>50</sub><br>(nM) | IR pAkt<br>%最大 |
|-----------|----------------------------------|----------------|-----------|----------------------------------|----------------|
| 1         | 1.50                             | 50.5           | 43        | 2.02                             | 35             |
| 2         | 3.77                             | 33             | 44        | 1.18                             | 33             |
| 3         | 1.38                             | 59.5           | 45        | 4.00                             | 38             |
| 4         | 1.62                             | 47.5           | 46        | 0.38                             | 25             |
| 5         | 2.42                             | 43             | 47        | 4.56                             | 30             |
| 6         | 1.00                             | 83             | 48        | 5.09                             | 35             |
| 7         | 3.19                             | 60             | 49        | 5.16                             | 58             |
| 8         | 7.15                             | 47.5           | 50        | 3.61                             | 39             |
| 9         | 3.29                             | 42             | 51        | 0.59                             | 27             |
| 10        | 3.59                             | 34             | 52        | 3.93                             | 67             |
| 11        | 1.37                             | 32             | 54        | 0.49                             | 26             |
| 12        | 13.1                             | 41             | 55        | 2.02                             | 28             |
| 13        | 2.51                             | 36             | 56        | 2.94                             | 33             |
| 14        | 4.42                             | 38             | 57        | 2.02                             | 26             |
| 15        | 2.53                             | 49             | 58        | 0.61                             | 34             |
| 16        | 4.76                             |                | 59        | 0.97                             | 53             |
| 17        | 5.27                             | 62             | 60        | 1.81                             | 60             |
| 18        | 5.23                             | 36             | 61        | 20.3                             | 33             |
| 19        | 1.40                             | 25             | 62        | 5.01                             | 32             |
| 20        | 0.62                             | 36             | 63        | 26.7                             | 41             |

|           |      |      |           |      |    |
|-----------|------|------|-----------|------|----|
| <b>21</b> | 1.88 | 41   | <b>64</b> | 15.7 | 34 |
| <b>22</b> | 1.85 | 41.5 | <b>65</b> | 3.05 | 42 |
| <b>23</b> | 2.48 | 39   | <b>66</b> | 34.5 | 33 |
| <b>24</b> | 4.29 | 29.3 | <b>67</b> | 0.54 | 24 |
| <b>25</b> | 1.82 | 46   | <b>68</b> | 4.81 | 34 |
| <b>26</b> | 3.74 | 44   | <b>69</b> | 4.99 | 18 |
| <b>27</b> | 3.98 | 31   | <b>70</b> | 14.8 | 21 |
| <b>28</b> | 1.96 | 25   | <b>71</b> | 2.28 | 45 |
| <b>29</b> | 1.18 | 30   | <b>72</b> | 2.35 | 42 |
| <b>30</b> | 1.79 | 30   | <b>73</b> | 37.8 | 35 |
| <b>31</b> | 1.36 | 31   | <b>74</b> | 73.8 | 33 |
| <b>32</b> | 21.6 | 33   | <b>75</b> | 1.85 | 52 |
| <b>33</b> | 2.41 | 38   | <b>76</b> | 1.87 | 35 |
| <b>34</b> | 0.57 | 67   | <b>77</b> | 42.1 | 23 |
| <b>35</b> | 1.17 | 66   | <b>78</b> | 167  | 22 |
| <b>36</b> | 0.53 | 28   | <b>79</b> | 1.47 | 42 |
| <b>37</b> | 3.52 | 42   | <b>80</b> | 5.48 | 39 |
| <b>38</b> | 2.18 | 45   | <b>81</b> | 0.3  | 40 |
| <b>39</b> | 3.17 | 45   | <b>82</b> | 1.73 | 50 |
| <b>40</b> | 2.03 | 41   | <b>83</b> | 558  | 21 |
| <b>41</b> | 0.64 | 35   | <b>84</b> | 2.19 | 50 |
| <b>42</b> | 2.97 | 49   |           |      |    |

## 實例31

在此項實例中，比較本發明之數種胰島素受體部分促效劑之活體內效應與化合物A（揭示於經公開之PCT申請案號WO2014052451中

之胰島素二聚體 MIU-90) 及化合物 B (揭示於 Deppe 等人, *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350: 213-217 (1994) 中之 B29, B29'-辛二醯基-(胰島素)<sub>2</sub>) 之活體內效應, 但在成年雄性精瘦 C57BL/6NTac 小鼠中進行之腹膜內胰島素耐受性測試 (IP-ITT) 分析中使用 RHI 替換牛胰島素。

根據體重 (平均約 30 公克) 隨機化每組 N=6-8 隻動物之組。研究前兩天, 使小鼠適應以 5 ml/kg 給藥體積腹膜內注射 0.9% 氯化鈉溶液之給藥。在研究日之早上, 在研究前兩小時或四小時移除食物。在 T=0 分鐘 (基線) 時使用血糖儀測定血液葡萄糖濃度。然後經由腹膜內注射對小鼠給藥 5 mL/kg 的媒劑、二聚體 24、二聚體 55、二聚體 58、二聚體 60、二聚體 67、化合物 A、化合物 B 或蛇麻素 (RHI) (所用劑量參見表 16)。血液葡萄糖水平係測定自給藥後 30 至 360 分鐘間抽取之尾部血液。

| 表 16   |             |
|--------|-------------|
| 化合物    | 劑量          |
| A      | 72 nmol/Kg  |
|        | 300 nmol/Kg |
| B      | 72 nmol/Kg  |
|        | 300 nmol/Kg |
| 二聚體 24 | 72 nmol/Kg  |
|        | 300 nmol/Kg |
| 二聚體 55 | 120 nmol/Kg |
|        | 300 nmol/Kg |
| 二聚體 58 | 60 nmol/Kg  |
|        | 300 nmol/Kg |

|       |             |
|-------|-------------|
| 二聚體60 | 120 nmol/Kg |
|       | 300 nmol/Kg |
| 二聚體67 | 60 nmol/Kg  |
|       | 300 nmol/Kg |
| 蛇麻素   | 18 nmol/Kg  |
|       | 72 nmol/Kg  |

該等結果顯示於圖2A、2B、2C、2D、2E、2F及2G中。該等結果顯示兩種測試劑量下之二聚體24、二聚體55、二聚體58、二聚體60及二聚體67之葡萄糖概況大體上相同，然而增加化合物A及B之劑量引起增加之葡萄糖降低效能，此指示相較於RHI或化合物A及B，該等二聚體之低血糖風險之低可能性。

### 實例32

如下比較二聚體24、18及40與RHI在糖尿病尤卡坦(Yucatan)小型豬(D小型豬)中之葡萄糖降低效應。

尤卡坦小型豬遵循由辛克萊研究中心(Sinclair Research Center)(Auxvasse, MO)開發之私有協議藉由四氧嘧啶注射劑而顯示1型糖尿病。若基礎葡萄糖水平超過150 mg/dL，則認為引入成功。具有約300 mg/dl之血漿葡萄糖水平之D小型豬用於此等實驗中。

在此等研究中使用配備兩個頸靜脈血管接入通口(VAP)之雄性尤卡坦小型豬。在過夜禁食後之研究日那天，將小型豬放置於吊物機中，及接入VAP進行輸液及取樣。在t=0分鐘時，及收集兩種基線血液樣本進行血漿葡萄糖量測(t=-30分鐘及t=0分鐘)後，以單一推注IV以0.69 nmol/kg向小型豬投與蛇麻素(重組人類胰島素，RHI)或IRPA。蛇麻素及IRPA係以69 nmol/ml調配於含有16 mg/mL甘油、1.6 mg/mL間甲酚、0.65 mg/mL苯酚、3.8 mg/mL無水磷酸二氫鈉之緩衝液(用

HCl將pH調整至7.4)中。給藥後，繼續取樣480分鐘；用於樣本收集之時間點係-30分鐘、0分鐘、8分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、120分鐘、150分鐘、180分鐘、210分鐘、240分鐘、270分鐘、300分鐘、330分鐘、360分鐘、420分鐘、480分鐘。血液收集於K3-EDTA管中，補充10 µg/mL蛋白酶抑制劑，並保持於冰上，直至收集後之30分鐘內進行處理。在4°C下以3000 rpm離心8分鐘後，收集血漿並經等分以使用貝克曼計數器(Beckman Coulter)AU480化學分析儀進行葡萄糖量測及進行化合物水平量測。

圖1顯示在0.69 nmol/kg濃度下，RHI將血清葡萄糖水平減小至50 mg/dL，然而該等胰島素二聚體並未如此。此結果顯示該等胰島素二聚體呈現比RHI小之促進低血糖症之風險。

### 實例33

如下比較二聚體4、5、7、8、9、18-29、32、37-41、43、44、48、55、57、58、60、61、62、64、67、69、71、72、77及78與RHI在糖尿病尤卡坦小型豬(D小型豬)中之葡萄糖降低效應。

尤卡坦小型豬遵循由辛克萊研究中心(Auxvasse, MO)開發之私有協議藉由四氧嘧啶注射劑而顯示1型糖尿病。若基礎葡萄糖水平超過150 mg/dL，則認為引入成功。在此等研究中使用具有約300-400 mg/dl之血漿葡萄糖水平及配備兩個頸靜脈血管接入通口(VAP)之D小型豬。

在過夜禁食後之研究日那天，將小型豬放置於吊物機中，及接入VAP進行輸液及取樣。在t=0分鐘時，及收集兩種基線血液樣本進行血液葡萄糖量測(t=-30分鐘及t=0分鐘)後，以單一推注IV以0.69 nmol/kg (化合物#78以0.35 nmol/kg)向小型豬投與蛇麻素(重組人類胰島素，RHI)或其他二聚體。蛇麻素及二聚體係以69 nmol/ml調配於含有16 mg/mL甘油、1.6 mg/mL間甲酚、0.65 mg/mL苯酚、3.8 mg/mL無

水磷酸二氫鈉之緩衝液(用HCl將pH調整至7.4)中。給藥後，繼續取樣480分鐘；用於樣本收集之時間點係-30分鐘、0分鐘、8分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、60分鐘、90分鐘、120分鐘、150分鐘、180分鐘、210分鐘、240分鐘、270分鐘、300分鐘、330分鐘、360分鐘、420分鐘及480分鐘。血液收集於K3-EDTA管中，補充10 µg/mL蛋白酶抑制劑，並保持於冰上，直至收集後之30分鐘內進行處理。在4°C下以3000 rpm離心8分鐘後，收集血漿並經等分以使用貝克曼計數器AU480化學分析儀進行葡萄糖量測。該等結果顯示於圖7A-7H中。該等圖式顯示在0.69 nmol/kg濃度下，RHI將血清葡萄糖水平減小至50 mg/dL，然而該等胰島素二聚體並未如此。此結果顯示該等胰島素二聚體呈現比RHI小之促進低血糖症之風險。

#### 實例34

此實驗比較化合物A之二硫化物連接部分與二聚體24之辛二醯基(C8)連接部分之穩定性。

1 µM化合物A及二聚體24各單獨培養於含有或不含5 mM麩胱甘肽(GSH)之大鼠腎臟細胞膜(RKCM)中。獲得時間0及時間2小時之樣本並用1體積含於含0.1%甲酸的AcCN中之10% MeOH中止該反應。然後在分析前離心並冷凍經中止之樣本。然後解凍該等樣本並使用Thermo Orbi Velos系統分析。以提取離子層析(XIC)使用來自2種電荷狀態之3種同位素在10 ppm窗口下進行目標化MetID分析。

在不含或含有GSH之RKCM中偵測到化合物A代謝物。如圖3中所示，培養2小時後，單體係親代(化合物A之原液)之約1%。如圖4中所示，培養2小時後，單體係親代(化合物A之原液)之約6.5%。該等結果顯示二硫鍵聯隨時間斷裂。在針對化合物A之0小時對照組中或在原液中未觀察到代謝物。

於RKCM中偵測到二聚體24產生之代謝物，然而，儘管觀察到因

A鏈多肽與B鏈多肽之間之二硫鍵之斷裂引起之A鏈多肽之損失，但未偵測到單體。圖5顯示若無GSH，則A鏈多肽之損失小於親代(二聚體24之原液)之1%。圖6顯示若具有GSH，則A鏈多肽之損失小於親代(二聚體24之原液)之1%。在針對二聚體24之0小時對照組中或在原液中未觀察到代謝物。酸性條件下之新穎中止過程恰當地停止二硫化物交換。

| 序列表        |   |  |
|------------|---|--|
| SEQ ID NO: | 描述  | 序列   |
| 1          | 智人胰島素A鏈   | GIVEQCCTSICSLYQLENYCN  |
| 2          | 智人胰島素B鏈   | FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT   |
| 3          | 人造序列胰島素A鏈<br>X <sub>2</sub> 係異白胺酸或蘇胺酸；<br>X <sub>3</sub> 係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸；<br>X <sub>8</sub> 係蘇胺酸或組胺酸；<br>X <sub>17</sub> 係麩胺酸或麩醯胺；<br>X <sub>19</sub> 係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；<br>X <sub>23</sub> 係天冬醯胺酸或甘胺酸； | GX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> EQCCX <sub>8</sub> SICSLYQLX <sub>17</sub> NX <sub>19</sub> CX <sub>23</sub>        |
| 4          | 人造序列胰島素B鏈<br>X <sub>25</sub> 係組胺酸或蘇胺酸；<br>X <sub>29</sub> 係丙胺酸,甘胺酸或絲胺酸；<br>X <sub>30</sub> 係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；<br>X <sub>31</sub> 係脯胺酸或離胺酸；及   | X <sub>25</sub> LCGX <sub>29</sub> X <sub>30</sub> LVEALYLVCGERGFX <sub>27</sub> YTX <sub>31</sub> X <sub>32</sub> |

|   |   |  |
|---|---|--|
|   | X <sub>32</sub> 係脯胺酸或離胺酸，限制條件為X <sub>31</sub> 或X <sub>32</sub> 中之至少一者係離胺酸   |  |
| 5 | <p>X<sub>22</sub>係苯丙胺酸或去胺基-苯丙胺酸；</p> <p>X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；</p> <p>X<sub>26</sub>係甘胺酸或白胺酸；</p> <p>X<sub>27</sub>係苯丙胺酸或天冬胺酸；</p> <p>X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；</p> <p>X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；</p> <p>X<sub>31</sub>係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸；</p> <p>X<sub>32</sub>係離胺酸或脯胺酸；</p> <p>X<sub>33</sub>係蘇胺酸、丙胺酸或不存在；</p> <p>X<sub>34</sub>係精胺酸或不存在；及</p> <p>X<sub>35</sub>係精胺酸或不存在；</p> <p>限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸</p> | <p>X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub></p> <p>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub></p> |
| 6 | <p>人造序列</p> <p>離脯胰島素B鏈</p>  | FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT   |
| 7 | <p>人造序列</p> <p>甘精胰島素A鏈</p>  | GIVEQCCTSICSLYQLENYCG  |
| 8 | <p>人造序列</p> <p>甘精胰島素B鏈</p>  | FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR   |
| 9 | <p>人造序列</p>   | FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT   |

|    |                 |                               |
|----|-----------------|-------------------------------|
|    | 胰島素天冬胰島素B鏈      |                               |
| 10 | 人造序列<br>B:des30 | FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK |
| 11 | 人造序列<br>A: Y19A | GIVEQCCTSICSLYQLENACN         |

儘管本文根據闡述之實施例描述本發明，但應瞭解本發明非限制於該等實施例。可明白本文之教義之一般技術者將知曉位於本發明之範圍內之其他修飾及實施例。因此，本發明僅由本文隨附之申請專利範圍限制。

#### 【符號說明】

無

## 【序列表】

<110> 松年 林  
 林 嚴  
 培 霍  
 德密特 皮薩尼斯基  
 丹青 馮  
 瑞維 納格恩  
 渝萍 朱  
 亞曼特 科克  
 克莉絲提娜 B 麥帝森-道格  
 志才 史  
 志才 吳  
 迎軍 穆

<120> 胰島素受體部分促效劑

<130> 23876

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<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  
 20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
 20 25 30

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 胰島素 A 鏈突變體

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 係異白胺酸或蘇胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa 係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa 係蘇胺酸或組胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa 係麩胺酸或麩醯胺

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa 係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或 4-胺基-苯丙胺酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa 可係任何天然生成之胺基酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Xaa 係天冬醯胺酸或甘胺酸

<400> 3

Gly Xaa Xaa Glu Gln Cys Cys Xaa Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15

Xaa Asn Xaa Cys Xaa  
 20

<210> 4  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人造序列

<220>  
 <223> 胰島素 B 鏈變體

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa 係組胺酸或蘇胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(25)  
 <223> 限制條件為 24 或 25 中至少一者係離胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa 係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)  
 <223> Xaa 係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa 係脯胺酸或離胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa 係脯胺酸或離胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Xaa 係脯胺酸或離胺酸

<400> 4

Xaa Leu Cys Gly Xaa Xaa Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Thr Xaa Xaa  
 20 25

<210> 5  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人造序列

<220>  
 <223> 胰島素 B 鏈變體

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa 係苯丙胺酸或去胺基-苯丙胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(32)  
 <223> 限制條件為 28 或 29 中至少一者係離胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa 係組胺酸或蘇胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa 係甘胺酸或白胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa 係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa 係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Xaa 係苯丙胺酸或天冬胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Xaa 係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa 係離胺酸或脯胺酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (30)..(30)  
 <223> Xaa 係蘇胺酸、丙胺酸或不存在

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Xaa 係精胺酸或不存在

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (32)..(32)  
 <223> Xaa 係精胺酸或不存在

<400> 5

Xaa Val Asn Gln Xaa Xaa Cys Gly Xaa Xaa Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Xaa Tyr Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人造序列

<220>  
 <223> 離脯胰島素 B 鏈

<400> 6

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

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr  
 20 25 30

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人造序列

<220>  
 <223> 甘精胰島素 A 鏈

&lt;400&gt; 7

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

Glu Asn Tyr Cys Gly  
 20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人造序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 甘精胰島素 B 鏈

&lt;400&gt; 8

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

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg  
 20 25 30

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人造序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 天冬胰島素 B 鏈

&lt;400&gt; 9

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

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr  
 20 25 30

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人造序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Des30 B 鏈

&lt;400&gt; 10

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

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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 21

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> A 鏈 Y19A

<400> 11

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

Glu Asn Ala Cys Asn  
                  20

## 申請專利範圍

1. 一種胰島素受體部分促效劑，其包含：

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；

其中該等第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；且

其中該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基，

限制條件為該連接部分不包括二硫鍵。

2. 一種胰島素受體部分促效劑，其包含：

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；

其中該等第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；且

視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之A鏈多肽及B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基，

限制條件為(1)該連接部分不包括二硫鍵及(2)當該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端不包括取代基時，則該連接部分非為草醯基(C2)部分、辛二醯基(C8)部分或十二烷二醯基(C12)部分。

3. 一種胰島素受體部分促效劑，其包含：

第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素

類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；

其中該等第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；

視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之A鏈多肽及B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基；且其中該胰島素受體部分促效劑對人類胰島素受體(IR)具有最大反應為原始人類胰島素對該IR之最大反應之約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%，如藉由功能性磷酸化分析測定。

4. 如請求項3之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含不包括二硫鍵之連接部分及當該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端不包括取代基時，該連接部分非為草醯基(C2)部分、辛二醯基(C8)部分或十二烷二醯基(C12)部分。
5. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含相同之第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體或其中該等第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係不同的。
6. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含連接部分經由在其等各自B鏈多肽之羧基端處或附近之離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基而共價連接該第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及該第二胰島素或胰島素類似物異二聚體。
7. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中該取代基包含通式 $RC(O)-$ ，其中R可係 $R'CH_2$ 、 $R'NH$ 、 $R'O$ ，及 $R'$ 可係

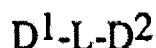
H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)及醣。

8. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含選自由以下組成之群之取代基：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。
9. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含第一及第二胰島素或胰島素類似物，其等係獨立地選自由以下組成之群：原始人類胰島素、離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素及甘精胰島素。
10. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中各A鏈多肽獨立地包含胺基酸序列GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EQCCX<sub>8</sub>SICSLYQLX<sub>17</sub>NX<sub>19</sub>CX<sub>23</sub> (SEQ ID NO: 3)及各B鏈多肽獨立地包含胺基酸序列X<sub>25</sub>LCGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO:4)或X<sub>22</sub>VNQX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>CGX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>LVEALYLVCGERGFX<sub>27</sub>YTX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>(SEQ ID NO: 5)，其中X<sub>2</sub>係異白胺酸或蘇胺酸；X<sub>3</sub>係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸；X<sub>8</sub>係蘇胺酸或組胺酸；X<sub>17</sub>係麩胺酸或麩醯胺；X<sub>19</sub>係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸；X<sub>23</sub>係天冬醯胺酸或甘胺酸；X<sub>22</sub>係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸；X<sub>25</sub>係組胺酸或蘇胺酸；X<sub>26</sub>係白胺酸或甘胺酸；X<sub>27</sub>係苯丙胺酸或天冬胺酸；X<sub>29</sub>係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸；X<sub>30</sub>係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸；X<sub>31</sub>係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸；X<sub>32</sub>係離胺酸或脯胺酸；X<sub>33</sub>係蘇胺酸、丙胺酸或不存在的；X<sub>34</sub>係精胺酸或不存在的；及X<sub>35</sub>係精胺酸或不存在的；限制條件為X<sub>31</sub>或X<sub>32</sub>中之至少一者係離胺酸。
11. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中該連接

部分包含二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地包含氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分及聚(乙二醇) (PEG)。

12. 如請求項1至4中任一項之胰島素受體部分促效劑，其中該連接部分包含烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-4)、醯基部分(-C(O)RC(O)-，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇) (PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈)。

13. 一種胰島素受體部分促效劑，其包含下式：



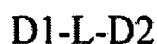
其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>各獨立地係胰島素或胰島素類似物多肽，

其中各胰島素多肽係包含透過鏈間二硫鍵連接在一起之A鏈多肽及B鏈多肽之異二聚體；

L係連接部分，其中該連接子部分之一端係連接至D<sup>1</sup>之羧基處或附近之胺基酸殘基且該連接子部分之另一端係連接至D<sup>2</sup>之羧基端處或附近之胺基酸殘基，限制條件為L不包括二硫鍵聯；及

其中該等第一及第二胰島素或胰島素類似物多肽包括取代基連接至該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端。

14. 一種胰島素受體部分促效劑，其包含下式：



其中D1及D2各獨立地係胰島素或胰島素類似物多肽，其中各

胰島素多肽係包含透過鏈間二硫鍵連接在一起之A鏈多肽及B鏈多肽之異二聚體；

L係連接部分，其中該連接子部分之一端係連接至D1之羧基處或附近之胺基酸殘基且該連接子部分之另一端係連接至D2之羧基端處或附近之胺基酸殘基，限制條件為L不包括二硫鍵聯；及

視需要，其中D1或D2中之至少一者包括取代基連接至D1或D2之A鏈多肽或B鏈多肽之胺基端；

限制條件為(1)該連接部分不包括二硫鍵及(2)當該胰島素或胰島素類似物非為人類胰島素或胰島素類似物及該A鏈多肽及該B鏈多肽之胺基端不包括取代基時，則該連接部分非為草醯基(C2)部分、辛二醯基(C8)部分或十二烷二醯基(C12)部分。

15. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含相同之D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>或不同之D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>。
16. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含連接部分經由在D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>之羧基端處或附近之離胺酸殘基之ε胺基而共價連接D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>。
17. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含具有通式RC(O)-之取代基，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)及醣。
18. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中該胰島素受體部分促效劑包含選自由以下組成之群之取代基：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。
19. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中胰島素受體部

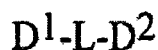
分促效劑包含獨立地選自由以下組成之群之 $D^1$ 及 $D^2$ ：原始人類胰島素、離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素及甘精胰島素。

20. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中各A鏈多肽獨立地包含胺基酸序列 $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$  (SEQ ID NO:3)及各B鏈多肽獨立地包含胺基酸序列 $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEQ ID NO:4)或 $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEQ ID NO:5)，其中 $X_2$ 係異白胺酸或蘇胺酸； $X_3$ 係纈胺酸、甘胺酸或白胺酸； $X_8$ 係蘇胺酸或組胺酸； $X_{17}$ 係麩胺酸或麩醯胺； $X_{19}$ 係酪胺酸、4-甲氧基-苯丙胺酸、丙胺酸或4-胺基苯丙胺酸； $X_{23}$ 係天冬醯胺酸或甘胺酸； $X_{22}$ 係或苯丙胺酸及去胺基-苯丙胺酸； $X_{25}$ 係組胺酸或蘇胺酸； $X_{26}$ 係白胺酸或甘胺酸； $X_{27}$ 係苯丙胺酸或天冬胺酸； $X_{29}$ 係丙胺酸、甘胺酸或絲胺酸； $X_{30}$ 係組胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、同型半胱胺酸或半胱胺酸； $X_{31}$ 係天冬胺酸、脯胺酸或離胺酸； $X_{32}$ 係離胺酸或脯胺酸； $X_{33}$ 係蘇胺酸、丙胺酸或不存在； $X_{34}$ 係精胺酸或不存在；及 $X_{35}$ 係精胺酸或不存在；限制條件為 $X_{31}$ 或 $X_{32}$ 中之至少一者係離胺酸。
21. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中該連接部分包含二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地包含氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分及聚(乙二醇) (PEG)。

22. 如請求項13或14之胰島素受體部分促效劑，其中該連接部分包含烷基二醯基  $(-C(O)(CH_2)_nC(O)-$ ，其中  $n=0-4$ )、醯基部分  $(-C(O)RC(O)-$ ，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇)(PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈)。
23. 一種胰島素類似物二聚體，其包含：
- 第一胰島素類似物異二聚體及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體，各異二聚體包括A鏈多肽及B鏈多肽，其中該A鏈多肽及該B鏈多肽係透過鏈間二硫鍵連接在一起；
- 其中該等第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係透過連接部分連接該等兩種各自B鏈多肽之羧基端處或附近之胺基酸之側鏈而共價連接在一起；
- 其中該胰島素類似物係選自離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素及甘精胰島素；及
- 視需要其中該第一胰島素多肽或第二胰島素多肽之該等A鏈多肽及該等B鏈多肽中之至少一者之胺基端係共價連接至取代基，
- 限制條件為該連接部分不包括二硫鍵。
24. 如請求項23之胰島素類似物二聚體，其中該胰島素類似物二聚體包含相同之第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體或其中該等第一及第二胰島素或胰島素類似物異二聚體係不同的。
25. 如請求項23之胰島素類似物二聚體，其中該胰島素類似物二聚體包含連接部分經由其等各自B鏈多肽之羧基端處或附近之離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基而共價連接該第一胰島素或胰島素類似物異二聚體及該第二胰島素或胰島素類似物異二聚體。
26. 如請求項23之胰島素類似物二聚體，其中該取代基包含通式  $RC(O)-$ ，其中R可係  $R'CH_2$ 、 $R'NH$ 、 $R'O$ ，及R'可係H、直鏈烷

基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)及醯。

27. 如請求項23之胰島素類似物二聚體，其中胰島素二聚體包含該第一及第二胰島素或胰島素類似物中之至少一者結合至選自由以下組成之群之取代基：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。
28. 如請求項23之胰島素類似物二聚體，其中該連接部分包含二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地包含氫、合適之保護基團、醯基部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分及聚(乙二醇)(PEG)。
29. 如請求項23之胰島素類似物二聚體，其中該連接部分包含烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-4)、醯基部分(-C(O)RC(O)-，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇)(PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈)。
30. 一種胰島素類似物二聚體，其包含下式：



其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>各獨立地係胰島素或胰島素類似物多肽，其中各胰島素多肽係包含透過鏈間二硫鍵連接在一起之A鏈多肽及B鏈多肽之異二聚體；

L係連接部分，其中該連接子部分之一端係連接至D<sup>1</sup>之羧基處

或附近之胺基酸殘基且該連接子部分之另一端係連接至D<sup>2</sup>之羧基端處或附近之胺基酸殘基，限制條件為L不包括二硫鍵聯；

其中該胰島素類似物係選自離脯胰島素、天冬胰島素、desB30胰島素及甘精胰島素；及

視需要，其中D<sup>1</sup>或D<sup>2</sup>中之至少一者包括取代基連接至D<sup>1</sup>或D<sup>2</sup>之A鏈多肽或B鏈多肽之胺基端；

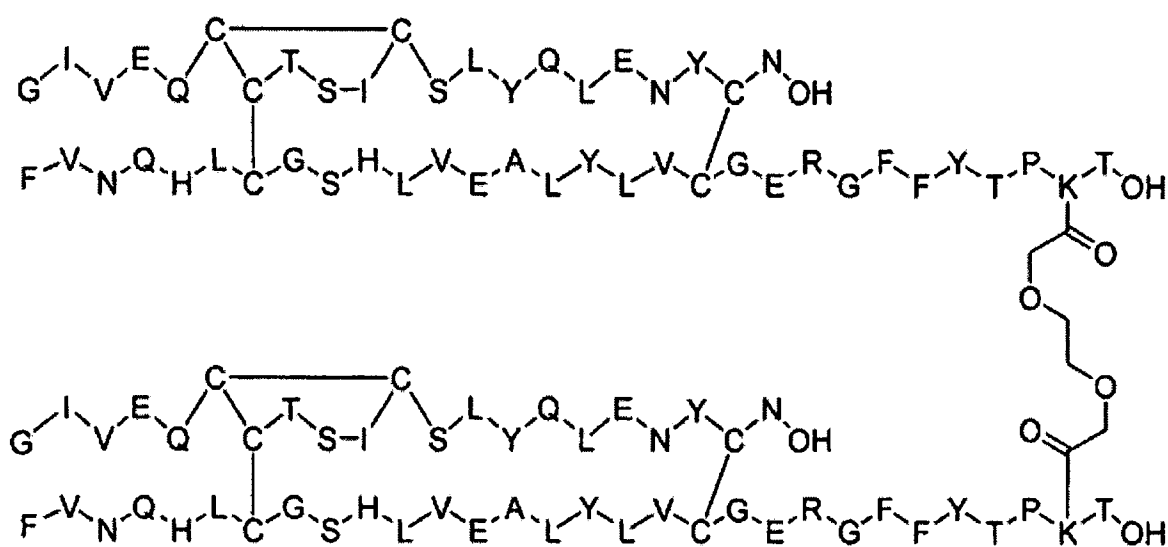
限制條件為該連接部分不包括二硫鍵。

31. 如請求項30之胰島素類似物二聚體，其中胰島素類似物二聚體包含相同之D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>或其中D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>係不同。
32. 如請求項30之胰島素類似物二聚體，其中該胰島素類似物二聚體包含連接部分經由D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>之羧基端處或附近之離胺酸殘基之ε胺基而共價連接D<sup>1</sup>及D<sup>2</sup>。
33. 如請求項30之胰島素類似物二聚體，其中該取代基包含通式RC(O)-，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)及醯。
34. 如請求項30之胰島素類似物二聚體，其中該胰島素類似物二聚體包含選自由以下組成之群之取代基：乙醯基、苯乙醯基、胺甲醯基、N-烷基胺甲醯基、異丁基、甲氧基乙醯基、甘胺酸、胺基乙基葡萄糖(AEG)、AEG-C6、PEG1、PEG2、N-二甲基及烷氧基羰基。
35. 如請求項30之胰島素類似物二聚體，其中該連接部分包含二價、直鏈或分支鏈、飽和或不飽和、視需要經取代之C1-C20烴鏈，其中一或多個亞甲基單元係視需要且獨立地經-O-、-S-、-N(R)-、-C(O)-、C(O)O-、OC(O)-、-N(R)C(O)-、-C(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-N(R)SO<sub>2</sub>-、SO<sub>2</sub>N(R)-、雜環基、芳基或雜芳基置換，其中每次出現之R獨立地包含氫、合適之保護基團、醯基

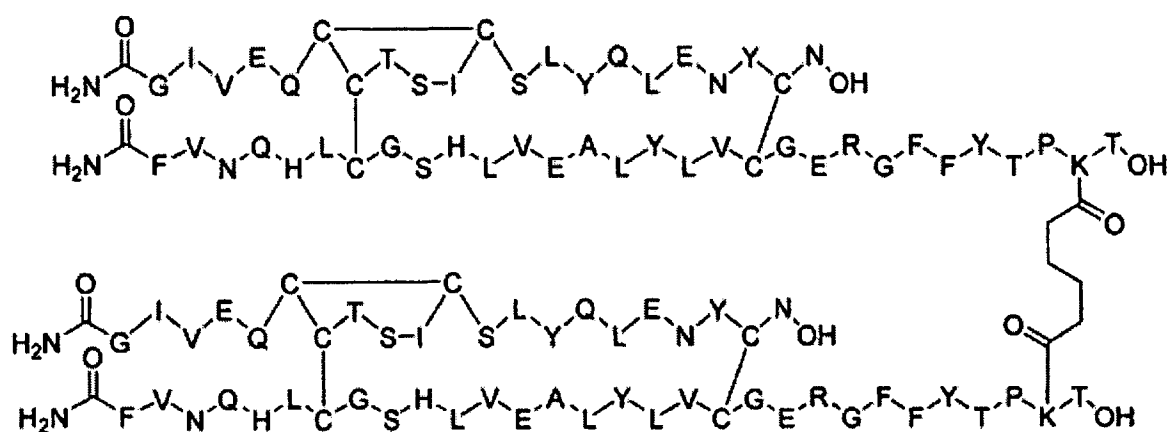
部分、芳基烷基部分、脂族部分、芳基部分、雜芳基部分或雜脂族部分及聚(乙二醇) (PEG)。

36. 如請求項30之胰島素類似物二聚體，其中該連接部分包含烷基二醯基(-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(O)-，其中n=0-4)、醯基部分(-C(O)RC(O)-，其中R係烷基鏈、聚(乙二醇) (PEG)鏈、含有醯胺之鏈、含有三唑之鏈、含有環辛炔之部分、經取代之醯基鏈或聚乙二醇(PEG)鏈)。

