



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102947331 B

(45) 授权公告日 2016.08.03

(21) 申请号 201180030864.2

(22) 申请日 2011.06.21

(30) 优先权数据

10167033.9 2010.06.23 EP

61/359500 2010.06.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/060382 2011.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/161124 EN 2011.12.29

(73) 专利权人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 S. 卢德维格森 F. 胡巴莱克

T.B. 克杰尔德森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 权陆军

(51) Int. Cl.

C07K 14/62(2006.01)

(56) 对比文件

WO 9200321 A1, 1992.01.09,

WO 2007135117 A2, 2007.11.29,

WO 2010066636 A1, 2010.06.17,

Brems D N等. Improved insulin stability through amino acid substitution. 《Protein Engineering》. 1992, 第5卷(第6期),

Brange J等. Insulin structure and stability. 《pharmaceutical biotechnology》. 1993, 第5卷

审查员 刘新蕾

权利要求书1页 说明书58页 附图2页

(54) 发明名称

包含额外的二硫键的胰岛素类似物

(57) 摘要

本发明涉及包含额外的二硫键的胰岛素类似物及其制备方法。

1. 修饰的胰岛素,其选自

A10C, A21G, B3C, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, B2C, B3E, desB30人胰岛素;
A10C, B3T, B4C, desB30人胰岛素;
A10C, B3V, B4C, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, B3E, B4C, desB27, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, B2C, B3E, desB27, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, desB27, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A21G, desB1, B3C, desB27, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, B4C, B25H, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素;
A10C, B4C, B28D, desB30人胰岛素;
A10C, B4C, B25H, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, B3C, B25H, desB30人胰岛素;
A10C, B3C, B25H, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素;
A10C, A14E, B3C, desB27, desB30人胰岛素;和
A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,

其中A和B分别代表胰岛素的A链和B链,且A或B之后的数字代表A链或B链中的位置。

2. 药物组合物,包含生物活性量的权利要求1的修饰的胰岛素和药学上可接受的载体。

3. 权利要求1的修饰的胰岛素或权利要求2的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在受试者中治疗糖尿病,包括施用于受试者。

4. 权利要求1的修饰的胰岛素或权利要求2的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防高血糖症、2型糖尿病、损伤的葡萄糖耐受性和1型糖尿病。

5. 制备权利要求2的药物组合物的方法,包括将权利要求1的修饰的胰岛素与药学上可接受的物质和/或赋形剂混合。

包含额外的二硫键的胰岛素类似物

发明领域

[0001] 本发明涉及包含额外的二硫键的胰岛素类似物及其制备方法。

[0002] 发明背景

[0003] 糖尿病是代谢病,在这种病中,利用葡萄糖的能力部分或完全丧失。在糖尿病的治疗中,已经提出并使用了许多种胰岛素制剂,如常规胰岛素、低精蛋白锌胰岛素(称为NPH),胰岛素锌悬浮液(如Semilente[®]、Lente[®]和Ultralente[®])以及两相低精蛋白锌胰岛素。

[0004] 人胰岛素由两个多肽链组成,即A和B链,其分别包含21个和30个氨基酸残基。A和B链通过两个二硫键相互连接。来自大多数其它物种的胰岛素是相似的,但在一些位置可能包含氨基酸取代。在过去十年内,已经开发了许多人胰岛素类似物。它们是设计用于特定的作用模式,即快速作用或延长作用。包括这种胰岛素类似物的商业上可获得的产品包括Levemir[®]、NovoRapid[®]、Humalog[®]、Apidra[®]和Lantus[®]。

[0005] 多种蛋白酶的作用使人胰岛素在胃肠道的内腔中迅速降解,限制了其吸收进入循环系统。当与天然胰岛素相比,亲水的并且对蛋白水解性降解稳定的胰岛素类似物在动物模型中表现出更高的生物利用度。

[0006] 将二硫键引入蛋白是改善蛋白稳定性一种天然方式:已经发现二硫键的丰度和嗜热生物体间最高的生长温度之间的相关性,暗示了高温环境中二硫键在蛋白稳定中的重要性(Mallick P,等, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 9679-9684.; Ladenstein R,等, 2006, FEBS J., 273, 4170-4185)。也有许多成功地将二硫键工程化进蛋白并伴随稳定性增加的例子。对于芽孢杆菌RNase获得了一种最高的稳定作用(根据新的二硫键的位置最高达4.1 kcal mol⁻¹)(Clarke J., Fersht A., 1993, Biochem., 32, 4322-4329)。通过增加解折叠(unfolding)所需的活化能,或者通过约束蛋白的解折叠的构象从而降低它们的构象熵,带来了这种稳定作用(Pace C.N., 1990, Trends Biol.Sci., 14-17)。然而,在这个新兴的研究领域,需要学习的多得多。至今,没有胰岛素中工程化的二硫键的报道。

[0007] 仍然需要稳定的新型胰岛素类似物。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及具有两个或更多个半胱氨酸取代并且至少一个氨基酸残基被不是半胱氨酸的氨基酸取代的胰岛素类似物,其中保留人胰岛素的三个二硫键,选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0010] 在一个方面,获得了本发明的胰岛素类似物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得(1)引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,以及(2)人胰岛素类似物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性。

[0011] 在一个方面,获得了本发明的胰岛素类似物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得(1)引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于

人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,(2)人胰岛素类似物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性,以及(3)人胰岛素类似物相对于人胰岛素和/或母体胰岛素增加了物理稳定性。

[0012] 在一个方面,获得了本发明的胰岛素类似物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得(1)引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,(2)人胰岛素类似物保留了与人胰岛素相关的所需的生物活性,以及 (3)人胰岛素类似物对蛋白水解性降解是稳定的。

[0013] 本文中還描述了稳定胰岛素的方法,其包括用半胱氨酸残基取代人胰岛素或 desB30 人胰岛素的两个或更多个氨基酸以及用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基,其中

[0014] a. 保留人胰岛素的三个二硫键,以及

[0015] b. 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,

[0016] 从而产生胰岛素类似物,其包含不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键。

发明内容

[0017] 在本发明中,提供了新的胰岛素类似物,其中将二硫键工程化进胰岛素类似物。

[0018] 在一个方面,本发明的胰岛素类似物具有两个或更多个半胱氨酸取代,保留了人胰岛素的三个二硫键。

[0019] 在本发明的一个方面,选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0020] 本发明人已经发现,本发明的胰岛素类似物具有改善的物理稳定性。因此已经发现,例如,类似物暴露于热-机械应激和/或与不稳定的界面和表面如疏水表面和界面的相互作用导致本发明的胰岛素类似物形成胰岛素类似物的无生物活性的和/或不溶性的聚集体的趋势降低。

[0021] 本发明的胰岛素类似物结合于胰岛素受体。因此,本发明人已经惊讶地发现,本发明的胰岛素类似物既具有改善的物理稳定性又保留了与胰岛素受体的结合。

[0022] 在一个方面,本发明的胰岛素类似物针对蛋白水解性降解,即针对胃肠(GI)道中或身体其它部位的快速降解,是稳定的。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素类似物针对蛋白水解性降解是稳定的。

[0023] 针对蛋白水解性降解稳定的胰岛素类似物在本文被理解为胰岛素类似物,相对于人胰岛素,其经受一种或多种蛋白酶的更慢的降解。在一个实施方案中,相对于人胰岛素,本发明的胰岛素类似物经受一种或多种蛋白酶的更慢的降解。在本发明的进一步的实施方案中,本发明的胰岛素类似物针对一种或多种酶的降解是稳定的,该酶选自:胃蛋白酶(如,例如,同种型胃蛋白酶A,胃蛋白酶B,胃蛋白酶C和/或胃蛋白酶F),糜蛋白酶(如,例如,同种型糜蛋白酶A,糜蛋白酶B和/或糜蛋白酶C),胰蛋白酶,胰岛素-降解酶(IDE),弹性蛋白酶(例如,同种型胰腺弹性蛋白酶I和/或II),羧肽酶(例如,同种型羧基肽酶A,羧肽酶A2和/或

羧肽酶B), 氨肽酶, 组织蛋白酶D及源自大鼠、猪或人的肠提取物中存在的其它酶。

[0024] 在一个实施方案中, 本发明的胰岛素类似物针对一种或多种酶的降解是稳定的, 该酶选自: 糜蛋白酶, 胰蛋白酶, 胰岛素-降解酶(IDE), 弹性蛋白酶, 羧肽酶, 氨肽酶和组织蛋白酶D。在进一步的实施方案中, 本发明的胰岛素类似物针对一种或多种酶的降解是稳定的, 该酶选自: 糜蛋白酶, 羧肽酶和IDE。在仍进一步的实施方案中, 本发明的胰岛素类似物针对一种或多种酶的降解是稳定的, 该酶选自: 糜蛋白酶和IDE。在仍进一步的实施方案中, 本发明的胰岛素类似物针对一种或多种酶的降解是稳定的, 该酶选自: 糜蛋白酶和羧肽酶。

[0025] “蛋白酶(protease)”或“蛋白酶(protease enzyme)”是消化酶, 其使蛋白和肽降解, 并且可以在人体的各种组织中发现它, 例如胃(胃蛋白酶), 肠腔(糜蛋白酶, 胰蛋白酶, 弹性蛋白酶, 羧肽酶, 等)或胃肠道的粘膜表面(氨肽酶, 羧肽酶, 肠肽酶, 二肽基肽酶, 内肽酶, 等等), 肝(胰岛素降解酶, 组织蛋白酶D等), 和其它组织中。

[0026] 可以测定 $T_{1/2}$ 作为本发明的胰岛素类似物对蛋白酶如糜蛋白酶、胃蛋白酶和/或羧基肽酶A或者对酶的混合物如组织提取液(来自肝, 肾, 十二指肠, 空肠, 回肠, 结肠, 胃, 等)的蛋白水解稳定性的量度。在本发明的一个实施方案中, 相对于人胰岛素, $T_{1/2}$ 增加。在进一步的实施方案中, 相对于母体胰岛素, $T_{1/2}$ 增加。在仍进一步的实施方案中, 相对于母体胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少2倍。在仍进一步的实施方案中, 相对于母体胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少3倍。在仍进一步的实施方案中, 相对于母体胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少4倍。在仍进一步的实施方案中, 相对于母体胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少5倍。在仍进一步的实施方案中, 相对于母体胰岛素, $T_{1/2}$ 增加至少10倍。

[0027] 在一个方面, 本发明的胰岛素类似物具有改善的化学稳定性。在一个方面, 本发明的胰岛素类似物具有改善的物理稳定性。在一个方面, 本发明的胰岛素类似物具有改善的化学和物理稳定性。

[0028] 在一个方面, 相对于人胰岛素, 本发明的胰岛素类似物具有改善的化学和/或物理稳定性。在一个方面, 相对于母体胰岛素, 本发明的胰岛素类似物具有改善的化学和/或物理稳定性。

[0029] 本文所用的术语“物理稳定性”是指, 胰岛素类似物暴露于热-机械应激和/或与使之不稳定的界面和表面如疏水表面和界面的相互作用导致的胰岛素类似物形成胰岛素类似物的无生物活性的和/或不溶性的聚集体的趋势。因此, 物理不稳定性涉及相对于人胰岛素的构象变化, 其包括更有序结构的损失, 聚集, 原纤化(fibrillation), 沉淀和/或吸附至表面。已知肽如胰岛素倾向于例如原纤化导致的不稳定。通过在不同温度不同时间期间将填充合适的容器(例如, 盒或小瓶)的溶液暴露于机械/物应(例如搅动)之后例如目视检查、比浊法和/或浊度测定法的常规方法, 可以评价包含人胰岛素类似物的溶液的物理稳定性。在具有黑背景的尖锐聚焦光中进行溶液的目视检查。通过例如在从0到3的等级(显示无浊度的溶液对应于目测评分0, 显示目测浊度的溶液对应于目测评分3)排序浊度的程度的目测评分而表征溶液的浊度。当溶液在日光下显示目测浊度时, 对于蛋白聚集, 溶液被分类为物理不稳定的。或者, 可以通过本领域技术人员公知的简单的浊度测定评价溶液的浊度。也可以通过使用胰岛素类似物的构象状态的光谱试剂或探针评价胰岛素类似物的物理稳定性。探针优选与蛋白的非天然构象异构体优先结合的小分子。蛋白结构的小分子光谱探针的一个例子是硫磺素T。硫磺素T是已经广泛用于淀粉样原纤维的检测的荧光染料。在

原纤维和还可能其它蛋白构型存在的情况下,当结合于原纤维蛋白形式时,硫磺素T产生在约450 nm的新的最大激发和在约482 nm的增强的发射。未结合的硫磺素T在该波长基本上无荧光。例如,如实施例90中所述测定本发明的胰岛素类似物的物理稳定性。

[0030] 可以使用其它小分子作为蛋白结构从天然至非天然状态的变化的探针。例如,优先结合于蛋白的暴露的疏水补丁的“疏水性补丁”探针。疏水性补丁通常埋在天然状态的蛋白的三级结构内,但当蛋白开始解折叠或变性时变得暴露。这些小分子的光谱探针的例子是芳族的疏水性染料,如葱,吖啶,菲咯啉等。其它光谱探针是金属-氨基酸复合物,如疏水性氨基酸如苯丙氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,甲硫氨酸和缬氨酸或等的钻金属复合物。

[0031] 本文所用的胰岛素类似物的术语“化学稳定性”是指导致化学降解产物的形成的蛋白结构中的化学共价变化,与天然蛋白结构相比,该化学降解产物具有潜在的更低的生物学效力和/或潜在的增加的免疫原性特性,其涉及避免共价键的降解如水解,外消旋,氧化或交联。根据天然蛋白的类型和性质和胰岛素类似物暴露的环境,可以形成各种化学降解产物。化学降解的消除最可能不能完全避免,在本领域技术人员公知的蛋白制剂的储存和使用期间经常看到逐渐增加的化学降解产物。大多数蛋白倾向于脱酰胺化,在该过程中谷氨酰胺或天冬酰胺残基中的侧链酰胺基被水解形成游离的羧酸。天冬酰胺和天冬氨酸残基可以进一步形成isoAsp降解产物。其它降解途径涉及形成高分子量转化产物,其中两个或更多的蛋白分子通过转酰胺基作用和/或二硫化物相互作用而彼此共价结合,导致形成共价结合的二聚体,寡聚体和多聚体降解产物(Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992)。(例如甲硫氨酸残基的)氧化和外消旋可以作为化学降解的另一种变体被提及。通过在暴露于不同的环境条件之后在各个时间点测定化学降解产物的量可以评价胰岛素类似物的化学稳定性(例如升高的温度经常可以加速降解产物的形成)。经常通过根据分子大小和/或电荷分离降解产物,例如,使用色谱(例如,SEC-HPLC,RP-HPLC或IE-HPLC)和光谱方法(各种质谱方法)的组合,有时与化学/酶片段化的组合,测定个别降解产物。