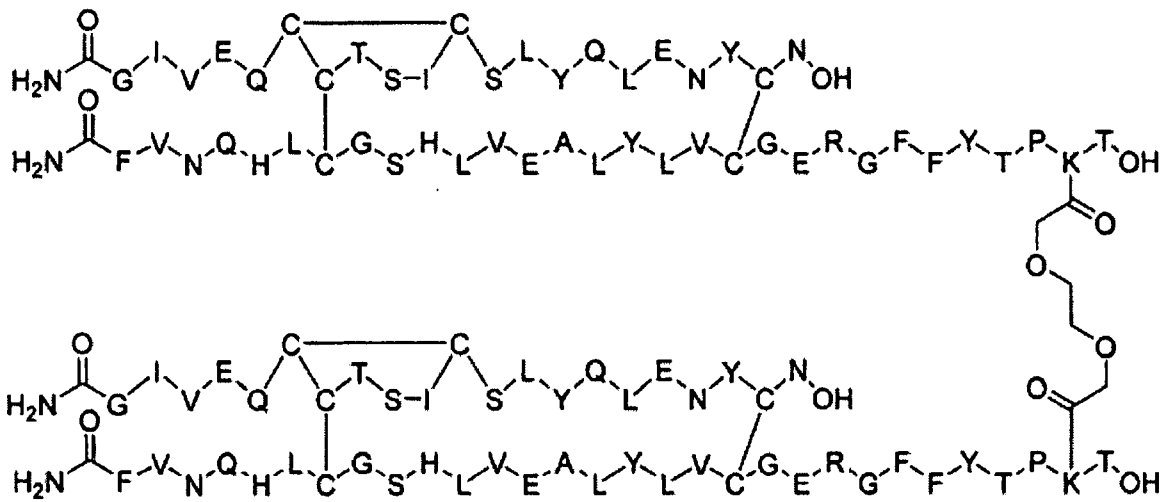
37. 一種化合物，其選自由以下組成之群：



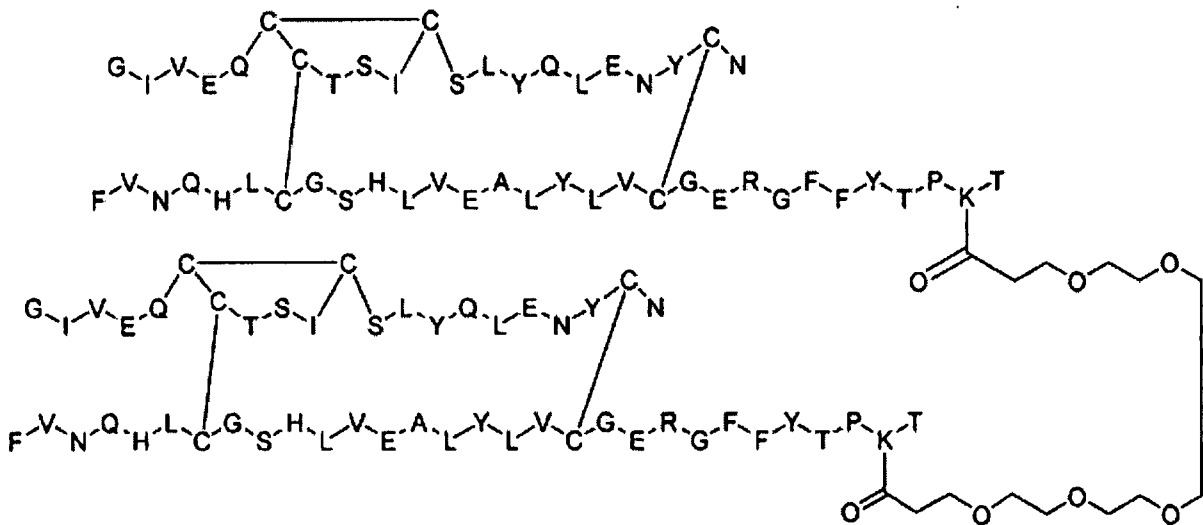
二聚體 1；



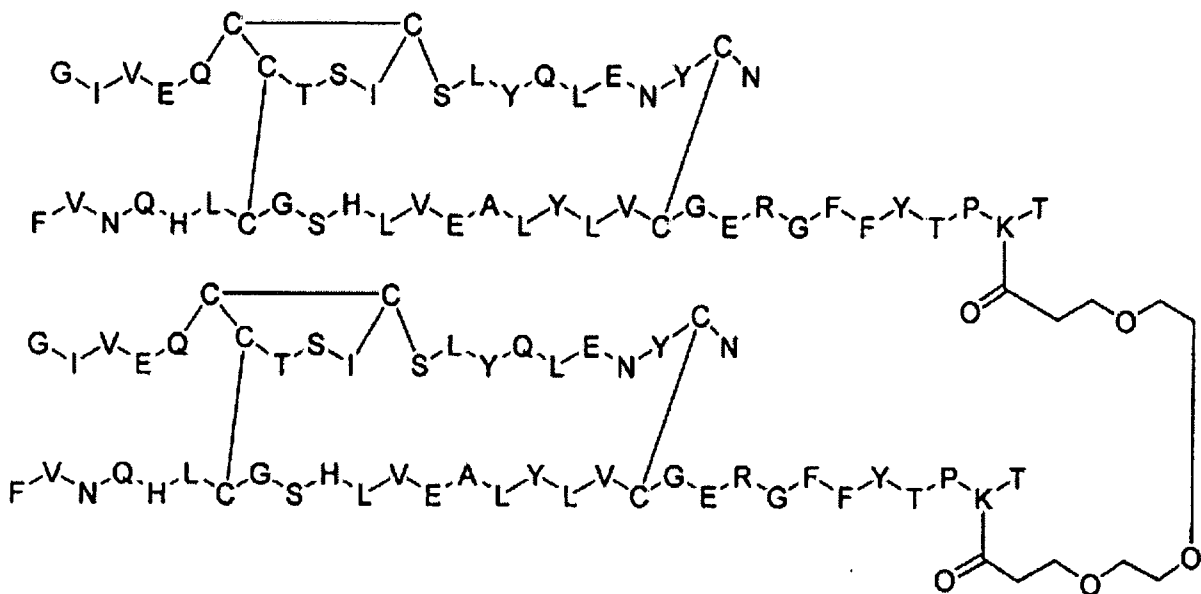
二聚體 2；



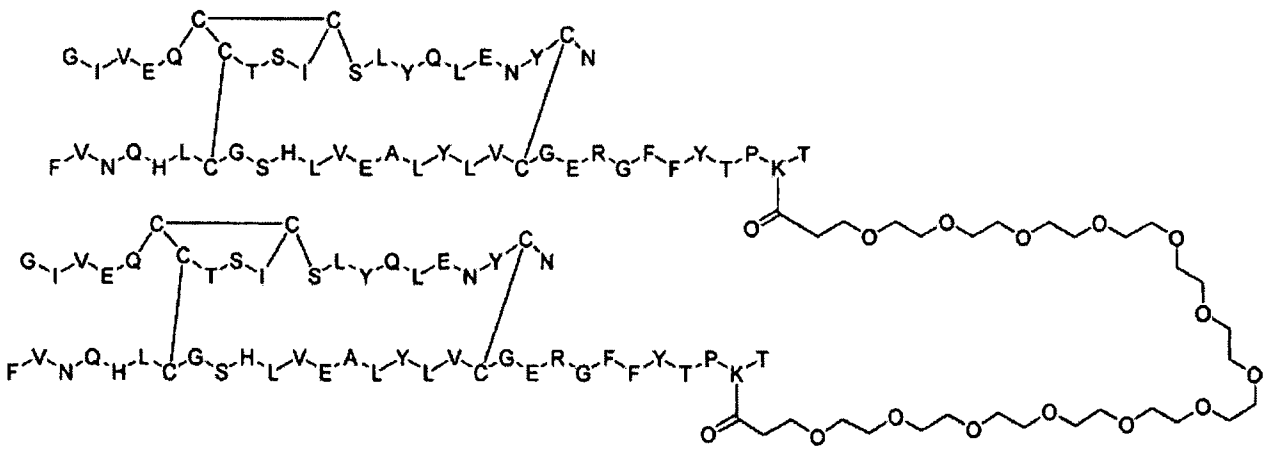
二聚體3；



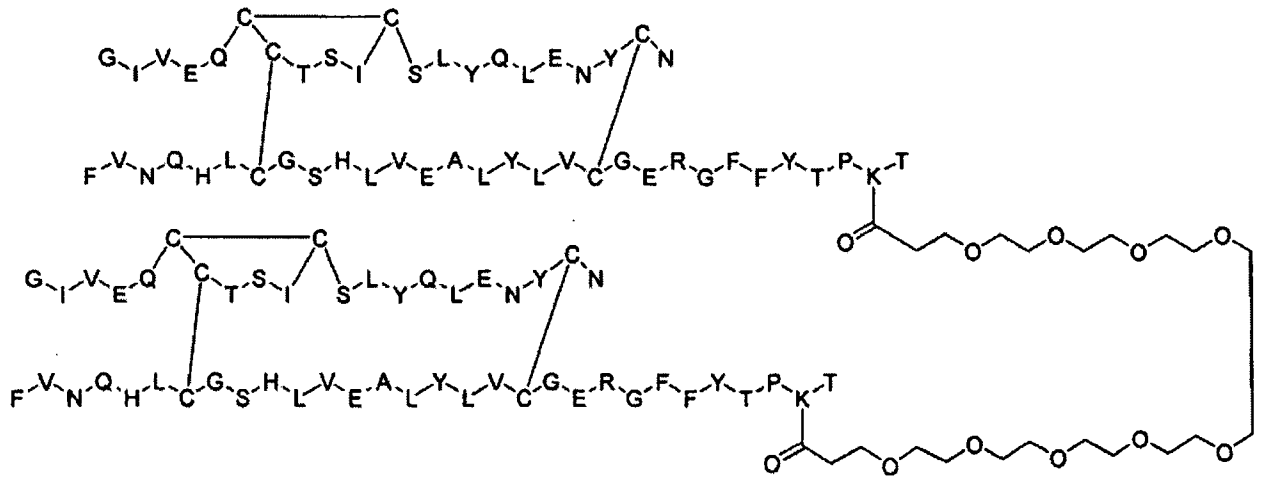
二聚體4；



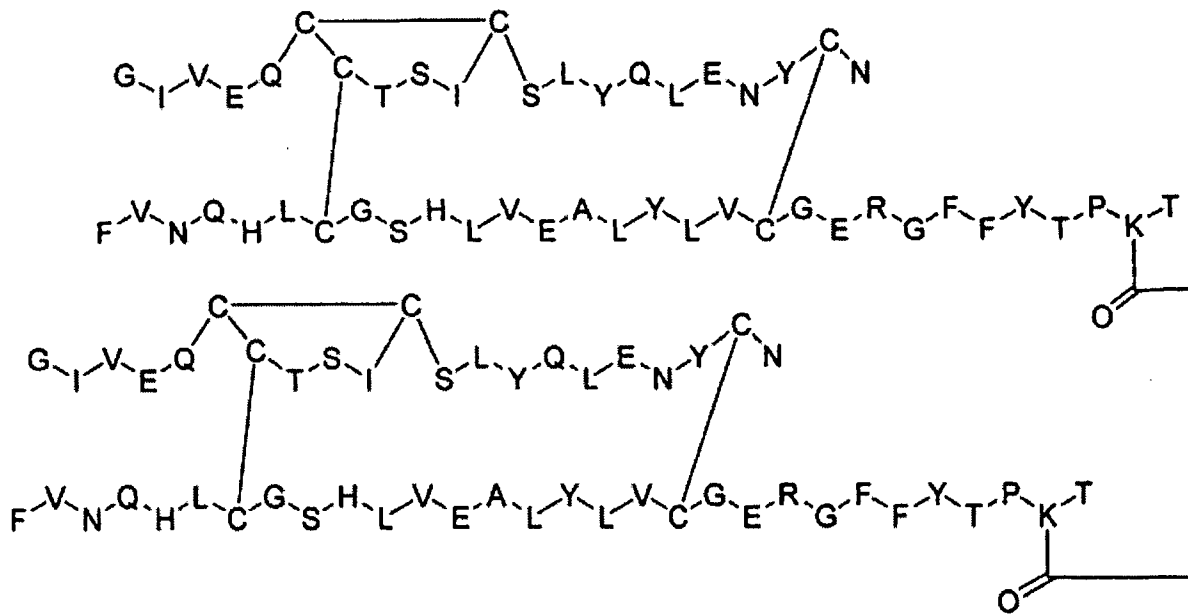
二聚體 5 ;



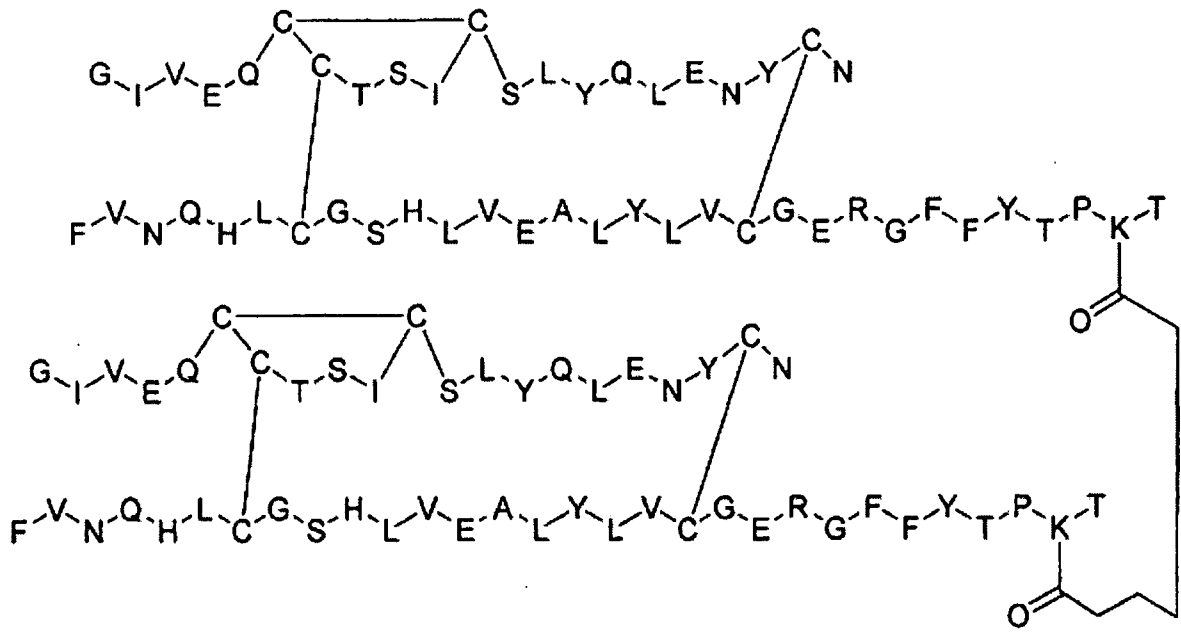
二聚體 6 ;



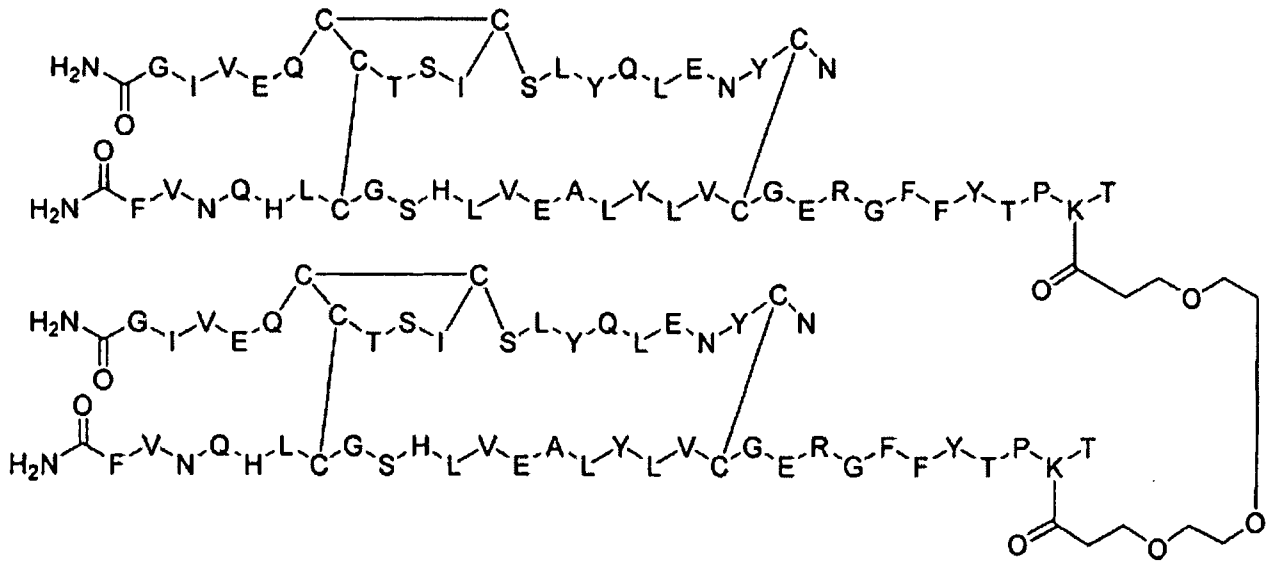
二聚體 7 ;



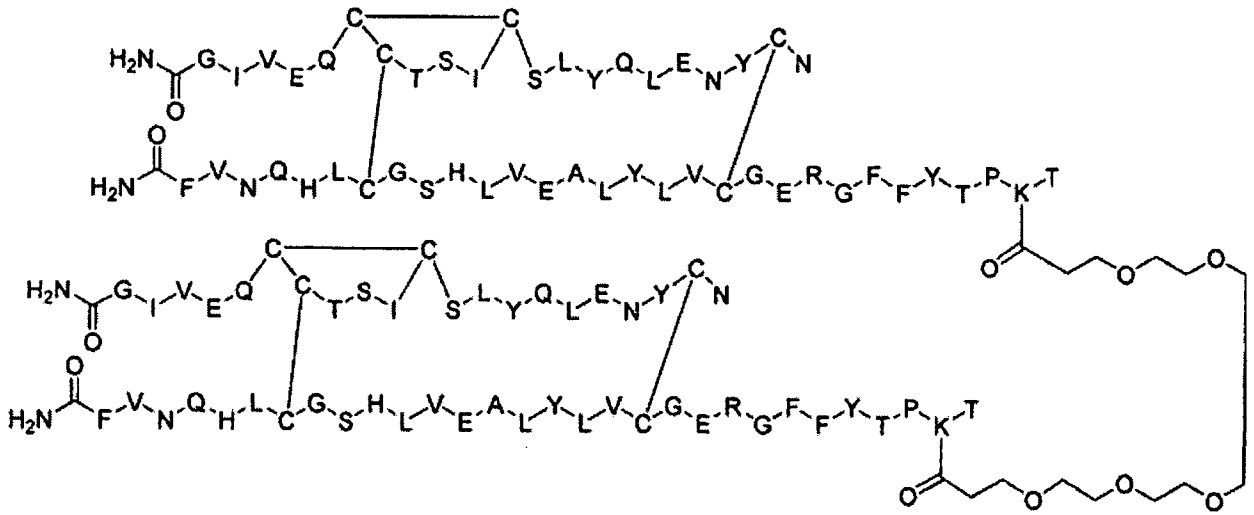
二聚體 8 ;



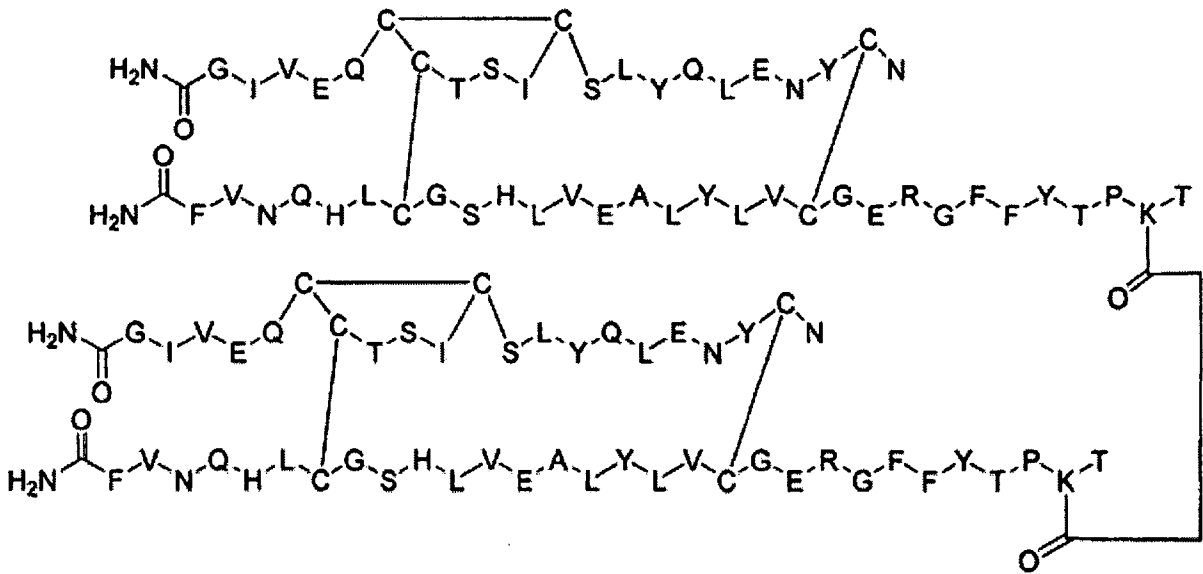
二聚體9；



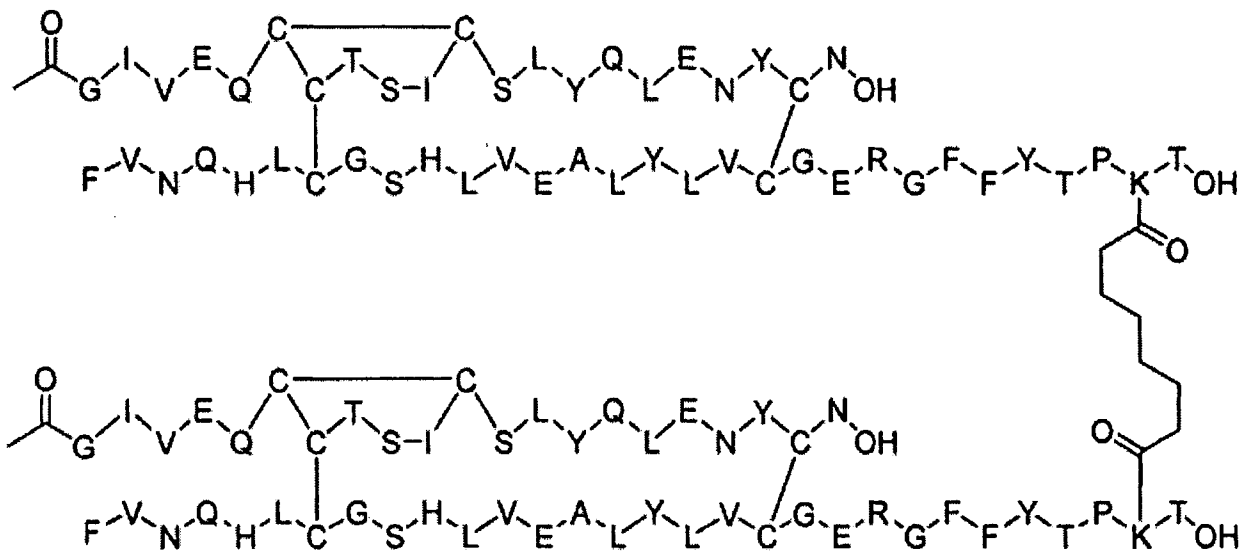
二聚體10；



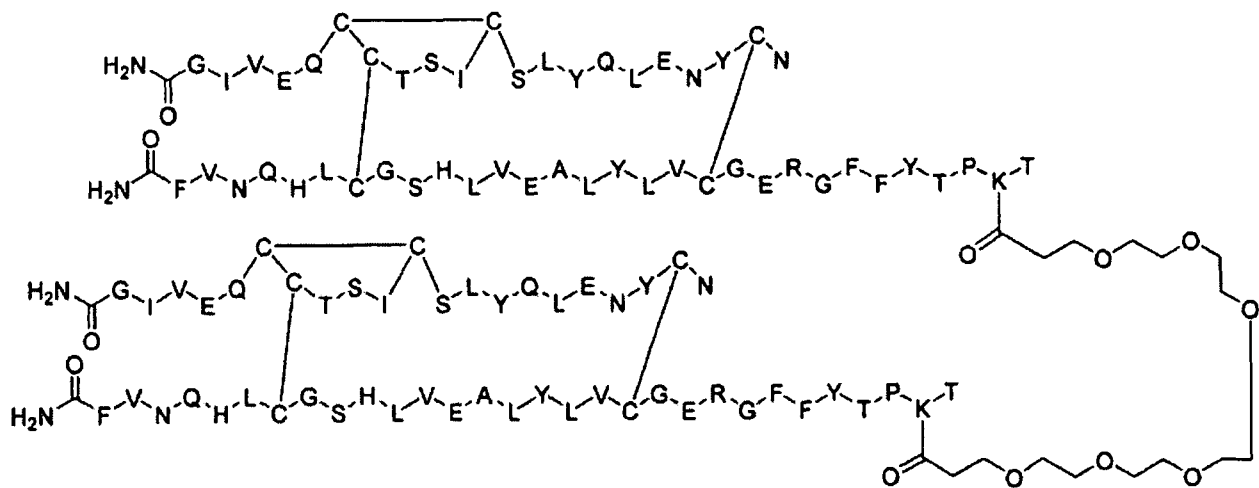
二聚體 11 ;



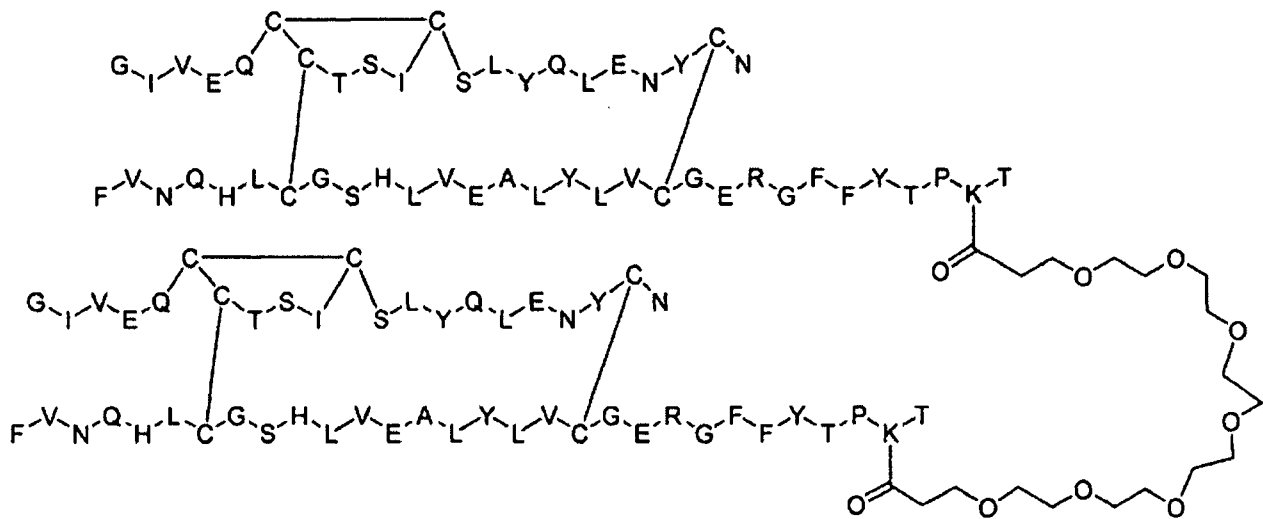
二聚體 12 ;



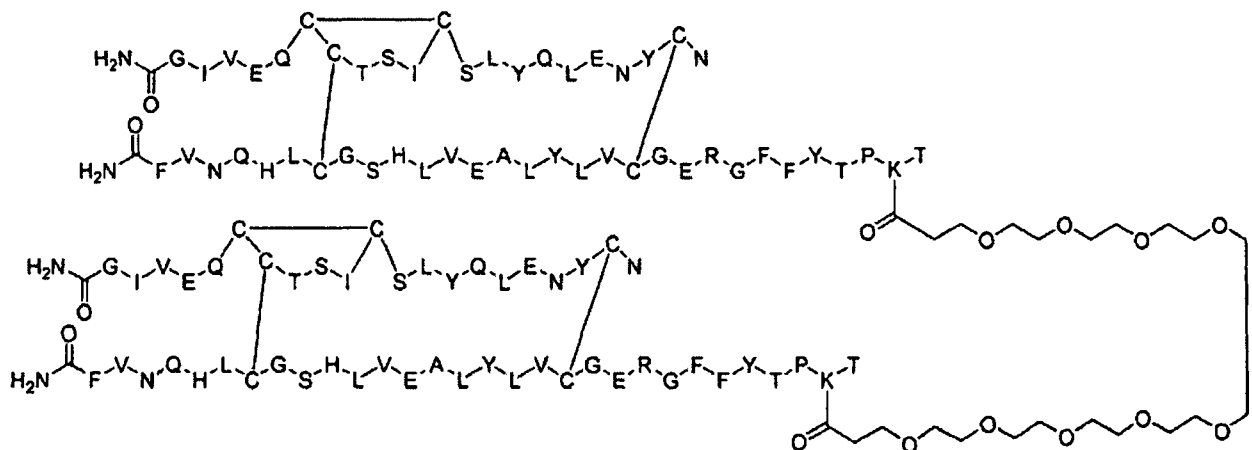
二聚體 13；



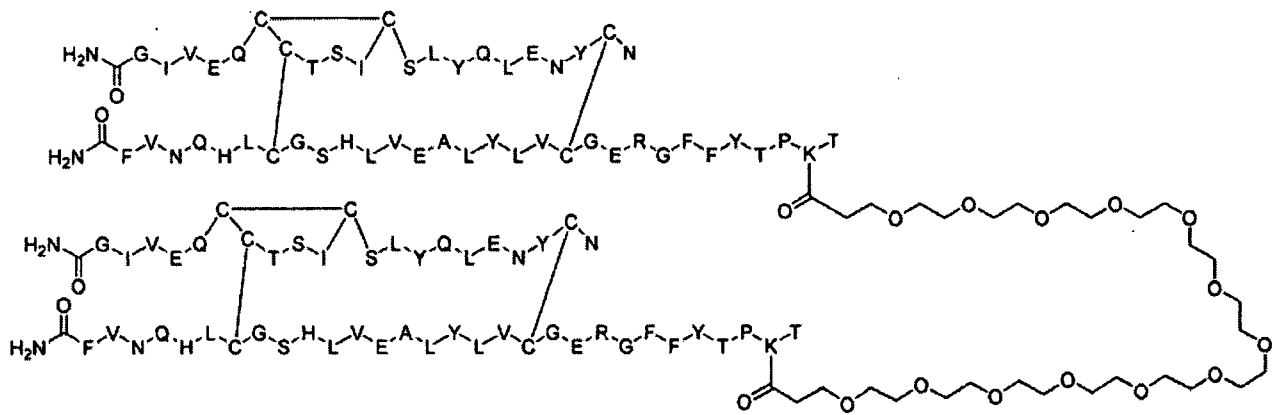
二聚體 14；



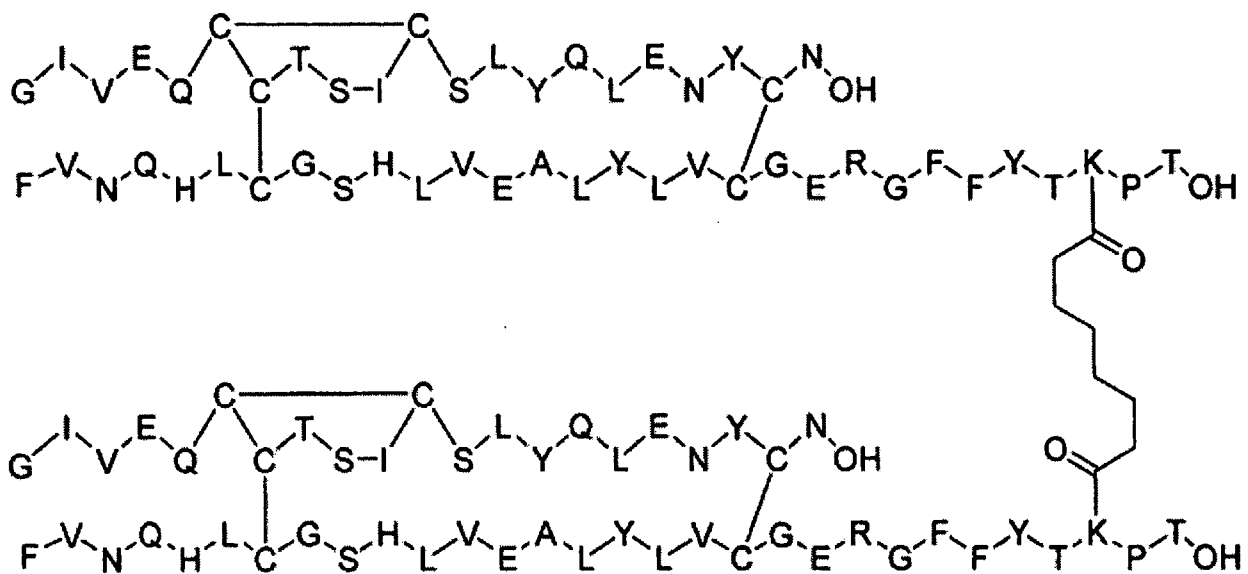
二聚體 15；



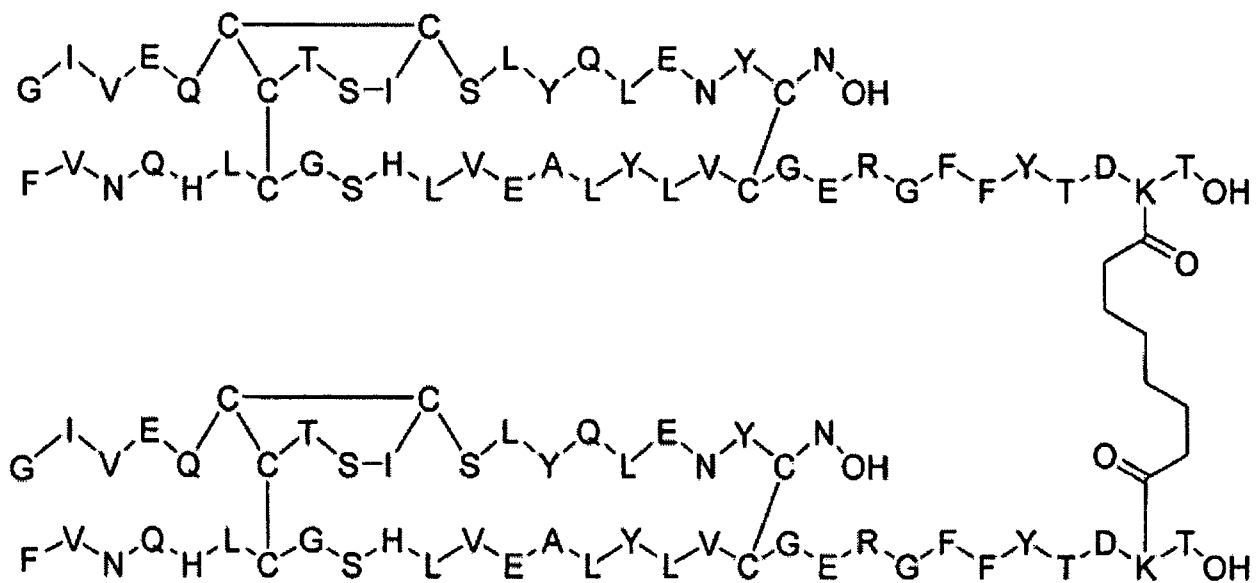
二聚體 16；



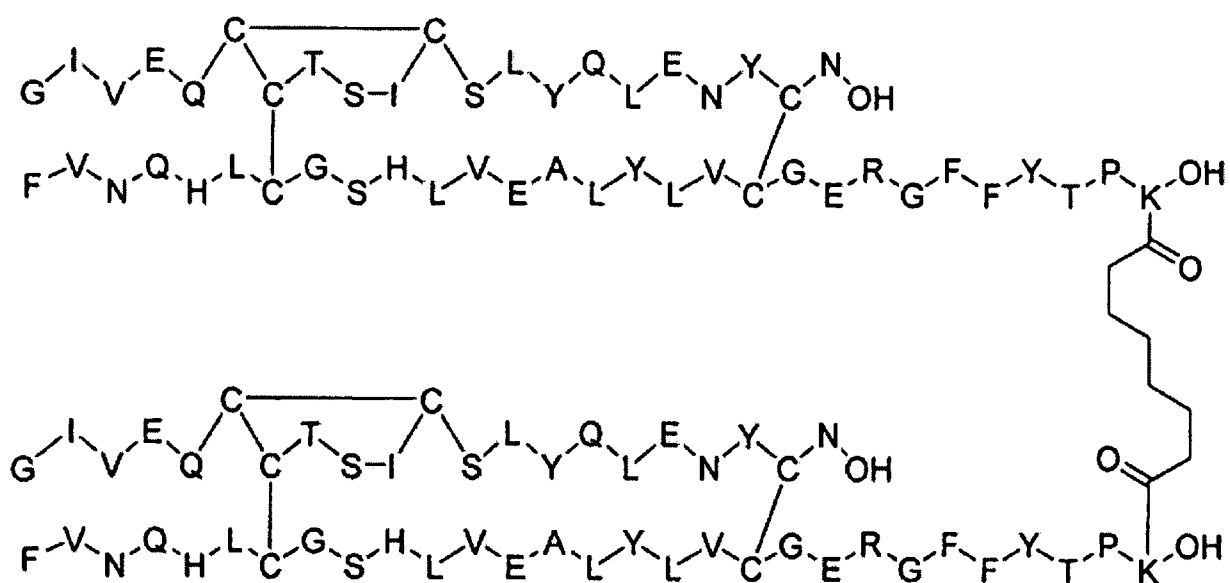
二聚體 17 ;



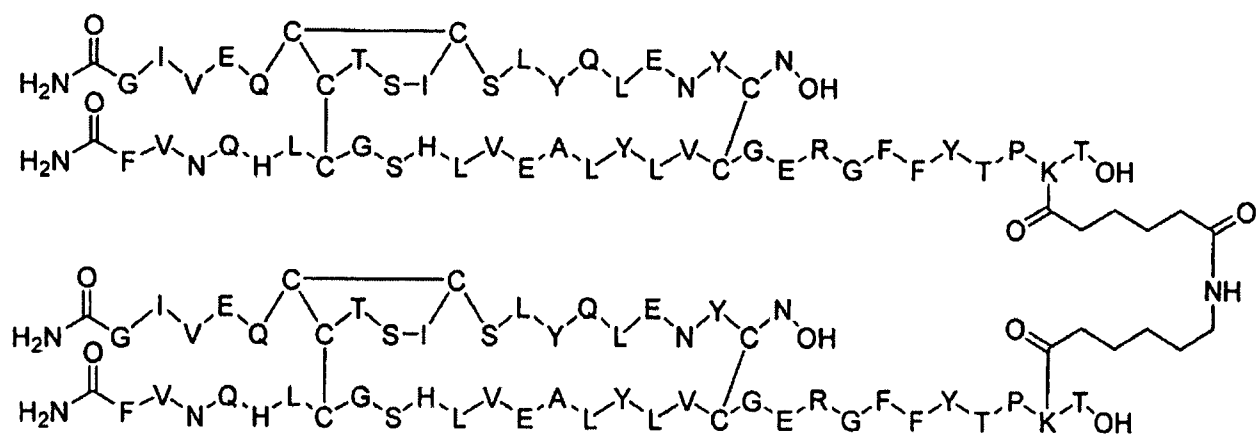
二聚體 18 ;



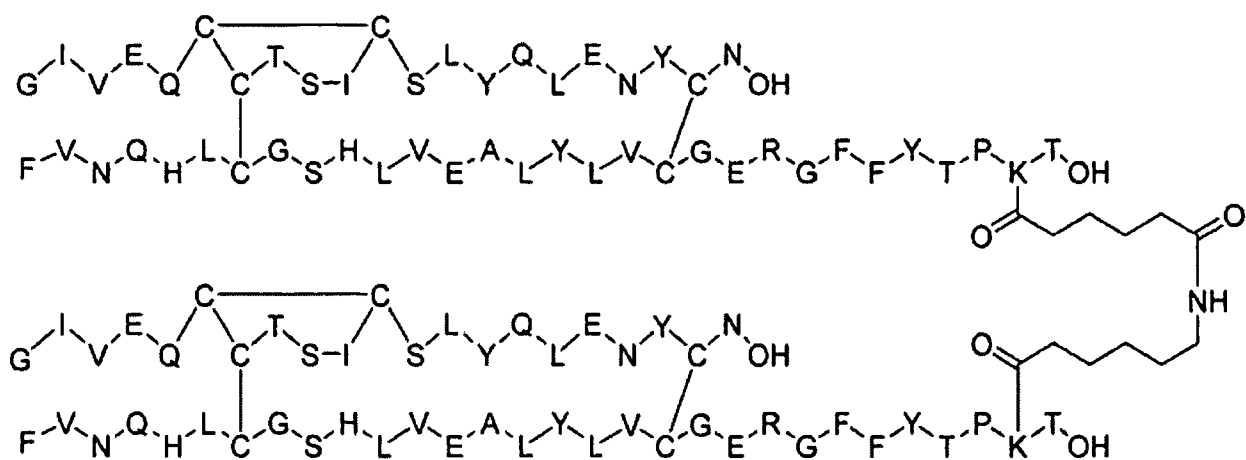
二聚體 19 ;



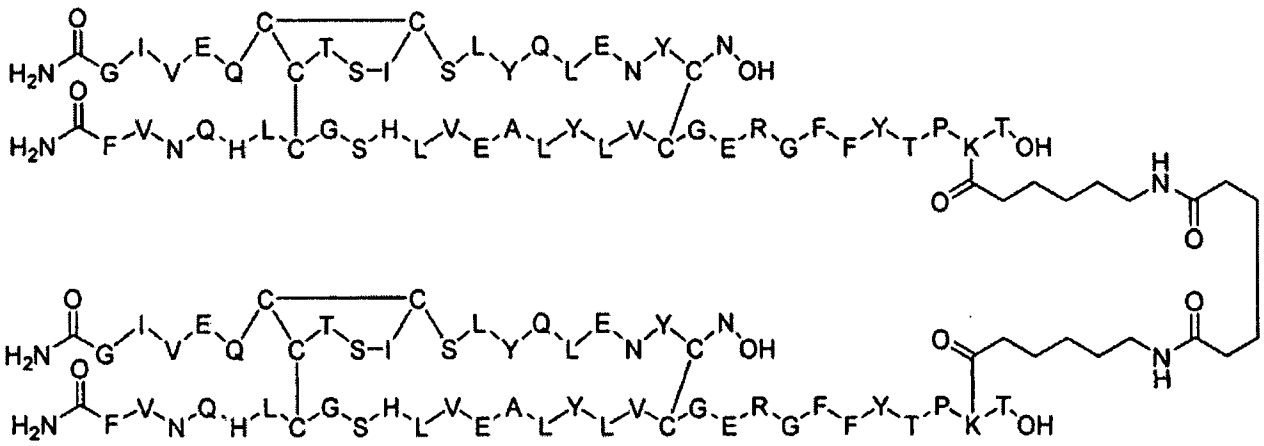
二聚體 20 ;



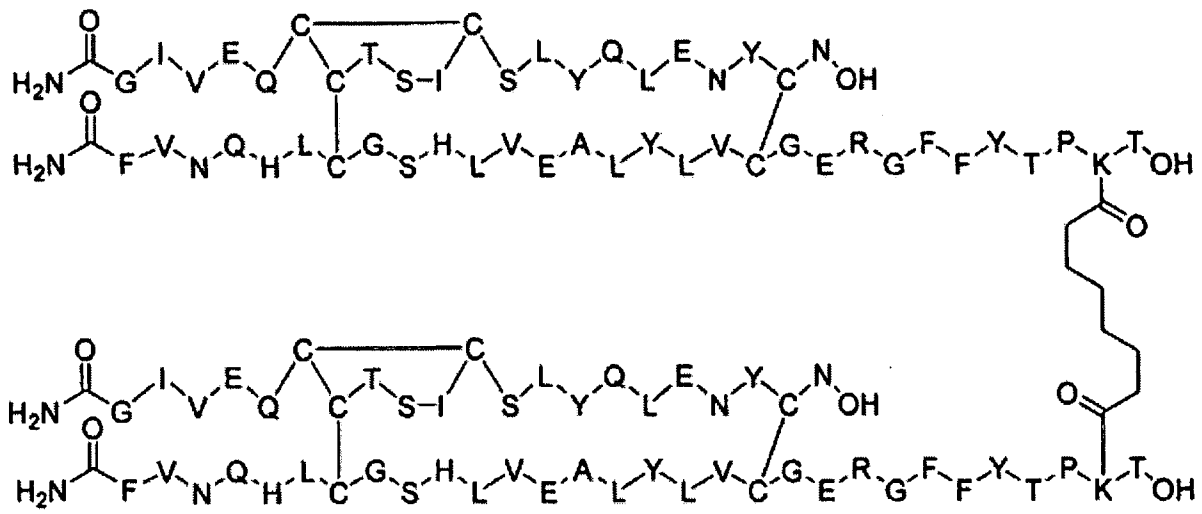
二聚體 21 ;



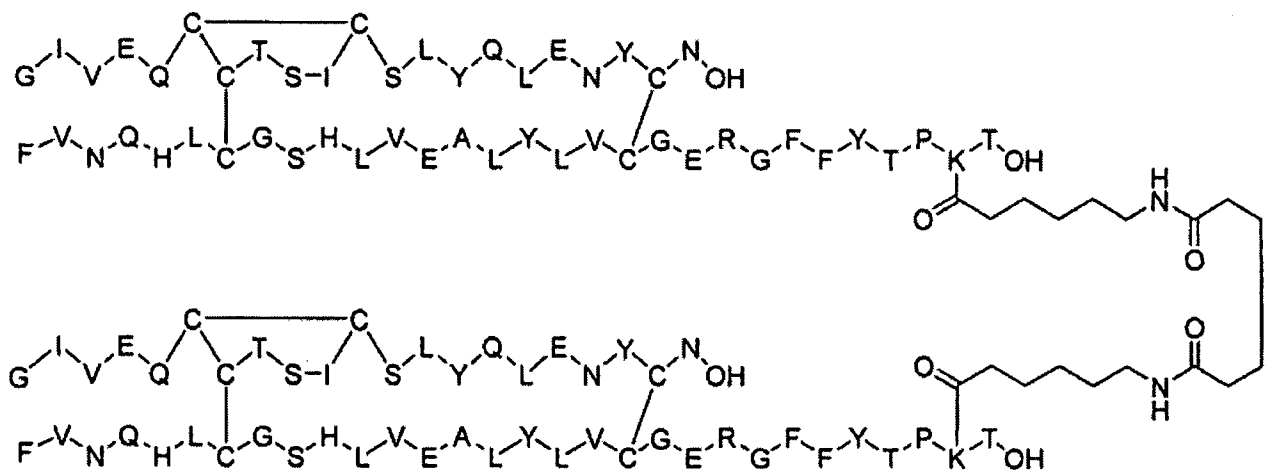
二聚體 22 ;



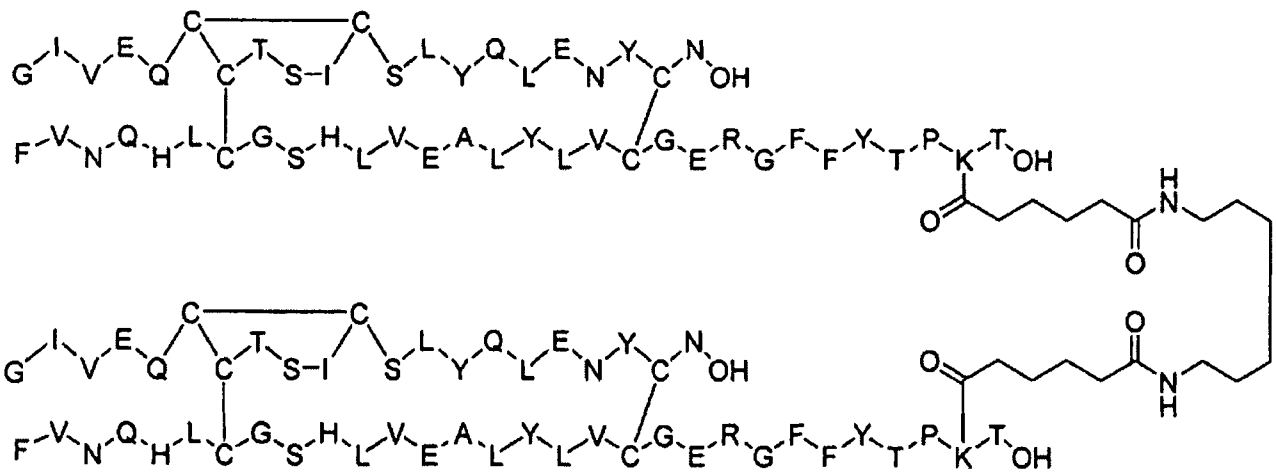
二聚體 23 ;



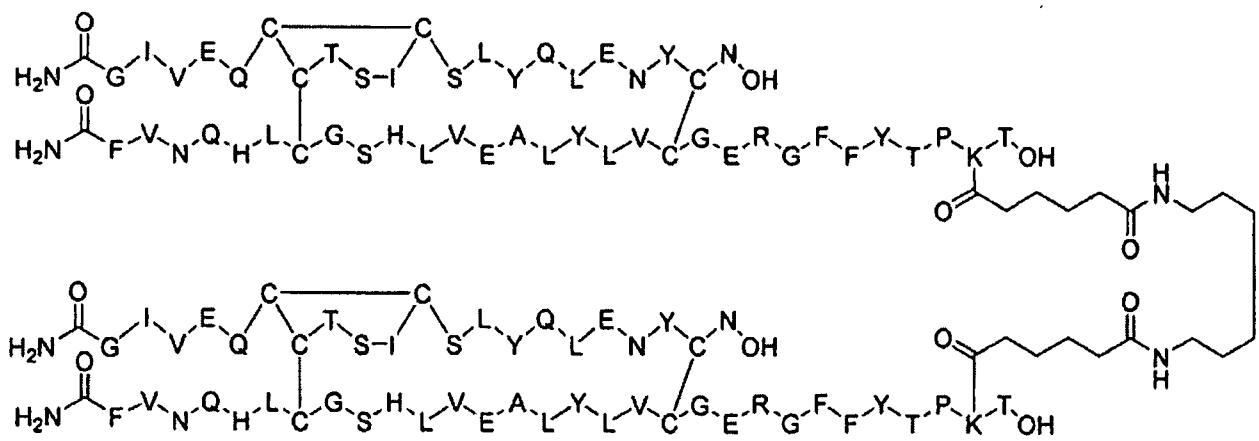
二聚體 24 ;



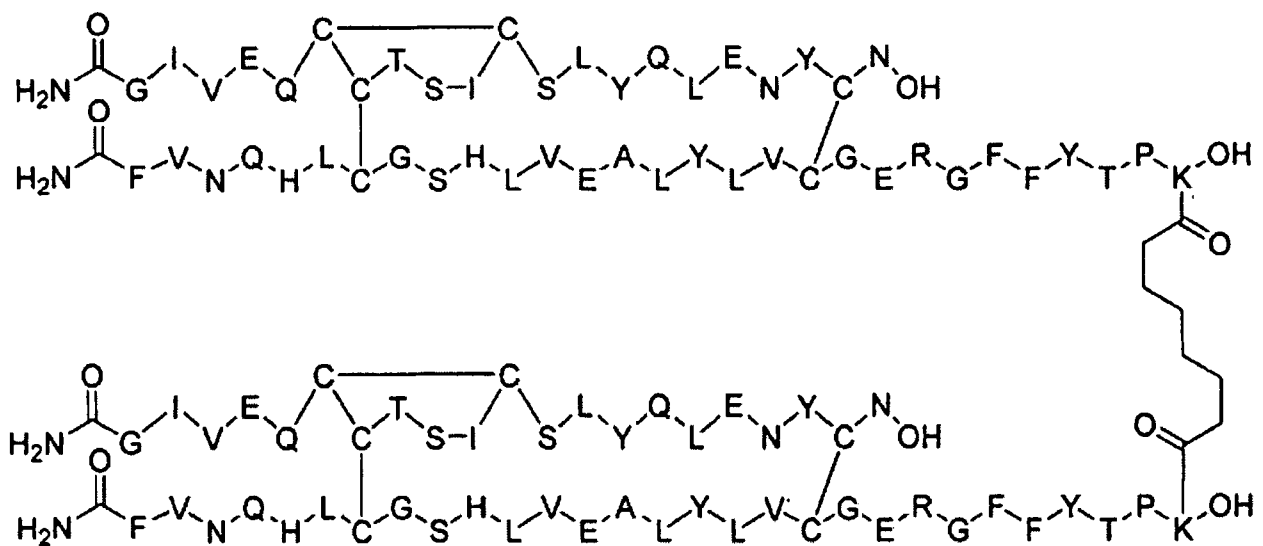
二聚體 25 ;



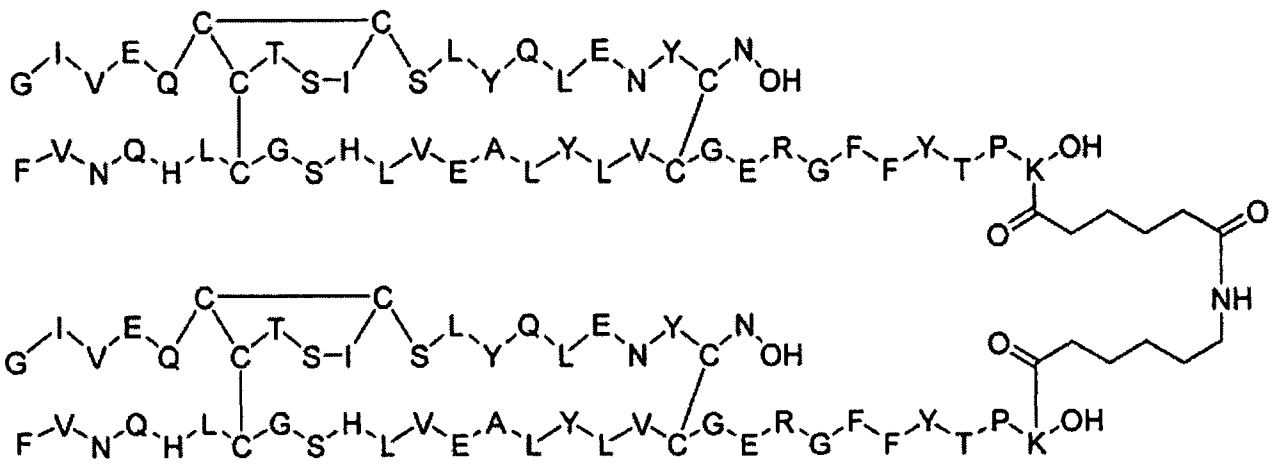
二聚體 26；



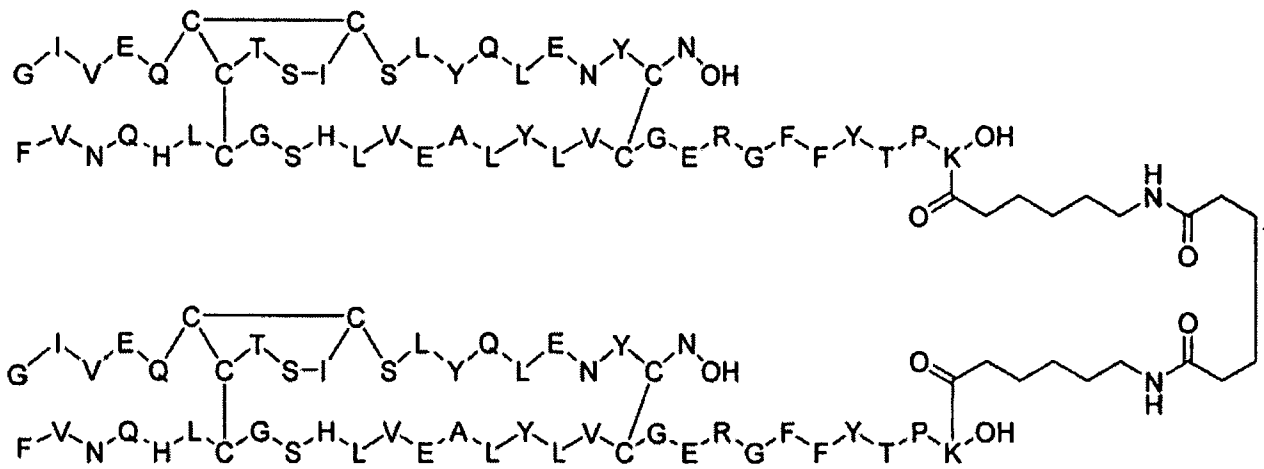
二聚體 27；



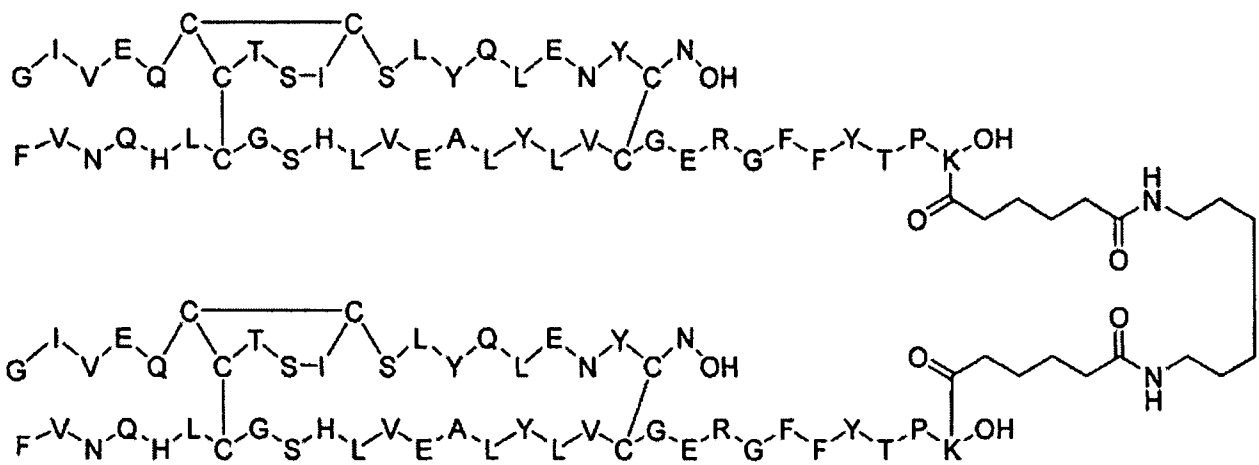
二聚體 28；



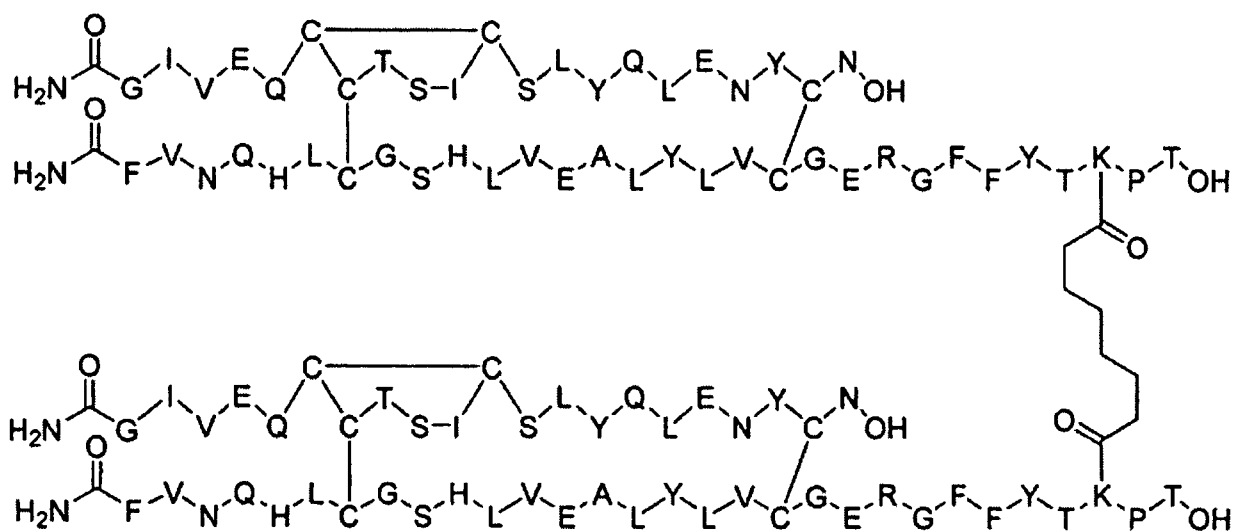
二聚體 29 ;



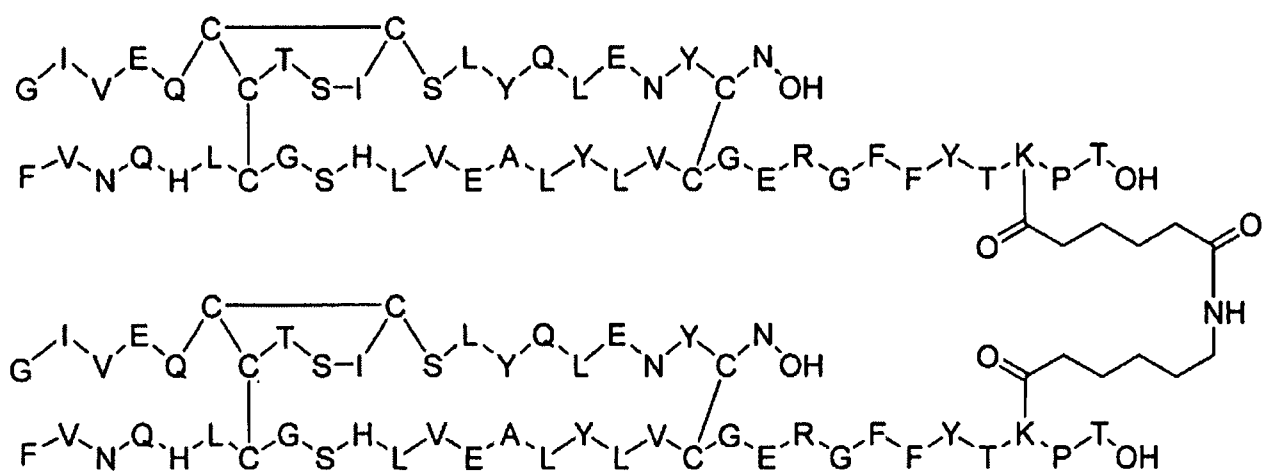
二聚體 30 ;



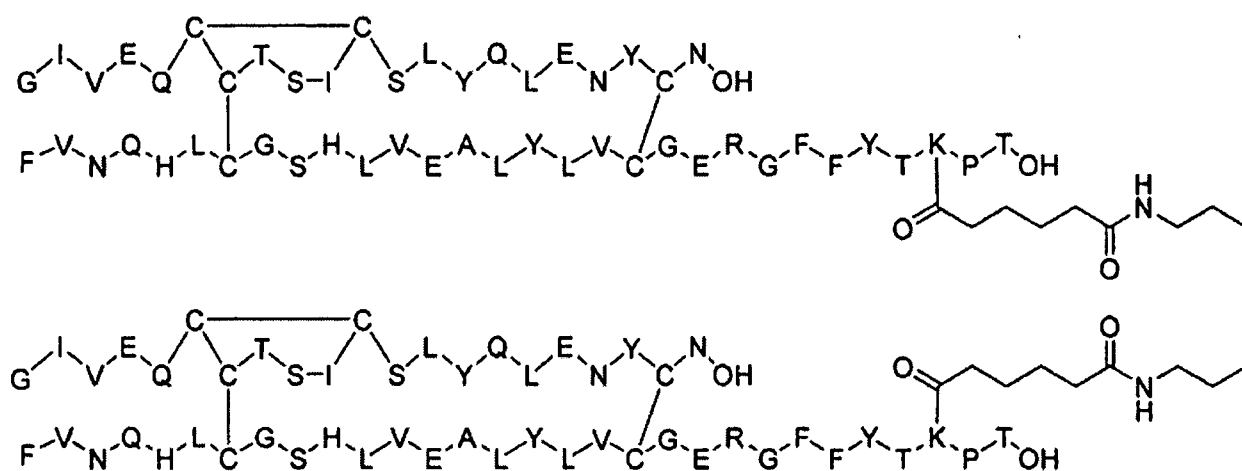
二聚體 31 ;



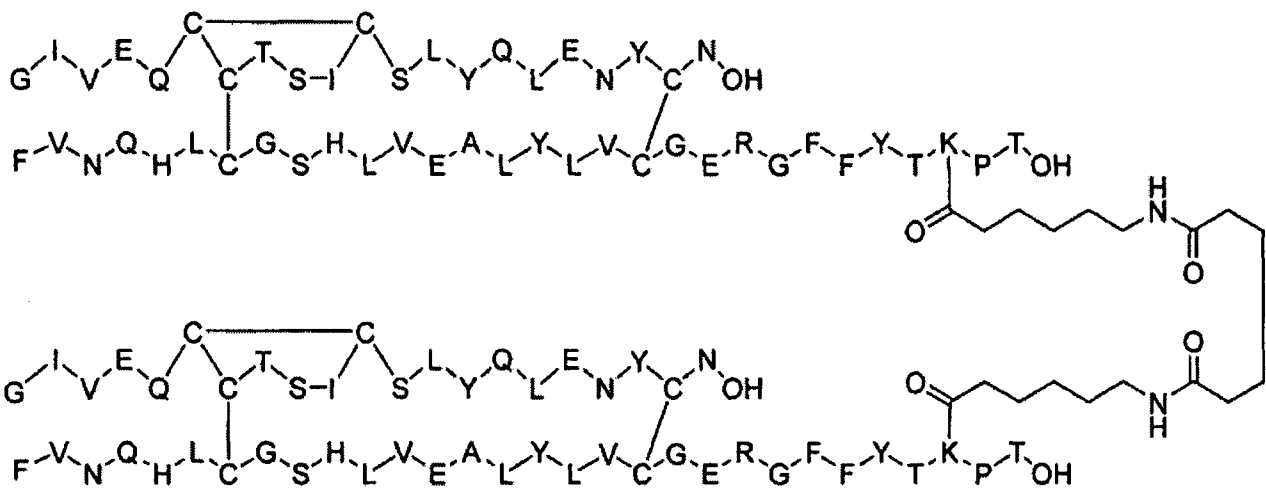
二聚體32；



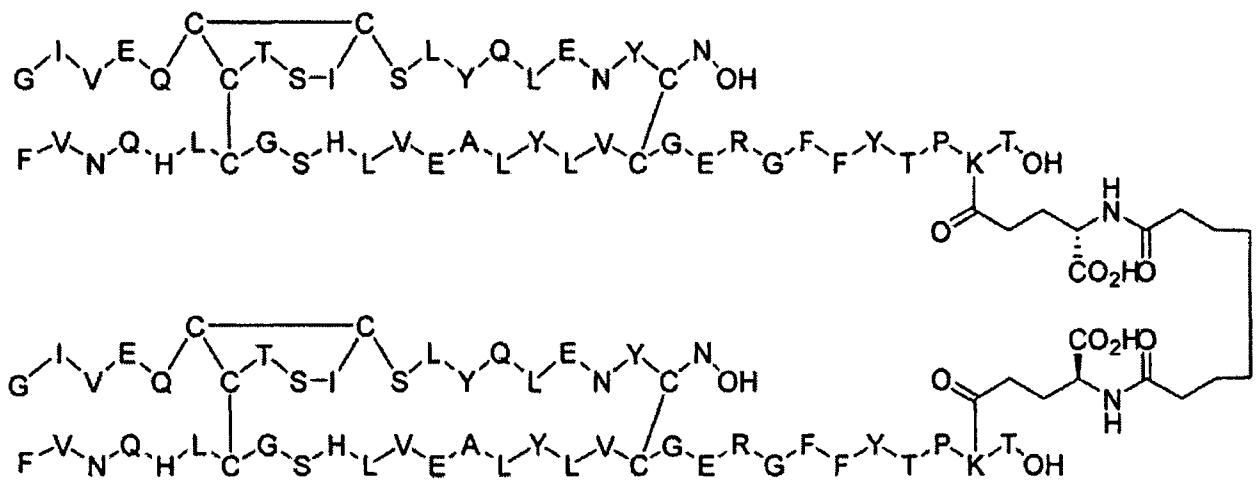
二聚體33；



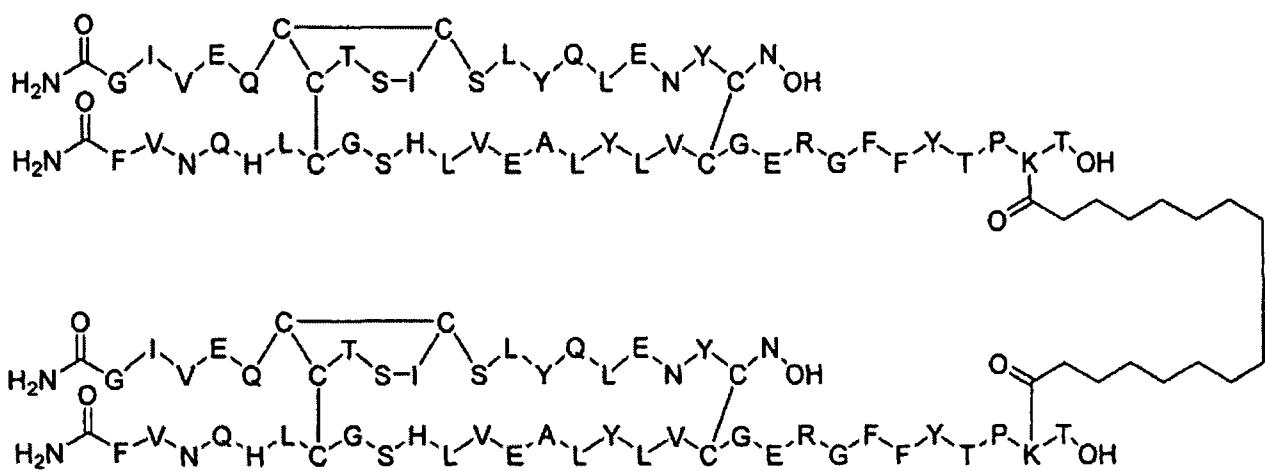
二聚體34；



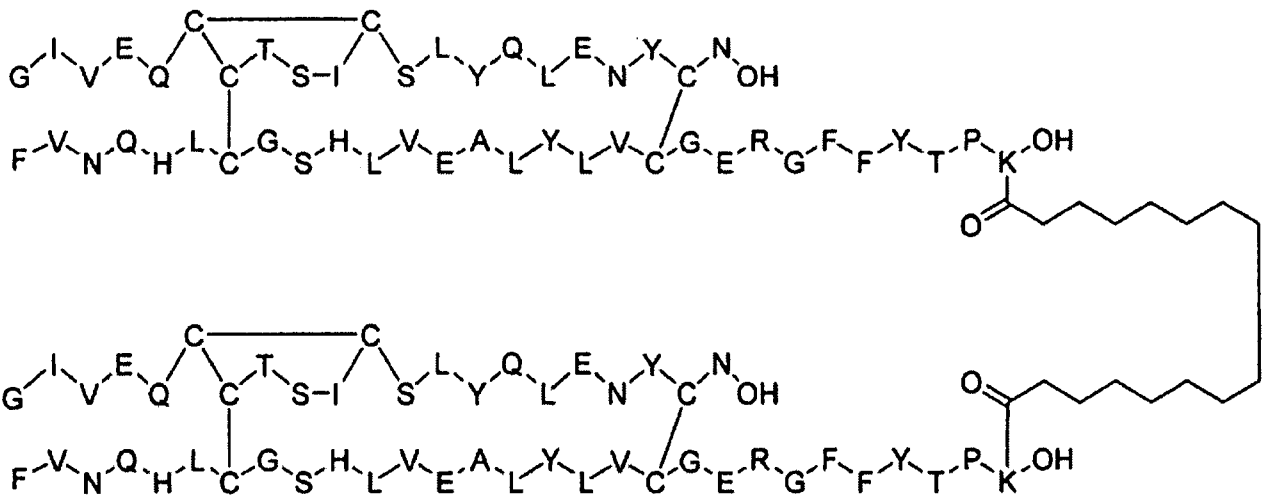
二聚體35；



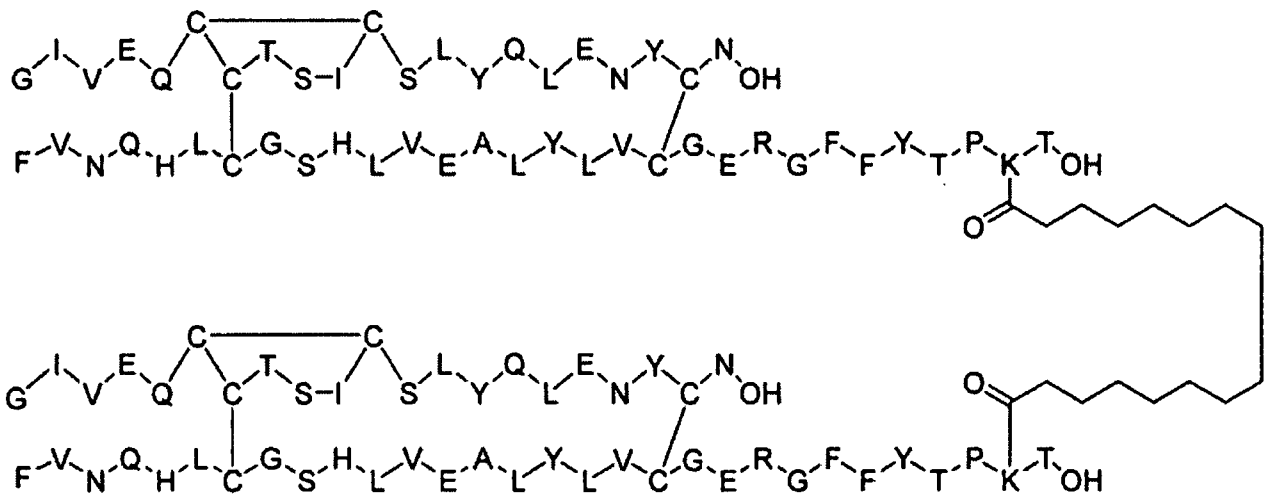
二聚體36；



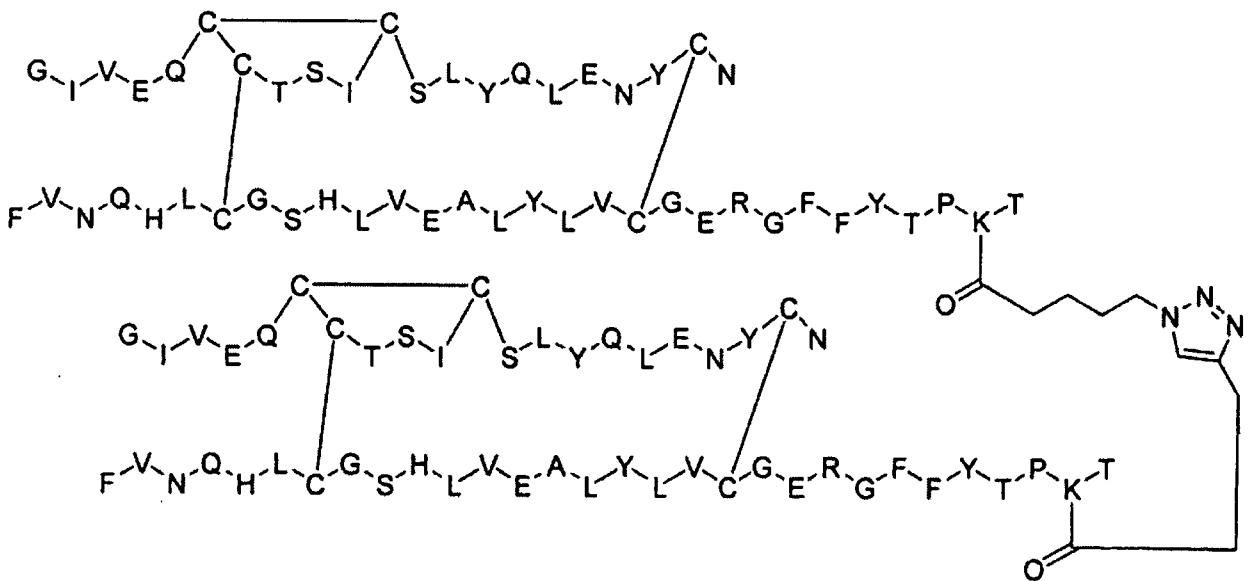
二聚體37；



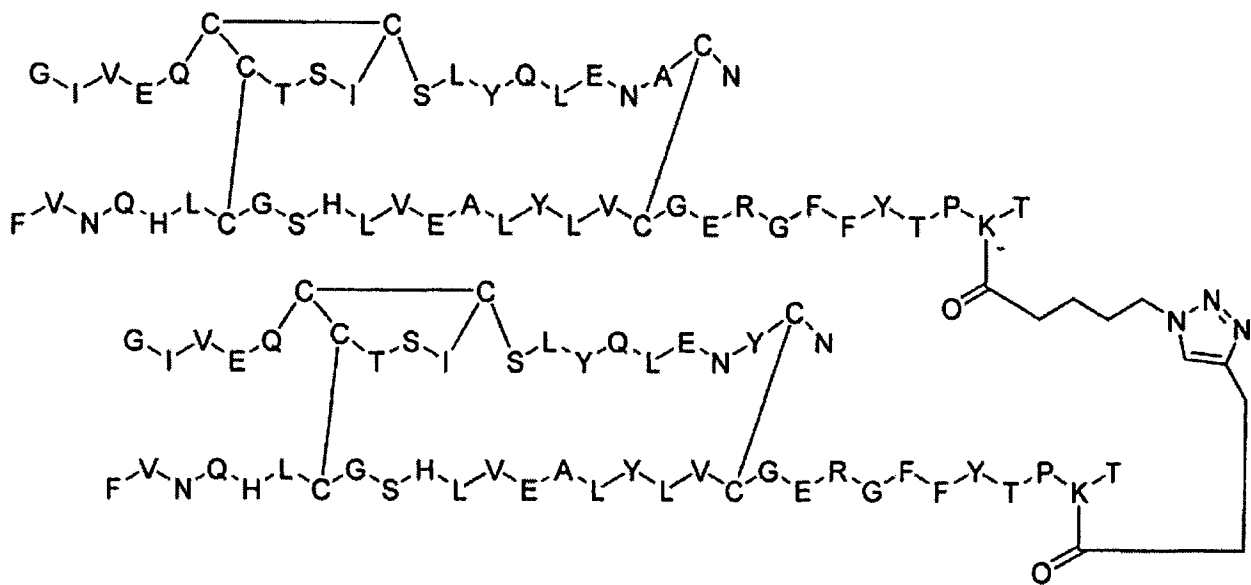
二聚體 38 ;