[0032] 在一个实施方案中,当如实施例中所述测试时,相对于人胰岛素和/或母体胰岛素的化学稳定性,本发明的胰岛素类似物具有改善的化学稳定性。

[0033] 在一个实施方案中,当如本领域技术人员已知并且例如实施例92中所述检测疏水性时,相对于人胰岛素和/或母体胰岛素的亲水性,本发明的胰岛素类似物具有增加的亲水性。

[0034] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物具有很少或没有聚集的趋势。当在硫磺素试验中测试时,相对于人胰岛素和/或母体胰岛素的聚集趋势,聚集趋势优选显著改善。

[0035] 相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素类似物具有基本上相同或增加的体内效力。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素类似物具有基本上相同的体内效力。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素类似物具有增加的体内效力。

[0036] 用于测定胰岛素体内效力的标准测定是本领域技术人员已知的,包括实施例中所述的测定,如:本发明的胰岛素类似物相对于人胰岛素的效力,静脉内稳态夹钳测定如在肠内注射后的大鼠药代动力学和大鼠PK,血糖降低效应和静脉内大鼠PK测定。

[0037] 相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素类似物具有基本上相同或增加的体外效力。

在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素类似物具有基本上相同的体外效力。在一个方面,相对于母体胰岛素,本发明的胰岛素类似物具有增加的体外效力。

[0038] 用于测定胰岛素体外效力的标准试验是本领域技术人员已知的,尤其包括下面的体外试验:

[0039] (1) 胰岛素放射受体试验,其中将胰岛素的相对效力定义为替代特异性结合于细胞膜,例如大鼠肝质膜部分上存在的胰岛素受体的50%的¹²⁵I-胰岛素所需的胰岛素和胰岛素类似物的比例;

[0040] (2) 脂肪生成试验,例如用大鼠脂肪细胞进行,其中将相对的胰岛素效力定义为实现[3-³H]葡萄糖向有机可提取的材料(即脂质)的最大转化的50%所需的胰岛素和胰岛素类似物的比例;和

[0041] (3) 在分离的脂肪细胞中的葡萄糖氧化测定,其中将胰岛素类似物的相对效力定义为实现葡萄糖-1-[¹⁴C]向[¹⁴CO₂]的最大转化的50%的胰岛素和胰岛素类似物的比例。

[0042] 在一个方面,本发明的胰岛素类似物具有改善的热力学稳定性,如例如,折叠稳定性,构象的稳定性和/或更高的熔解温度。

[0043] 当本文使用时,如果与人胰岛素或母体胰岛素相比,所述胰岛素类似物的变性需要更高的应激水平如更高的温度和/或更高浓度的变性剂,那么胰岛素类似物被称为具有改善的“热力学稳定性”。

[0044] 可以通过如例如Hudson和Andersen, Peptide Science, vol 76 (4), pp.298-308 (2004)中所述圆二色光谱和NMR评价构象的稳定性。熔解温度被理解为胰岛素结构可逆或不可逆地变化的温度。更高的熔解温度对应更稳定的结构。可以,例如,通过圆二色光谱和/或NMR将构象稳定性评价为温度的函数,或通过差示扫描量热法而测定熔解温度。也可以在逐渐增加浓度的变性剂如例如盐酸胍存在的情况下通过CD光谱和或NMR测定热力学稳定性。可以从这种实验测定以前所述(Kaarsholm, N.C.,等, 1993, Biochemistry, 32, 10773-8)的解折叠的自由能。蛋白变性后,远UV范围(240-218-nm)内的负CD逐渐减小,与伴随蛋白解折叠的有序的二级结构的损失一致(Holladay等, 1977, Biochim.Biophys.Acta, 494, 245-254; Melberg和Johnson, 1990, Biochim.Biophys.Acta, 494, 245-254)。在近UV范围(330-250-nm)内的胰岛素CD谱反映了具有来自二硫键的贡献的酪氨酸发色团的环境(Morris等, 1968, Biochim.Biophys.Acta., 160, 145-155; Wood等, 1975, Biochim.Biophys.Acta, 160, 145-155; Strickland & Mercola, 1976, Biochemistry, 15, 3875-3884)。从这些研究以前计算的胰岛素的解折叠的自由能为4.5 kcal/mol(Kaarsholm, N.C.,等, 1993, Biochemistry, 32, 10773-8)。

[0045] 在近UV范围(330-250-nm)内的胰岛素CD谱反映了具有来自二硫键的贡献的酪氨酸发色团的环境。由于酪氨酸残基是胰岛素二聚体表面的部分,在该区域(尤其是在276 nm)的摩尔椭圆率(molar ellipticity)的变化反映在胰岛素的结合状态上。测量胰岛素的结合状态的另一种方式是通过在本领域已知并且在实施例中描述的非解离条件下应用大小排除色谱法。

[0046] 通过两个硫醇基的偶联得到二硫键,二硫键在本文理解为两个硫原子之间的连接,即具有整体连接R-S-S-R的结构。二硫键也可以被称为连接性二硫键、SS-键或二硫键

(disulfide bridges)。通过将两个半胱氨酸氨基酸残基引入肽并且随后将两个硫醇基氧化为一个二硫键而产生二硫键。这种氧化可以化学地进行(如本领域技术人员已知的)或者可以,例如在酵母中,胰岛素表达期间发生。

[0047] 当将半胱氨酸残基引入母体胰岛素时,将半胱氨酸残基置于折叠的胰岛素类似物的三维结构中以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。例如,如果放置两个新的半胱氨酸残基,三维结构中新的半胱氨酸残基的邻近使得在两个新的半胱氨酸残基之间可以形成二硫键。

[0048] 通过如,例如实施例中所描述的准确的完整质量测量,可以容易地测定蛋白(如胰岛素)中二硫键的数量。通过本领域已知的标准技术,如肽作图,可以验证(确定)二硫键连接。在胰岛素肽中二硫键作图的一般策略包括以下步骤:1)将非还原的胰岛素片段化为包含,如果可能,每个肽只有一个单一的二硫键,的二硫键键合的肽。选择的条件也使得避免二硫键的重排,2)二硫键键合的肽彼此分离。3)鉴定参与单个二硫键的半胱氨酸残基。

[0049] 通常,通过Glu-C蛋白酶消化人胰岛素,产生包含两个二硫键(A6-A11和A7-B7)的肽I和包含一个单一的二硫键(A20-B19)的肽II。为了明确指定肽I中的二硫键,进一步片段化是必要的。以前采用酸水解(Ryle等, 1955 Biochem J. 60, 541-56),手工Edman降解(Kumazaki T, Ishii, S. 1990 J. Biochem (Tokyo) 17, 414-9),或用嗜热菌蛋白酶延长的消化(Ota M, Ariyoshi, Y., 1995, Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1956-7)来水解蛋白中的CysCys键。指定肽I中的二硫键的另外的方式是用三羧乙基膦部分还原(A7-B7二硫键的还原),使用不同的烷基使还原的半胱氨酸残基的烷基化以及随后的完全还原以及半胱氨酸的烷基化(Yen, T.-Y., Yan, H., Macher, B., 2001 J Mass Spectrom. 37, 15-30)。包含额外的二硫键的胰岛素的二硫键作图的策略在原则上与对于每种类似物以容许新的二硫键的方式调整的人胰岛素的上述策略是相同的。通过NMR或X-射线晶体学测定胰岛素结构是用于验证二硫键连接的一种另外的方法。解析胰岛素的NMR和/或X-射线结构的条件以前已经描述并且是本领域已知的。

[0050] 在本发明的一个方面,提供了相对于人胰岛素或desB30人胰岛素具有至少两个半胱氨酸取代和至少一个其它氨基酸残基取代的胰岛素类似物,其中保留了人胰岛素的三个二硫键。

[0051] 术语“半胱氨酸取代”在本文中是指用半胱氨酸替代人胰岛素中存在的氨基酸。例如,可以通过半胱氨酸残基各自替代人胰岛素的A链中10位的异亮氨酸(IleA10)和B链中4位的谷氨酰胺(GlnB4)。术语“其它氨基酸取代”在本文中是指用不是半胱氨酸的氨基酸替代人胰岛素中存在的氨基酸。

[0052] 本文所用的术语“人胰岛素”是指人胰岛素激素,其二维和三维结构和性质是公知的。例如,通过许多不同的条件下由NMR和X-射线晶体学确定人胰岛素的三维结构,许多这些结构保存在蛋白数据库(<http://www.rcsb.org>)。人胰岛素结构的非限制性例子是T6结构(<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MS0>)和R6结构(<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1EV3>)。人胰岛素有两条多肽链,名为A-链和B-链。A-链是21个氨基酸的肽,B-链是30个氨基酸的肽,两条链通过二硫键连接:在A-链7位的半胱氨酸和B-链7位的半胱氨酸之间的第一桥连和在A-链20位的半胱氨酸和B-链19位的半胱氨酸之间的第二桥连。第三桥连存在于A-链的6和11位的半胱氨酸之间。因此,“其中保

留人胰岛素的三个二硫键的胰岛素类似物”在本文中理解为包含人胰岛素的三个二硫键的胰岛素类似物,即在A-链的7位的半胱氨酸和B-链的7位的半胱氨酸之间的二硫键,在A-链的20位的半胱氨酸和B-链的19位的半胱氨酸之间的二硫键以及在A-链的6和11位的半胱氨酸之间的二硫键。

[0053] 在人体中,胰岛素激素被合成为结构为前肽-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A(其中C是31个氨基酸的连接肽)的由24个氨基酸的前肽以及随后的包含86个氨基酸的胰岛素原组成的单链前体胰岛素原(前胰岛素原)。Arg-Arg和Lys-Arg是用于从A和B链的连接肽的切割的切割位点。

[0054] 在本发明的一个方面,提供了具有两个或更多个半胱氨酸取代的胰岛素类似物,其中保留了人胰岛素的三个二硫键,其中用半胱氨酸取代选自A-链的A9、A10和A12的位置中的至少一个氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B1, B2, B3, B4, B5和B6的位置中的至少一个氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基以及任选地缺失B30位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B1,B2,B3和B4的位置中的至少一个氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基以及任选地缺失B30位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代选自A-链的A9、A10和A12的位置中的至少一个氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B1,B2,B3,B4,B5和B6的位置中的至少一个氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代选自A14, A21, B1, B3, B10, B16, B22, B25, B26, B27, B28, B29, B30, B31, B32的位置中的至少一个氨基酸残基以及任选地缺失B30位的氨基酸。可以理解的是,当B1或B3是半胱氨酸时,相同的氨基酸可以不是不是半胱氨酸的氨基酸,而如果,例如B1是半胱氨酸,可以根据本发明的方面用不是半胱氨酸的氨基酸取代B3,反之亦然。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B1,B2,B3和B4的位置中的至少一个氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基以及任选地缺失B30位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B3和B4的位置中的至少一个氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基以及任选地缺失B30位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代B-链的B3位的氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基以及任选地缺失B30位的氨基酸。在本发明的一个方面,用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代B-链的B4位的氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基以及任选地缺失B30位的氨基酸。在本发明的一个方面,用不是半胱氨酸的氨基酸取代的至少一个氨基酸残基在选自A14, A21, B10, B16, B22, B25, B26, B27, B28, B29, B30, B31, B32的位置。

[0055] 在一个方面,获得本发明的胰岛素类似物,其中缺失B30位的氨基酸。

[0056] 本发明获得的一个额外的二硫键可以连接相同链的两个半胱氨酸,即胰岛素的A-链的两个半胱氨酸或B-链的两个半胱氨酸,或者连接胰岛素的A-链的一个半胱氨酸和B-链的一个半胱氨酸。在一个方面,获得本发明的胰岛素类似物,其中至少一个额外的二硫键连接A-链的两个半胱氨酸或连接B-链的两个半胱氨酸。在一个方面,获得本发明的胰岛素类似物,其中至少一个额外的二硫键连接A-链的一个半胱氨酸和B-链的一个半胱氨酸。

[0057] 当在本文中使用时,术语“额外的二硫键”是指不存在于人胰岛素的一个或多个二

硫键。

[0058] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置选自:

[0059] A10C, B1C;

[0060] A10C, B2C;

[0061] A10C, B3C;

[0062] A10C, B4C;

[0063] A10C, B5C;和

[0064] B1C, B4C。

[0065] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置选自:

[0066] A10C, B1C;

[0067] A10C, B2C;

[0068] A10C, B3C;

[0069] A10C, B4C;和

[0070] B1C, B4C。

[0071] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置选自:

[0072] A10C, B1C;

[0073] A10C, B2C;

[0074] A10C, B3C;和

[0075] A10C, B4C。

[0076] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置选自:

[0077] A10C, B3C;和

[0078] A10C, B4C。

[0079] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置是A10C和B3C。

[0080] 在本发明的一个方面,半胱氨酸被取代进胰岛素类似物的两个位置,其中所述位置是A10C和B4C。

[0081] 在本发明的一个方面,获得了胰岛素类似物,所述胰岛素类似物包含两个半胱氨酸取代,产生相对于人胰岛素的一个额外的二硫键。

[0082] 本发明的术语“胰岛素(an insulin)”在本文被理解为人胰岛素或desB30人胰岛素。

[0083] 本文所用的术语“胰岛素肽”是指是人胰岛素或具有胰岛素活性的其类似物或衍生物的肽。

[0084] 本文所用的术语“母体胰岛素”意在是指在本发明的任何半胱氨酸取代已经被应用之前的胰岛素。在一个方面,母体胰岛素选自:

[0085] B28D 人胰岛素,

[0086] B28D, desB30人胰岛素,

[0087] A21G, B28E, desB30人胰岛素,

[0088] A21G, B3Q, B28E, desB30人胰岛素,

[0089] A21G, desB1, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素,

[0090] A21G, desB1, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素,

[0091] A14E, B25H, desB30人胰岛素,

[0092] A14E, B16H, B25H, desB30人胰岛素,

[0093] A14E, B25H, desB27, desB30人胰岛素,

[0094] A14E, desB27, desB30人胰岛素,

[0095] A14H, B25H, desB30人胰岛素, 以及

[0096] A8H, A21G, B3E, B27E, desB30人胰岛素。

[0097] 在本发明的一个方面,选择半胱氨酸取代的位点的方式使得人胰岛素类似物保留与人胰岛素相关的期望的生物活性。期望的生物活性是本领域技术人员已知的,例如,包括如例如实施例中所所述的结合胰岛素受体,结合IGF-1(胰岛素生长因子1)受体,体外效力(脂肪生成,糖原合成的量度),体内效力(稳态夹钳,PK和PD实验)。

[0098] 在一个方面,获得了本发明的胰岛素类似物,其中与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少1%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少3%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少5%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少10%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少15%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少20%。

[0099] 在一个方面,获得了本发明的胰岛素类似物,其中与胰岛素受体的受体结合增加。在一个方面,获得了本发明的胰岛素类似物,其中与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少110%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少120%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少130%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少140%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少150%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少160%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的110-200%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的120-180%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的140-180%。在一个方面,与胰岛素受体的受体结合是母体胰岛素与胰岛素受体的受体结合的150-170%。

[0100] 例如,可以如下所述测定与胰岛素受体的受体结合:

[0101] 胰岛素受体结合试验(对溶解的胰岛素受体):

[0102] 用闪烁近似测定法(SPA)测定本发明的胰岛素类似物对于人胰岛素受体的亲和力(根据Glendorf等.(2008), Biochemistry, 47, 4743-4751)。使用通过麦胚凝集素纯化从幼仓鼠肾(BHK)细胞(该细胞用包含人IR-A和IR-B插入物的pZem载体稳定转染)半纯化的溶

解的人IR(holoreceptor)在Eppendorf epMotion 5075机器人上在96-孔板(聚苯乙烯 Optiplate-96, PerkinElmer)中进行竞争性结合实验。通过进行包含胰岛素类似物的酵母上清液和人胰岛素标准品的稀释系列(8次稀释,每次5倍,第一次稀释43倍)而开始测定。将由重悬在结合缓冲液中的SPA珠子(SPA PVT Antibody-Binding Beads, Anti-Mouse Reagent Cat. No. RPNQ0017, GE Healthcare),抗-IR单克隆小鼠抗体(83-7),溶解的人IR(hIR-A或hIR-B)和 $[^{125}\text{I}]$ A14Tyr-标记的胰岛素组成的试剂混合物加入适当样品的系列稀释物。 $[^{125}\text{I}]$ A14Tyr-标记的胰岛素的最终浓度为7.5 pM,缓冲液由100 mM HEPES (pH 7.8), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄和0.025% (v/v) Tween 20组成。将板在室温轻轻振荡地孵育24小时,2000rpm离心2分钟,3分钟/孔在TopCount NXT中计数。根据四参数逻辑模型(Vølund, A., (1978), Biometrics, 34, 357-365.)分析来自SPA的数据,胰岛素类似物的亲和力相对于人胰岛素的亲和力表示。

[0103] 单克隆mIR抗体的制备

[0104] 通过单克隆技术生产特异性抗体(F12或83-7):通过皮下注射50 μg FCA中纯化的mIR并随后两次注射20 μg FIA中的mIR而免疫RBF小鼠。用25 μg mIR静脉内增强高应答的小鼠,3天后收获脾脏。用骨髓瘤Fox细胞系融合脾细胞(Köhler, G & Milstein C. (1976), European J. Immunology, 6:511-19; Taggart RT等(1983), Science 219: 1228-30)。在mIR特异性ELISA中筛选上清液的抗体产生。克隆阳性孔并在Western印迹中检测。

[0105] 胰岛素受体结合试验(对膜相关的胰岛素受体):

[0106] $[^{125}\text{I}]$ -人胰岛素与膜相关的重组胰岛素受体同种型A(hIR-A)的结合:

[0107] 膜相关的胰岛素受体的提取:从10层细胞工厂收获表达人胰岛素受体同种型A的BHK细胞(tk- ts13)并在25 ml冰冷的缓冲液(25 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 250 mg/l杆菌肽, 0.1 mM Pefablock (Roche))中匀浆。将匀浆物小心地铺在41%蔗糖垫(sucrose cushions)上,在超速离心机的Beckman SW28转子中在4°C以95,000 x g离心75分钟。从蔗糖垫的顶部收集质膜,用缓冲液1:4稀释,在Beckman SW28转子中以40,000 x g离心45分钟。沉淀悬浮于缓冲液(25 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 250 mg/l杆菌肽, 0.1 mM Pefablock)中,并储存在-80°C。

[0108] 在96孔OptiPlates (Perkin Elmer)中一式两份进行放射配体与膜相关的胰岛素受体的结合。膜蛋白与总体积200 ml的测定缓冲液(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 0.01% Triton X-100, 0.1% HSA (无脂肪酸), Complete™ 无EDTA的蛋白酶抑制剂)中50 pM $[^{125}\text{I}]$ -Tyr^{A14}-人胰岛素,浓度逐渐增加的人胰岛素或胰岛素类似物(通常在0.01-300 nM之间)以及1 mg WGA-包被的PVT微球(GE Healthcare)在25°C孵育150分钟。通过在2000 RPM将板离心2分钟而终止测定,通过在延迟60分钟之后在Packard TopCount NXT中计数而定量结合的放射活性。

[0109] 在GraphPad Prism 5.02(GraphPad Software, San Diego, CA)中,使用四参数S形回归拟合结合数据。结果表示为%的相对于人胰岛素的IC₅₀。

[0110] 在一个方面,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被不是半胱氨酸残基的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。

[0111] 在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr和Val。在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Pro, Thr和Val。在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自:A8H, A14E, A14H, A18L, A21G, A22K, desB1, B1G, B3Q, B3E, B3T, B3V, B3K, B3L, B16H, B16E, B22E, B24G, B25A, B25H, B25N, B26G, B27G, B27E, B27D, B27P, desB27, B28G, B28D, B28E, B28K和B29R。

[0112] 在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自:A8H, A14E, A21G, A22K, desB1, B1G, B3Q, B3E, B10E, B16H, B16E, B24G, B25H, B25A, B25N, B25G, B26G, B27G, desB27, B27E, B28E, B28D, B28G和B29R。

[0113] 在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自:A21G, desB1, B1G, B3Q, B3S, B3T和B3E。

[0114] 在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自:A8H, A14E, A14H, B16H, B10E, B16E, B25H, B25A, B25N, B26G, B27G, B27E, B27P, desB27, B28G和B28E。

[0115] 在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自:A22K, B28E, B28D, desB27, A14E和B29R。

[0116] 在一个实施方案中,不是半胱氨酸残基的氨基酸残基选自:B3K, B29E, B27E, B27D, desB27, B28E, B28D, B28K和B29P。

[0117] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物也包含一个或多个缺失。在一个实施方案中,缺失选自:desB1, desB24, desB25和/或desB27。

[0118] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr和Val的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Pro, Thr和Val的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自A8H, A14E, A14H, A18L, A21G, A22K, desB1, B1G, B3Q, B3E, B3T, B3V, B3K, B3L, B16H, B16E, B22E, B24G, B25A, B25H, B25N, B26G, B26K, B27G, B27E, B27D, B27P, B27K, desB27, B28G, B28D, B28E, B28K和B29R的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。

[0119] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自A8H, A14E, A21G, A22K, desB1, B1G, B3Q, B3E, B10E, B16H, B16E, B24G, B25H, B25A, B25N, B25G, B26G, B27G, desB27, B27E, B28E, B28D, B28G和B29R的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。

[0120] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自A21G, desB1, B1G, B3Q, B3S, B3T和B3E的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。

[0121] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自A8H, A14E, A14H, B16H, B10E, B16E, B25H, B25A, B25N, B26G, B27G, B27E, B27P, desB27, B28G和B28E的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。

[0122] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自A22K, B28E, B28D, desB27, A14E和B29R的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。

[0123] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物是修饰的胰岛素,其中两个氨基酸残基已经被半胱氨酸残基取代,一个或多个氨基酸残基已经被选自B3K, B29E, B27E, B27D, desB27, B28E, B28D, B28K和B29P的氨基酸残基取代,任选地,相对于人胰岛素的氨基酸序列,在B30位的氨基酸已经缺失。

[0124] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物也包含一个或多个缺失。在一个实施方案中,缺失选自:desB1, desB24, desB25和/或desB27。

[0125] 本发明的胰岛素类似物的例子为例如:

[0126] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0127] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0128] A10C, A14E, B2C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0129] A10C, A14E, B1C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0130] A10C, A14E, B4C, desB27, desB30人胰岛素

[0131] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30人胰岛素

[0132] A10C, A14E, B2C, desB27, desB30人胰岛素

[0133] A10C, A14E, B1C, desB27, desB30人胰岛素

[0134] A10C, B4C, B25H, desB30人胰岛素

[0135] A10C, B3C, B25H, desB30人胰岛素

[0136] A10C, B2C, B25H, desB30人胰岛素

[0137] A10C, B1C, B25H, desB30人胰岛素

[0138] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30人胰岛素

[0139] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30人胰岛素

[0140] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30人胰岛素

[0141] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30人胰岛素

[0142] A10C, A14E, B4C, desB30人胰岛素

[0143] A10C, A14E, B3C, desB30人胰岛素

[0144] A10C, A14E, B2C, desB30人胰岛素

[0145] A10C, A14E, B1C, desB30人胰岛素

- [0146] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0147] A10C, A14E, desB1, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0148] A10C, A14E, desB1, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0149] A10C, A14E, desB1, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0150] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0151] A10C, A14E, B3C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0152] A10C, A14E, B2C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0153] A10C, A14E, B1C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0154] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0155] A10C, A14H, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0156] A10C, A14H, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0157] A10C, A14H, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0158] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0159] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0160] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0161] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0162] A8H, A21C和B25C人胰岛素,
- [0163] A21C, B10E和B25C人胰岛素,
- [0164] A8H, A21C, B10E和B25C人胰岛素,
- [0165] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30人胰岛素
- [0166] A10C, A14E, B3C, B25A, desB30人胰岛素
- [0167] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30人胰岛素
- [0168] A10C, A14E, B1C, B25A, desB30人胰岛素
- [0169] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0170] A10C, A14E, B3C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0171] A10C, A14E, B2C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0172] A10C, A14E, B1C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0173] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0174] A10C, A14E, B3C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0175] A10C, A14E, B2C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0176] A10C, A14E, B1C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0177] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0178] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0179] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0180] A10C, B2C, B3E, desB30人胰岛素
- [0181] A10C, B3T, B4C, desB30人胰岛素
- [0182] A10C, B3V, B4C, desB30人胰岛素
- [0183] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0184] A10C, A21G, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素

- [0185] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0186] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0187] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0188] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0189] A10C, B3Q, B4C, desB30人胰岛素
- [0190] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30人胰岛素
- [0191] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30人胰岛素
- [0192] A10C, B3C, B28D, desB30人胰岛素
- [0193] A10C, B2C, B28D, desB30人胰岛素
- [0194] A10C, B1C, B28D, desB30人胰岛素
- [0195] A10C, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [0196] A10C, B1C, B28E, desB30人胰岛素
- [0197] A10C, B2C, B28E, desB30人胰岛素
- [0198] A10C, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0199] A10C, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0200] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0201] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0202] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0203] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0204] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0205] A10C, A21G, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0206] A10C, A21G, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0207] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0208] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0209] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素
- [0210] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素
- [0211] A8H, A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素
- [0212] A8H, A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0213] A10C, A14E, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0214] A10C, A14E, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素
- [0215] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素
- [0216] A10C, A21G, B0G, B1E, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素
- [0217] A10C, A14E, A21G, B1G, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素
- [0218] A10C, A14E, A21G, B0G, B1E, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素
- [0219] A10C, A21G, B1G, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素
- [0220] A10C, A21G, B0G, B1E, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素
- [0221] A10C, A14E, A21G, B1G, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素
- [0222] A10C, A14E, A21G, B0G, B1E, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素
- [0223] A10C, A21G, B3E, B4C, desB25, B28E, desB30人胰岛素

- [0224] A10C, B3E, B4C, desB30人胰岛素
- [0225] A10C, B3L, B4C, desB30人胰岛素
- [0226] A10C, A22K, B1C, B29R, desB30人胰岛素
- [0227] A10C, A22K, B2C, B29R, desB30人胰岛素
- [0228] A10C, A22K, B3C, B29R, desB30人胰岛素
- [0229] A10C, A22K, B4C, B29R, desB30人胰岛素
- [0230] A10C, A22K, B4C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0231] A10C, A22K, B3C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0232] A10C, A22K, B2C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0233] A10C, A22K, B1C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0234] A10C, A14E, A22K, B1C, B29R, desB30人胰岛素
- [0235] A10C, A14E, A22K, B2C, B29R, desB30人胰岛素
- [0236] A10C, A14E, A22K, B3C, B29R, desB30人胰岛素
- [0237] A10C, A14E, A22K, B4C, B29R, desB30人胰岛素
- [0238] A10C, A14E, A22K, B4C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0239] A10C, A14E, A22K, B3C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0240] A10C, A14E, A22K, B2C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0241] A10C, A14E, A22K, B1C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0242] A10C, A14E, A22K, B4C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0243] A10C, A14E, A22K, B3C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0244] A10C, A14E, A22K, B2C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0245] A10C, A14E, A22K, B1C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0246] A10C, A14E, A22K, B4C, B28D, B29R, desB30人胰岛素
- [0247] A10C, A14E, A22K, B3C, B28D, B29R, desB30人胰岛素
- [0248] A10C, A14E, A22K, B2C, B28D, B29R, desB30人胰岛素
- [0249] A10C, A14E, A22K, B1C, B28D, B29R, desB30人胰岛素
- [0250] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0251] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0252] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0253] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0254] A10C, A14E, B1C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0255] A10C, A14E, B2C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0256] A10C, A14E, B3C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0257] A10C, A14E, B4C, B16E, B25H, desB30人胰岛素。