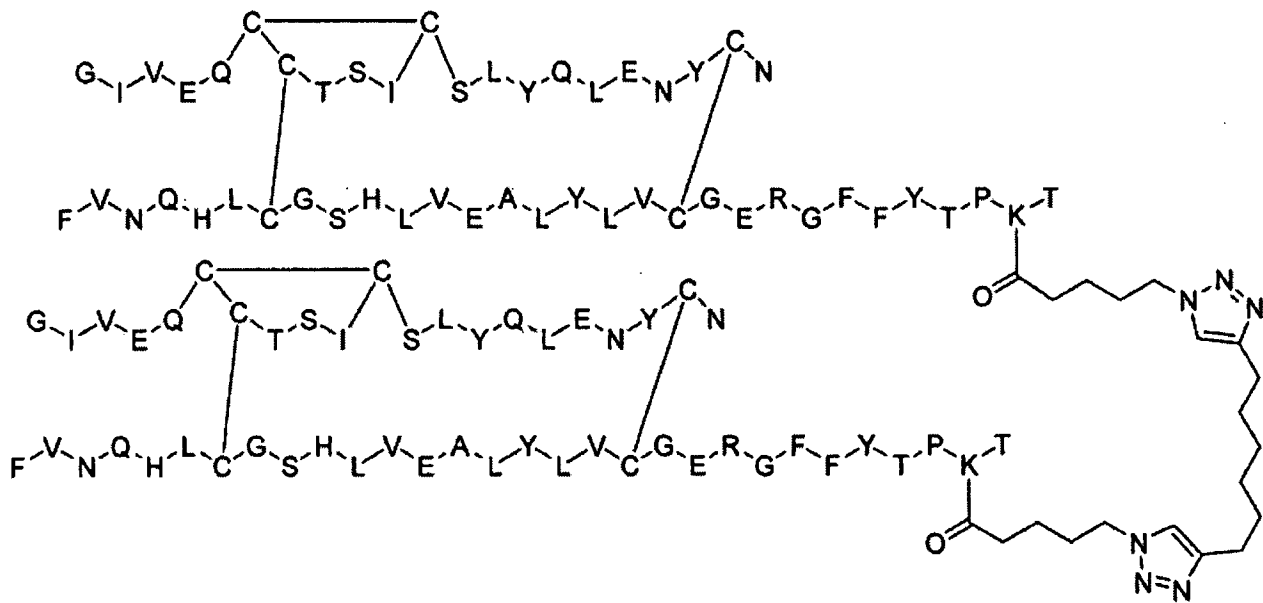
二聚體 39 ;



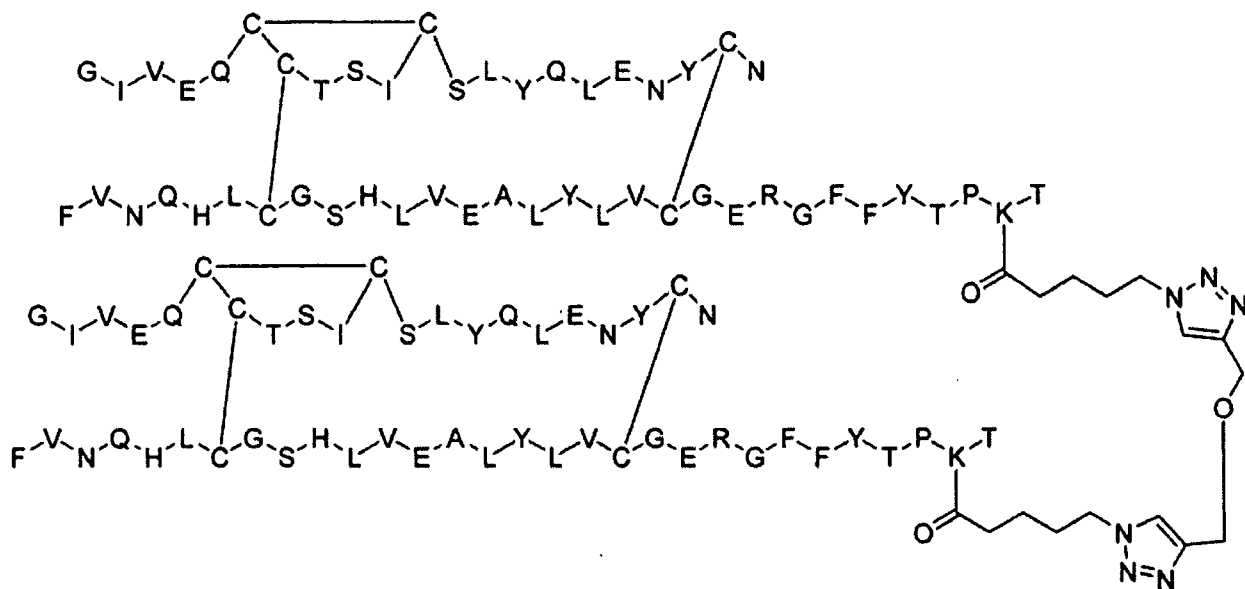
二聚體 40 ;



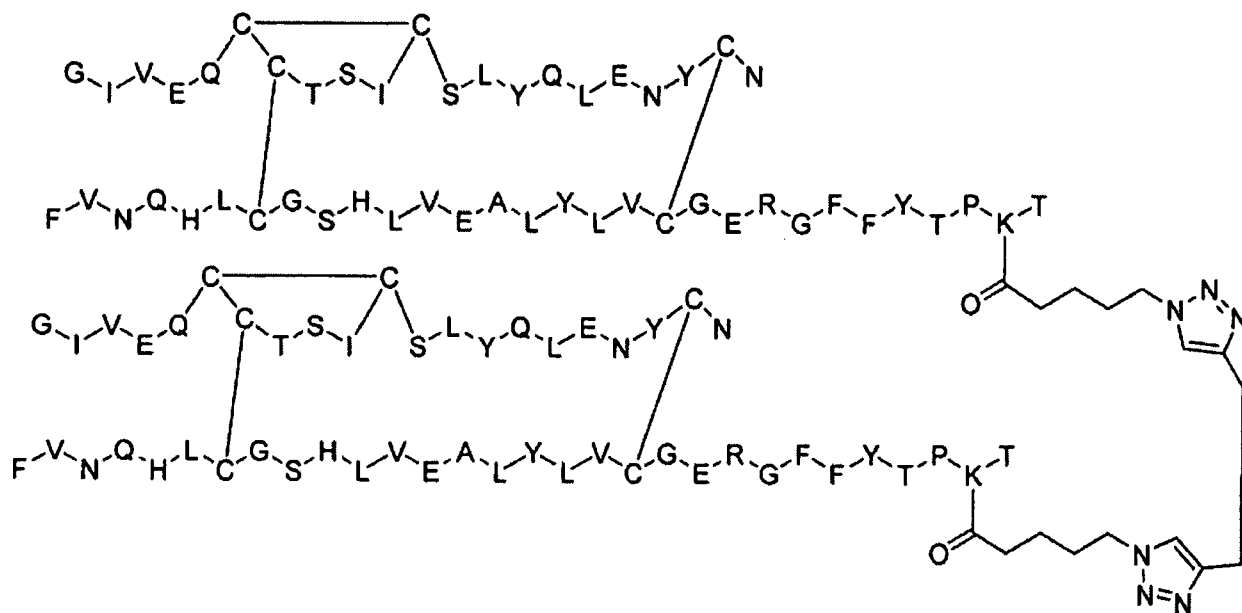
二聚體 41；



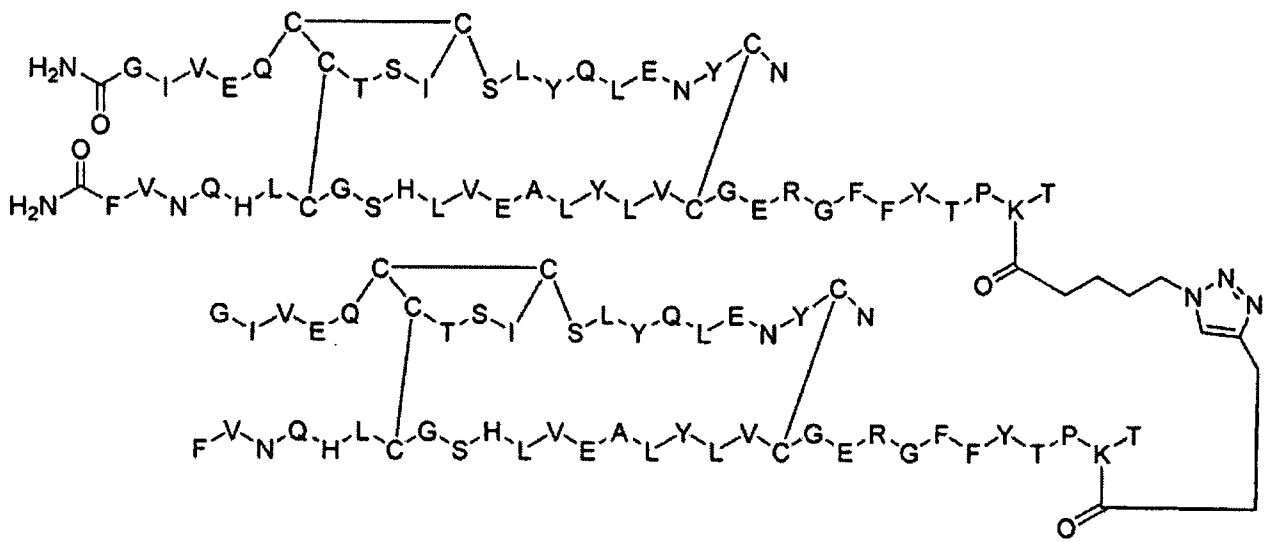
二聚體 42；



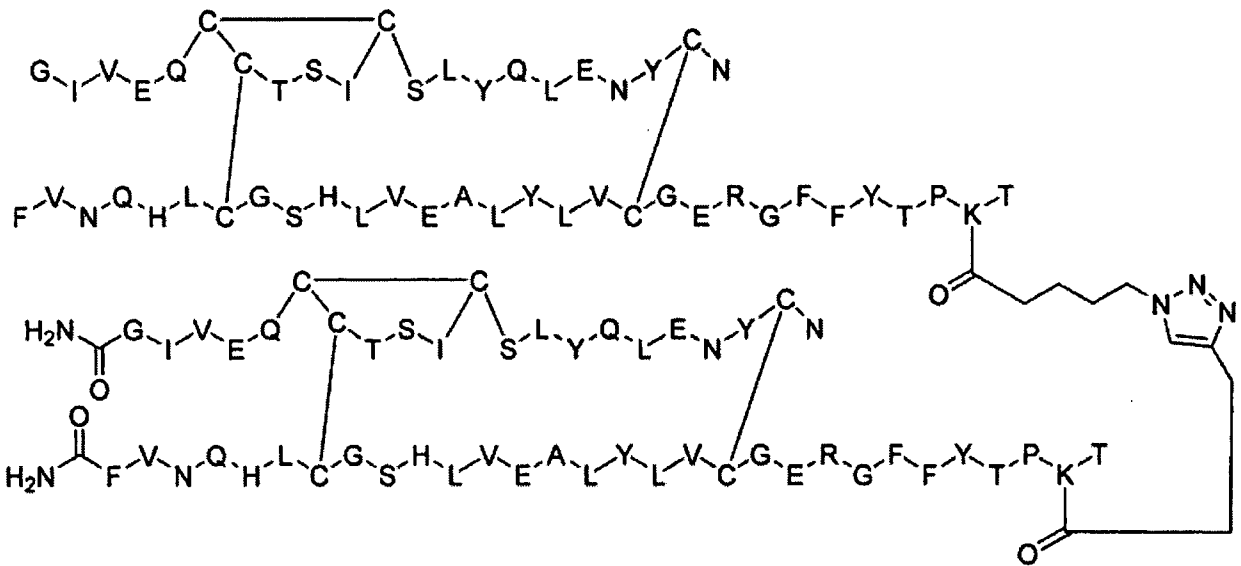
二聚體 43 ;



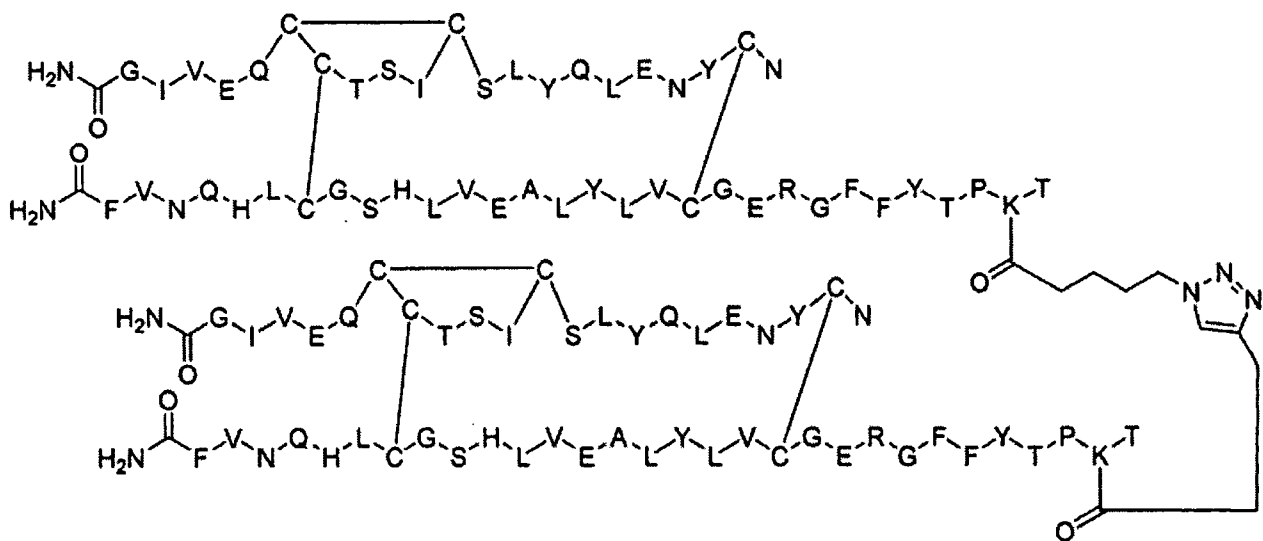
二聚體 44 ;



二聚體 45 ;

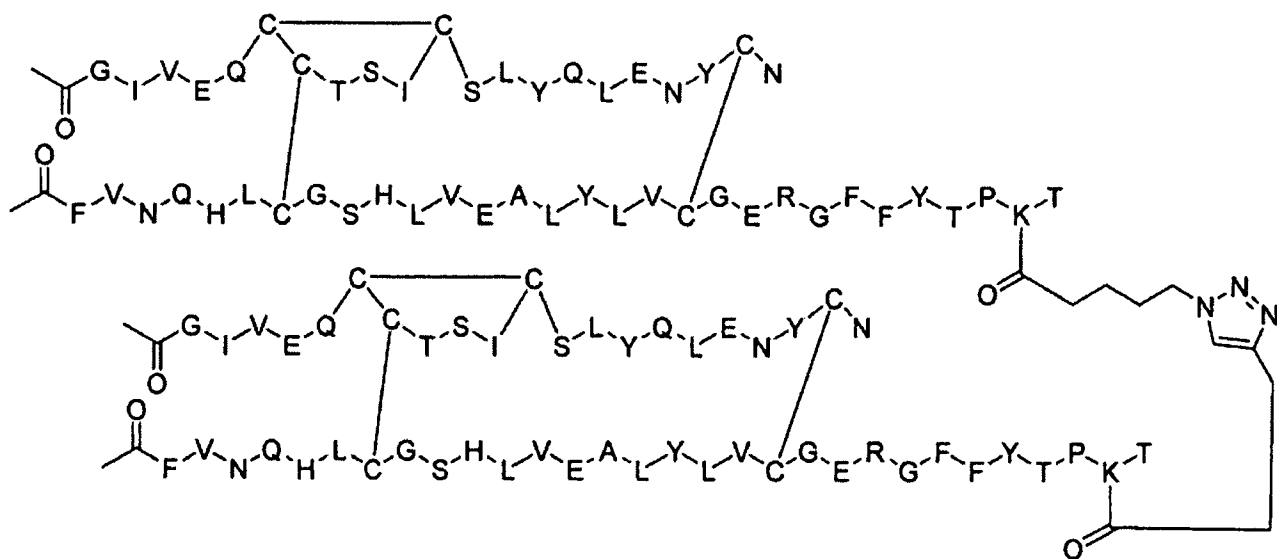


二聚體 46 ;

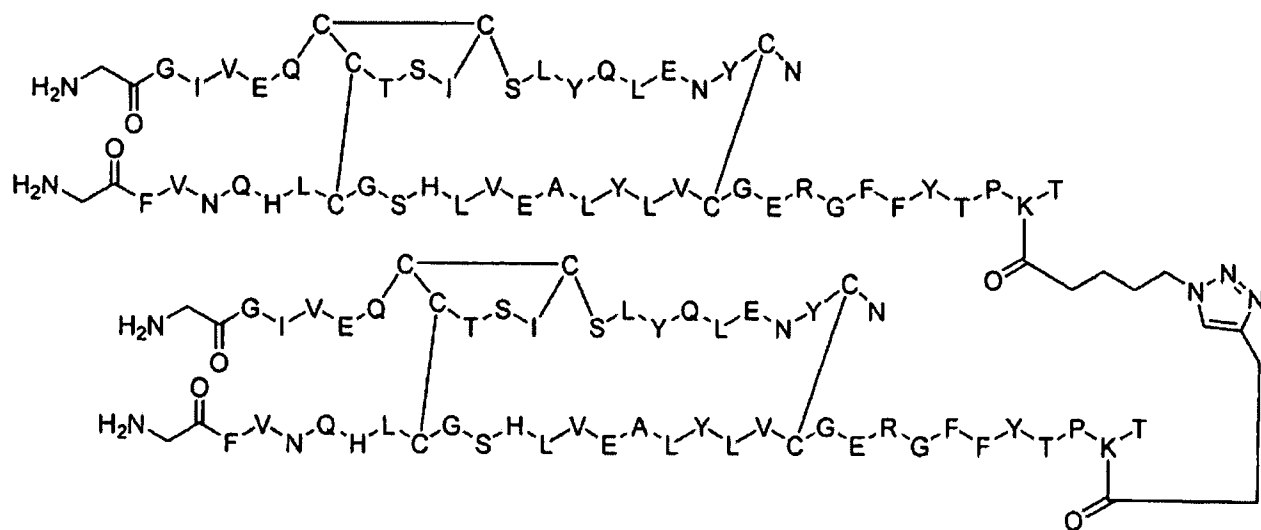


二聚體 47 ;

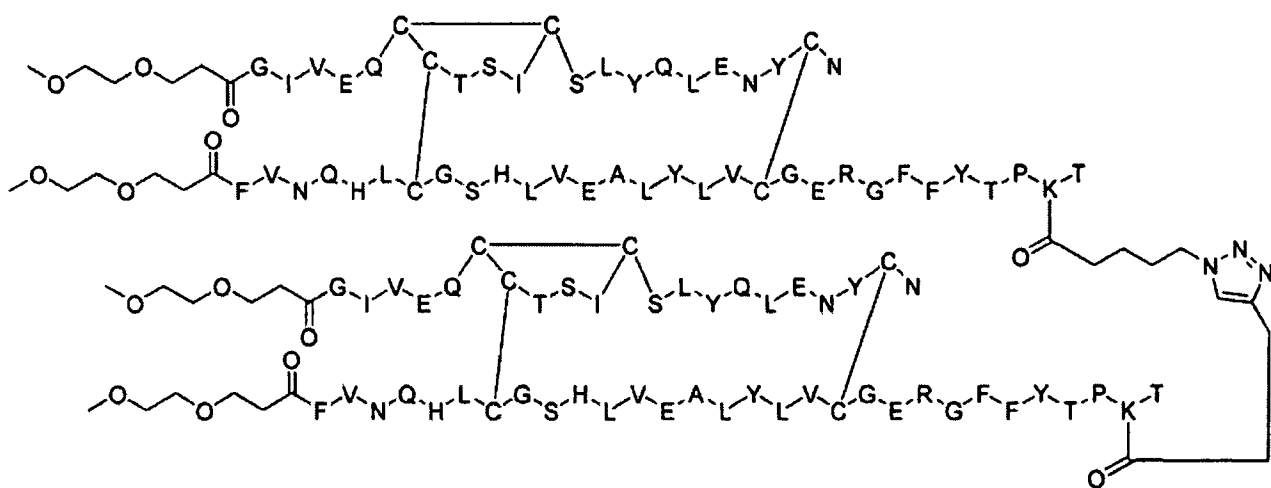




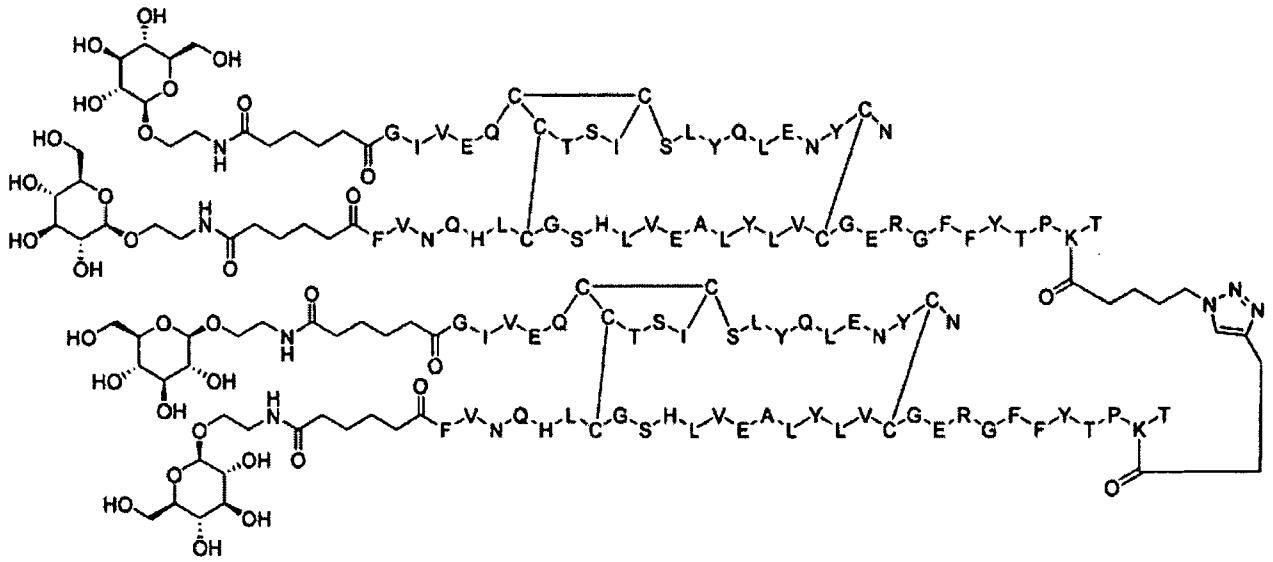
二聚體 48 ;



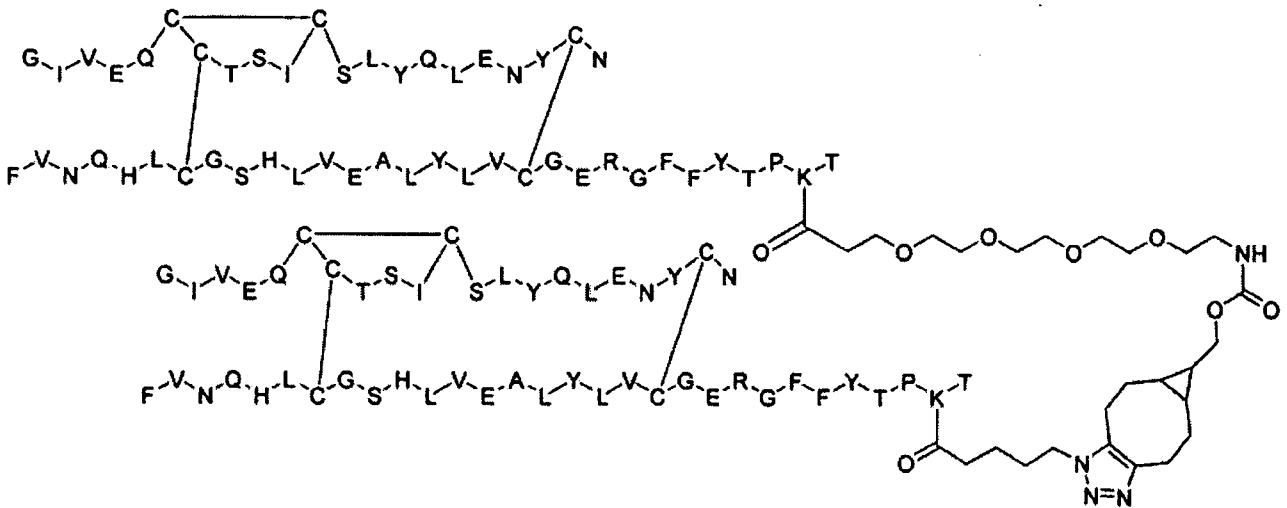
二聚體 49 ;



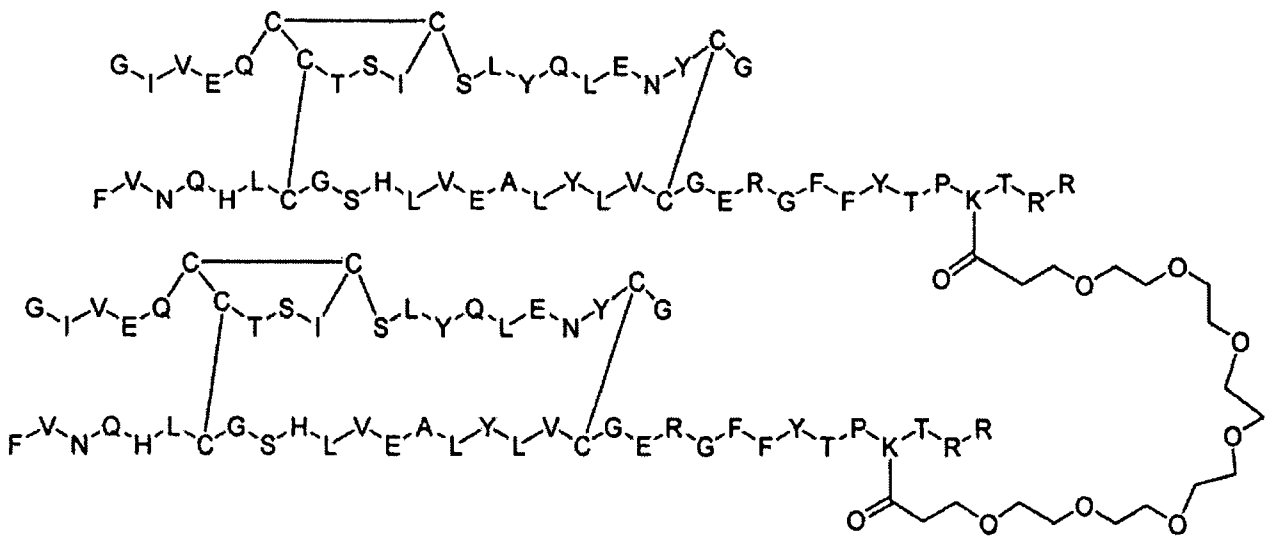
二聚體 50 ;



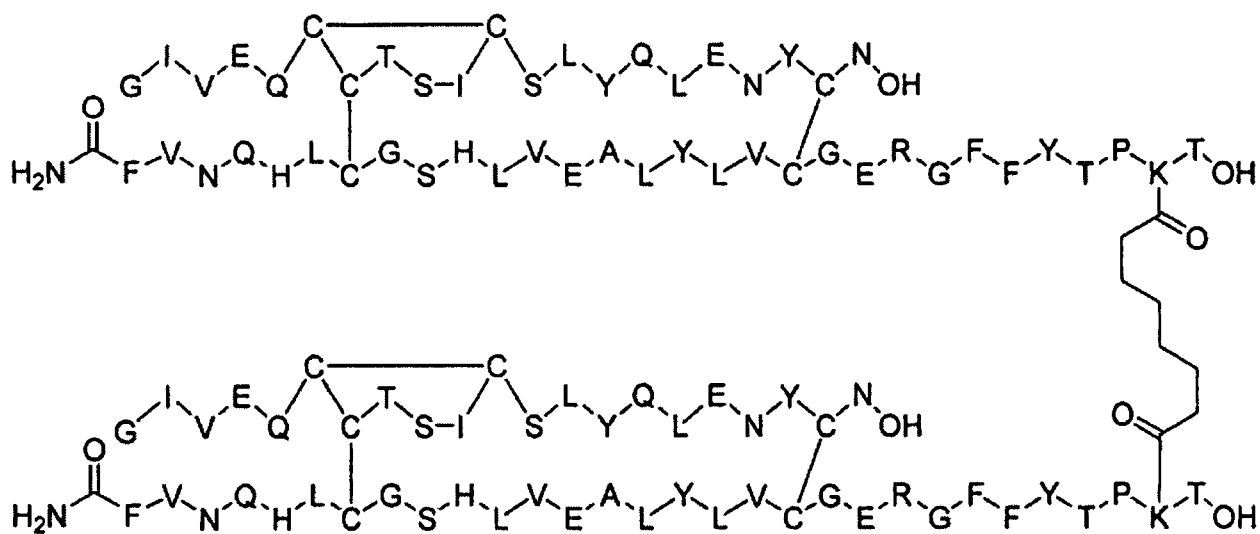
二聚體 51 ;



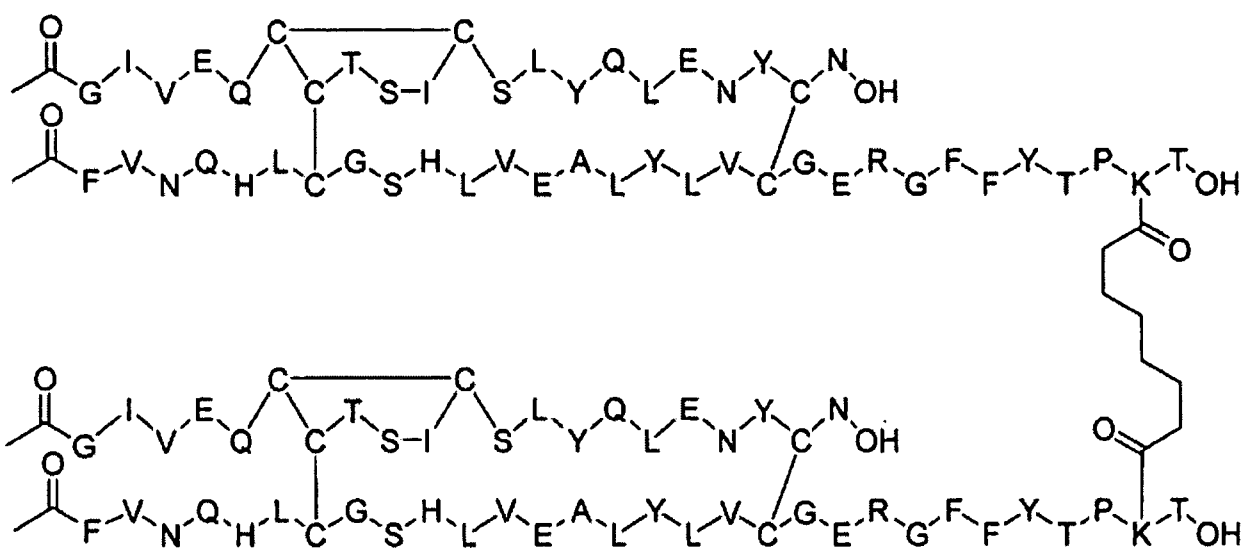
二聚體 52 ;



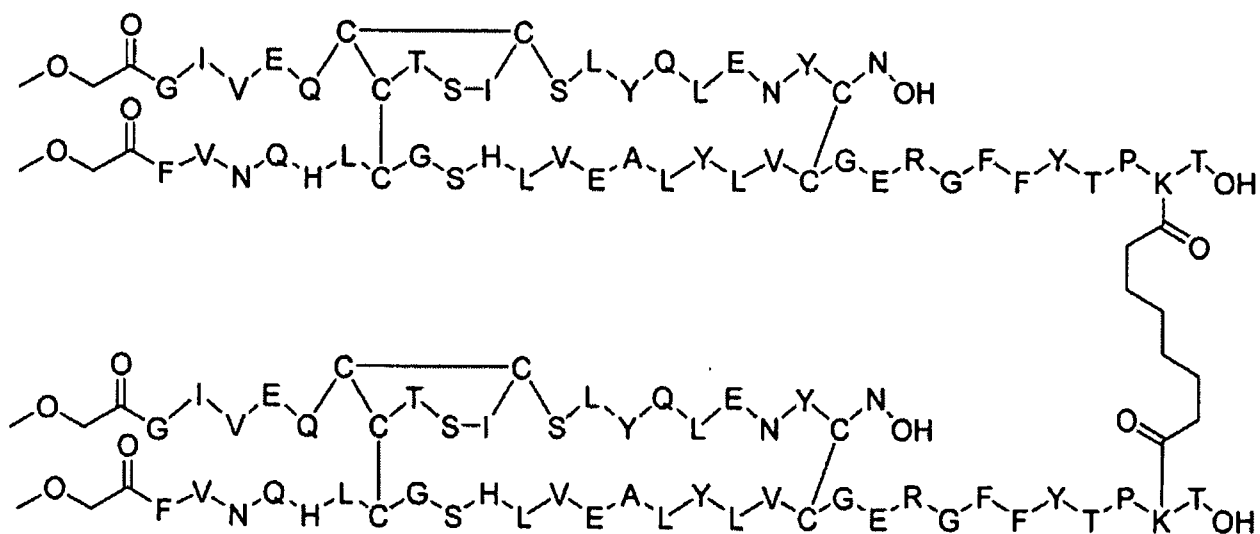
二聚體 53 ;



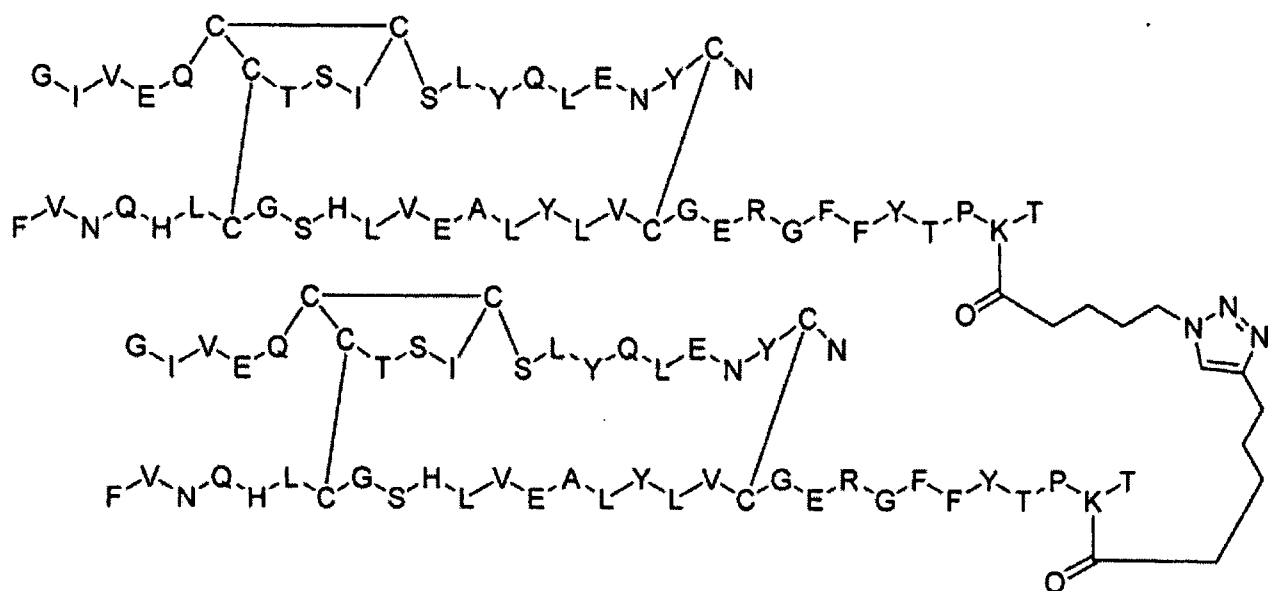
二聚體 54 ;