[0258] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物包含相对于人胰岛素的3-9个取代,其中两个取代是针对半胱氨酸残基并且一个或多个取代是针对不是半胱氨酸残基的氨基酸残基,或者本发明的胰岛素类似物包含相对于人胰岛素的3-8个取代,或者相对于人胰岛素的3-7个取代,或者相对于人胰岛素的3-6个取代,或者相对于人胰岛素的3-5个取代,或者相对于人胰岛素的3-4个取代,或者相对于人胰岛素的3个取代,其中两个取代是针对半胱

氨酸残基并且一个或多个取代是针对不是半胱氨酸残基的氨基酸残基。

[0259] 通过说明取代天然的氨基酸残基的氨基酸残基的链(A或B),位置和一个或三个字母代码来表示胰岛素分子的修饰。

[0260] 在本文中,术语像“A1”、“A2”和“A3”等分别表明胰岛素A链中的位置1、2和3(从N末端计算)的氨基酸。类似地,术语像B1、B2、B3等分别表明胰岛素B链中的位置1、2和3(从N末端计算)的氨基酸。使用氨基酸的一个字母代码,术语像A10C表示在A10位的氨基酸是半胱氨酸。使用氨基酸的三个字母代码,相应的表达是A10Cys。

[0261] “desB30”或“B(1-29)”是指缺乏B30氨基酸的天然胰岛素B链或其类似物,“A(1-21)”是指天然的胰岛素A链。因此,例如,A10C,B1C,desB30人胰岛素或者A10Cys,B1Cys,desB30人胰岛素是人胰岛素类似物,其中A链的10位的氨基酸被半胱氨酸取代,B链的1位的氨基酸被半胱氨酸取代,B链的30位的氨基酸缺失。

[0262] 本文中,术语“氨基酸残基”是氨基酸,其中已经从羧基上除去羟基和/或其中已经从氨基上除去氢原子。

[0263] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:

[0264] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0265] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0266] A10C, A14E, B2C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0267] A10C, A14E, B1C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

[0268] A10C, A14E, B4C, desB27, desB30人胰岛素

[0269] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30人胰岛素

[0270] A10C, A14E, B2C, desB27, desB30人胰岛素

[0271] A10C, A14E, B1C, desB27, desB30人胰岛素

[0272] A10C, B4C, B25H, desB30人胰岛素

[0273] A10C, B3C, B25H, desB30人胰岛素

[0274] A10C, B2C, B25H, desB30人胰岛素

[0275] A10C, B1C, B25H, desB30人胰岛素

[0276] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30人胰岛素

[0277] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30人胰岛素

[0278] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30人胰岛素

[0279] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30人胰岛素

[0280] A10C, A14E, B4C, desB30人胰岛素

[0281] A10C, A14E, B3C, desB30人胰岛素

[0282] A10C, A14E, B2C, desB30人胰岛素

[0283] A10C, A14E, B1C, desB30人胰岛素

[0284] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素

[0285] A10C, A14E, desB1, B3C, B25H, desB30人胰岛素

[0286] A10C, A14E, desB1, B2C, B25H, desB30人胰岛素

[0287] A10C, A14E, desB1, B1C, B25H, desB30人胰岛素

[0288] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素

- [0289] A10C, A14E, B3C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0290] A10C, A14E, B2C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0291] A10C, A14E, B1C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0292] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0293] A10C, A14H, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0294] A10C, A14H, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0295] A10C, A14H, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0296] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0297] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0298] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0299] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0300] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30人胰岛素
- [0301] A10C, A14E, B3C, B25A, desB30人胰岛素
- [0302] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30人胰岛素
- [0303] A10C, A14E, B1C, B25A, desB30人胰岛素
- [0304] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0305] A10C, A14E, B3C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0306] A10C, A14E, B2C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0307] A10C, A14E, B1C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0308] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0309] A10C, A14E, B3C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0310] A10C, A14E, B2C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0311] A10C, A14E, B1C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0312] A10C, B1C, desB27, desB30人胰岛素
- [0313] A10C, B2C, desB27, desB30人胰岛素
- [0314] A10C, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0315] A10C, B4C, desB27, desB30人胰岛素
- [0316] A10C, A14E, A22K, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0317] A10C, A14E, A22K, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0318] A10C, A14E, A22K, B2C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0319] A10C, A14E, A22K, B1C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0320] A10C, A14E, A22K, B4C, desB27, desB30人胰岛素
- [0321] A10C, A14E, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0322] A10C, A14E, A22K, B2C, desB27, desB30人胰岛素
- [0323] A10C, A14E, A22K, B1C, desB27, desB30人胰岛素
- [0324] A10C, A22K, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0325] A10C, A22K, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0326] A10C, A22K, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0327] A10C, A22K, B1C, B25H, desB30人胰岛素

- [0328] A10C, A14E, A22K, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0329] A10C, A14E, A22K, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0330] A10C, A14E, A22K, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0331] A10C, A14E, A22K, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0332] A10C, A14E, A22K, B4C, desB30人胰岛素
- [0333] A10C, A14E, A22K, B3C, desB30人胰岛素
- [0334] A10C, A14E, A22K, B2C, desB30人胰岛素
- [0335] A10C, A14E, A22K, B1C, desB30人胰岛素
- [0336] A10C, A14E, A22K, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0337] A10C, A14E, A22K, desB1, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0338] A10C, A14E, A22K, desB1, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0339] A10C, A14E, A22K, desB1, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0340] A10C, A14E, A22K, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0341] A10C, A14E, A22K, B3C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0342] A10C, A14E, A22K, B2C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0343] A10C, A14E, A22K, B1C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0344] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0345] A10C, A14H, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0346] A10C, A14H, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0347] A10C, A14H, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0348] A10C, A14E, A22K, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0349] A10C, A14E, A22K, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0350] A10C, A14E, A22K, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0351] A10C, A14E, A22K, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0352] A10C, A14E, A22K, B4C, B25A, desB30人胰岛素
- [0353] A10C, A14E, A22K, B3C, B25A, desB30人胰岛素
- [0354] A10C, A14E, A22K, B2C, B25A, desB30人胰岛素
- [0355] A10C, A14E, A22K, B1C, B25A, desB30人胰岛素
- [0356] A10C, A14E, A22K, B4C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0357] A10C, A14E, A22K, B3C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0358] A10C, A14E, A22K, B2C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0359] A10C, A14E, A22K, B1C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0360] A10C, A14E, A22K, B4C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0361] A10C, A14E, A22K, B3C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0362] A10C, A14E, A22K, B2C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0363] A10C, A14E, A22K, B1C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0364] A10C, A22K, B1C, desB27, desB30人胰岛素
- [0365] A10C, A22K, B2C, desB27, desB30人胰岛素
- [0366] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素

- [0367] A10C, A22K, B4C, desB27, desB30人胰岛素。
- [0368] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0369] A8H, A14E, A21C, B25H, B26C, desB30人胰岛素
- [0370] A8H, A21C, B26C, desB30人胰岛素,
- [0371] A21C, B10E, B26C, desB30人胰岛素,
- [0372] A8H, A21C, B10E, B26C, desB30人胰岛素,
- [0373] A8H, A21C, B25C, desB30人胰岛素,
- [0374] A21C, B10E, B25C, desB30人胰岛素,
- [0375] A8H, A21C, B10E, B25C, desB30人胰岛素。
- [0376] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0377] A8H, A14E, A21C, A22K, B25H, B26C, desB30人胰岛素
- [0378] A8H, A21C, A22K, B26C, desB30人胰岛素,
- [0379] A21C, A22K, B10E, B26C, desB30人胰岛素,
- [0380] A8H, A21C, A22K, B10E, B26C, desB30人胰岛素,
- [0381] A8H, A21C, A22K, B25C, desB30人胰岛素,
- [0382] A21C, A22K, B10E, B25C, desB30人胰岛素,
- [0383] A8H, A21C, A22K, B10E, B25C, desB30人胰岛素
- [0384] A8H, A14E, A21C, A22K, B25H, B26C, B29R, desB30人胰岛素
- [0385] A8H, A21C, A22K, B26C, B29R, desB30人胰岛素,
- [0386] A21C, A22K, B10E, B26C, B29R, desB30人胰岛素,
- [0387] A8H, A21C, A22K, B10E, B26C, B29R, desB30人胰岛素,
- [0388] A8H, A21C, A22K, B25C, B29R, desB30人胰岛素,
- [0389] A21C, A22K, B10E, B25C, B29R, desB30人胰岛素,
- [0390] A8H, A21C, A22K, B10E, B25C, B29R, desB30人胰岛素。
- [0391] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0392] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0393] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0394] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0395] A10C, B2C, B3E, desB30人胰岛素;
- [0396] A10C, B3T, B4C, desB30人胰岛素;
- [0397] A10C, B3V, B4C, desB30人胰岛素;
- [0398] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0399] A10C, A21G, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素;
- [0400] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0401] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素;
- [0402] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素;
- [0403] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素;
- [0404] A10C, B3Q, B4C, desB30人胰岛素;
- [0405] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30人胰岛素;

- [0406] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30人胰岛素;
- [0407] A10C, B3C, B28D, desB30人胰岛素;
- [0408] A10C, B2C, B28D, desB30人胰岛素;
- [0409] A10C, B1C, B28D, desB30人胰岛素;
- [0410] A10C, B4C, B28D, desB30人胰岛素;
- [0411] A10C, B1C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0412] A10C, B2C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0413] A10C, B3C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0414] A10C, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0415] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0416] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0417] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素;
- [0418] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素;
- [0419] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30人胰岛素;
- [0420] A10C, A21G, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素;
- [0421] A10C, A21G, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素;
- [0422] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0423] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0424] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0425] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0426] A8H, A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0427] A8H, A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0428] A10C, A14E, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0429] A10C, A14E, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素;
- [0430] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素;
- [0431] A10C, A21G, B0G, B1E, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素;
- [0432] A10C, A14E, A21G, B1G, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素;
- [0433] A10C, A14E, A21G, B0G, B1E, B3C, B27E, B28E, desB30人胰岛素;
- [0434] A10C, A21G, B1G, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素;
- [0435] A10C, A21G, B0G, B1E, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素;
- [0436] A10C, A14E, A21G, B1G, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素;
- [0437] A10C, A14E, A21G, B0G, B1E, B3C, B27P, B28E, desB30人胰岛素;
- [0438] A10C, A21G, B3E, B4C, desB25, B28E, desB30人胰岛素;
- [0439] A10C, B3E, B4C, desB30人胰岛素;
- [0440] A10C, B3L, B4C, desB30人胰岛素;
- [0441] A10C, B1C, desB27, desB30人胰岛素;
- [0442] A10C, B2C, desB27, desB30人胰岛素;
- [0443] A10C, B3C, desB27, desB30人胰岛素;
- [0444] A10C, B4C, desB27, desB30人胰岛素;

- [0445] A10C, B4C和B29E人胰岛素;
- [0446] A10C, B4C, B28K和B29P人胰岛素;
- [0447] A10C, B3C和B28D人胰岛素;
- [0448] A10C, B3C和B29E人胰岛素;
- [0449] A10C, B3C, B28K和B29P人胰岛素;或
- [0450] A10C, B3K, B4C和B29E人胰岛素。
- [0451] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0452] A10C, A22K, B1C, B29R, desB30人胰岛素
- [0453] A10C, A22K, B2C, B29R, desB30人胰岛素
- [0454] A10C, A22K, B3C, B29R, desB30人胰岛素
- [0455] A10C, A22K, B4C, B29R, desB30人胰岛素
- [0456] A10C, A22K, B4C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0457] A10C, A22K, B3C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0458] A10C, A22K, B2C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0459] A10C, A22K, B1C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0460] A10C, A14E, A22K, B1C, B29R, desB30人胰岛素
- [0461] A10C, A14E, A22K, B2C, B29R, desB30人胰岛素
- [0462] A10C, A14E, A22K, B3C, B29R, desB30人胰岛素
- [0463] A10C, A14E, A22K, B4C, B29R, desB30人胰岛素
- [0464] A10C, A14E, A22K, B4C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0465] A10C, A14E, A22K, B3C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0466] A10C, A14E, A22K, B2C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0467] A10C, A14E, A22K, B1C, desB27, B29R, desB30人胰岛素
- [0468] A10C, A14E, A22K, B4C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0469] A10C, A14E, A22K, B3C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0470] A10C, A14E, A22K, B2C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0471] A10C, A14E, A22K, B1C, B28E, B29R, desB30人胰岛素
- [0472] A10C, A14E, A22K, B4C, B28D, B29R, desB30人胰岛素
- [0473] A10C, A14E, A22K, B3C, B28D, B29R, desB30人胰岛素
- [0474] A10C, A14E, A22K, B2C, B28D, B29R, desB30人胰岛素
- [0475] A10C, A14E, A22K, B1C, B28D, B29R, desB30人胰岛素。
- [0476] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0477] A10C, A22K, B1C, desB30人胰岛素
- [0478] A10C, A22K, B2C, desB30人胰岛素
- [0479] A10C, A22K, B3C, desB30人胰岛素
- [0480] A10C, A22K, B4C, desB30人胰岛素
- [0481] A10C, A22K, B4C, desB27, desB30人胰岛素
- [0482] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0483] A10C, A22K, B2C, desB27, desB30人胰岛素

- [0484] A10C, A22K, B1C, desB27, desB30人胰岛素
- [0485] A10C, A14E, A22K, B1C, desB30人胰岛素
- [0486] A10C, A14E, A22K, B2C, desB30人胰岛素
- [0487] A10C, A14E, A22K, B3C, desB30人胰岛素
- [0488] A10C, A14E, A22K, B4C, desB30人胰岛素
- [0489] A10C, A14E, A22K, B4C, desB27, desB30人胰岛素
- [0490] A10C, A14E, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0491] A10C, A14E, A22K, B2C, desB27, desB30人胰岛素
- [0492] A10C, A14E, A22K, B1C, desB27, desB30人胰岛素
- [0493] A10C, A22K, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0494] A10C, A22K, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0495] A10C, A22K, B2C, B28E, desB30人胰岛素
- [0496] A10C, A22K, B1C, B28E, desB30人胰岛素
- [0497] A10C, A22K, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [0498] A10C, A22K, B3C, B28D, desB30人胰岛素
- [0499] A10C, A22K, B2C, B28D, desB30人胰岛素
- [0500] A10C, A22K, B1C, B28D, desB30人胰岛素
- [0501] A10C, A14E, A22K, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0502] A10C, A14E, A22K, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0503] A10C, A14E, A22K, B2C, B28E, desB30人胰岛素
- [0504] A10C, A14E, A22K, B1C, B28E, desB30人胰岛素
- [0505] A10C, A14E, A22K, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [0506] A10C, A14E, A22K, B3C, B28D, desB30人胰岛素
- [0507] A10C, A14E, A22K, B2C, B28D, desB30人胰岛素
- [0508] A10C, A14E, A22K, B1C, B28D, desB30人胰岛素。
- [0509] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0510] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0511] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0512] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0513] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0514] A10C, A14E, B1C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0515] A10C, A14E, B2C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0516] A10C, A14E, B3C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0517] A10C, A14E, B4C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0518] A10C, A14E, A22K, B1C, B16H, B25H, B29R, desB30人胰岛素
- [0519] A10C, A14E, A22K, B2C, B16H, B25H, B29R, desB30人胰岛素
- [0520] A10C, A14E, A22K, B3C, B16H, B25H, B29R, desB30人胰岛素
- [0521] A10C, A14E, A22K, B4C, B16H, B25H, B29R, desB30人胰岛素
- [0522] A10C, A14E, A22K, B1C, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素

- [0523] A10C, A14E, A22K, B2C, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素
- [0524] A10C, A14E, A22K, B3C, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素
- [0525] A10C, A14E, A22K, B4C, B16E, B25H, B29R, desB30人胰岛素。
- [0526] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0527] A10C, A14E, A22K, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0528] A10C, A14E, A22K, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0529] A10C, A14E, A22K, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0530] A10C, A14E, A22K, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0531] A10C, A14E, A22K, B1C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0532] A10C, A14E, A22K, B2C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0533] A10C, A14E, A22K, B3C, B16E, B25H, desB30人胰岛素
- [0534] A10C, A14E, A22K, B4C, B16E, B25H, desB30人胰岛素。
- [0535] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0536] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0537] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0538] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0539] A10C, B2C, B3E, desB30人胰岛素
- [0540] A10C, B3T, B4C, desB30人胰岛素
- [0541] A10C, B3V, B4C, desB30人胰岛素
- [0542] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0543] A10C, A21G, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0544] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0545] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0546] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0547] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0548] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0549] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0550] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0551] A10C, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [0552] A10C, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0553] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0554] A10C, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0555] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0556] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0557] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0558] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0559] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0560] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0561] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素

- [0562] A10C, B4C, B28D人胰岛素
- [0563] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0564] A10C, B3Q, B4C, desB30人胰岛素
- [0565] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30人胰岛素
- [0566] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30人胰岛素
- [0567] A10C, B2C, B28D, desB30人胰岛素
- [0568] A10C, B1C, B28D, desB30人胰岛素
- [0569] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0570] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0571] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0572] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0573] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0574] A10C, A21G, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0575] A10C, A21G, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0576] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0577] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0578] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素
- [0579] A10C, B2C, B3A, desB30人胰岛素
- [0580] A10C, B2C, B3R, desB30人胰岛素
- [0581] A10C, B2C, B3D, desB30人胰岛素
- [0582] A10C, B2C, B3Q, desB30人胰岛素
- [0583] A10C, B2C, B3G, desB30人胰岛素
- [0584] A10C, B2C, B3H, desB30人胰岛素
- [0585] A10C, B2C, B3I, desB30人胰岛素
- [0586] A10C, B2C, B3L, desB30人胰岛素
- [0587] A10C, B2C, B3K, desB30人胰岛素
- [0588] A10C, B2C, B3M, desB30人胰岛素
- [0589] A10C, B2C, B3F, desB30人胰岛素
- [0590] A10C, B2C, B3P, desB30人胰岛素
- [0591] A10C, B2C, B3S, desB30人胰岛素
- [0592] A10C, B2C, B3T, desB30人胰岛素
- [0593] A10C, B2C, B3W, desB30人胰岛素
- [0594] A10C, B2C, B3Y, desB30人胰岛素
- [0595] A10C, B2C, B3V, desB30人胰岛素
- [0596] A10C, B3R, B4C, desB30人胰岛素
- [0597] A10C, B3D, B4C, desB30人胰岛素
- [0598] A10C, B3G, B4C, desB30人胰岛素
- [0599] A10C, B3H, B4C, desB30人胰岛素
- [0600] A10C, B3K, B4C, desB30人胰岛素

- [0601] A10C, B3P, B4C, desB30人胰岛素
- [0602] A10C, B3S, B4C, desB30人胰岛素
- [0603] A10C, B3Y, B4C, desB30人胰岛素
- [0604] A8H, A14E, A21C, B25H, B26C, desB30人胰岛素
- [0605] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0606] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0607] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30人胰岛素
- [0608] A21C, B10E, B25C, desB30人胰岛素
- [0609] A8H, A21C, B10E, B25C, desB30人胰岛素
- [0610] A8H, A21C, B25C, desB30人胰岛素
- [0611] A10C, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0612] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [0613] A10C, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0614] A10C, A21G, B4C, desB30人胰岛素
- [0615] A8H, A21C, B10E, B26C, desB30人胰岛素
- [0616] A21C, B10E, B26C, desB30人胰岛素
- [0617] A8H, A21C, B26C, desB30人胰岛素
- [0618] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0619] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0620] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0621] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30人胰岛素。
- [0622] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0623] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0624] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [0625] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0626] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30人胰岛素
- [0627] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [0628] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0629] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0630] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0631] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0632] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0633] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30人胰岛素
- [0634] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [0635] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0636] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0637] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30人胰岛素
- [0638] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30人胰岛素
- [0639] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素

- [0640] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [0641] A10C, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0642] A10C, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [0643] A10C, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [0644] A10C, B4C, B25H, desB30人胰岛素。
- [0645] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0646] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0647] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0648] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [0649] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素。
- [0650] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物选自:
- [0651] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0652] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素
- [0653] A10C, A21G, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0654] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0655] A10C, A21G, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0656] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0657] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30人胰岛素
- [0658] A10C, A21G, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0659] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0660] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30人胰岛素
- [0661] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0662] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [0663] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0664] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0665] A10C, A21G, B4C, desB30人胰岛素
- [0666] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0667] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0668] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0669] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0670] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0671] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0672] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0673] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0674] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0675] A10C, B1C, B28D, desB30人胰岛素
- [0676] A10C, B2C, B28D, desB30人胰岛素
- [0677] A10C, B2C, B3A, desB30人胰岛素
- [0678] A10C, B2C, B3D, desB30人胰岛素

- [0679] A10C, B2C, B3E, desB30人胰岛素
[0680] A10C, B2C, B3F, desB30人胰岛素
[0681] A10C, B2C, B3G, desB30人胰岛素
[0682] A10C, B2C, B3H, desB30人胰岛素
[0683] A10C, B2C, B3I, desB30人胰岛素
[0684] A10C, B2C, B3K, desB30人胰岛素
[0685] A10C, B2C, B3L, desB30人胰岛素
[0686] A10C, B2C, B3M, desB30人胰岛素
[0687] A10C, B2C, B3P, desB30人胰岛素
[0688] A10C, B2C, B3Q, desB30人胰岛素
[0689] A10C, B2C, B3R, desB30人胰岛素
[0690] A10C, B2C, B3S, desB30人胰岛素
[0691] A10C, B2C, B3T, desB30人胰岛素
[0692] A10C, B2C, B3V, desB30人胰岛素
[0693] A10C, B2C, B3W, desB30人胰岛素
[0694] A10C, B2C, B3Y, desB30人胰岛素
[0695] A10C, B3D, B4C, desB30人胰岛素
[0696] A10C, B3G, B4C, desB30人胰岛素
[0697] A10C, B3H, B4C, desB30人胰岛素
[0698] A10C, B3K, B4C, desB30人胰岛素
[0699] A10C, B3P, B4C, desB30人胰岛素
[0700] A10C, B3Q, B4C, desB30人胰岛素
[0701] A10C, B3R, B4C, desB30人胰岛素
[0702] A10C, B3S, B4C, desB30人胰岛素
[0703] A10C, B3T, B4C, desB30人胰岛素
[0704] A10C, B3V, B4C, desB30人胰岛素
[0705] A10C, B3Y, B4C, desB30人胰岛素
[0706] A10C, B4C, B28D人胰岛素
[0707] A10C, B4C, B28D, desB30人胰岛素。

[0708] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物还包含连接B-链的C-末端和A-链的N-末端(以形成所谓的单链的胰岛素类似物)的C-肽。在本发明的一个实施方案中,母体胰岛素选自单链胰岛素类似物。在本发明的一个实施方案中,母体胰岛素选自W02007096332, W02005054291或W02008043033(该专利都通过引用特异性地并入本文)中所列的单链胰岛素类似物。

[0709] 多肽,例如,胰岛素的生产是本领域中公知的。例如,可以通过经典的肽合成,例如,用t-Boc或Fmoc化学或其它已有的技术(见,例如,Greene和Wuts, “Protective Groups in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons, 1999)的固相肽合成生产本发明的胰岛素类似物。还可以通过一种方法生产胰岛素类似物,该方法包括在允许胰岛素类似物的表达的条件下在合适的营养培养基中培养包含编码该类似物的DNA序列并且能够表达该胰岛素

类似物的宿主细胞。可以在人胰岛素和胰岛素类似物的生产中使用数种重组方法。例如，W02008034881中公开了可以在微生物(如，例如，大肠杆菌和酿酒酵母)中胰岛素的生产中使用的方法三个非限制性的例子。

[0710] 通常，利用例如在EP 1,246,845或W02008034881(该专利都通过引用特异性地并入本文)中公开的公知的技术，在合适宿主细胞中，通过表达编码讨论的胰岛素类似物或其前体的DNA序列来制备胰岛素类似物。

[0711] 如EP 1,246,845中公开的，可以表达具有N-末端延伸的胰岛素类似物。分泌到培养基并回收之后，胰岛素前体将进行各种体外程序以去除可能的N-末端的延伸序列和连接肽以得到胰岛素类似物。这种方法包括通过胰蛋白酶或在L-苏氨酸酯存在的情况下 *Achromobacter lyticus* 蛋白酶随后通过碱性或酸水解将胰岛素类似物的苏氨酸酯转化为胰岛素类似物(如美国专利说明书No.4,343,898或4,916,212中所述)的酶转化。

[0712] 美国专利号No.5,395,922和欧洲专利No.765,395公开了适用于本发明中的N-末端延伸的类型的例子，该专利都通过引用特异性地并入本文。

[0713] 对于包含非天然的氨基酸残基的胰岛素类似物，应当修饰重组细胞使得将非天然的氨基酸引入该类似物，例如通过使用tRNA突变体。因此，简而言之，与已知的胰岛素类似物的制备类似地制备本发明的胰岛素类似物。

[0714] 本发明还涉及编码要求保护的胰岛素类似物的核酸序列。在进一步的实施方案中，本发明涉及包含这种核酸序列的载体和包含这种核酸序列或载体的宿主细胞。

[0715] 在仍进一步的实施方案中，本发明涉及生产胰岛素类似物的方法，包括：

[0716] (i) 培养包含编码胰岛素前体的核酸序列的宿主细胞；

[0717] (ii) 从培养基中分离胰岛素前体，以及

[0718] (iii) 通过体外酶转化将胰岛素前体转化为本发明的胰岛素类似物。

[0719] 在仍进一步的实施方案中，本发明涉及生产胰岛素类似物的方法，包括：

[0720] (i) 培养包含编码胰岛素前体的核酸序列的宿主细胞；

[0721] (ii) 从培养基中分离胰岛素前体，以及

[0722] (iii) 将胰岛素前体转化为本发明的胰岛素类似物。

[0723] 在本发明的一个实施方案中，宿主细胞是酵母宿主细胞，在进一步的实施方案中，酵母宿主细胞选自酵母属。在进一步的实施方案中，酵母宿主细胞选自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 种。

[0724] 在本发明的一个方面，获得了稳定胰岛素类似物的方法，其包括用半胱氨酸残基取代母体胰岛素的两个或更多个氨基酸，其中

[0725] a. 保留人胰岛素的三个二硫键以及

[0726] b. 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中，以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成，

[0727] 从而产生胰岛素类似物，其包含不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键。

[0728] 根据本说明书，如何获得本发明的胰岛素类似物是显而易见的。因此，当阅读本说明书时，本领域技术人员知道如何以这种方式修饰人胰岛素或desB3人胰岛素使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中，以允许除了人胰岛素的三个二硫键

之外不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0729] 药物组合物

[0730] 本发明的另一个目的是提供药物制剂,其包含浓度为0.1mg/ml—500mg/ml的本发明的胰岛素类似物,其中所述制剂具有2.0-10.0的pH值。该制剂可以进一步包括一种或多种蛋白酶抑制剂,缓冲系统,一种或多种防腐剂,一种或多种等渗剂,一种或多种螯合剂,稳定剂和表面活性剂。在本发明的一个实施方案中,药物制剂是水性制剂,即包含水的制剂。

[0731] 在另一个实施方案中,药物制剂是没有任何事先溶解的准备使用的干燥的制剂(例如冷冻干燥的或喷雾干燥的)。

[0732] 包含本发明的胰岛素类似物的药物组合物可以施用于需要这种治疗的患者,在数个部位,例如,在局部部位,例如,皮肤和粘膜部位,在绕过吸收的部位,例如,动脉中,静脉中,心脏中,的施用,在涉及吸收的部位,例如,皮肤中,皮肤下,肌肉中或腹腔中的施用。

[0733] 本发明的药物组合物的施用可以是通过多种施用途径施用于需要这种治疗的患者中,例如,舌,舌下,颊,嘴中,口腔,胃和肠中,鼻,肺,例如,通过细支气管和肺泡或其组合,表皮,真皮,经皮,阴道,直肠,眼,例如通过结膜,输尿管和肠胃外。