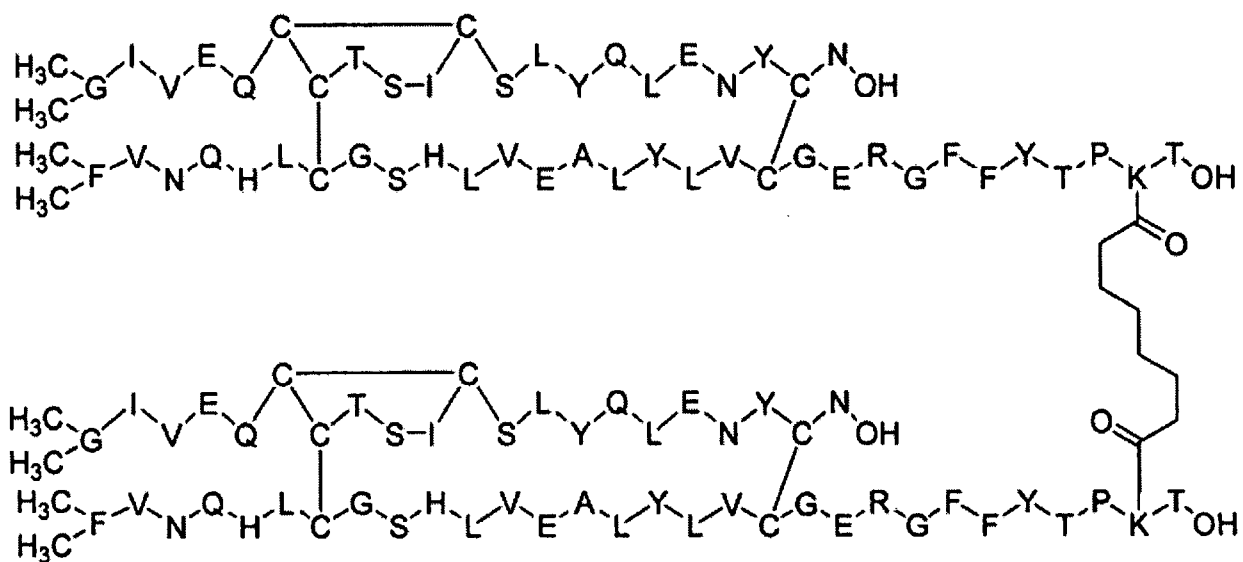
二聚體 55 ;



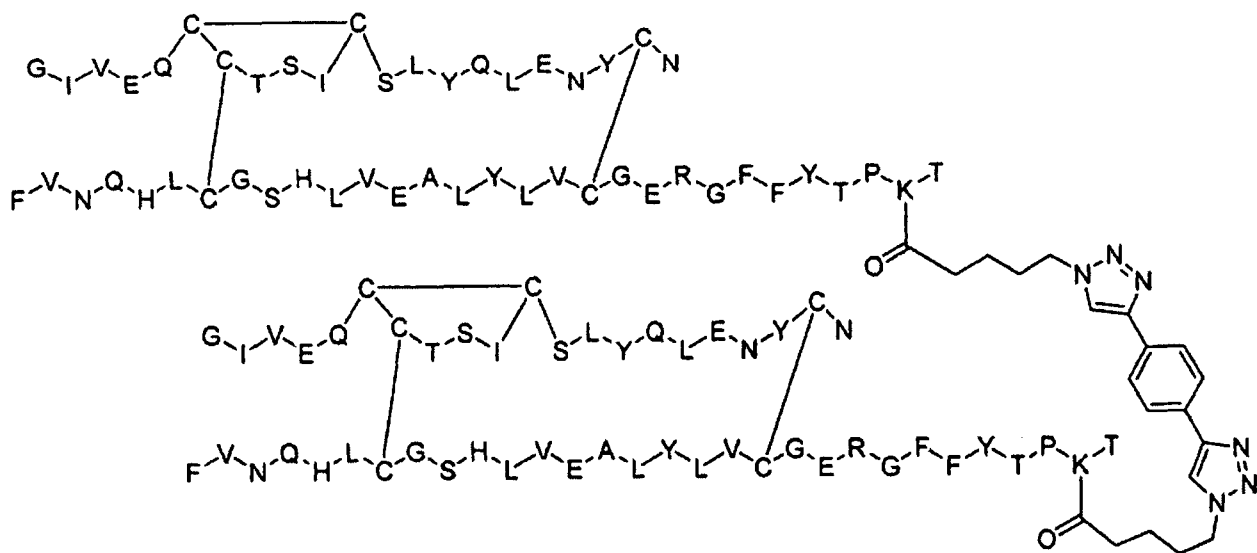
二聚體 56 ;



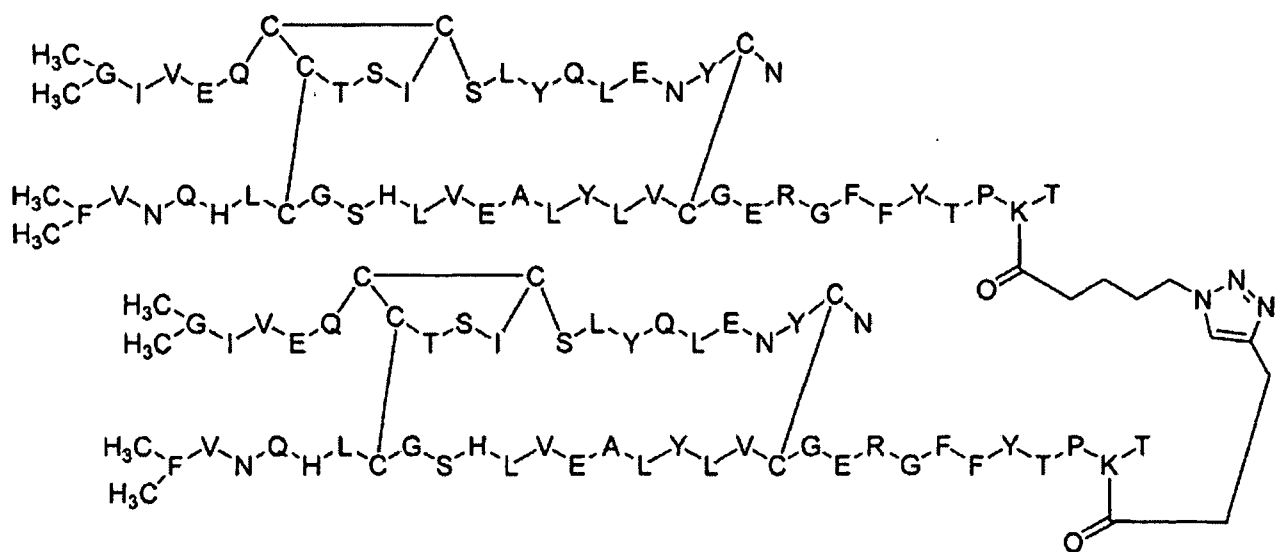
二聚體 57 ;



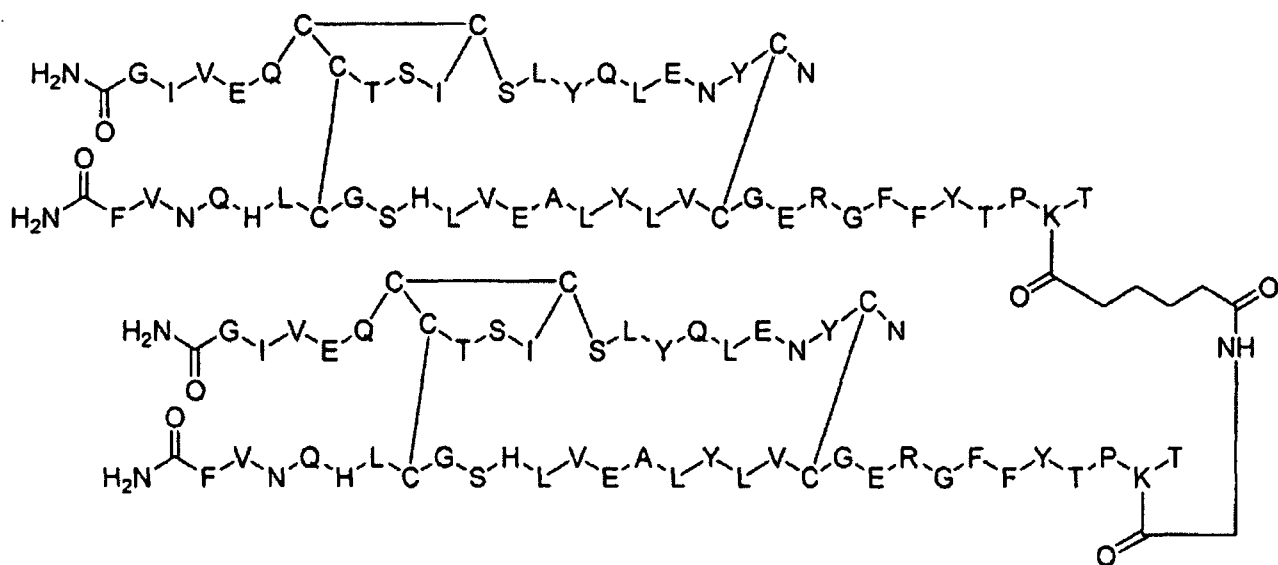
二聚體 58 ;



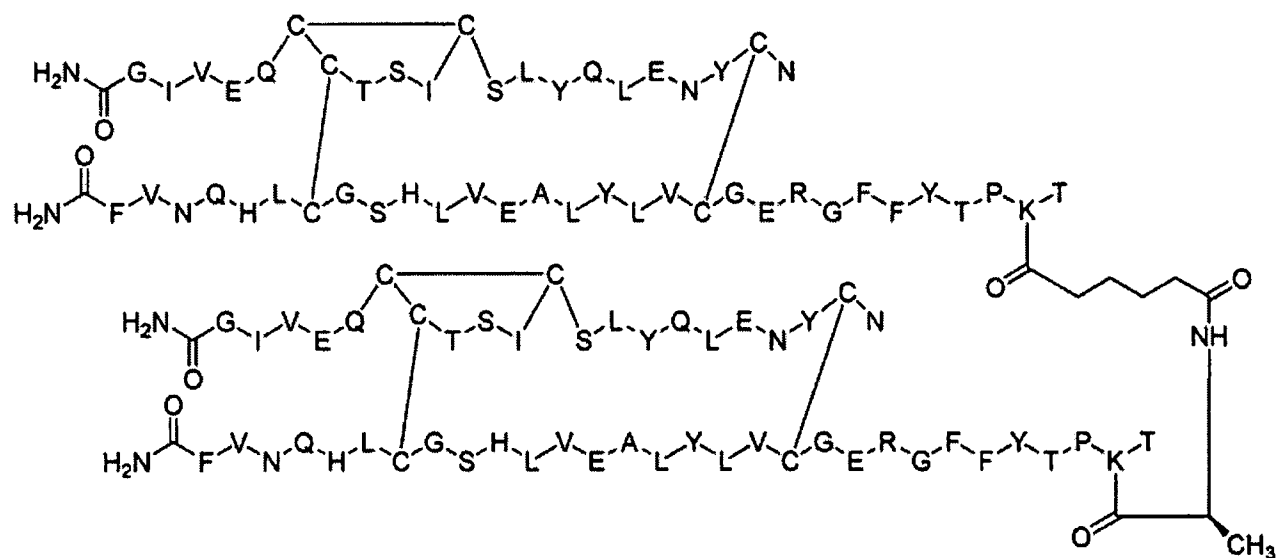
二聚體 59；



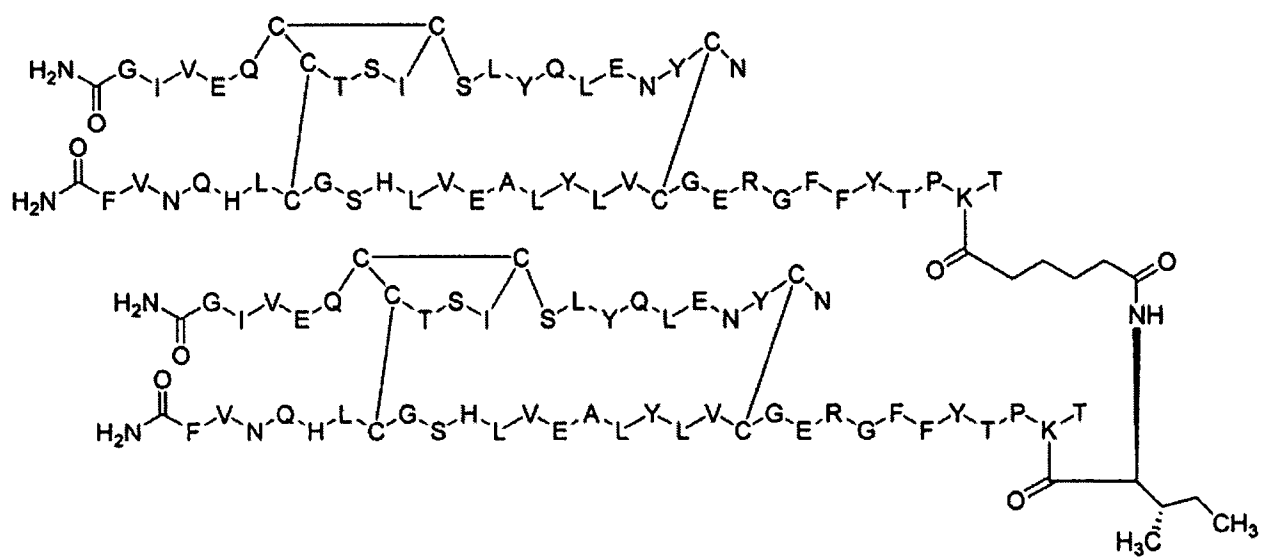
二聚體 60；



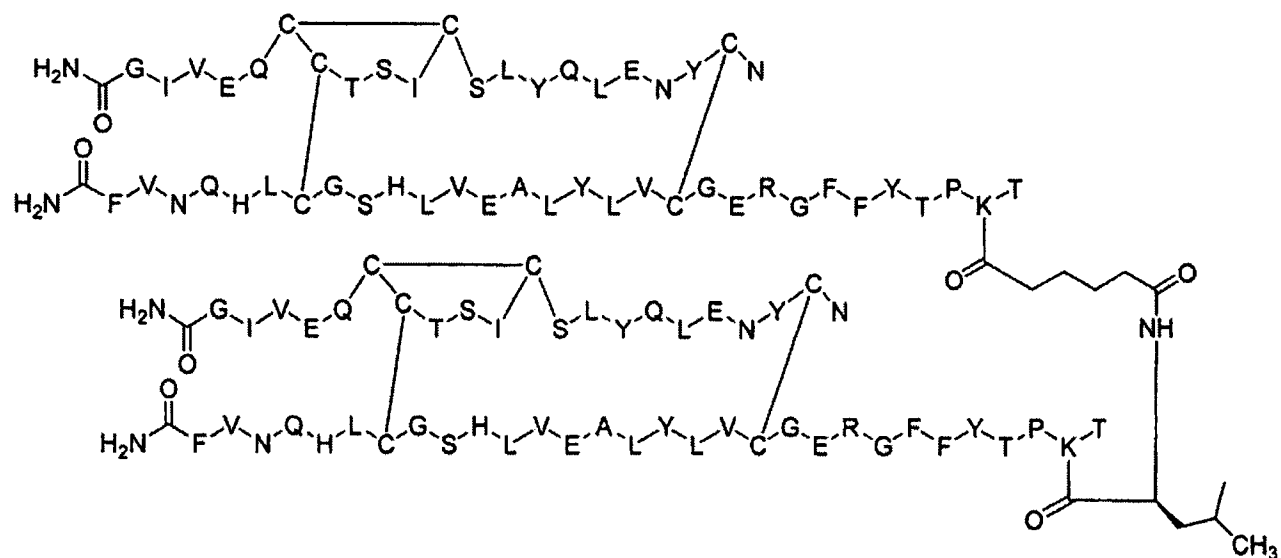
二聚體 61 ;



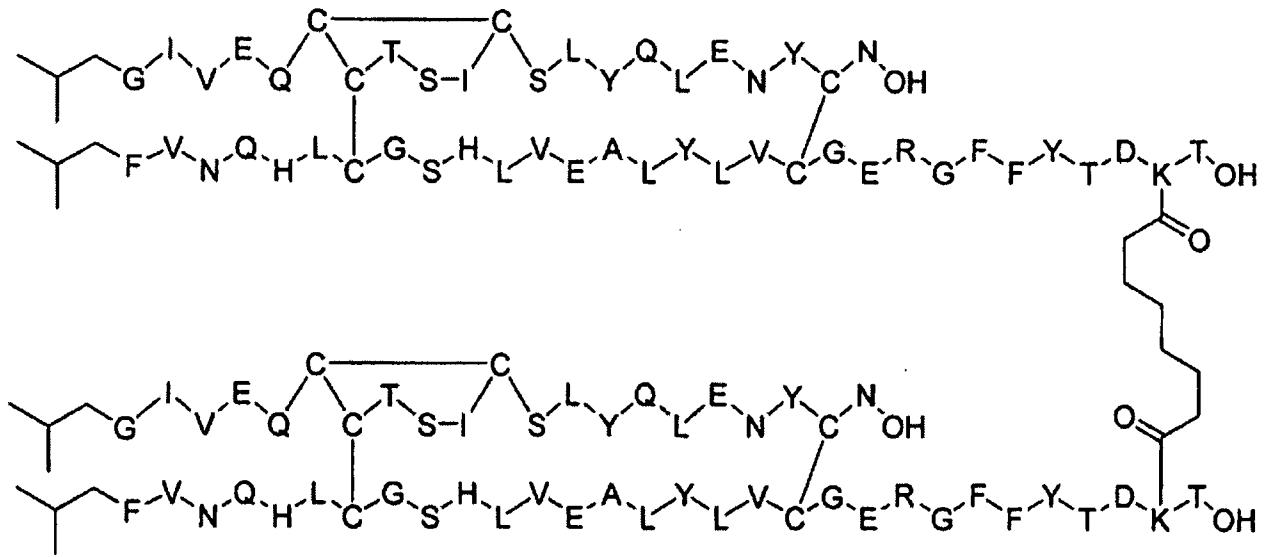
二聚體 62 ;



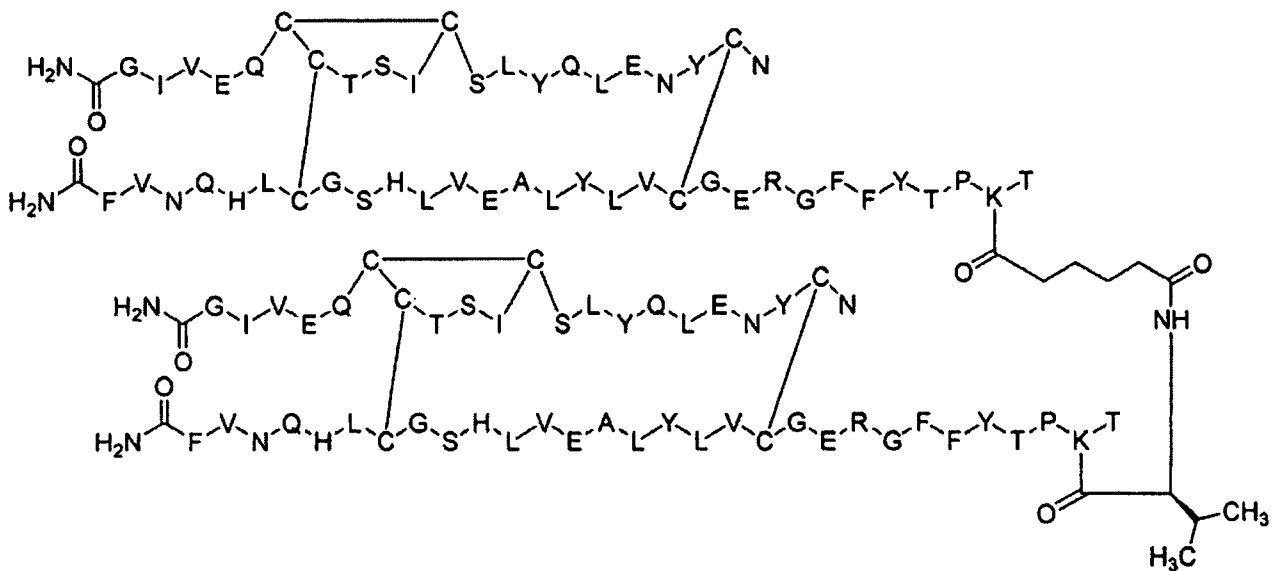
二聚體 63 ;



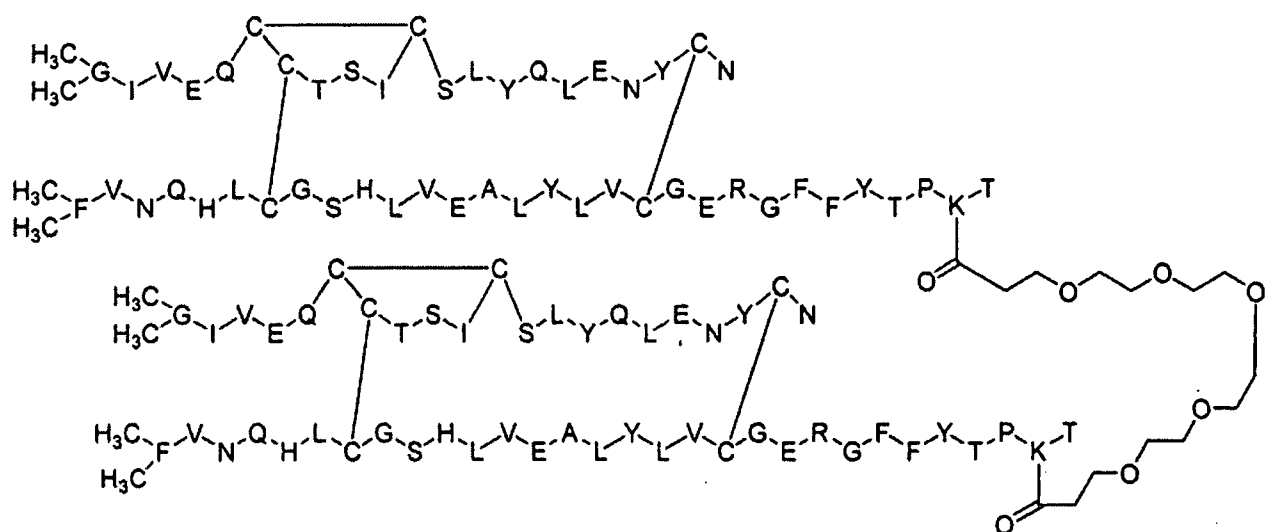
二聚體 64 ;



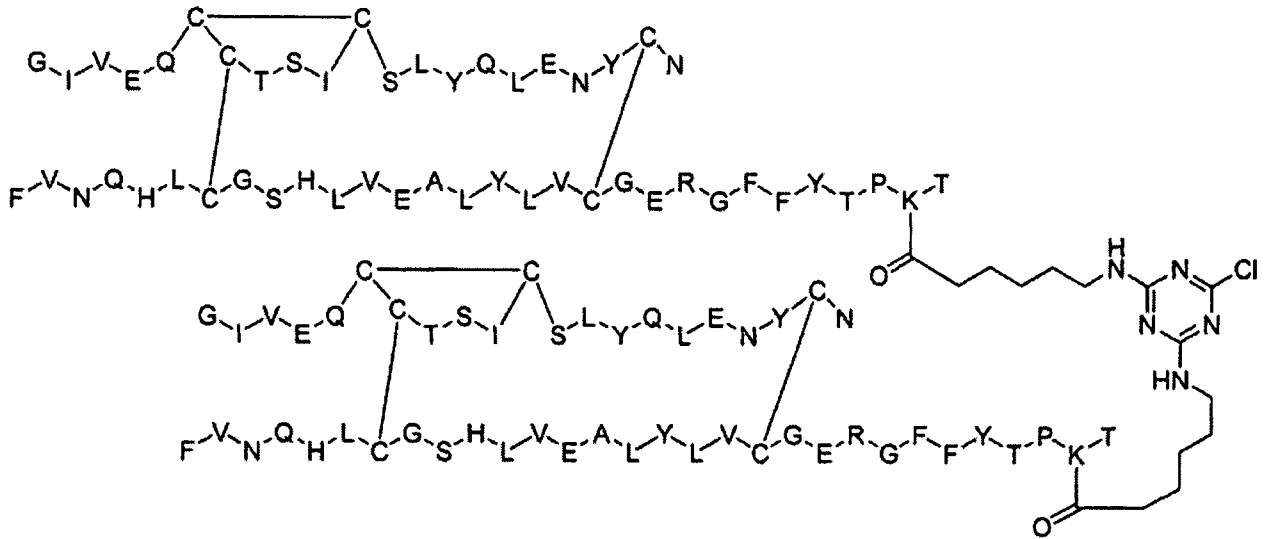
二聚體 65 ;



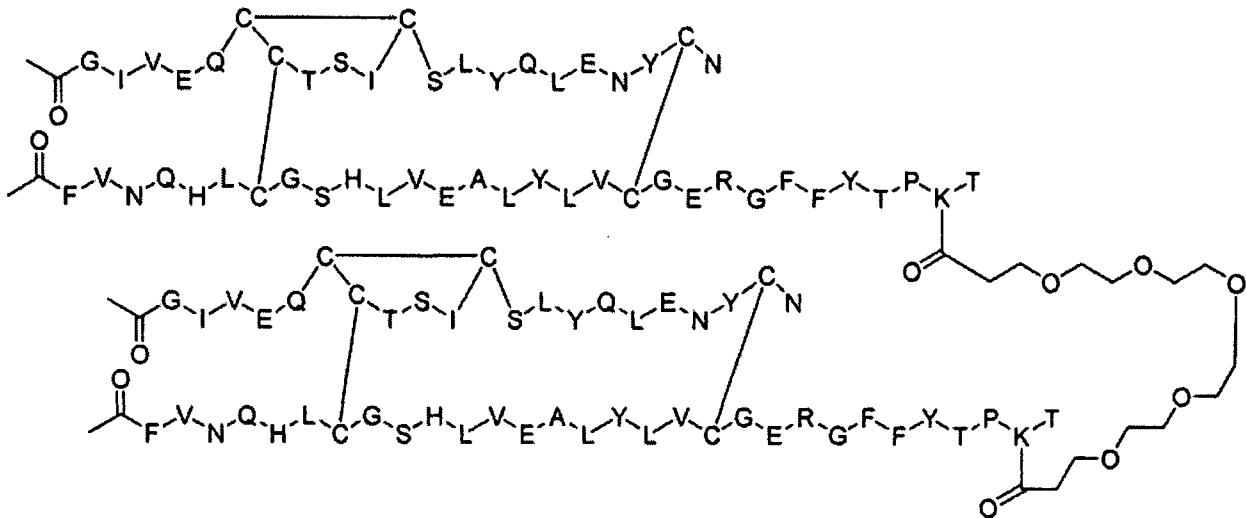
二聚體 66 ;



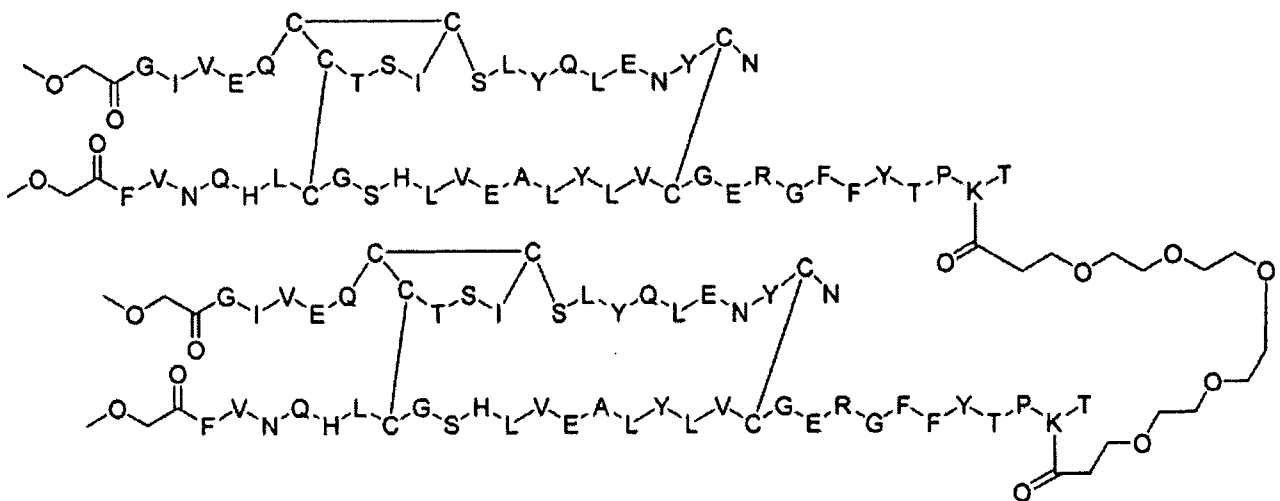
二聚體 67 ;



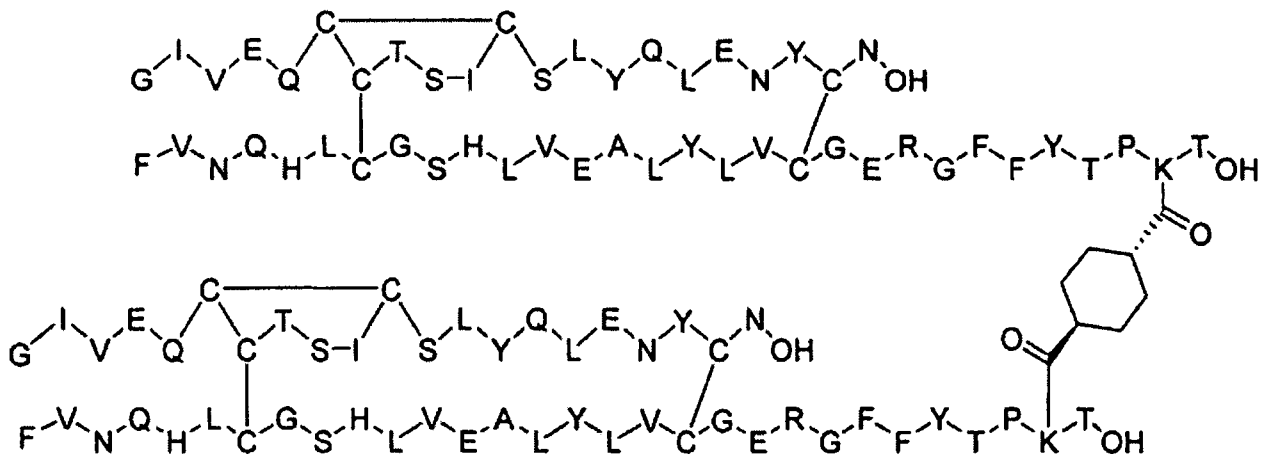
二聚體 68 ;



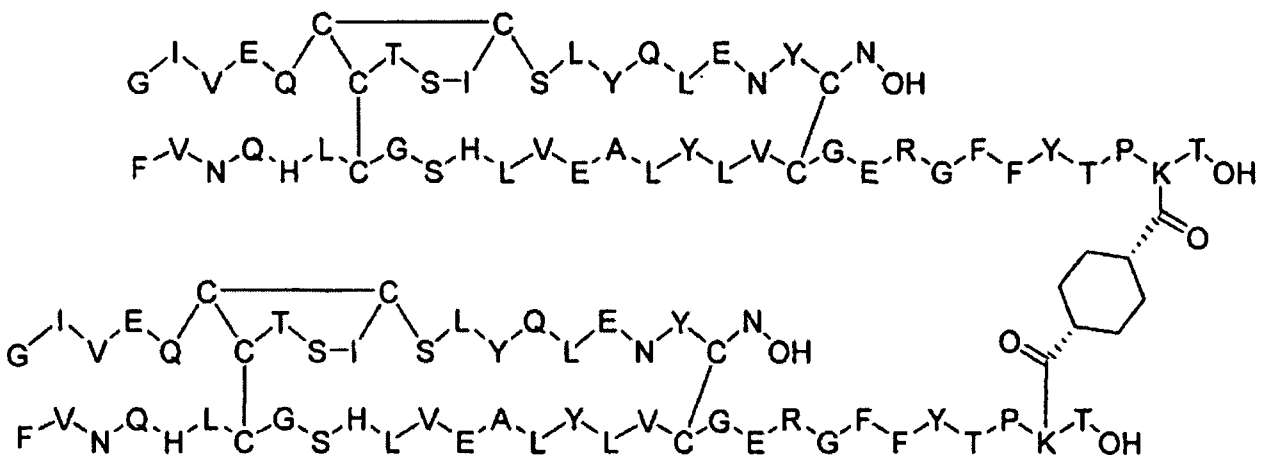
二聚體 69 ;



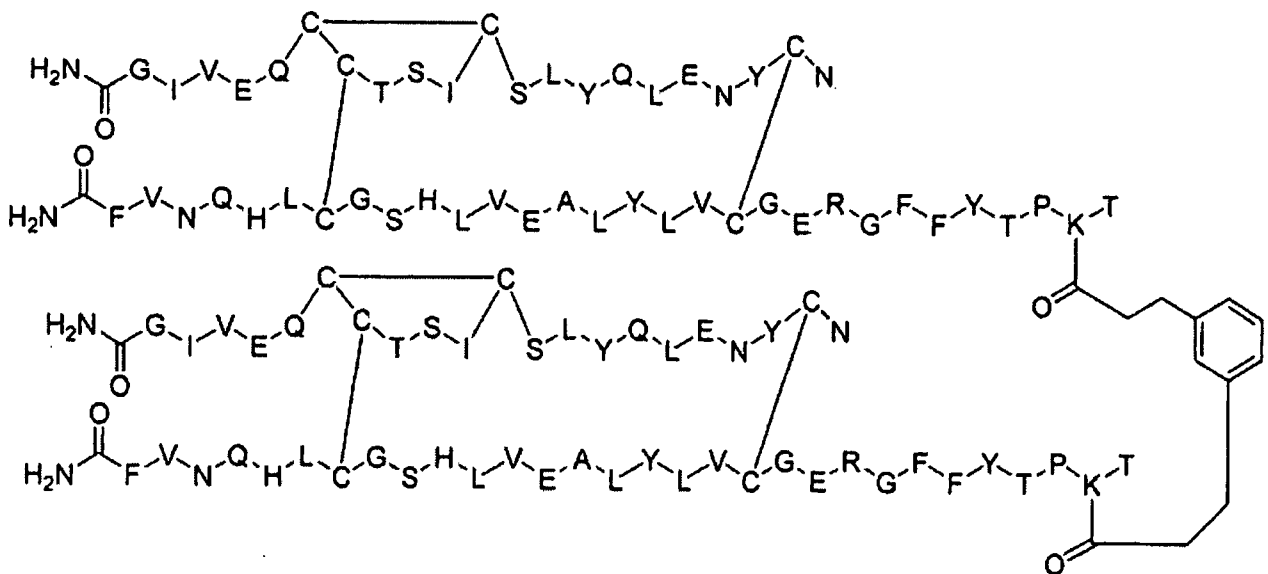
二聚體 70 ;



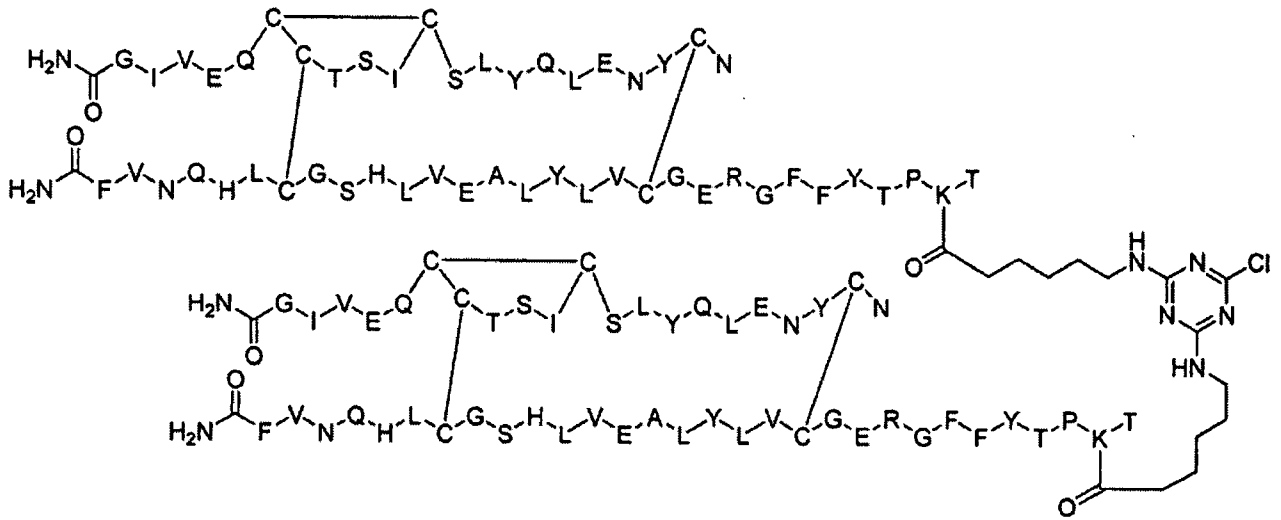
二聚體 71 ;