[0734] 本发明的组合物可以以数种剂型施用,例如,溶液,悬浮液,乳液,微乳液,多重乳液,泡沫剂,膏剂,糊剂,硬膏剂,软膏剂,片剂,包衣片剂,冲洗剂,胶囊剂,例如,硬明胶胶囊和软明胶胶囊,栓剂,直肠胶囊,滴剂,凝胶剂,喷雾剂,粉剂,气雾剂,吸入剂,滴眼剂,眼用软膏剂,眼用冲洗剂,阴道栓剂,阴道环,阴道软膏剂,注射液,原位转化溶液,例如,原位凝胶,原位放置,原位沉淀,原位结晶,输注溶液,和植入物。

[0735] 对于肠胃外施用,以类似于已知胰岛素制剂的方式来配制本发明的胰岛素类似物。此外,对于肠胃外施用,可以用与施用已知胰岛素施用的类似方式来施用本发明的胰岛素类似物,并且医生熟悉该方法。

[0736] 可以通过注射器,任选笔类注射器的方式进行肠胃外施用。或者,可以通过输液泵的方式进行肠胃外施用。

[0737] 包含本发明的胰岛素类似物的注射组合物可以使用制药工业的常规方法制备,该方法涉及将适合的组分溶解和混合,得到所需终产物。因此,按照一种方法,将本发明的胰岛素类似物溶于适量的水中,水的体积稍微少于所制备组合物的终体积。根据需要,加入等渗剂、防腐剂和/或缓冲剂,和如果需要的话,使用酸例如盐酸或碱例如氢氧化钠水溶液(根据需要)调节溶液的pH值。最后,用水调节溶液的体积,得到该组分的所需浓度。

[0738] 更准确地,通过将本发明的化合物,例如,以约240—约2400纳摩尔/ml的浓度溶解于微酸性条件的水性介质中可以制备本发明的胰岛素类似物制剂,例如溶液或悬浮液。例如,用氯化钠或甘油将水性介质制成等渗的。而且,水性介质可以包含缓冲剂,如乙酸盐或柠檬酸盐,防腐剂,如间甲酚或苯酚和锌离子,例如,其浓度为最高达约20 $\mu\text{g Zn}^{++}$ /单位胰岛素活性。溶液的pH值向中性调整,为了避免沉淀,该值与本发明的化合物的等电点不能太接近。最终的胰岛素制剂的pH值取决于使用本发明的何种化合物,锌离子的浓度以及本发明的化合物的浓度。例如,通过无菌过滤将胰岛素类似物制剂制成无菌的。

[0739] 可以根据任何已知的方法制备旨在用于口服使用的制剂,这种制剂可以包含选自甜味剂,调味剂,着色剂和防腐剂的一种或多种试剂,以提供药学上优雅并且可口的制剂。片剂可以包含与适合用于片剂制备的无毒的药学上可接受的赋形剂混合的活性组分。这些

赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂,如甘露醇,麦芽糊精,高岭土,碳酸钙,碳酸钠,乳糖,磷酸钙或磷酸钠;粒化剂和崩解剂,例如玉米淀粉;结合剂,例如,淀粉,明胶,聚合物或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁,硬脂酸或滑石粉。片剂可以不包衣,或者它们可以用已知的技术包衣以延缓药学上活性多肽的崩解或释放。

[0740] 根据药物化学中公知的方法,见Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版.(A. Osol ed., 1985),可以制备本发明的口服施用的制剂。

[0741] 与已知的胰岛素制剂的使用类似地使用本发明的胰岛素类似物制剂。

[0742] 通过咨询对糖尿病治疗熟悉的医生而决定本发明的化合物施用的量,确定何种频率施用本发明的化合物,和选择本发明的何种一种或多种化合物,以及任选地连同另一抗糖尿病化合物。

[0743] 在一个方面,口服施用本发明的胰岛素类似物。在一个方面,肠胃外施用本发明的胰岛素类似物。

[0744] 在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的胰岛素类似物,其被用作药物。

[0745] 在一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物被用于药物的制备中,该药物用于治疗或预防高血糖症,2型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性和1型糖尿病。

[0746] 在另一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物被用作延迟或防止2型糖尿病的疾病进展的药物。

[0747] 在本发明的一个实施方案中,本发明的胰岛素类似物被用于治疗或预防高血糖症,2型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性,1型糖尿病,或者用于延迟或防止2型糖尿病的疾病进展的药物。

[0748] 在本发明的进一步实施方案中,提供了用于治疗或预防高血糖症,2型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性,1型糖尿病,或者用于延迟或防止2型糖尿病的疾病进展的方法,该方法包括将对于这种治疗的有效量的本发明的胰岛素类似物施用于需要这种治疗的患者。

[0749] 术语“糖尿病”包括1型糖尿病,2型糖尿病和导致高血糖的其它状态。

[0750] 术语疾病的“治疗”包括疾病的治疗,预防或减轻。

[0751] 以下是进一步描述本发明的方面的列表:

[0752] 1. 胰岛素类似物,其具有两个或更多个半胱氨酸取代并且至少一个氨基酸残基被不是半胱氨酸的氨基酸取代,其中保留了人胰岛素的三个二硫键,以及

[0753] 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成。

[0754] 2. 根据方面1的胰岛素类似物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得

[0755] (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,以及

[0756] (2) 人胰岛素类似物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性。

[0757] 3. 根据方面1或2的胰岛素类似物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得

[0758] (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,

[0759] (2) 人胰岛素类似物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性,以及

[0760] (3) 相对于人胰岛素和/或母体胰岛素,人胰岛素类似物具有增加的物理稳定性。

[0761] 4. 根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中选择半胱氨酸取代的位点的方式使得

[0762] (1) 引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,

[0763] (2) 人胰岛素类似物保留了与人胰岛素相关的期望的生物活性,以及

[0764] (3) 人胰岛素类似物对蛋白水解性降解是稳定的。

[0765] 5. 根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中用半胱氨酸取代选自A-链的A9、A10、A11和A12的位置中的至少一个氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B1、B2、B3、B4、B5和B6的位置中的至少一个氨基酸残基,用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

[0766] 6. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B1、B2、B3和B4的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

[0767] 7. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B3和B4的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

[0768] 8. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代B-链的B3位的氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

[0769] 9. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中用半胱氨酸取代A-链的A10位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代B-链的B4位的氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

[0770] 10. 根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中用半胱氨酸取代A-链的A21位的氨基酸残基,用半胱氨酸取代选自B-链的B25和B26的位置中的氨基酸残基,以及任选地缺失B30位的氨基酸。

[0771] 11. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中在A-链和B-链之间获得一个或多个额外的二硫键。

[0772] 12. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中在A-链和B-链之间获得一个或多个额外的二硫键。

[0773] 13. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中至少一个额外的二硫键连接A-链中的两个半胱氨酸,或者连接B-链中的两个半胱氨酸。

[0774] 14. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中与胰岛素受体的受体结合是人胰岛素与胰岛素受体的受体结合的至少1%。

[0775] 15. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,相对于母体胰岛素,其具有改善的物理稳定性。

[0776] 16. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中缺失B30位的氨基酸。

[0777] 17. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其中至少一个额外的二硫键连接A-链中的两个半胱氨酸,或者连接B-链中的两个半胱氨酸。

[0778] 18. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其具有两个半胱氨酸取代。

[0779] 19. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其选自:

- [0780] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,
- [0781] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0782] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,
- [0783] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30人胰岛素,
- [0784] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0785] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,
- [0786] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素,
- [0787] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0788] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30人胰岛素,
- [0789] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,
- [0790] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30人胰岛素,
- [0791] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素,
- [0792] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素,
- [0793] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0794] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30人胰岛素,
- [0795] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30人胰岛素,
- [0796] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0797] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0798] A10C, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素,
- [0799] A10C, B3C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0800] A10C, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素,
- [0801] A10C, B4C, B25H, desB30人胰岛素,
- [0802] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,
- [0803] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,
- [0804] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素,和
- [0805] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素。
- [0806] 20. 在最大可能范围内根据前述方面中任一项的胰岛素类似物,其选自:
- [0807] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0808] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素
- [0809] A10C, A21G, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0810] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0811] A10C, A21G, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0812] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0813] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30人胰岛素
- [0814] A10C, A21G, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0815] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素

- [0816] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30人胰岛素
- [0817] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0818] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [0819] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0820] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0821] A10C, A21G, B4C, desB30人胰岛素
- [0822] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0823] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素
- [0824] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0825] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素
- [0826] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30人胰岛素
- [0827] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B27E, B28K, desB29, desB30人胰岛素
- [0828] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0829] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0830] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [0831] A10C, B1C, B28D, desB30人胰岛素
- [0832] A10C, B2C, B28D, desB30人胰岛素
- [0833] A10C, B2C, B3A, desB30人胰岛素
- [0834] A10C, B2C, B3D, desB30人胰岛素
- [0835] A10C, B2C, B3E, desB30人胰岛素
- [0836] A10C, B2C, B3F, desB30人胰岛素
- [0837] A10C, B4C, B28D人胰岛素,和
- [0838] A10C, B4C, B28D, desB30人胰岛素。
- [0839] 21. 稳定胰岛素的方法,其包括用半胱氨酸残基取代人胰岛素或desB30人胰岛素的一个或更多个氨基酸以及用不是半胱氨酸的氨基酸取代至少一个氨基酸残基,其中
- [0840] a. 保留人胰岛素的三个二硫键,以及
- [0841] b. 选择半胱氨酸取代的位点的方式使得引入的半胱氨酸残基位于折叠的胰岛素类似物的三维结构中,以允许不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键的形成,
- [0842] 从而产生胰岛素类似物,其包含不存在于人胰岛素中的一个或多个额外的二硫键。
- [0843] 22. 药物组合物,包含生物活性量的方面1-20中任一项的胰岛素类似物和药学上可接受的载体。
- [0844] 23. 根据方面22的药物组合物,进一步包括药学上可接受的载体和/或赋形剂,以及任选的助剂。
- [0845] 24. 在受试者中治疗糖尿病的方法,包括将方面1-20中任一项的胰岛素类似物或方面22-23中任一项的药物组合物施用于受试者。
- [0846] 25. 哺乳动物中降低血糖水平的方法,其通过将治疗活性剂量的方面1-20中任一项的胰岛素类似物或方面22-23中任一项的药物组合物施用于需要这种治疗的患者。
- [0847] 26. 根据方面24-25的方法,其是口服施用。

- [0848] 27. 根据方面24-25的方法,其是肠胃外施用。
- [0849] 28. 根据方面24-25的方法,其是气管内施用。
- [0850] 29. 根据方面1-20中任一项的胰岛素类似物,其用作高血糖症,2型糖尿病,损伤的葡萄糖耐受性和1型糖尿病的治疗或预防中的药物。
- [0851] 30. 根据方面1-20中任一项的胰岛素类似物,其用作延迟或防止2型糖尿病中疾病进展的药物。
- [0852] 31. 编码方面1-20中任一项的胰岛素类似物的核酸序列,其衍生物,其部分序列,其简并序列或在严格条件下与之杂交的序列。
- [0853] 32. 编码方面1-20中任一项的胰岛素类似物的前体的核酸序列,其衍生物,其部分序列,其简并序列或在严格条件下与之杂交的序列。
- [0854] 33. 包含方面31或32的核酸序列的表达载体。
- [0855] 34. 包含方面33的表达载体的宿主细胞。
- [0856] 35. 生产胰岛素类似物的方法,包括培养方面34的宿主细胞的步骤。
- [0857] 36. 制备方面1-20中任一项的胰岛素类似物的方法,其中通过定点诱变进行氨基酸的半胱氨酸取代。
- [0858] 37. 制备方面22-23中任一项的药物组合物的方法,包括将方面1-20中任一项的胰岛素类似物与药学上可接受的物质和/或赋形剂混合。
- [0859] 38. 通过方面37的方法获得的药物组合物。
- [0860] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,在此通过引用被完整地并入,其程度如同每份参考文献被单独且明确地指明通过引用并入并且在本文中完整地记载(法律允许的最大程度)。
- [0861] 本文使用的所有的标题和副标题仅仅为了方便,不应当被解释为以任何方式限制本发明。
- [0862] 本文提供的任何和所有实施例,或示例性语言(例如,“如”)的使用,除非另有要求,仅仅为了更好地阐明本发明,并不构成对本发明的范围的限制。说明书中任何语言都不应当被解释为指明任何非要求保护的对于本发明的实施所必需的元素。
- [0863] 在本文中专利文件的引用并并入仅仅是为了方便,并不反映专利文件的有效性、可专利性和/或可执行性的任何观点。
- [0864] 本发明包括本文所附加权利要求中所记载主题的所有变型和等同内容,其是为适用的法律所允许的。

附图说明

- [0865] 图1. 人胰岛素和实施例60的差示扫描量热法(DSC)比较。实施例60的胰岛素类似物的熔解温度比人胰岛素的熔解温度高35.1℃。
- [0866] 图2. 人胰岛素和实施例55的胰岛素类似物的ThT原纤化测定比较。很容易检测到人胰岛素原纤化具有<2h的滞后时间,而实施例55的胰岛素类似物在实验的45h持续时间内没有原纤化。
- [0867] 图3. 人胰岛素(现有技术)和实施例55的胰岛素类似物(图A)以及实施例60的胰岛素类似物(图B)的i.v施用后的血糖特征。以3.6 nmol/kg施用胰岛素类似物(平均值±

SEM)。

实施例

[0868] 以示例而非限制地提供下列实施例。

[0869] 本文使用的缩写如下： γ Glu是 γ L-谷氨酰基，HCl是盐酸，MeCN是乙腈，OEG是[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙基羰基，RPC是反相色谱法，RT是室温，TFA是三氟乙酸。

[0870] 以下实施例和通用程序涉及说明书和合成方案中鉴定的中间化合物和最终产物。采用以下实施例对本发明化合物的制备进行详细描述，但描述的化学反应根据它们对本发明化合物制备的一般适用性来公开。有时，所述反应可能不能适用于如所述的本发明范围内的每种化合物。本领域技术人员容易识别会发生这种情况的化合物。在这些情况下，所述反应可成功地通过本领域技术人员已知的常规改进进行，也就是说，通过干扰基团的合适保护，通过改变为其它常规试剂，或通过反应条件的常规改进。或者，本文中公开的或常规的其它反应将适用于制备本发明的相应化合物。在所有制备方法中，所有原料都是已知的或能容易地采用已知原料制备的。所有温度都以摄氏度给出，除非另外明确指出，当提到产率时，所有份和百分比都以重量计，当提到溶剂和洗脱剂时，所有份都以体积计。