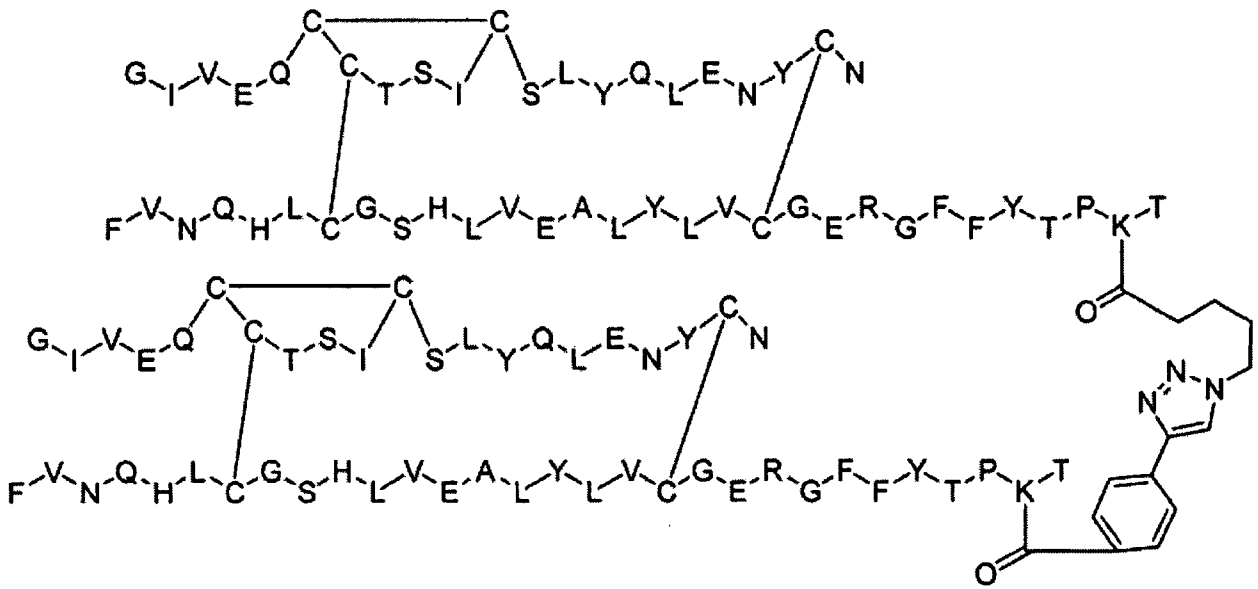
二聚體 72 ;



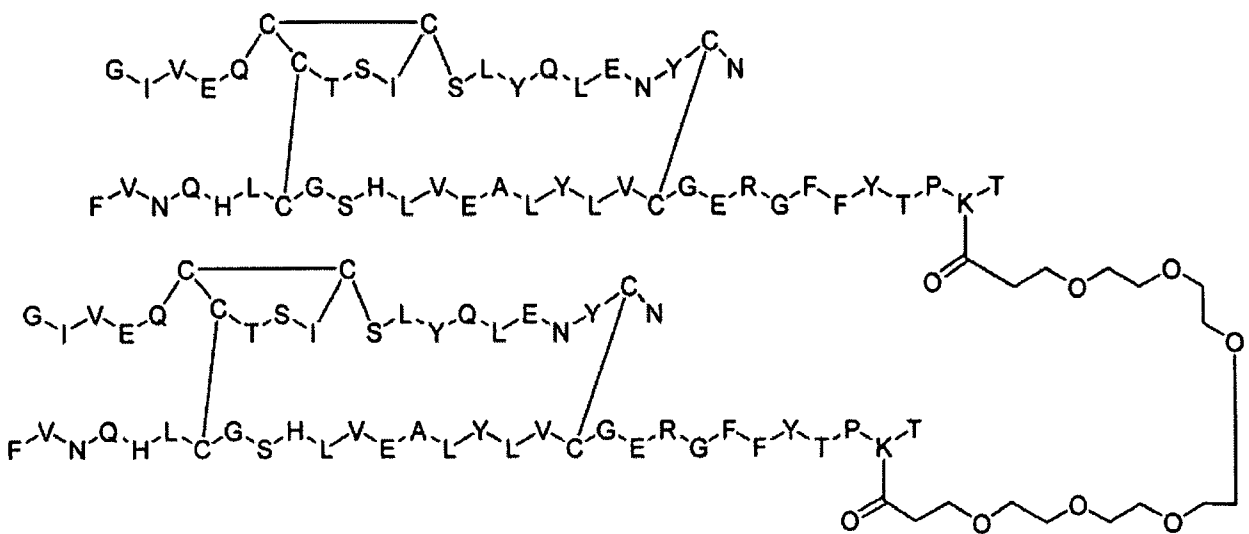
二聚體 73 ;



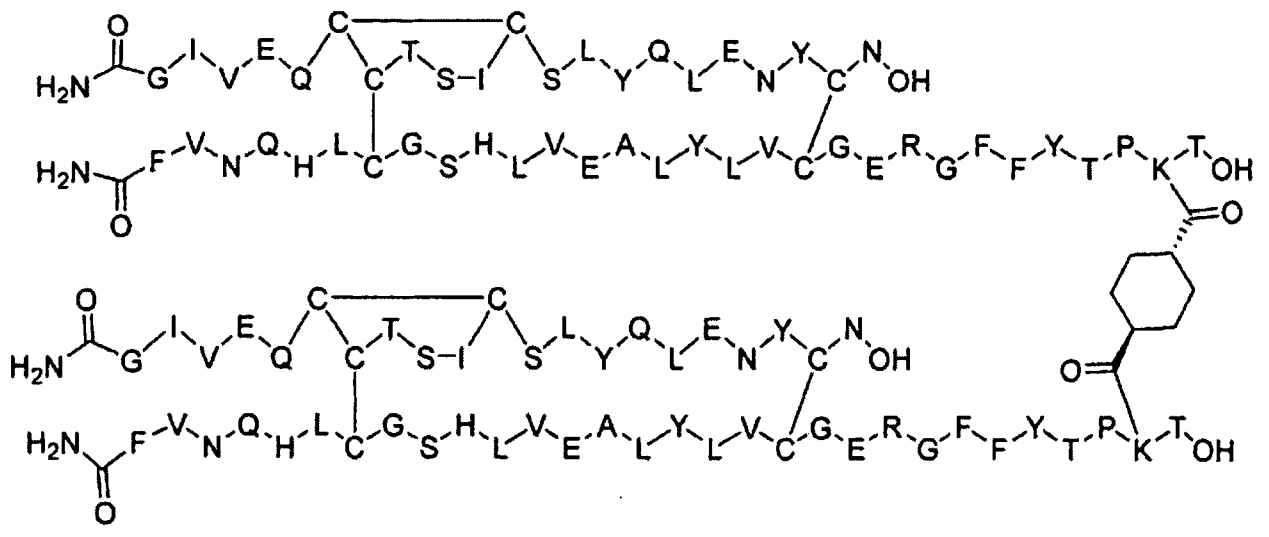
二聚體 74 ;



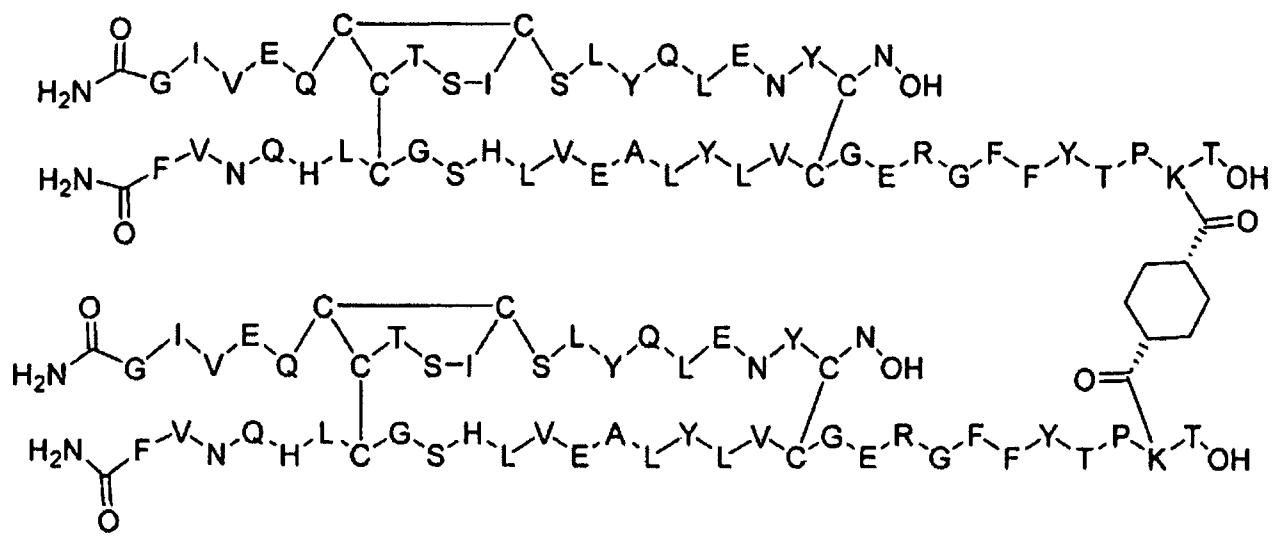
二聚體 75 ;



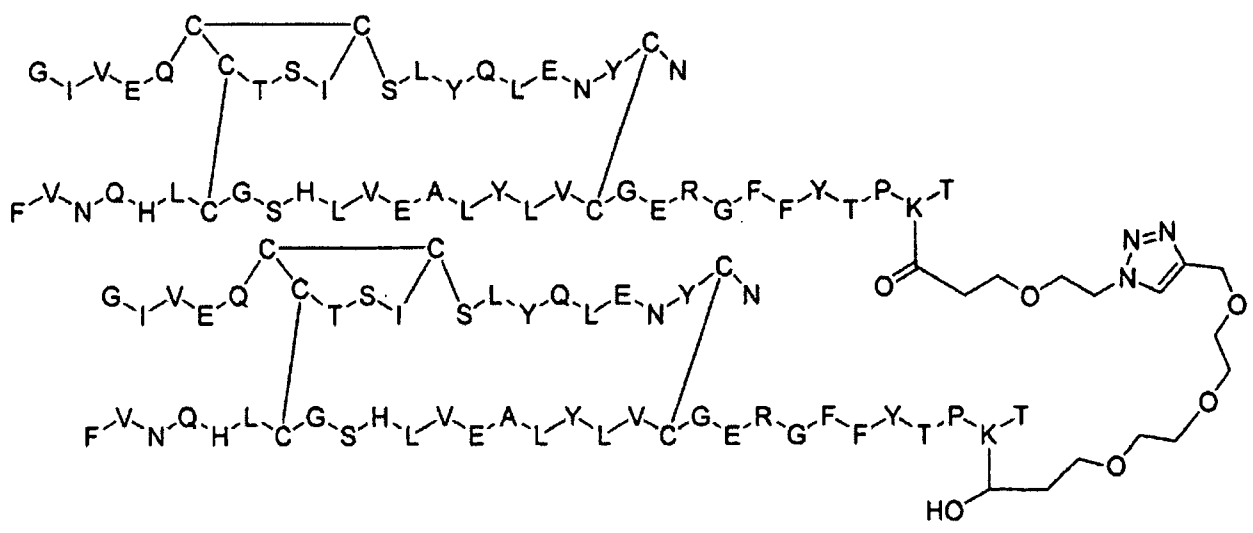
二聚體 76 ;



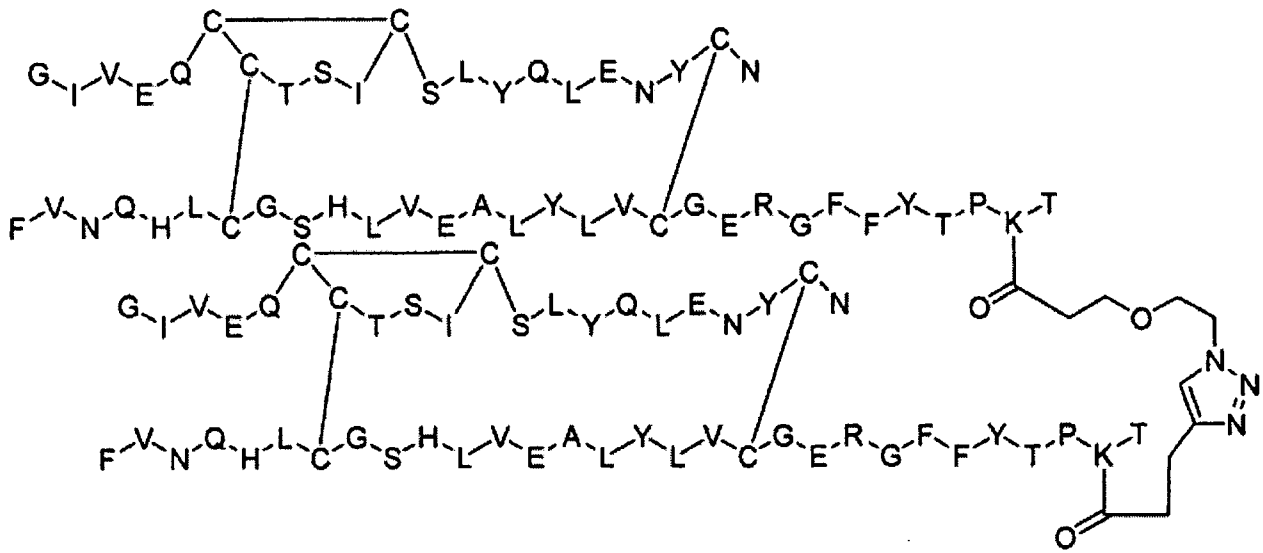
二聚體 77 ;



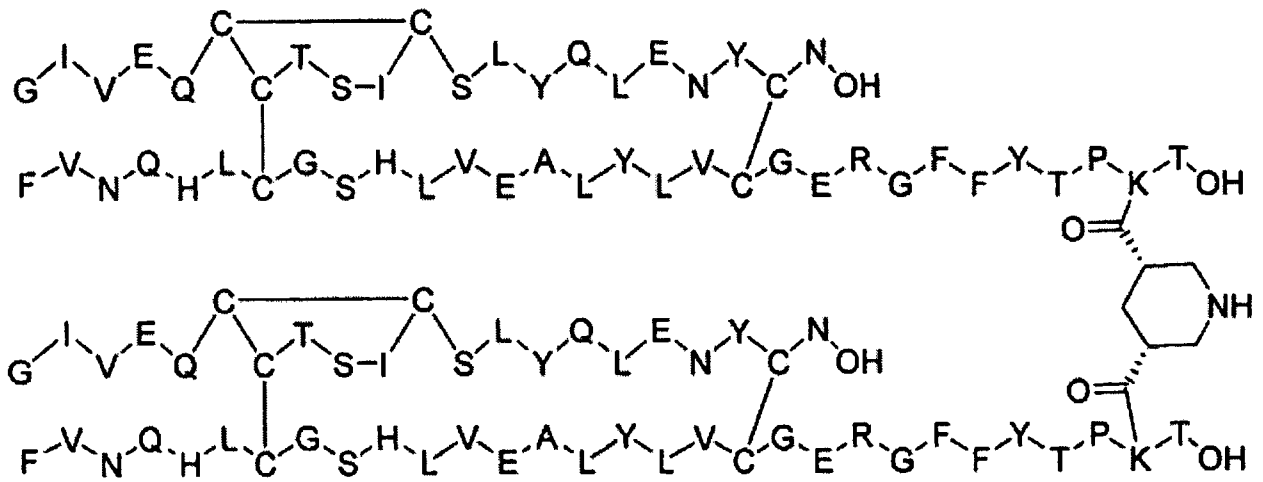
二聚體 78 ;



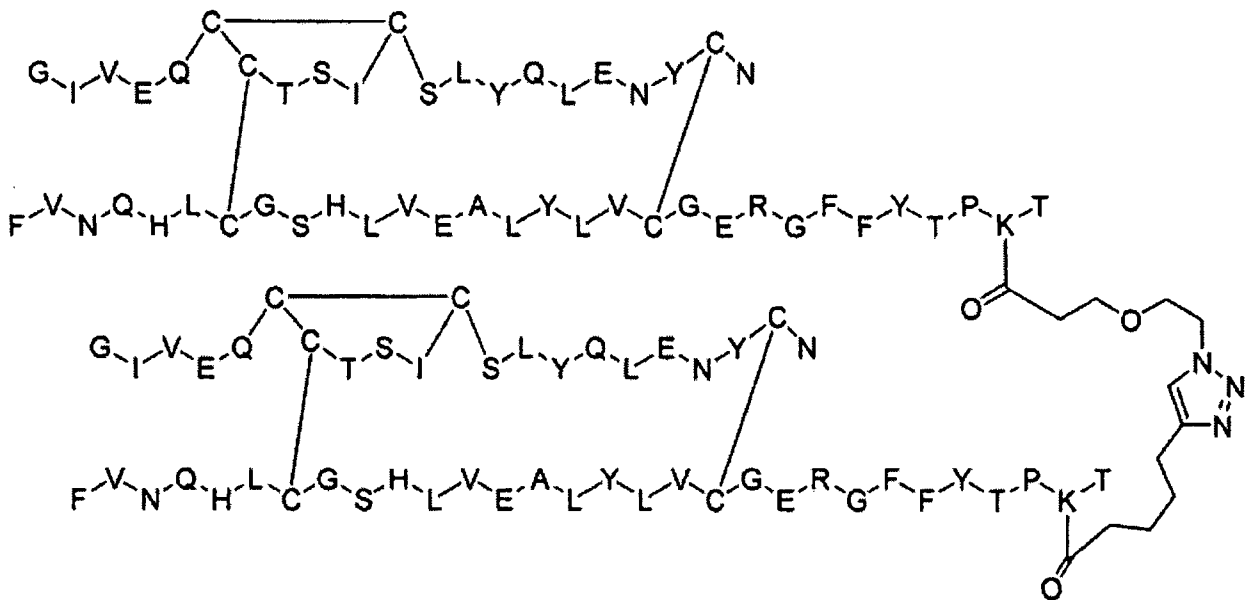
二聚體 79 ;



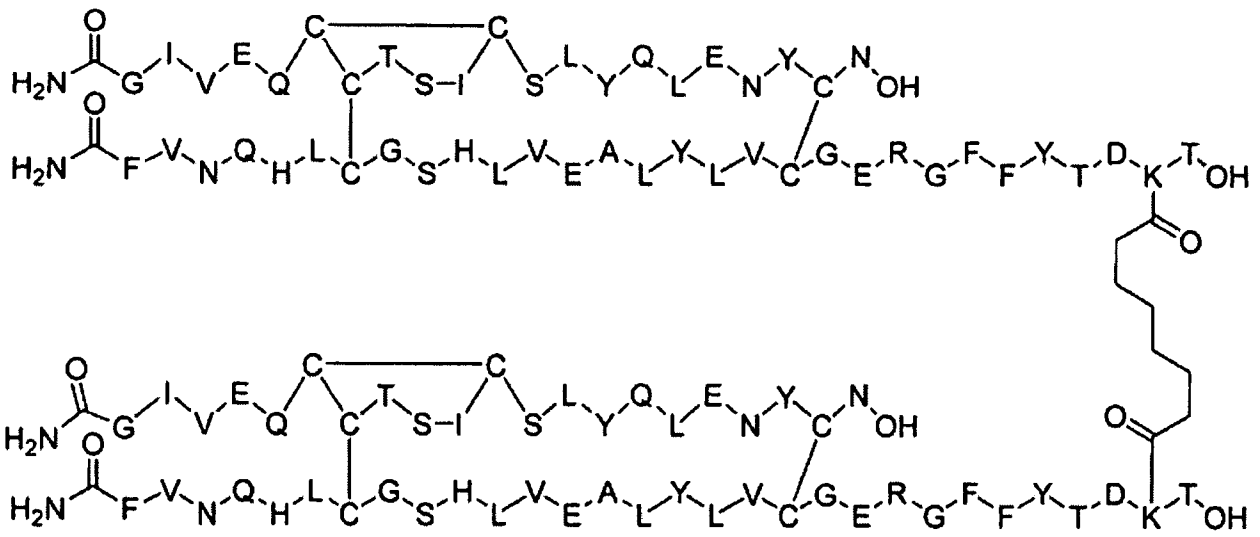
二聚體 80 ;



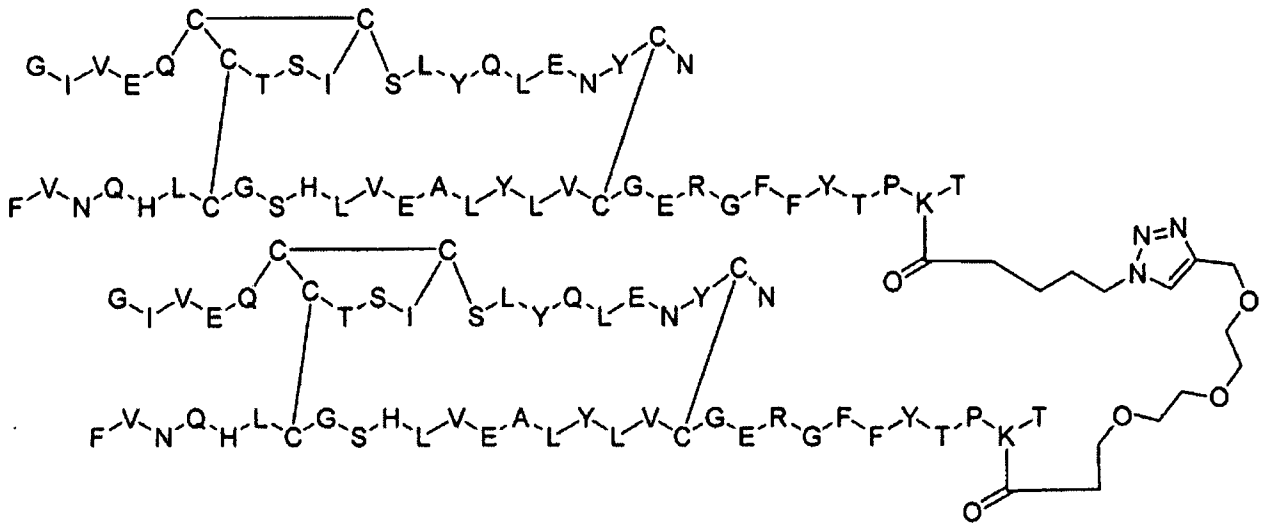
二聚體 81 ;



二聚體 82 ;

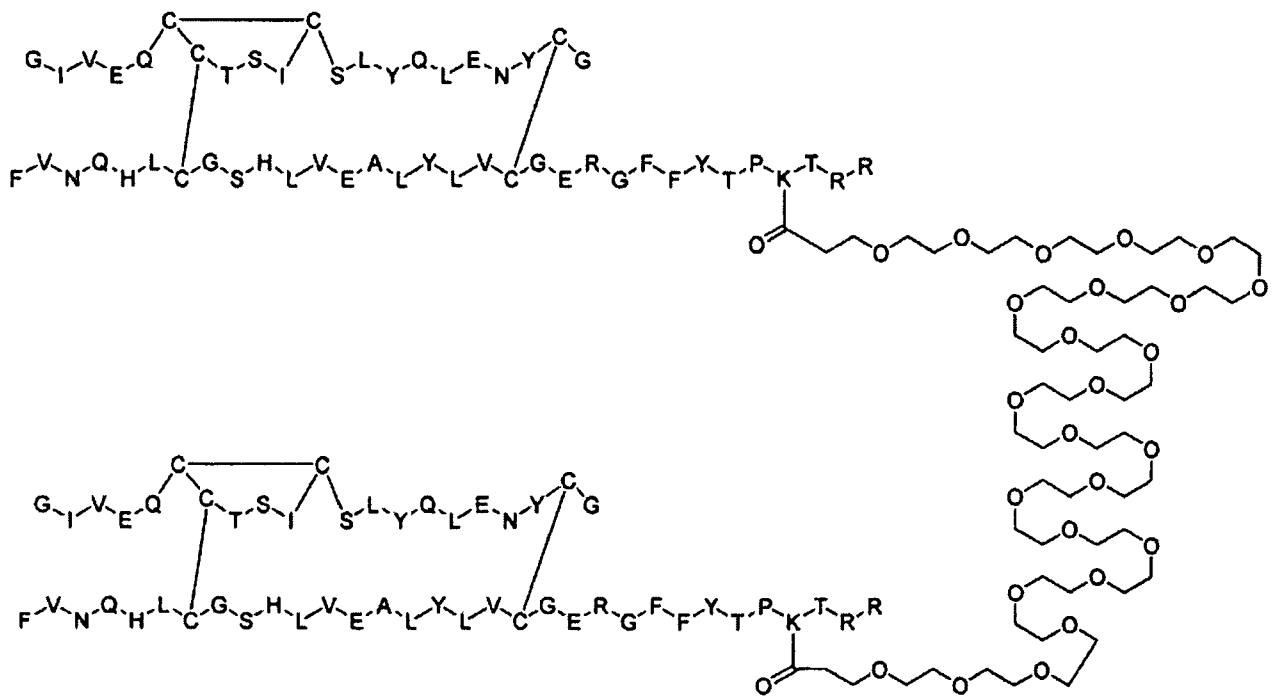


二聚體 83 ;

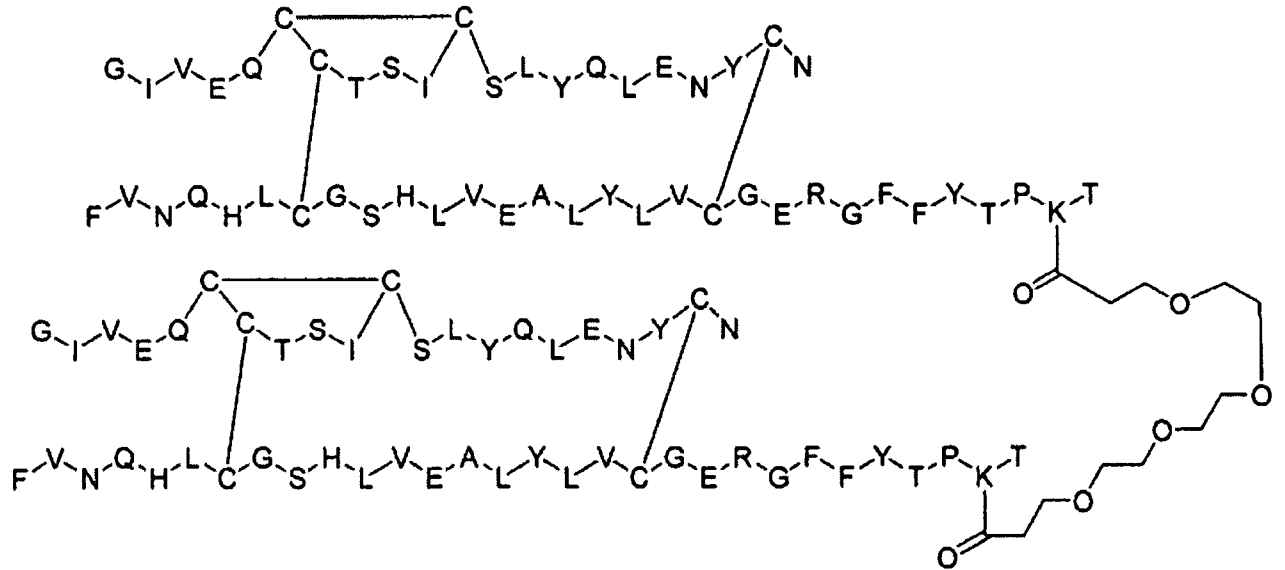


二聚體 84 ;

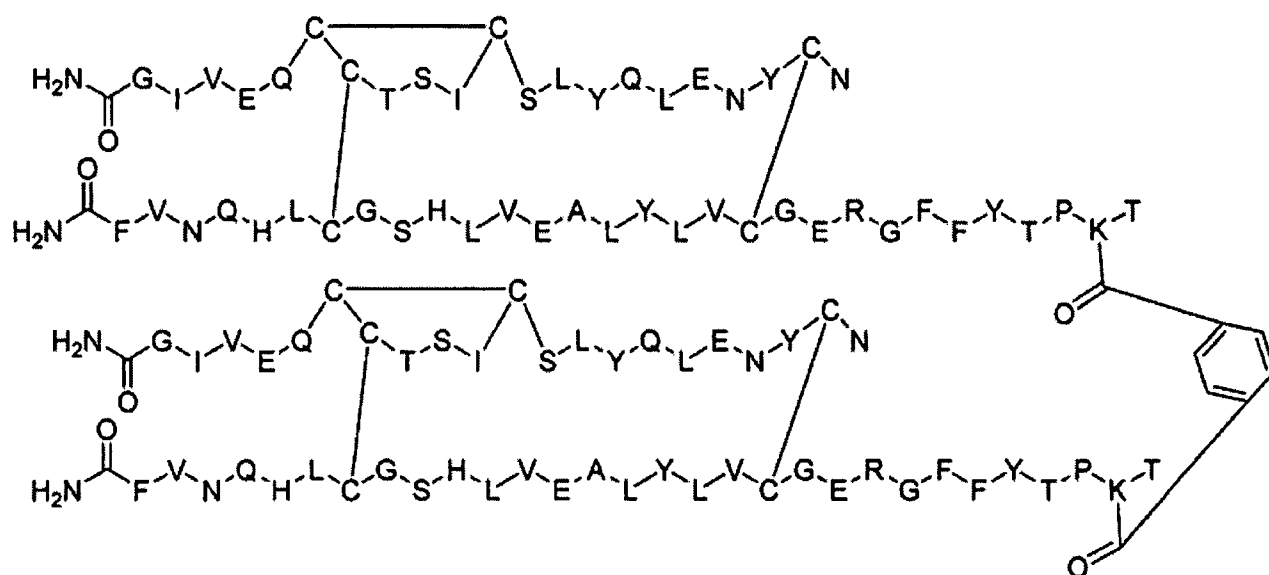




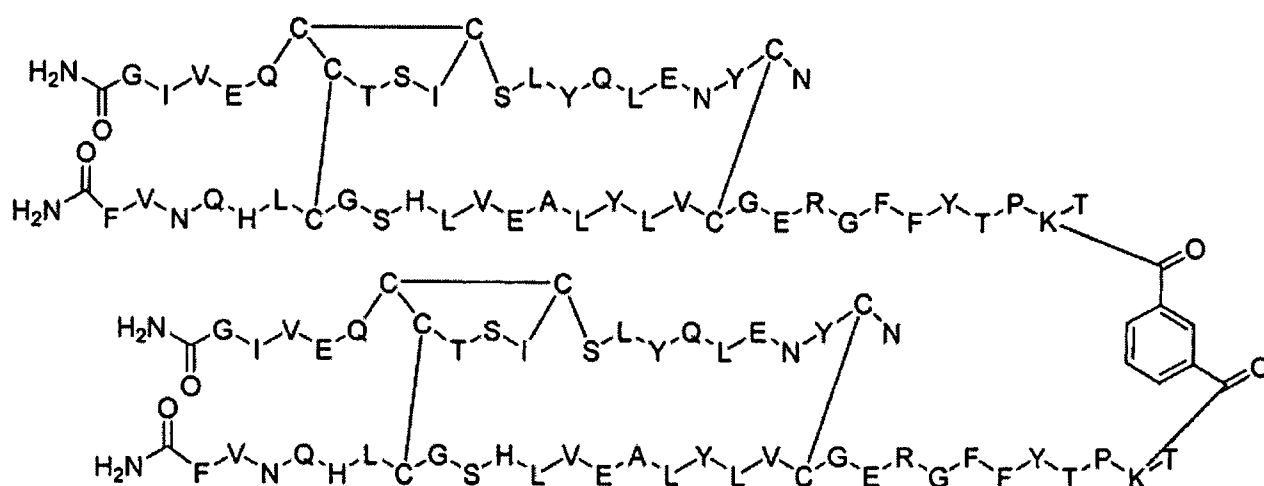
二聚體 87 ;



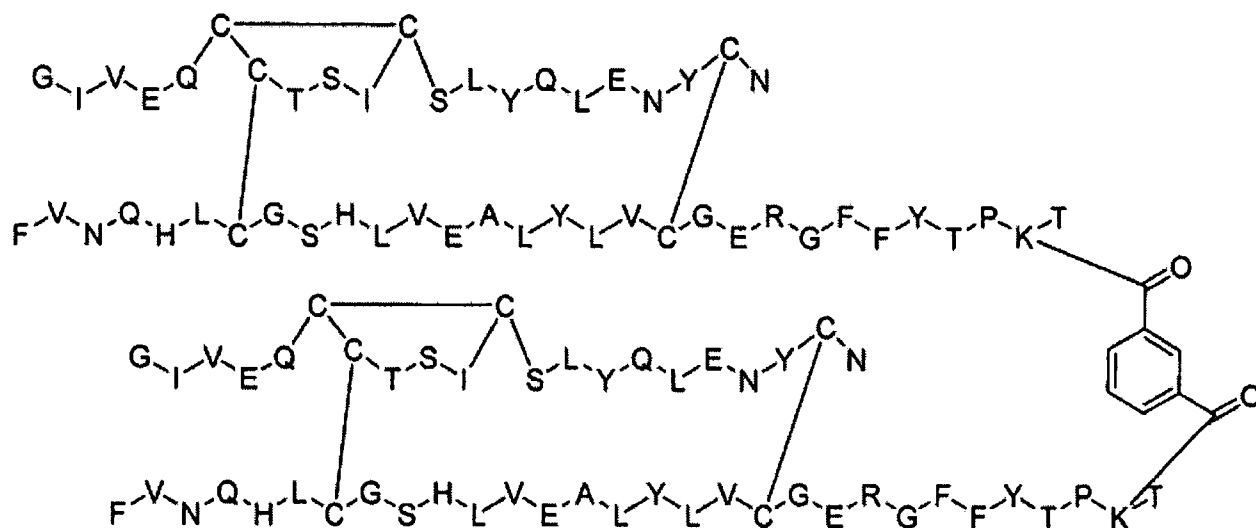
二聚體 88 ;



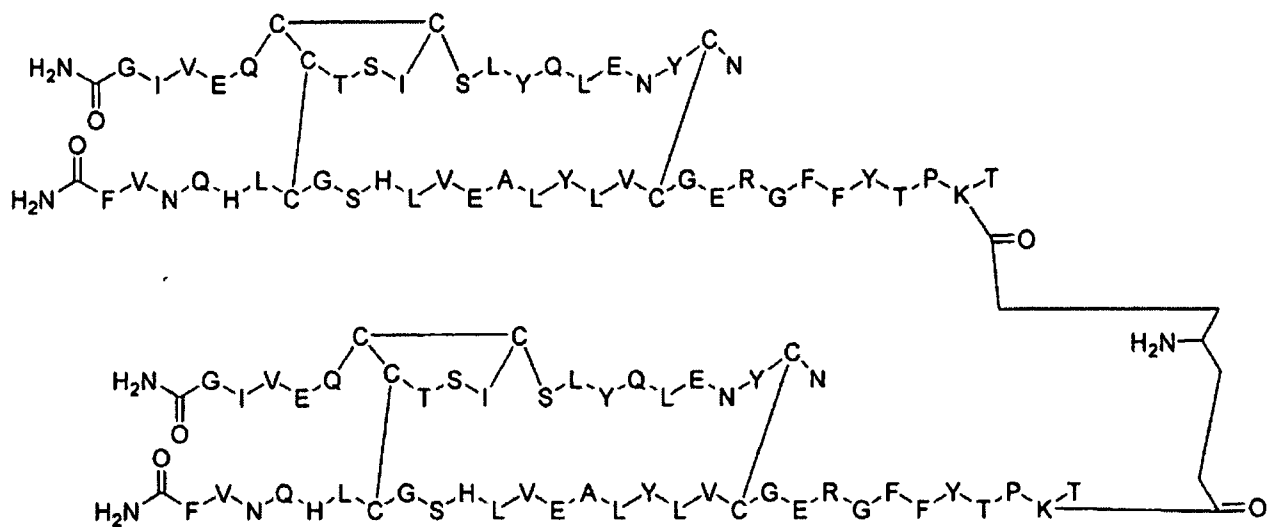
二聚體 89 ;



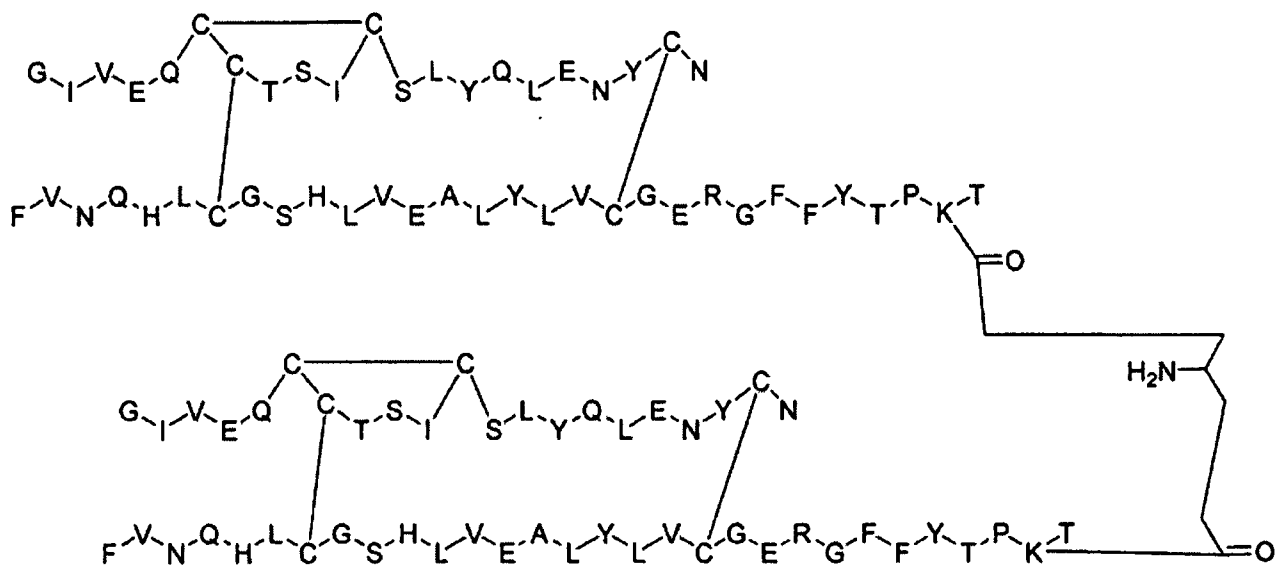
二聚體 90 ;



二聚體 91 ;



二聚體93；或



二聚體94

其中在該A鏈多肽之Cys<sub>6</sub>與Cys<sub>11</sub>殘基之間之二硫鍵聯及在該A鏈之Cys<sub>7</sub>及Cys<sub>20</sub>與該B鏈多肽之Cys<sub>7</sub>及Cys<sub>19</sub>之間之二硫鍵聯分別由其等間之實線表示；其中該等連接部分係共價連接至該所示離胺酸殘基之ε胺基酸，其中二聚體1-40、42-52、54-86及88-94之A鏈多肽具有SEQ ID NO:1中所示之胺基酸序列；二聚體56之A鏈多肽具有SEQ ID NO:11中所示之胺基酸序列；二聚體1-17、21-27、36、37、39-40及42-52、54-82、84-86及88-94之B鏈多肽具有SEQ ID NO:2中所示之胺基酸序列；二聚體18及32-35之B鏈多肽具有SEQ ID NO:6中所示之胺基酸序列；二聚體19及83之B

鏈多肽具有SEQ ID NO:9中所示之胺基酸序列；二聚體20、28-31及38之B鏈多肽具有SEQ ID NO:10中所示之胺基酸序列；及二聚體53及87之A鏈多肽及B鏈多肽分別係SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8。

38. 一種胰島素二聚體，其包含：

具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys藉由選自由以下組成之群之雙官能連接子結合在一起：連接子1、連接子2、連接子3、連接子10、連接子11、連接子12、連接子13、連接子14、連接子15、連接子16、連接子17、連接子18、連接子19、連接子20、連接子21、連接子22、連接子23、連接子24、連接子25、連接子26、連接子27、連接子28、連接子29、連接子30、連接子31、連接子32、連接子33、連接子34、連接子35、連接子36、連接子37、連接子38、連接子39、連接子40、連接子41、連接子42、連接子43、連接子44、連接子45、連接子46、連接子47、連接子48、連接子49及連接子50，限制條件為當該雙官能連接子係連接子10、連接子11、連接子12、連接子13或連接子14時，該等第一或第二A鏈或B鏈多肽中之至少一者係以其N端胺基酸結合至取代基或該第一胰島素異二聚體分子之至少N端胺基酸係結合至取代基或該第一胰島素異二聚體及第二胰島素異二聚體兩者之N端胺基酸係結合至取代基。

39. 一種胰島素二聚體，其包含：

具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys係結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島

素異二聚體之第二B29或B28 Lys結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第二連接子，該第一B29或B28 Lys及該第二B29或B28 Lys係經由該第一連接子及該第二連接子結合在一起。

40. 如請求項38或39之胰島素二聚體，其中該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣。
41. 如請求項38或39之胰島素二聚體，其中該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6烷基或PEG2基。
42. 一種胰島素類似物二聚體，其包含：

具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子之第一B29或B28 Lys結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys結合至選自由連接子5及連接子7組成之群之第二連接子，其中該等第一及第二連接子係經由具有以下結構之橋接連接子結合在一起：



其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環；在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。

43. 一種胰島素類似物二聚體，其包含：

具有第一A鏈多肽及第一B鏈多肽之第一胰島素異二聚體分子

之第一B29或B28 Lys結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第一連接子及具有第二A鏈多肽及第二B鏈多肽之第二胰島素異二聚體之第二B29或B28 Lys結合至選自由連接子4、連接子6、連接子8及連接子9組成之群之第二連接子，其中該等第一及第二連接子係經由具有以下結構之橋接連接子結合在一起：



其中R係共價鍵、碳原子、苯基、雜原子或視需要經取代之選自由以下組成之群之基團：醯基、脂族、雜脂族、芳基、雜芳基及雜環；在特定態樣中，R係C2、C3、C4、C6、C7、C8、C9或C10醯基或PEG2、PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10、PEG11、PEG12、PEG13或PEG25。

44. 如請求項42或43之胰島素類似物二聚體，其中該取代基包含連接至具有通式RC(O)-基團之N-羥基琥珀醯亞胺酯，其中R可係R'CH<sub>2</sub>、R'NH、R'O，及R'可係H、直鏈烷基鏈、胺基酸、肽、聚乙二醇(PEG)、醣。
45. 如請求項42或43之胰島素類似物二聚體，其中該取代基係胺甲醯基、乙醯基、甘胺酸、甲基、甲氧基、二甲基、異丁基、PEG1基、AEG基、AEG-C6胺基或PEG2基。
46. 一種組合物，其包含如請求項1至22中任一項之胰島素受體部分促效劑；如請求項23至36及42至45中任一項之胰島素類似物二聚體；如請求項37之化合物或如請求項29至41中任一項之胰島素二聚體及醫藥上可接受之載劑。
47. 如請求項46之組合物，其用於糖尿病之治療。
48. 如請求項47之組合物，其中該等糖尿病係1型糖尿病、2型糖尿

病或妊娠糖尿病。

49. 一種如請求項1至22中任一項之胰島素受體部分促效劑；如請求項23至36及42至45中任一項之胰島素類似物二聚體；如請求項37之化合物或如請求項39至41中任一項之胰島素二聚體之用途，其等用於製造治療糖尿病之藥劑。
50. 如請求項49之用途，其中該等糖尿病係1型糖尿病、2型糖尿病或妊娠糖尿病。