[0871] 可以使用本领域技术人员容易认可的标准技术进行胰岛素类似物的载体的构建，酵母表达，处理和纯化。以前描述了胰岛素类似物的制备的一个非限制性例子(通用方法(A))(Glendorf, T., Sørensen, A.R., Nishimura, E., Pettersson, I.和Kjeldsen, T. Importance of the 溶剂-Exposed Residues of the Insulin B Chain α -Helix for Receptor Binding. *Biochemistry* 2008, 47, 4743-4751)。简而言之，用重叠延伸PCR将突变引入编码胰岛素的载体中。胰岛素类似物在酿酒酵母菌株MT663中被表达为具有Ala-Ala-Lys小C-肽的胰岛素原样融合蛋白。使用A. lyticus内切蛋白酶将单链前体酶转化为两条链的desB30类似物。通过MALDI-TOF MS验证全部转换为两条链的desB30类似物，并在酸性和中性的pH通过RP-HPLC测定其纯度。

[0872] 纯化：

[0873] 可以通过采用本领域中典型的以下方法中的一种或多种来纯化本发明的化合物。如果需要，可将这些方法针对梯度、pH、盐、浓度、流速、柱等等进行改进。根据因素如杂质特征、考虑的胰岛素溶解性等等，本领域技术人员容易认识和进行这些改进。

[0874] 胰岛素类似物的纯化以一个和/或两个步骤进行：

[0875] 1) 通过吸附到阳离子交换柱而捕获酸化并澄清的培养物上清液，和/或

[0876] 2) 通过在C18硅胶柱上的制备型反相高压液相色谱(使用例如在磷酸盐缓冲液pH3中的乙醇/水梯度)纯化胰岛素类似物。

[0877] 中性HPLC或阴离子交换色谱后，使所述化合物脱盐，例如通过大小排阻色谱法，在等电pH下沉淀或通过酸性HPLC脱盐。

[0878] 酸性HPLC或脱盐后，通过冷冻干燥纯的部分来分离化合物。

[0879] 典型的纯化方法：

[0880] HPLC系统为由以下组成的Gilson系统：215型液体处理系统，322-H2型泵和155型UV检测仪。典型地在210 nm和280 nm下进行检测。

[0881] Äkta Purifier FPLC系统(Amersham Biosciences)由如下组成：P-900型泵，UV-

900型UV检测仪,pH/C-900型pH和电导率检测仪,Frac-950型馏分收集器。通常在214 nm、254 nm和276 nm下进行UV检测。

[0882] 酸性HPLC:

[0883] 柱: Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7 C4

[0884] 流速: 8 ml/min

[0885] 缓冲液A: 乙腈中的0.1% TFA

[0886] 缓冲液B: 水中的0.1% TFA

[0887] 梯度: 0.0 - 5.0 min:10% A

[0888] 5.00 - 30.0 min:10% A至90% A

[0889] 30.0 - 35.0 min:90% A

[0890] 35.0 - 40.0 min:100% A

[0891] 中性HPLC:

[0892] 柱: Phenomenex, Jupiter, C4 5 μ m 250 x 10.00 mm, 300 Å

[0893] 流速: 6 ml/min

[0894] 缓冲液A: 5 mM TRIS, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, pH = 7.3, 20% CH₃CN

[0895] 缓冲液B: 60% CH₃CN, 40%水

[0896] 梯度: 0 - 5 min: 10% B

[0897] 5 - 35 min: 10- 60% B

[0898] 35 - 39 min: 60% B

[0899] 39 - 40 min: 70% B

[0900] 40 - 43.5 min: 70% B

[0901] 阴离子交换色谱法:

[0902] 柱: RessourceQ, 1 ml

[0903] 流速: 6 ml/min

[0904] 缓冲液A: 0.09% NH₄HCO₃, 0.25% NH₄OAc, 42.5%乙醇 pH 8.4

[0905] 缓冲液B: 0.09% NH₄HCO₃, 2.5% NH₄OAc, 42.5%乙醇 pH 8.4

[0906] 梯度: 在30个柱体积期间100% A至100% B

[0907] 脱盐:

[0908] 柱: HiPrep 26/10

[0909] 流速: 10 ml/min,6个柱体积

[0910] 缓冲液: 10 mM NH₄HCO₃。

[0911] 全长人胰岛素类似物的纯化(将Thr偶联至B29位):

[0912] 将0.23 g L-苏氨酸甲酯溶解于水(1mL)中,加入N-甲基吡咯烷-2-酮(NMP)并加入200 mg胰岛素类似物。用乙酸水溶液将得到的pH(8.2)调节至pH 6.6。将ALP III Sepharose 4 fast flow (Novo Nordisk)加入混合物中,并且在室温将该混合物轻轻搅拌3小时。用盐酸将pH调节至1.5,并过滤该混合物。将乙腈(2mL)加入滤液中,用1N氢氧化钠将pH调节至7.5。使用Phenomenex, Gemini, 5 μ , C18, 110 Å, 250x30 cm柱和以下洗脱剂和梯度通过HPLC纯化具有B30T甲酯的胰岛素类似物:

[0913] 流速: 20 ml/min

- [0914] 洗脱剂:A:20% CH₃CN 10mM TRIS + 15mM (NH₄)SO₄ pH = 7.3
- [0915] B:80% CH₃CN, 20 %水
- [0916] 梯度: 0-7.5 min: 10%B,
- [0917] 7.5-47.5 min: 10%B至60%B
- [0918] 47.5 -47.5 min: 60%B
- [0919] 47.5-48 min: 60%B至100%B
- [0920] 48-50 min: 100%B
- [0921] 50-53 min: 10%B。
- [0922] 合并纯的部分,用1N盐酸将pH调节至1.5,在Phenomenex, Gemini, 5 μ , C18, 110 Å, 250x30 cm柱上使用以下洗脱剂和梯度脱盐:
- [0923] 流速: 20 ml/min'
- [0924] 洗脱剂:A:水中的0.1%三氟乙酸
- [0925] B:乙腈中的0.1%三氟乙酸
- [0926] 梯度: 0-7.5 min: 0%B,
- [0927] 7.5-27.5 min: 0%B至 60%B,
- [0928] 27.5 -32.5 min: 60%B
- [0929] 32.5-38 min: 60%B至100%B
- [0930] 38-40 min: 100%B
- [0931] 40-43 min: 10%B。
- [0932] 合并包含胰岛素的部分,冻干,得到全长人胰岛素类似物。
- [0933] 将其溶解在冰冷的0.1N氢氧化钠(10 mg/ml)中,静置1小时,在室温30分钟。然后用1N盐酸将Ph调节至2.5,使用Phenomenex, Gemini, 5 μ , C18, 110 Å, 250x30 cm柱并使用以下洗脱剂和梯度通过HPLC纯化胰岛素:
- [0934] 流速: 20 ml/min'
- [0935] 洗脱剂:A: 水中的0.1%三氟乙酸 TFA iCH₃CN
- [0936] B: 乙腈中的0.1%三氟乙酸
- [0937] 梯度: 0-7.5 min: 25%B,
- [0938] 7.5-47.5 min: 25%B 至 55%B,
- [0939] 47.5 -52.5 min: 55%B
- [0940] 52.5-57.5 min: 55%B 至 100%B
- [0941] 57.5-60 min: 100%B。
- [0942] 最后冻干纯的部分。
- [0943] 或者,使用J. Markussen:Human Insulin by Tryptic Transpeptidation of Porcine Insulin and Biosynthetic P公开的方法制备这些类似物。
- [0944] 方法1. 用C18反相HPLC柱通过Alliance HPLC系统(Waters, Milford, MA)分析胰岛素类似物。采用磷酸盐/硫酸盐缓冲液中乙腈的线性梯度实现胰岛素类似物的分离。
- [0945] 柱: ODDMS 120Å, 5 μ m, YMC 4x125 mm, FeF Chemicals
- [0946] 流速: 1ml/min
- [0947] 缓冲液A: 7.8% (w/v)乙腈, 2.84% (w/v)硫酸钠, 0.46% (w/v)磷酸, 0.13%

(w/v)乙醇胺

[0948] 缓冲液B: 水中的43.8% (w/w)乙腈

[0949] 梯度: 20 min内20% B至50% B, 5 min内50% B至80%

[0950] 温度: 50℃。

[0951] 方法2: LC-MS仪器由Acquity UPLC系统(Waters, Milford, MA)和Synapt G2质谱仪(Waters, Milford, MA)组成。将胰岛素类似物应用到C18反相HPLC柱,并使用0.05%三氟乙酸中乙腈的线性梯度进行分析。将来自HPLC的流直接应用于以正MS的唯一模式(in the positive MS only mode)操作的Synapt G2的电喷雾界面,毛细管电位为2500 V,源温度为110℃,去溶剂化温度为250℃,圆锥气流速(N_2)为50 L/h。每秒两次获得 $m/z=100$ 至 $m/z=3000$ 的MS谱。分析之前通过NaI的标准混合物校准仪器,在LC-MS分析期间应用亮氨酸脑啡肽的锁喷雾(lock spray)。使用MaxEnt3算法通过BioPharmaLynx 1.2 (Waters, Milford, MA)重构完整的胰岛素质量。可以使用Orbitrap XL质谱仪(Thermo Fisher)代替Synapt G2。以正MS模式操作Orbitrap仪器,源电压为4 kV,源电流为100 μ A,鞘气流为40,辅助气流为10,扫除气流为5,毛细管电压为20 V。在调整仪器的最佳性能期间调整所有MS参数,这些参数可能与上面给出的那些有轻微偏离。通过这种方法获得的质量准确度优于10 ppm。

[0952] 柱: Acquity BEH C18 1x150 mm, 1.7 μ m (Waters)

[0953] 流速: 0.1 ml/min

[0954] 缓冲液A:0.02% (v/v)或0.05% (v/v) TFA

[0955] 缓冲液B:乙腈中的0.02% (v/v)或0.04% (v/v) TFA

[0956] 梯度: 5% B持续2 min;在12 min 内5%B至50%B, 在1 min内50%B至90%B

[0957] UV检测: 215 nm。

[0958] 方法3:使用10%TFA溶液将包含胰岛素类似物的酵母培养物上清液酸化并点样至包含HCCA基质点的PAC384 MALDI板(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)上。使用磷酸铵/0.1%TFA结束溶液(finishing solution)将每个点洗涤两次。使用以线性正模式操作的Autoflex ToF/ToF MALDI质谱仪(Bruker)分析样品并使用自制的胰岛素类似物的混合物进行校准。这种方法允许在完整的胰岛素类似物的范围内(5000–6000 Da)的平均质量分辨率。

[0959] 下面每个实施例给出的结果表示多次测量和/或单次测量的一些情况中的平均值。在一些情况下,自从提交首次优先权申请以来已经进行了额外的测量,这可以导致平均值的调整,这解释了在本申请的不同版本中稍微不同的值。

[0960] 实施例1通用方法(A):

[0961] A10C, A21G, B3C, B28E, desB30人胰岛素

[0962] 方法2: RT=10.1min;理论质量=5654.43Da;测定质量=5654.46Da。

[0963] 实施例2, 通用方法(A):

[0964] A10C, A21G, B4C, B28E, desB30人胰岛素

[0965] 方法2: RT=10.1min; 理论质量=5640.42Da; 测定质量=5640.44Da。

[0966] 实施例3, 通用方法(A):

[0967] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素

[0968] 方法2: RT=10min; 理论质量=5654.43Da; 测定质量=5654.47Da。

- [0969] 实施例4, 通用方法(A):
- [0970] A10C, B2C, B3E, desB30人胰岛素
- [0971] 方法2: RT=10.3min; 理论质量=5709.44Da; 测定质量=5709.46Da。
- [0972] 实施例5, 通用方法(A):
- [0973] A10C, B3T, B4C, desB30人胰岛素
- [0974] 方法2: RT=10.2min; 理论质量=5652.45Da; 测定质量=5652.48Da。
- [0975] 实施例6, 通用方法(A):
- [0976] A10C, B3V, B4C, desB30人胰岛素
- [0977] 方法2: RT=10.4min; 理论质量=5650.48Da; 测定质量=5650.49Da。
- [0978] 实施例7, 通用方法(A):
- [0979] A10C, B3Q, B4C, desB30人胰岛素。
- [0980] 实施例8, 通用方法(A):
- [0981] A10C, A21G, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0982] 方法2: RT=10min; 理论质量=5655.42Da; 测定质量=5655.43Da。
- [0983] 实施例9, 通用方法(A):
- [0984] A10C, A21G, B3E, B4C, B22E, B28E, desB30人胰岛素。
- [0985] 实施例10, 通用方法(A):
- [0986] A10C, A21G, B3E, B4C, desB24, B28E, desB30人胰岛素。
- [0987] 实施例11, 通用方法(A):
- [0988] A10C, A21G, B3E, B4C, desB27, B28E, desB30人胰岛素
- [0989] 方法2: RT=10min; 理论质量=5554.37Da; 测定质量=5554.39Da。
- [0990] 实施例12, 通用方法(A):
- [0991] A10C, B2C, B28D, desB30人胰岛素。
- [0992] 实施例13, 通用方法(A):
- [0993] A10C, B1C, B28D, desB30人胰岛素。
- [0994] 实施例14, 通用方法(A):
- [0995] A10C, A21G, B3K, B4C, B28E, desB30人胰岛素
- [0996] 方法2: RT=9.8min; 理论质量=5654.47Da; 测定质量=5654.48Da。
- [0997] 实施例15, 通用方法(A):
- [0998] A10C, A21G, desB1, B3Q, B4C, B28E, desB30人胰岛素。
- [0999] 实施例16, 通用方法(A):
- [1000] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, B28E, desB30人胰岛素。
- [1001] 实施例17, 通用方法(A):
- [1002] A10C, A21G, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素。
- [1003] 实施例18, 通用方法(A):
- [1004] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, B28E, desB30人胰岛素。
- [1005] 实施例19, 通用方法(A):
- [1006] A10C, A21G, desB1, B3C, B28E, desB30人胰岛素。
- [1007] 实施例20, 通用方法(A):