圖式

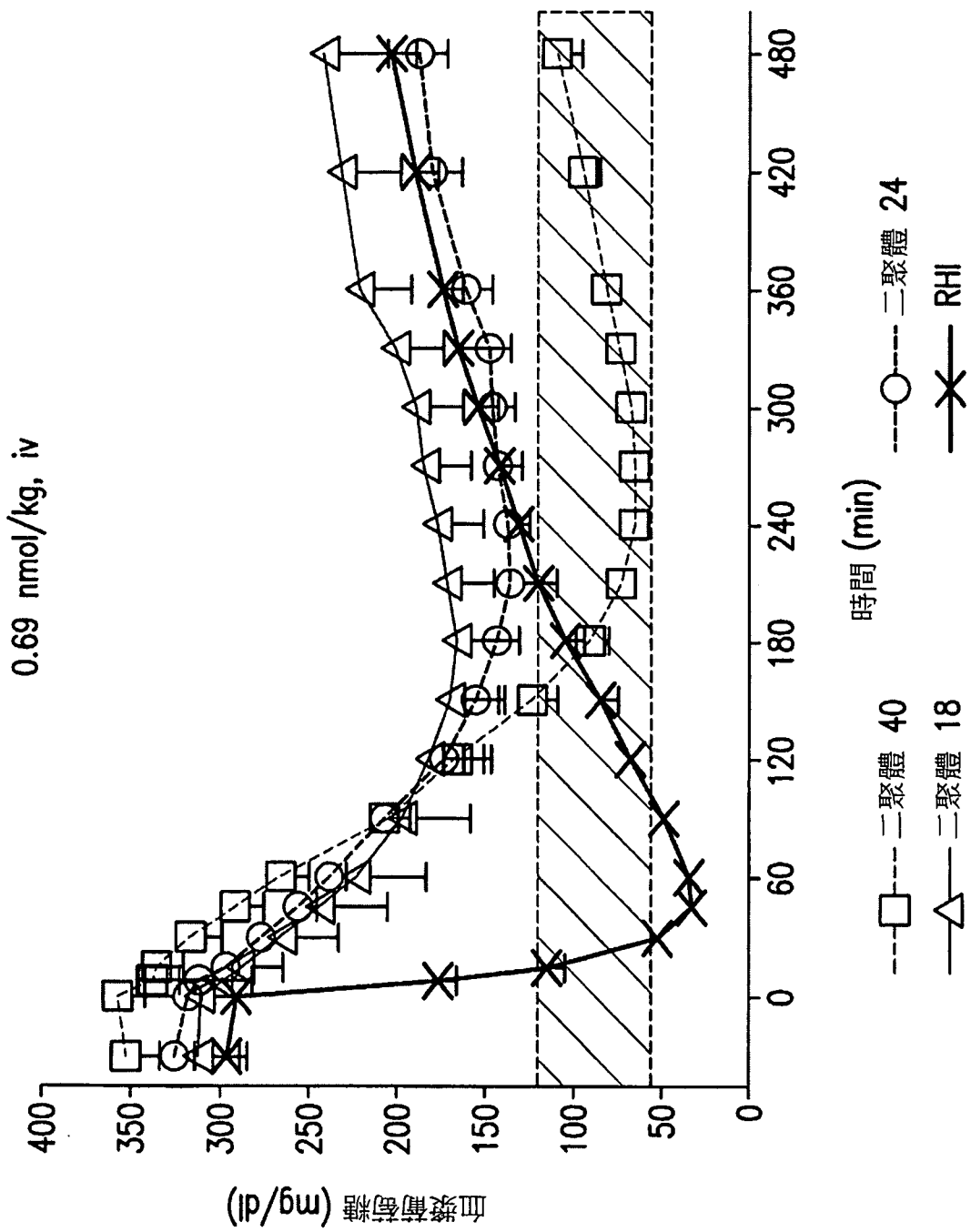


圖1

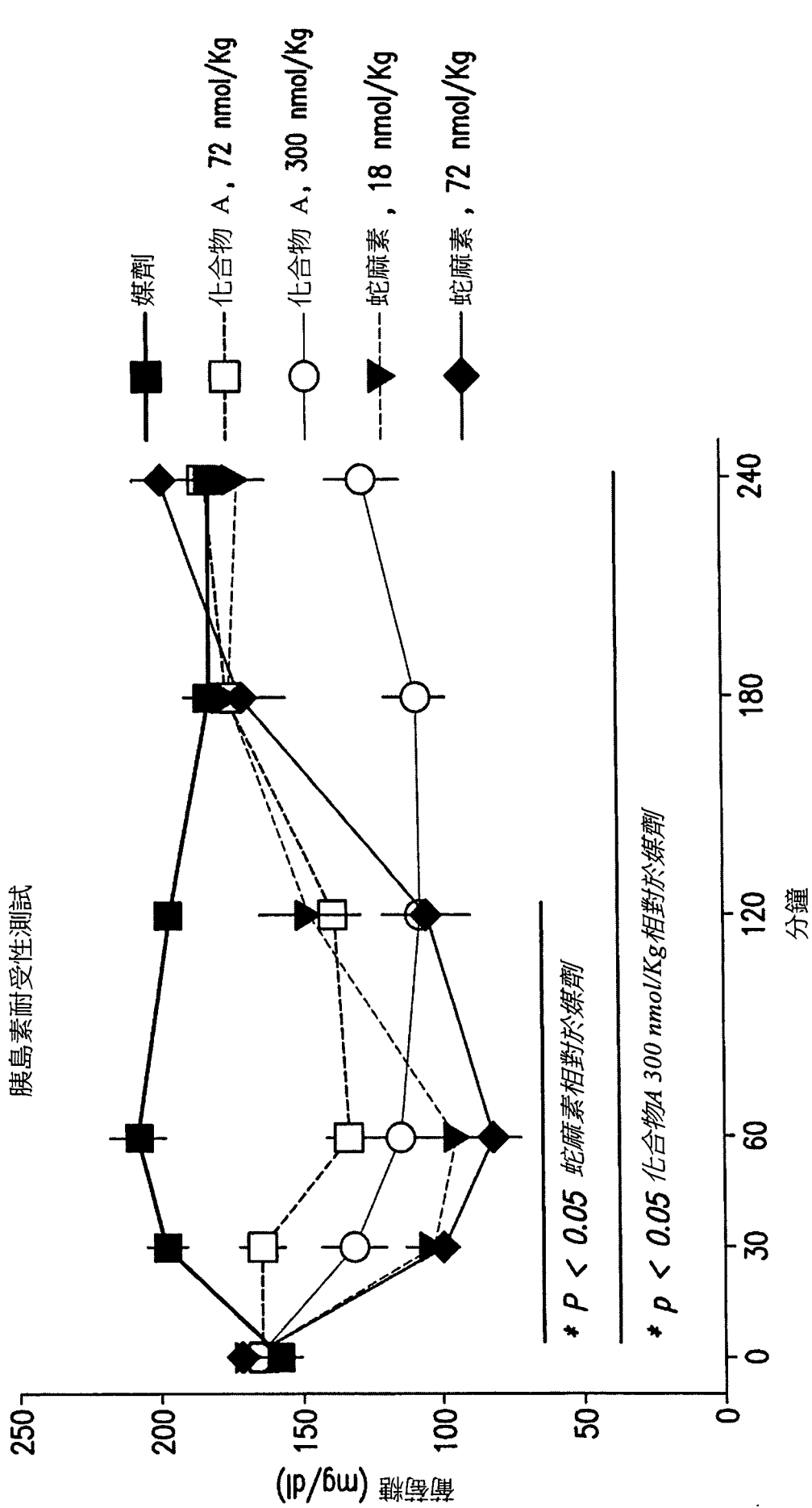


圖2A

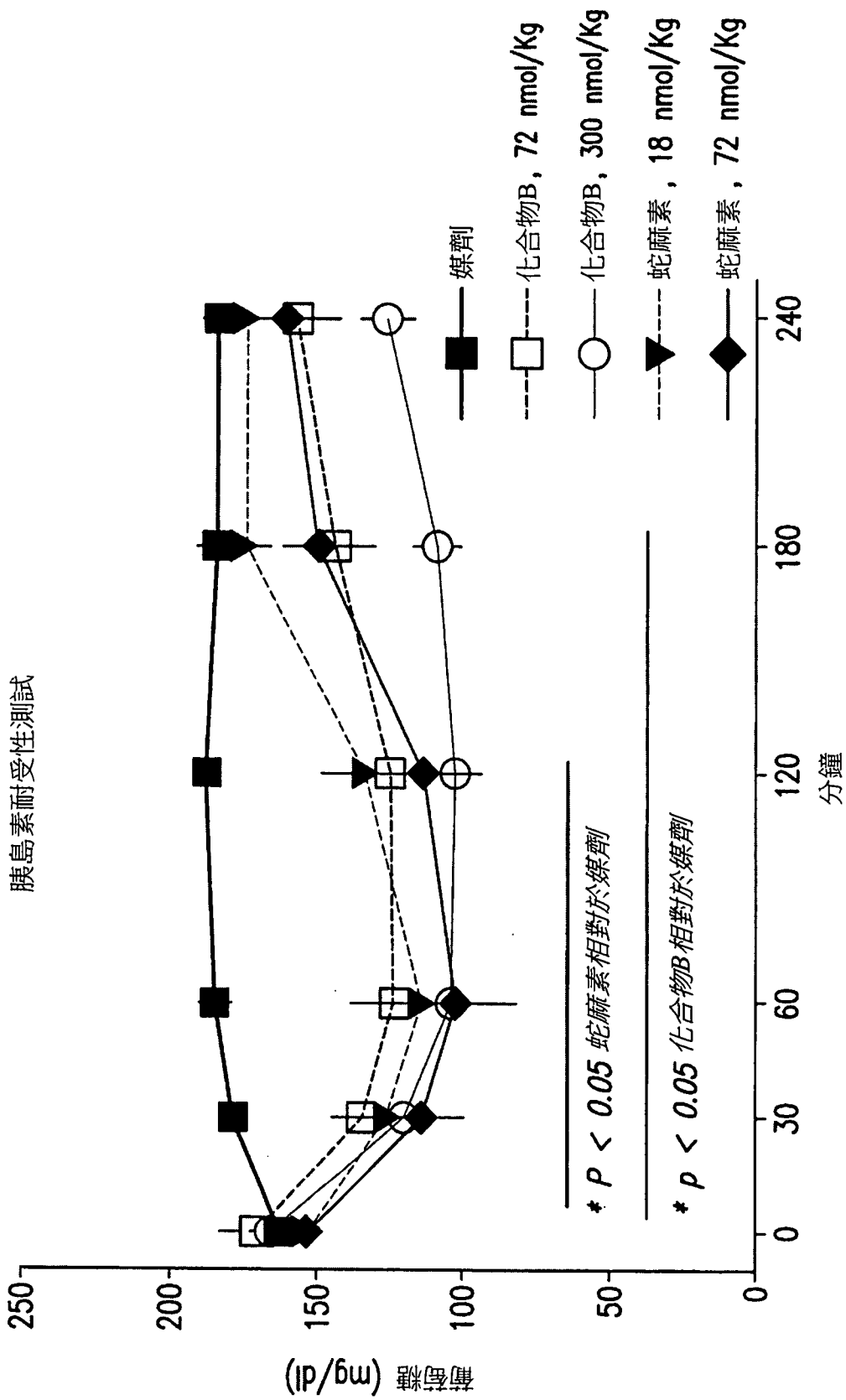


圖2B

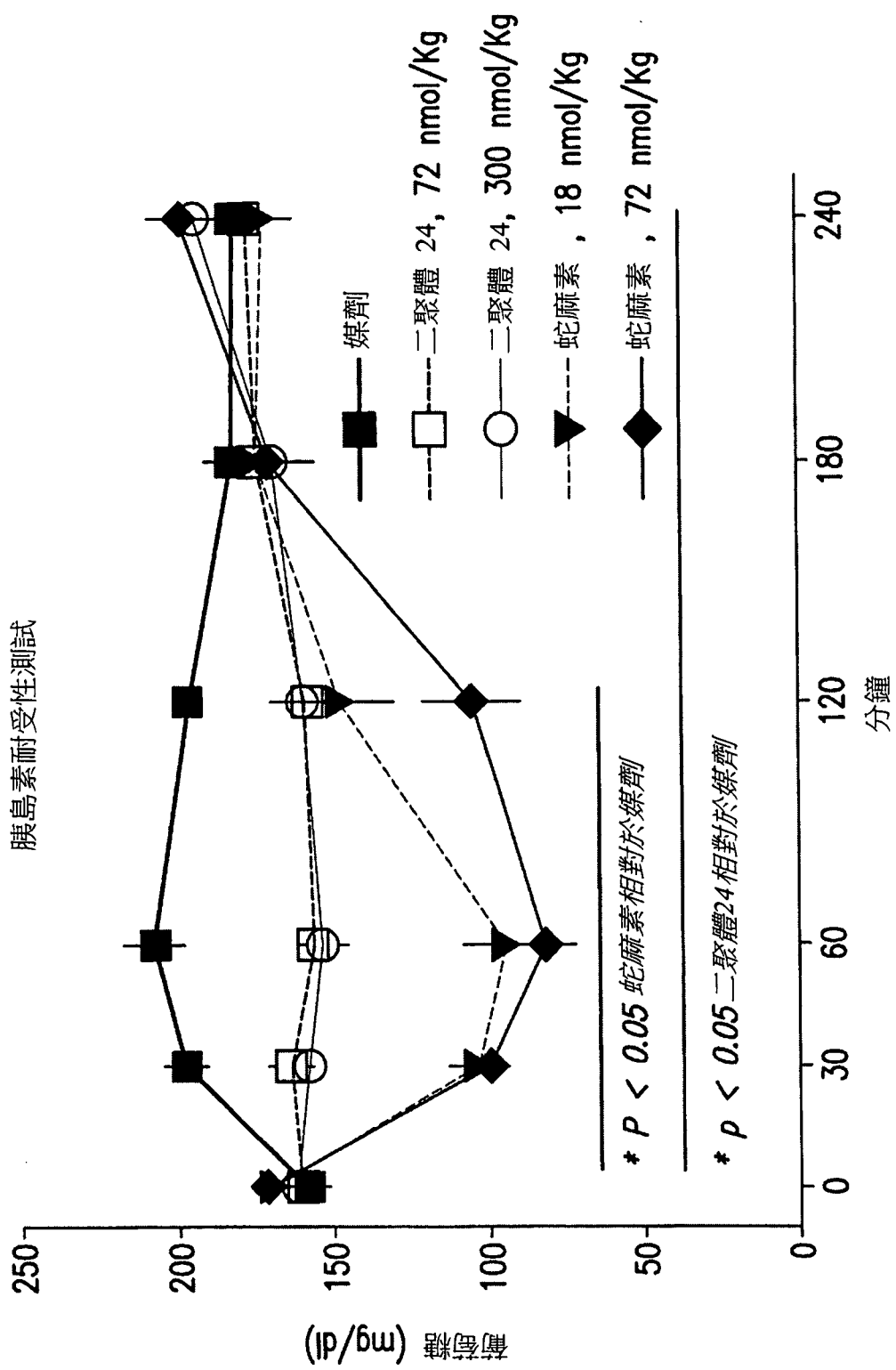


圖2C

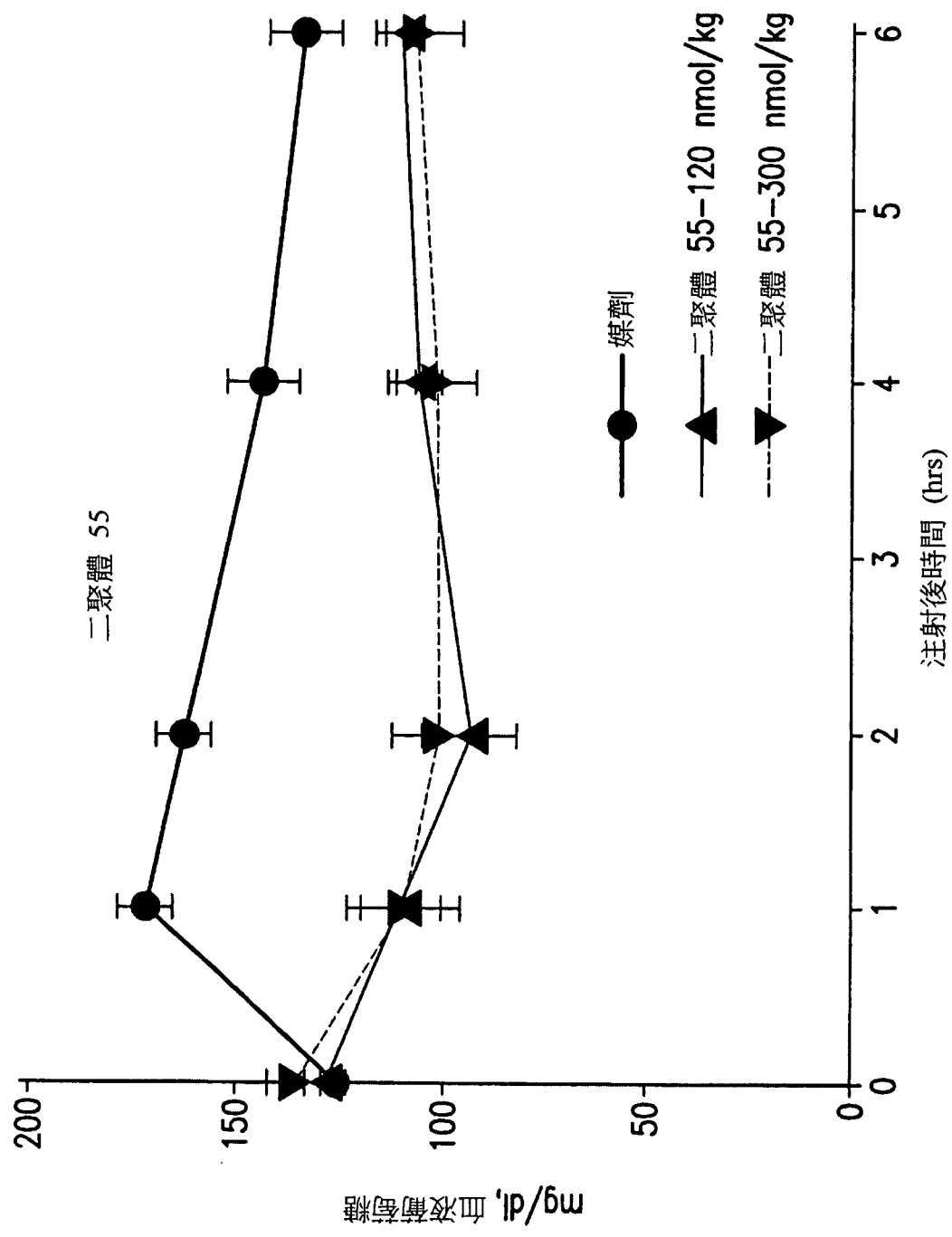


圖2D



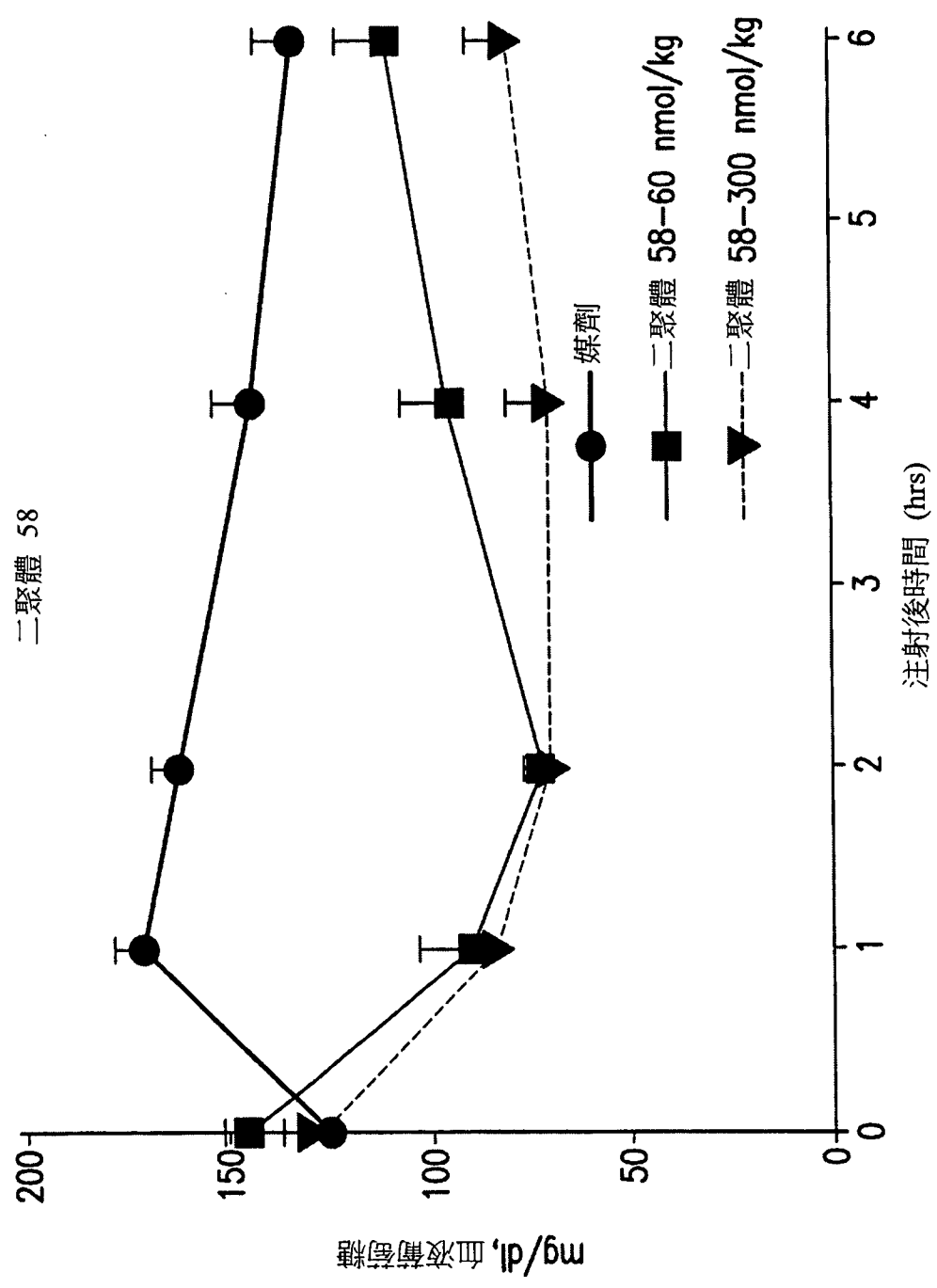


圖2E

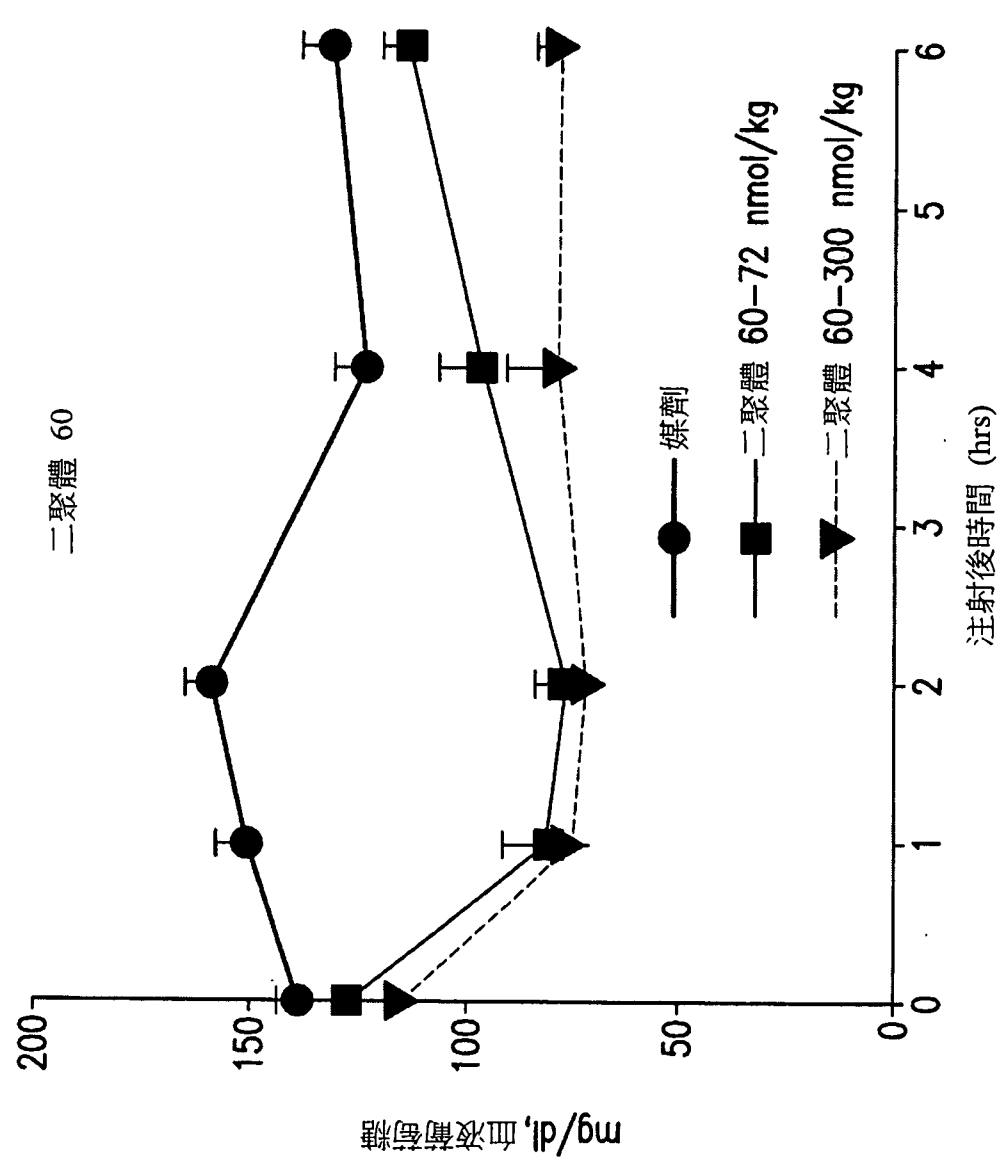


圖2F



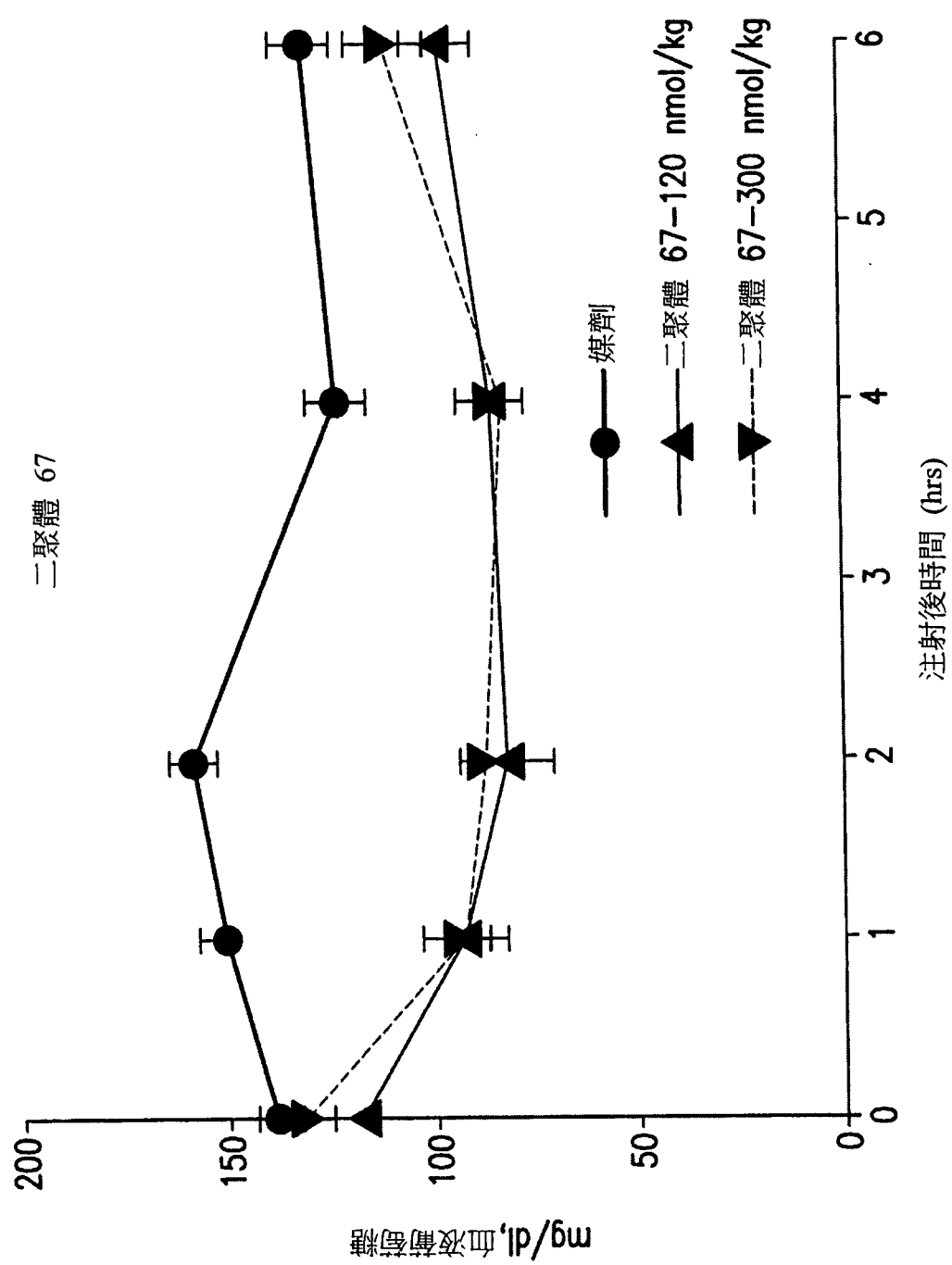


圖2G

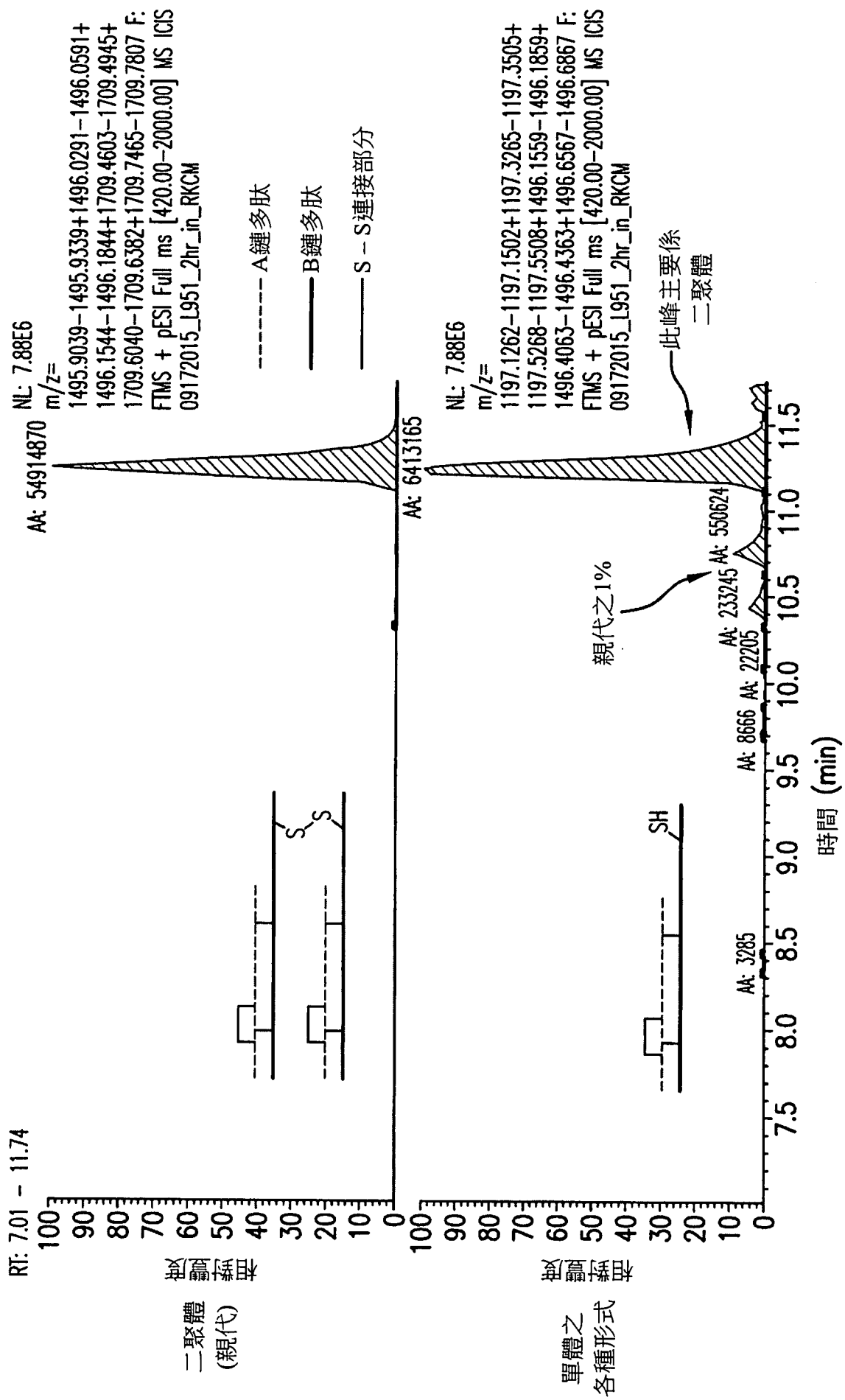


圖3



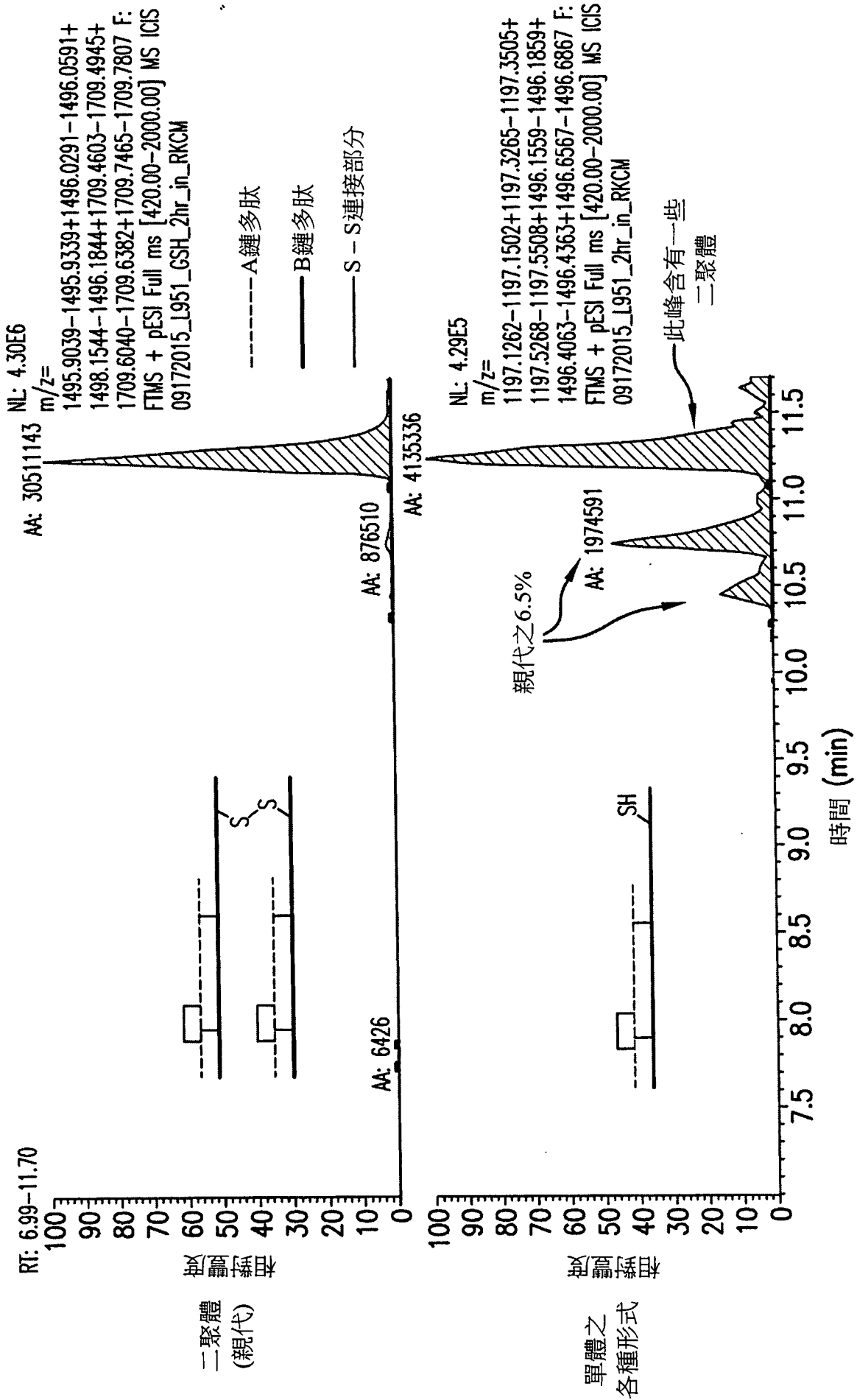


圖4

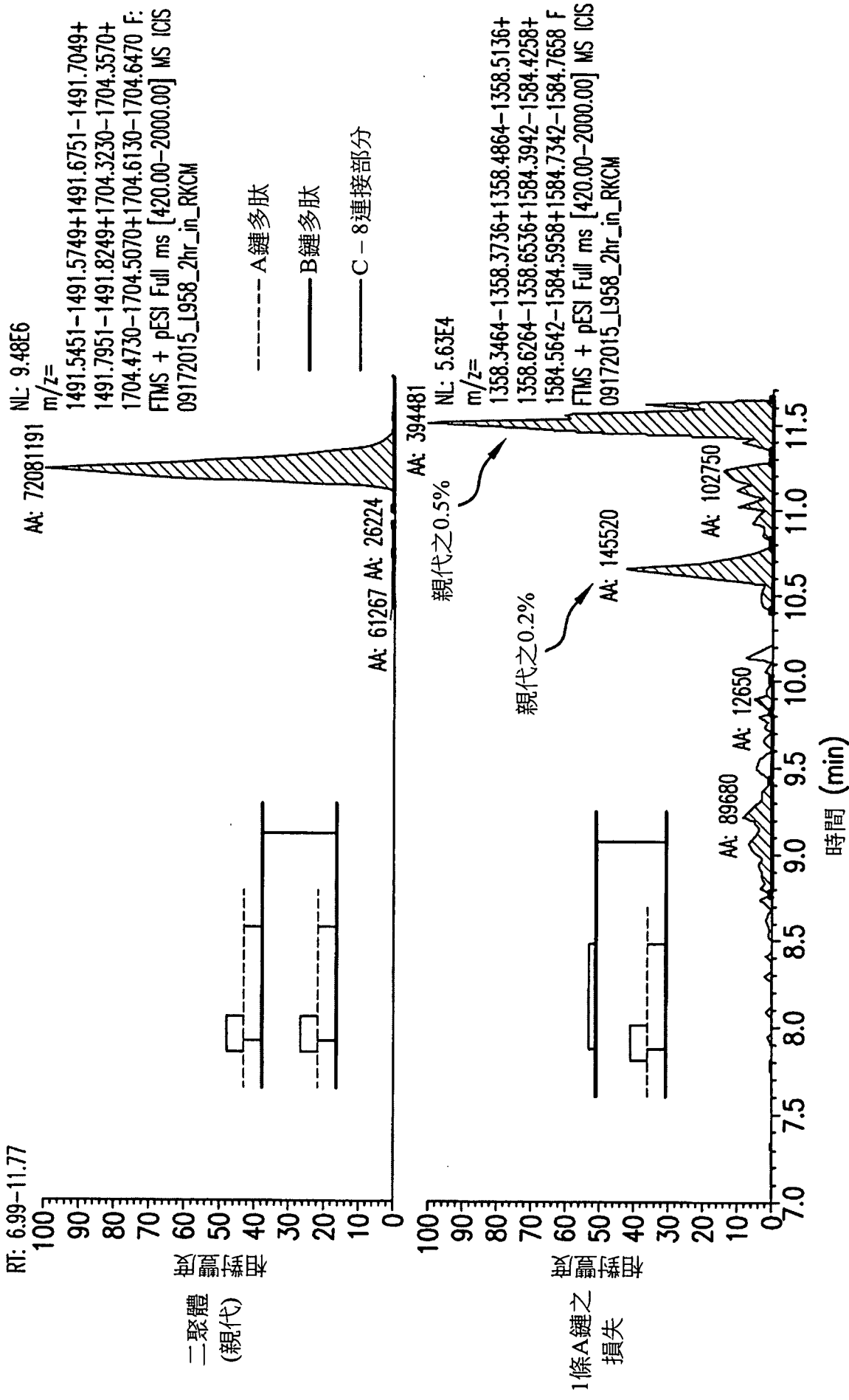


圖5



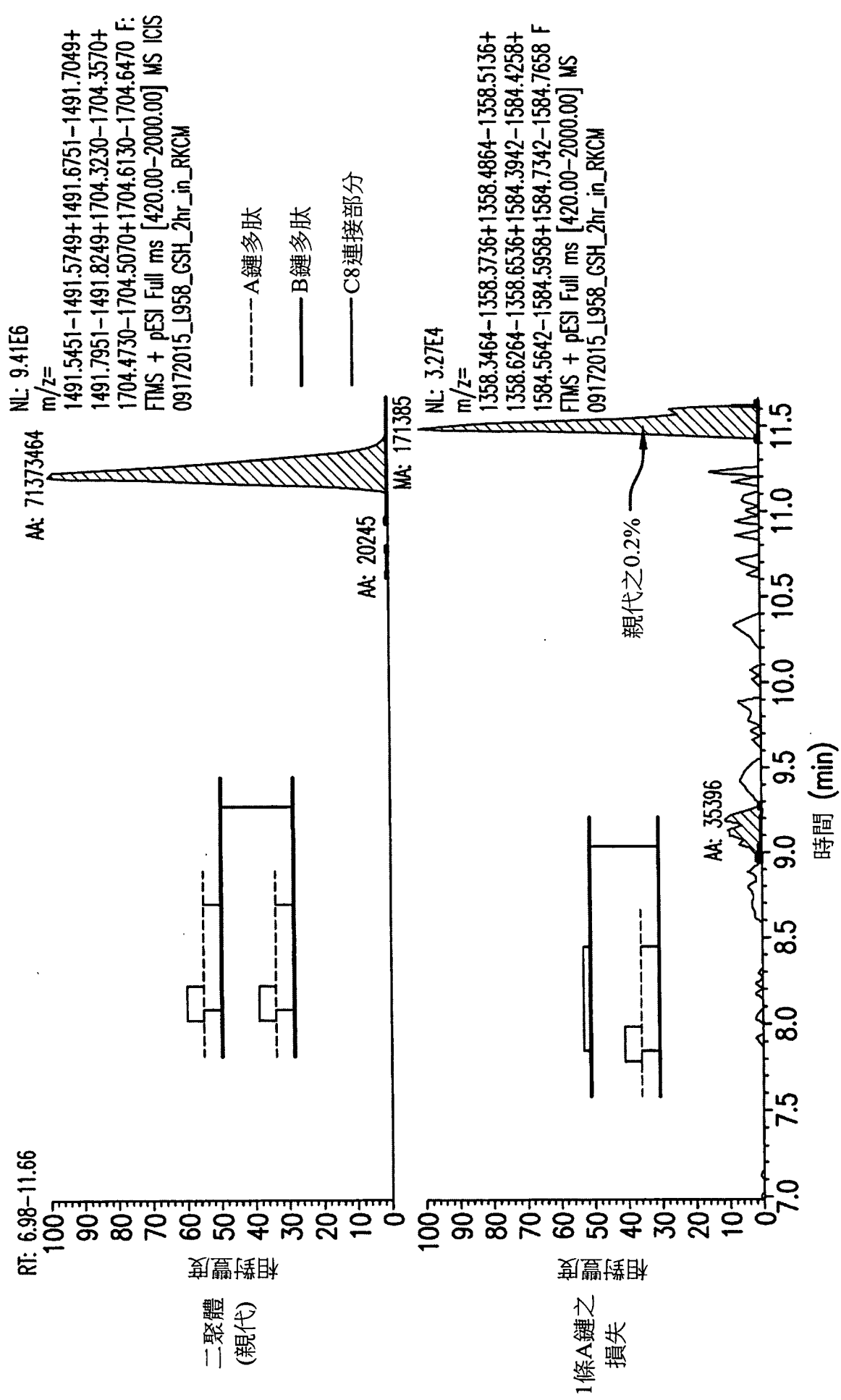


圖6

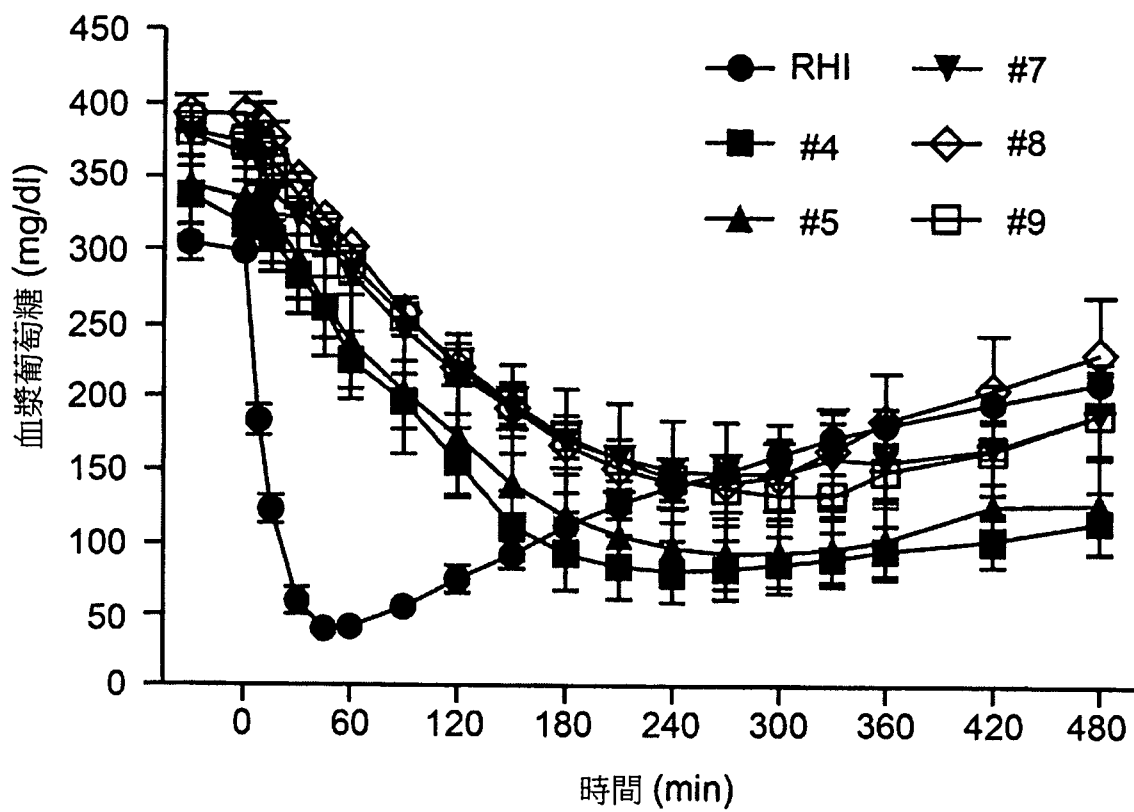


圖 7A

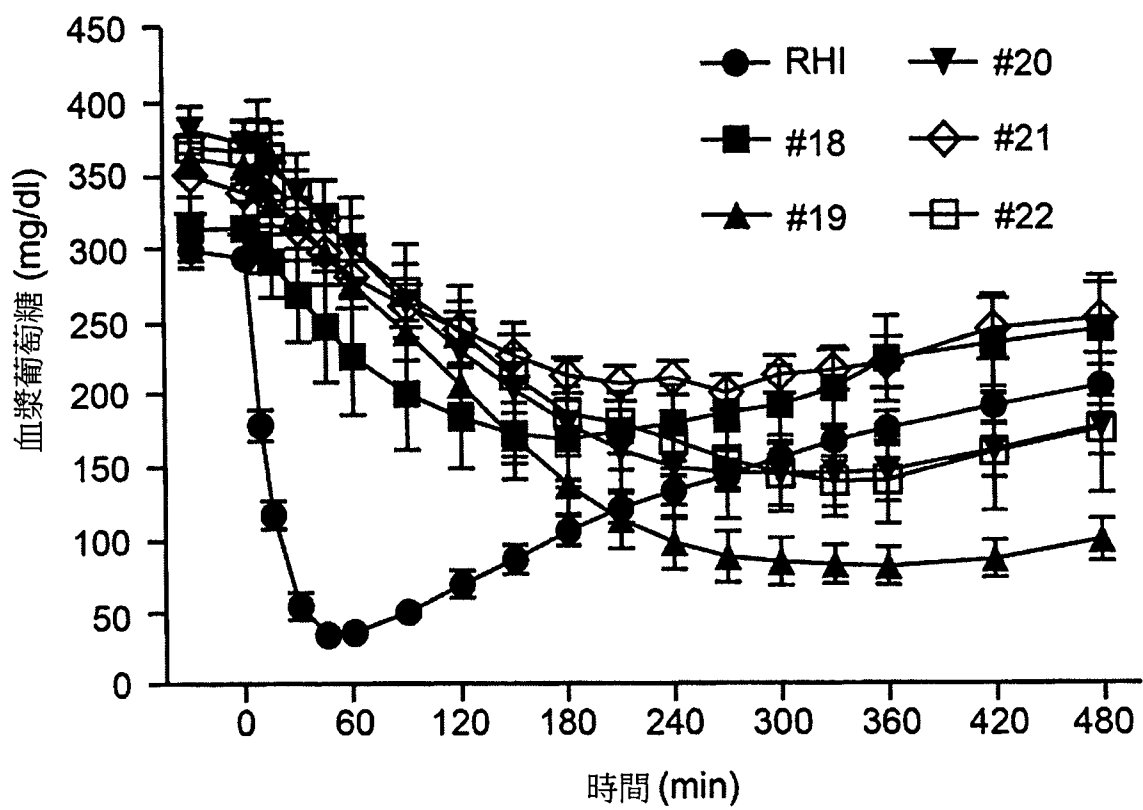


圖 7B

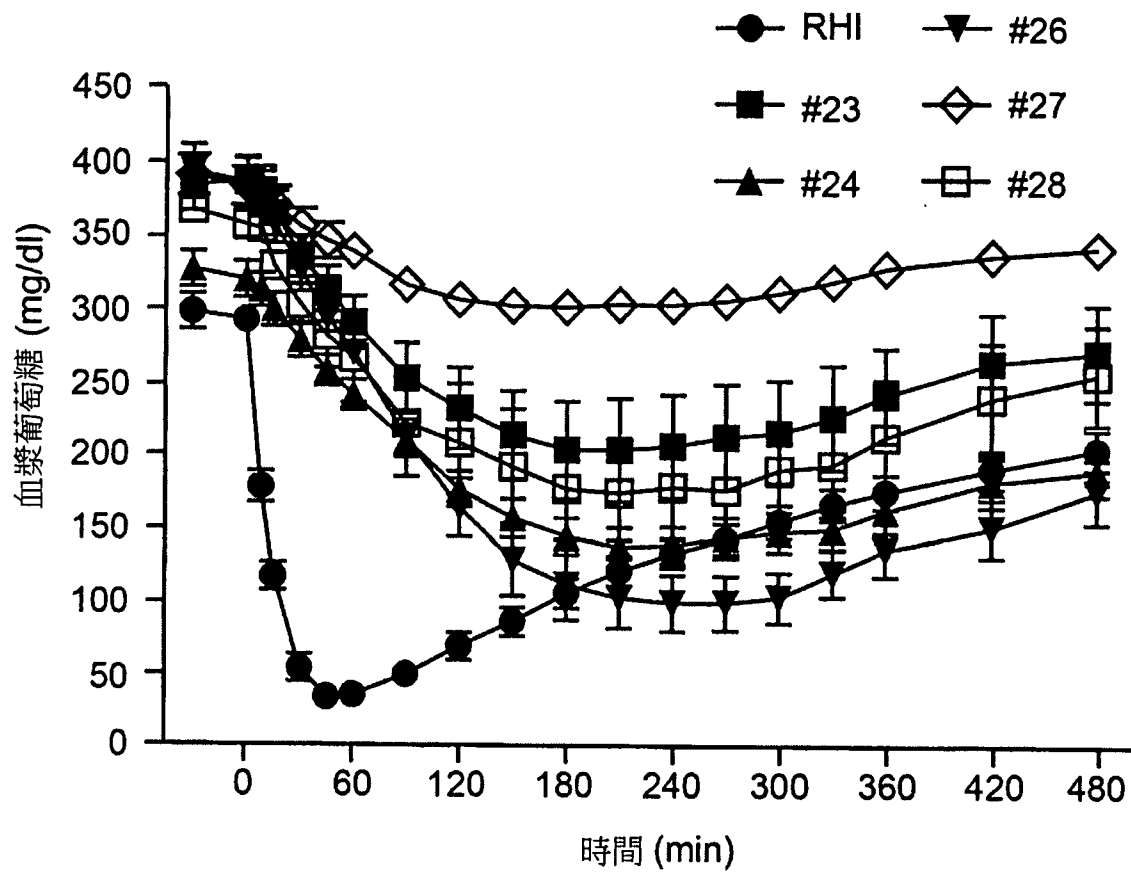


圖 7C

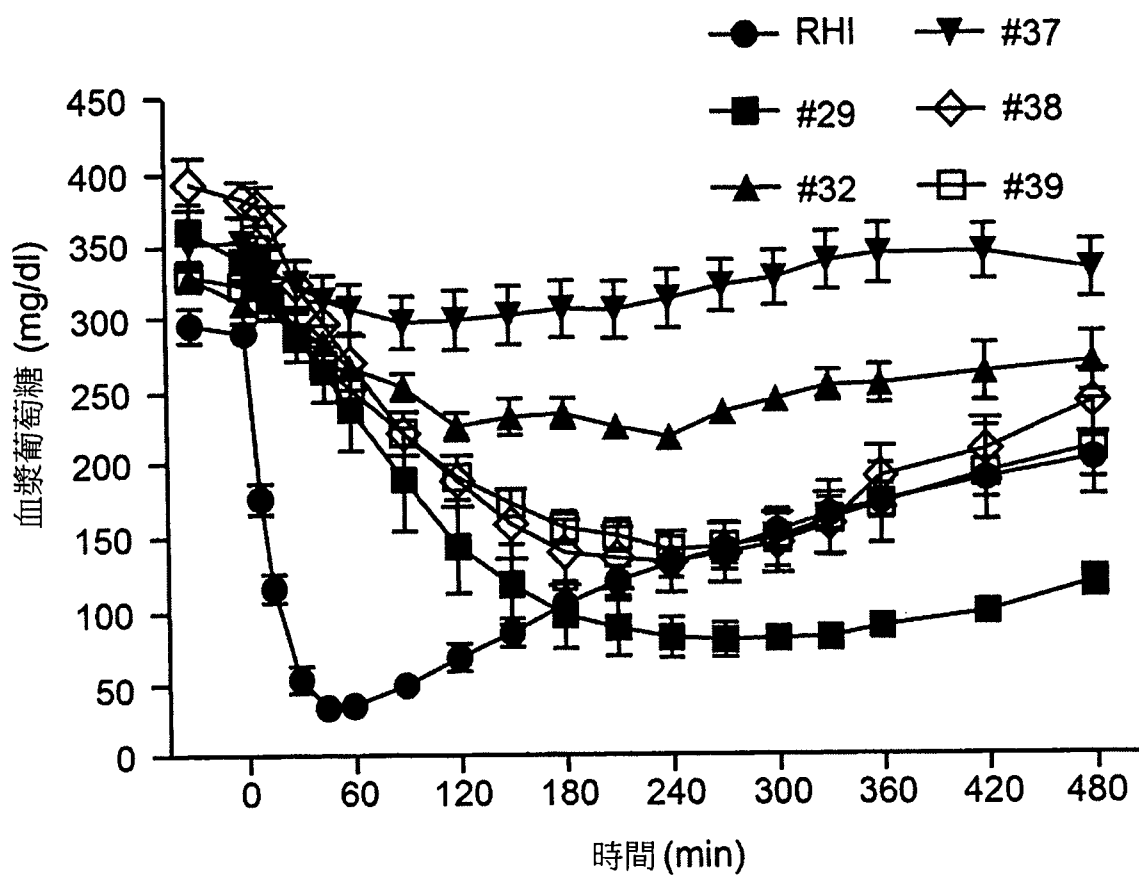


圖 7D



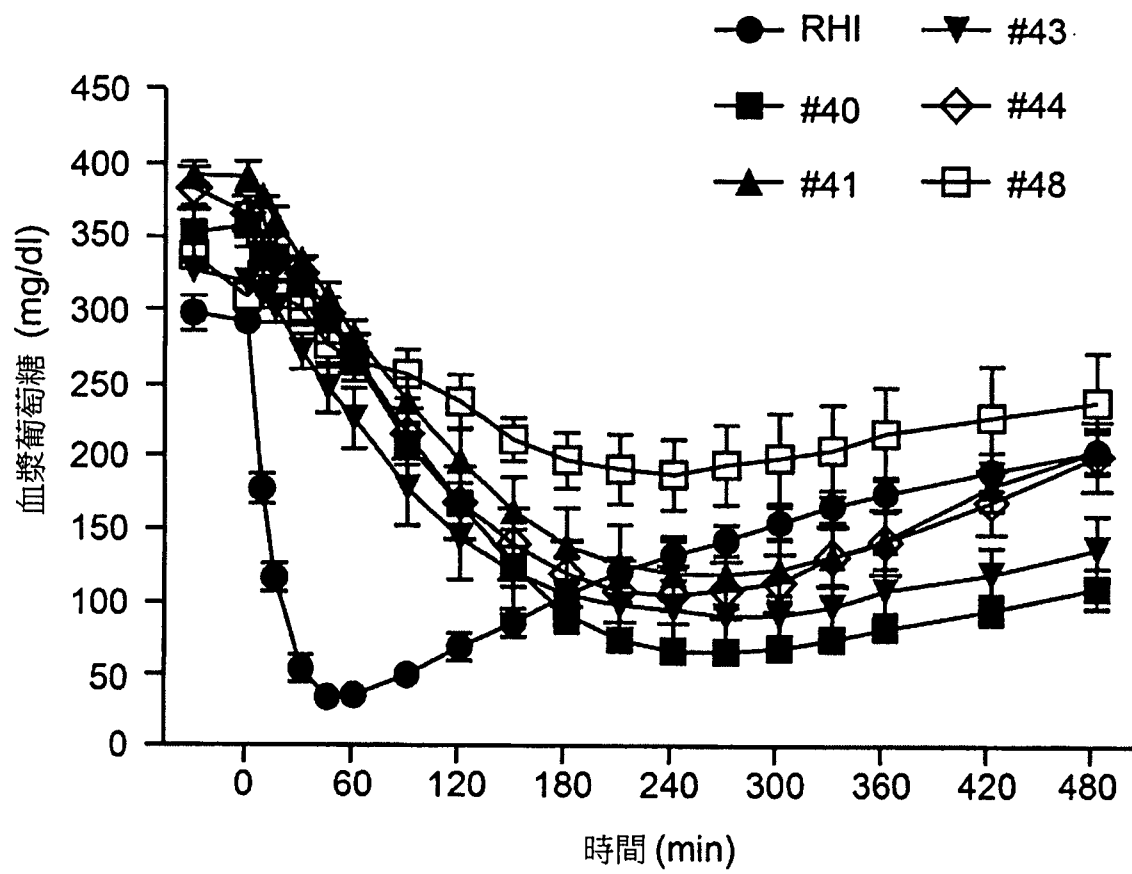


圖 7E

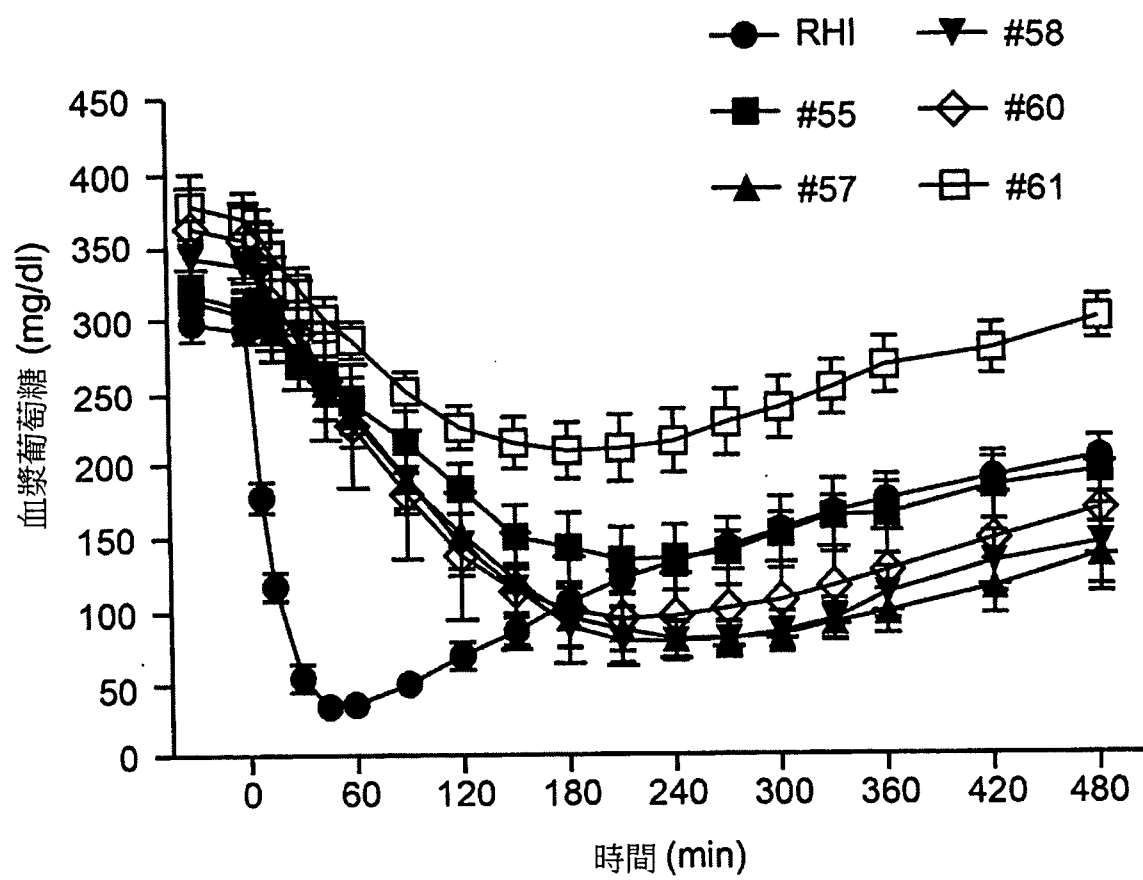


圖 7F

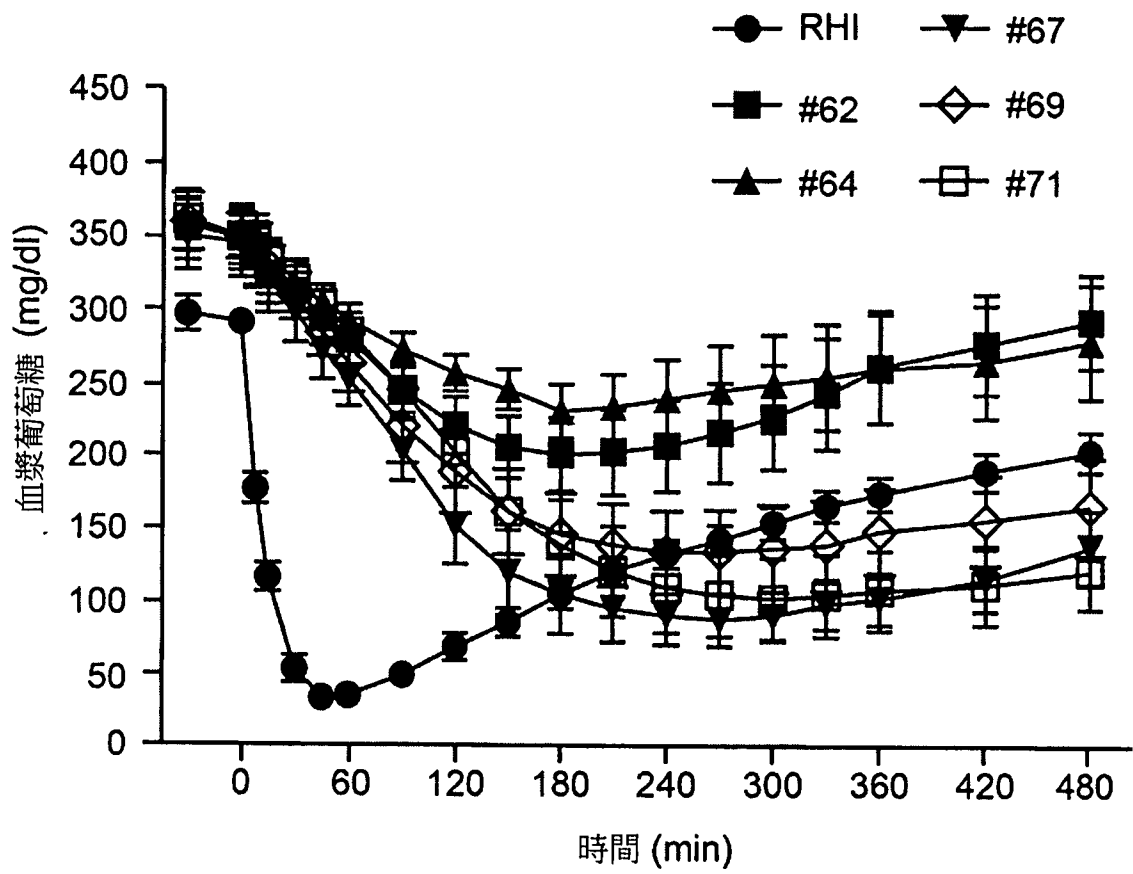


圖 7G

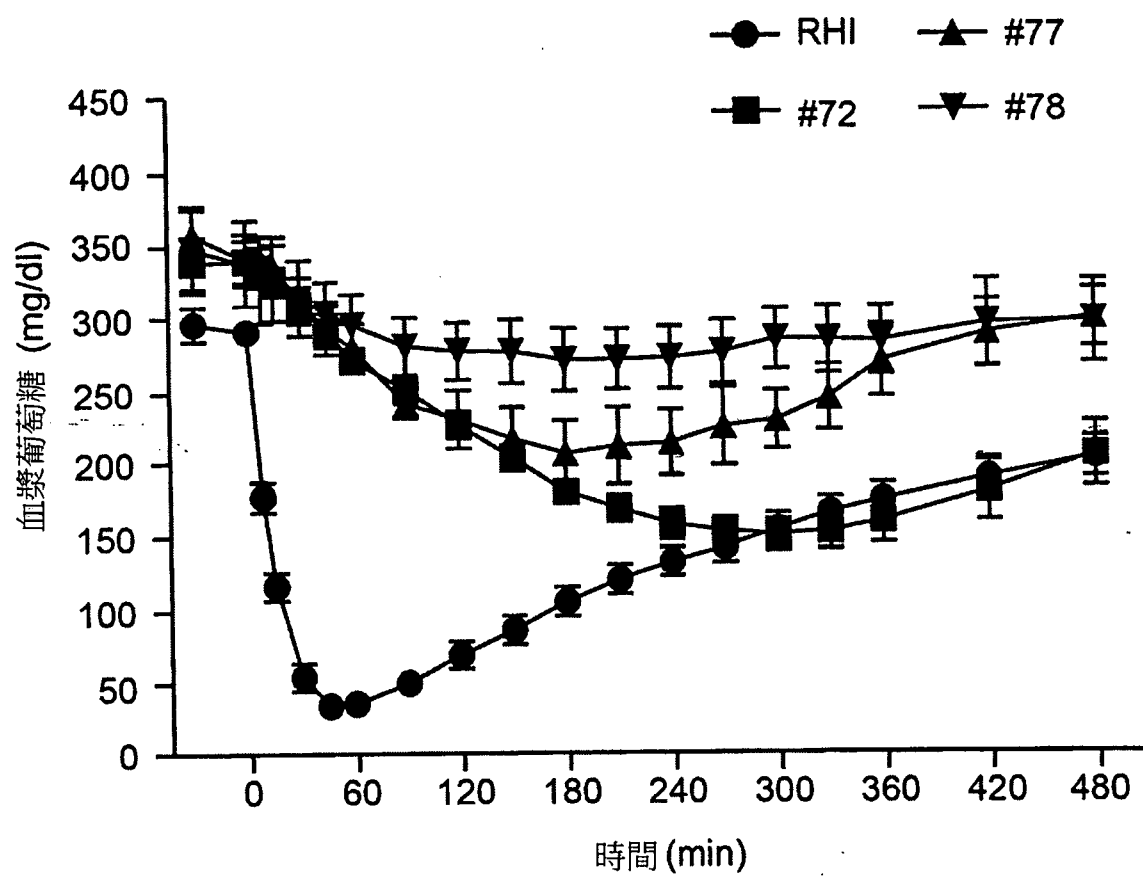


圖 7H

60