- [1008] A10C, A21G, B2C, B3E, desB27, B28E, desB30人胰岛素。
- [1009] 实施例21, 通用方法(A):
- [1010] A10C, A21G, desB1, B2C, B3E, desB27, B28E, desB30人胰岛素
- [1011] 方法2: RT=10min; 理论质量=5436.29Da; 测定质量=5436.31Da。
- [1012] 实施例22, 通用方法(A):
- [1013] A10C, A21G, desB1, B3E, B4C, desB27, B28E, desB30人胰岛素
- [1014] 方法2: RT=9.9min; 理论质量=5407.3Da; 测定质量=5407.33Da。
- [1015] 实施例23, 通用方法(A):
- [1016] A10C, A21G, B3C, desB27, B28E, desB30人胰岛素。
- [1017] 实施例24, 通用方法(A):
- [1018] A10C, A21G, desB1, B3C, desB27, B28E, desB30人胰岛素
- [1019] 方法2: RT=9.9min; 理论质量=5406.32Da; 测定质量=5406.33Da。
- [1020] 实施例25, 通用方法(A):
- [1021] A10C, A21G, desB1, B3C, B27E, desB30人胰岛素。
- [1022] 实施例26, 通用方法(A):
- [1023] A10C, A21G, B1G, B3C, B27E, desB30人胰岛素。
- [1024] 实施例27, 通用方法(A):
- [1025] A10C, A21G, B1G, B3E, B4C, B27E, desB30人胰岛素。
- [1026] 实施例28, 通用方法(A):
- [1027] A10C, A22K, B3C, desB27, desB30人胰岛素
- [1028] 方法2: RT=9.6min; 理论质量=5734.52Da; 测定质量=5734.52Da。
- [1029] 实施例29, 通用方法(A):
- [1030] A10C, B2C, B3A, desB30人胰岛素。
- [1031] 实施例30, 通用方法(A):
- [1032] A10C, B2C, B3R, desB30人胰岛素。
- [1033] 实施例31, 通用方法(A):
- [1034] A10C, B2C, B3D, desB30人胰岛素。
- [1035] 实施例32, 通用方法(A):
- [1036] A10C, B2C, B3Q, desB30人胰岛素。
- [1037] 实施例33, 通用方法(A):
- [1038] A10C, B2C, B3G, desB30人胰岛素。
- [1039] 实施例34, 通用方法(A):
- [1040] A10C, B2C, B3H, desB30人胰岛素。
- [1041] 实施例35, 通用方法(A):
- [1042] A10C, B2C, B3I, desB30人胰岛素。
- [1043] 实施例36, 通用方法(A):
- [1044] A10C, B2C, B3L, desB30人胰岛素。
- [1045] 实施例37, 通用方法(A):
- [1046] A10C, B2C, B3K, desB30人胰岛素。

- [1047] 实施例38, 通用方法(A):
- [1048] A10C, B2C, B3M, desB30人胰岛素。
- [1049] 实施例39, 通用方法(A):
- [1050] A10C, B2C, B3F, desB30人胰岛素。
- [1051] 实施例40, 通用方法(A):
- [1052] A10C, B2C, B3P, desB30人胰岛素。
- [1053] 实施例41, 通用方法(A):
- [1054] A10C, B2C, B3S, desB30人胰岛素。
- [1055] 实施例42, 通用方法(A):
- [1056] A10C, B2C, B3T, desB30人胰岛素。
- [1057] 实施例43, 通用方法(A):
- [1058] A10C, B2C, B3W, desB30人胰岛素。
- [1059] 实施例44, 通用方法(A):
- [1060] A10C, B2C, B3Y, desB30人胰岛素。
- [1061] 实施例45, 通用方法(A):
- [1062] A10C, B2C, B3V, desB30人胰岛素。
- [1063] 实施例46, 通用方法(A):
- [1064] A10C, B3R, B4C, desB30人胰岛素。
- [1065] 实施例47, 通用方法(A):
- [1066] A10C, B3D, B4C, desB30人胰岛素。
- [1067] 实施例48, 通用方法(A):
- [1068] A10C, B3G, B4C, desB30人胰岛素。
- [1069] 实施例49, 通用方法(A):
- [1070] A10C, B3H, B4C, desB30人胰岛素。
- [1071] 实施例50, 通用方法(A):
- [1072] A10C, B3K, B4C, desB30人胰岛素。
- [1073] 实施例51, 通用方法(A):
- [1074] A10C, B3P, B4C, desB30人胰岛素。
- [1075] 实施例52, 通用方法(A):
- [1076] A10C, B3S, B4C, desB30人胰岛素。
- [1077] 实施例53, 通用方法(A):
- [1078] A10C, B3Y, B4C, desB30人胰岛素。
- [1079] 实施例54, 通用方法(A):
- [1080] A8H, A14E, A21C, B25H, B26C, desB30人胰岛素。
- [1081] 实施例55, 通用方法(A):
- [1082] A10C, A14E, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [1083] 方法2: RT=9.2min; 理论质量=5621.42Da; 测定质量=5621.44Da。
- [1084] 实施例56, 通用方法(A):
- [1085] A10C, A14E, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素

- [1086] 方法2: RT=9.1min; 理论质量=5520.37Da; 测定质量=5520.39Da。
- [1087] 实施例57, 通用方法(A):
- [1088] A10C, A14E, B4C, B25N, B27E, desB30人胰岛素。
- [1089] 实施例58, 通用方法(A):
- [1090] A10C, A14E, B4C, B25N, desB27, desB30人胰岛素。
- [1091] 实施例59, 通用方法(A):
- [1092] A10C, A14E, B4C, B25A, desB30人胰岛素。
- [1093] 实施例60, 通用方法(A):
- [1094] A10C, B4C, B28D, desB30人胰岛素
- [1095] 方法2: RT=10min; 理论质量=5683.42Da; 测定质量=5684.46Da。
- [1096] 实施例61, 通用方法(A):
- [1097] A10C, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [1098] 方法2: RT=9.3min; 理论质量=5655.44Da; 测定质量=5655.46Da。
- [1099] 实施例62, 通用方法(A):
- [1100] A10C, A14E, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [1101] 方法2: RT=9.2min; 理论质量=5635.44Da; 测定质量=5635.47Da。
- [1102] 实施例63, 通用方法(A):
- [1103] A10C, B3C, B25H, desB30人胰岛素
- [1104] 方法2: RT=9.3min; 理论质量=5669.46Da; 测定质量=5669.49Da。
- [1105] 实施例64, 通用方法(A):
- [1106] A21C, B10E, B25C, desB30人胰岛素
- [1107] 方法1: RT=18.4min
- [1108] 方法3: 平均质量,理论值= 5641.5 Da , 测定值= 5642.6 Da。
- [1109] 实施例65, 通用方法(A):
- [1110] A8H, A21C, B10E, B25C, desB30人胰岛素
- [1111] 方法1: RT=17.4min
- [1112] 方法3: 平均质量,理论值= 5677.6 Da , 测定值= 5677.1 Da。
- [1113] 实施例66, 通用方法(A):
- [1114] A8H, A21C, B25C, desB30人胰岛素
- [1115] 方法1: RT=15.6min
- [1116] 方法3: 平均质量,理论值= 5685.6 Da , 测定值= 5684.8 Da。
- [1117] 实施例67, 通用方法(A):
- [1118] A10C, A14E, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素
- [1119] 方法2: RT=10min; 理论质量=5534.39Da; 测定质量=5534.41Da。
- [1120] 实施例68, 通用方法(A):
- [1121] A10C, B3C, B25H, desB27, desB30人胰岛素。
- [1122] 实施例69, 通用方法(A):
- [1123] A10C, A21G, B3Q, B4C, B28D, desB30人胰岛素。
- [1124] 实施例70, 通用方法(A):

- [1125] A10C, B4C, B25H, desB27, desB30人胰岛素。
- [1126] 实施例71, 通用方法(A):
- [1127] A10C, A14E, desB1, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [1128] 方法2: RT=9min; 理论质量=5474.35Da; 测定质量=5474.37Da。
- [1129] 实施例72, 通用方法(A):
- [1130] A10C, A14E, B4C, B25H, B28E, desB30人胰岛素
- [1131] 方法2: RT=9.1min; 理论质量=5653.41Da; 测定质量=5653.44Da。
- [1132] 实施例73, 通用方法(A):
- [1133] A10C, A14H, B4C, B25H, desB30人胰岛素
- [1134] 方法2: RT=9min; 理论质量=5629.44Da; 测定质量=5629.46Da。
- [1135] 实施例74, 通用方法(A):
- [1136] A10C, A14E, B2C, B25H, desB30人胰岛素
- [1137] 方法2: RT=9.4min; 理论质量=5650.41Da; 测定质量=5650.43Da。
- [1138] 实施例75, 通用方法(A):
- [1139] A10C, A14E, B1C, B25H, desB30人胰岛素
- [1140] 方法2: RT=9.6min; 理论质量=5602.41Da; 测定质量=5602.43Da。
- [1141] 实施例76, 通用方法(A):
- [1142] A10C, A21G, B4C, desB30人胰岛素。
- [1143] 实施例77, 通用方法(A):
- [1144] A8H, A21C, B10E, B26C, desB30人胰岛素
- [1145] 方法1: RT=21.9min
- [1146] 方法3: 平均质量,理论值= 5661.6 Da , 测定值= 5662.3 Da。
- [1147] 实施例78, 通用方法(A):
- [1148] A21C, B10E, B26C, desB30人胰岛素
- [1149] 方法1: RT=22.2min。
- [1150] 实施例79, 通用方法(A):
- [1151] A8H, A21C, B26C, desB30人胰岛素
- [1152] 方法1: RT=19.5min。
- [1153] 实施例80, 通用方法(A):
- [1154] A10C, A14E, B4C, B16H, B25H, desB30人胰岛素。
- [1155] 实施例81, 通用方法(A):
- [1156] A10C, A14E, B3C, B16H, B25H, desB30人胰岛素
- [1157] 方法2: RT=8.6min; 理论质量=5609.43Da; 测定质量=5609.45Da。
- [1158] 实施例82, 通用方法(A):
- [1159] A10C, A14E, B2C, B16H, B25H, desB30人胰岛素。
- [1160] 实施例83, 通用方法(A):
- [1161] A10C, A14E, B1C, B16H, B25H, desB30人胰岛素。
- [1162] 实施例84, 通用方法(A):
- [1163] A10C, A14E, B2C, B25A, desB30人胰岛素。

[1164] 实施例85, 通用方法(A):

[1165] A10C, B4C, B28D人胰岛素

[1166] 方法2: RT=10min; 理论质量=5784.47Da; 测定质量=5784.49Da。

[1167] 实施例86, 通用方法(A):

[1168] A10C, A14E, B3C, desB27, desB30人胰岛素

[1169] 方法2: RT=10min; 理论质量=5544.4Da; 测定质量=5544.43Da。

[1170] 实施例87 选择的本发明胰岛素的胰岛素受体亲和力:

[1171] 胰岛素受体结合试验(对溶解的胰岛素受体)

[1172] 用闪烁近似测定法(SPA)测定本发明的胰岛素类似物对于人胰岛素受体的亲和力(根据Glendorf等.(2008), Biochemistry, 47, 4743-4751)。使用通过麦胚凝集素纯化从幼仓鼠肾(BHK)细胞(该细胞用包含人IR-A和IR-B插入物的pZem载体稳定转染)半纯化的溶解的人IR(holoreceptor)在Eppendorf epMotion 5075机器人上在96-孔板(聚苯乙烯 Optiplate-96, PerkinElmer)中进行竞争性结合实验。通过进行包含胰岛素类似物的酵母上清液和人胰岛素标准品的稀释系列(8次稀释, 每份5倍, 第一次稀释43倍)而开始测定。将由重悬在结合缓冲液中的SPA珠子(SPA PVT Antibody-Binding Beads, Anti-Mouse Reagent Cat. No. RPNQ0017, GE Healthcare), 抗-IR单克隆小鼠抗体(83-7), 溶解的人IR(hIR-A或hIR-B)和 $[^{125}\text{I}]$ A14Tyr-标记的胰岛素组成的试剂混合物加入适当样品的系列稀释物。 $[^{125}\text{I}]$ A14Tyr-标记的胰岛素的最终浓度为7.5 pM, 缓冲液由100 mM HEPES (pH 7.8), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄和0.025% (v/v) Tween 20组成。将板在室温轻轻振荡地孵育24小时, 2000rpm离心2分钟, 3分钟/孔在TopCount NXT中计数。根据四参数逻辑模型(Vølund, A., (1978), Biometrics, 34, 357-365.)分析来自SPA的数据, 胰岛素类似物的亲和力相对于人胰岛素的亲和力表示。

[1173] 单克隆mIR抗体的制备

[1174] 通过单克隆技术生产特异性抗体(F12或83-7): 通过皮下注射50 μg FCA中的纯化的mIR并随后两次注射20 μg FIA中的mIR而免疫RBF小鼠。用25 μg mIR静脉内增强高应答的小鼠, 3天后收获脾脏。用骨髓瘤Fox细胞系融合脾细胞(Köhler, G & Milstein C. (1976), European J. Immunology, 6:511-19; Taggart RT等(1983), Science 219: 1228-30)。在mIR特异性ELISA中筛选上清液的抗体产生。克隆阳性孔并在Western印迹中检测。

[1175] 本发明胰岛素类似物的胰岛素受体亲和力:

[1176]

来自实施例#的胰岛素类似物	相对于人胰岛素受体 A 的亲和力 (% HI)
1	32.9
2	135.0
3	32.4
4	120.9
5	49.7
6	2.9
7	39.6
8	50.7
9	3.4
10	35.0
11	23.7
12	116.8
13	48.6
14	67.1
15	39.3
16	37.6
17	80.0
18	67.5
19	29.5
20	49.7
21	69.3
22	20.1
23	20.0
24	17.8
25	29.2
26	24.3
27	24.3
29	109.3
30	95.3
31	107.2
32	115.0
33	123.9
34	96.5
35	37.3
36	72.1
37	42.9
38	78.1
39	75.5
40	37.4
41	136.7

[1177]

来自实施例#的胰岛素类似物	相对于人胰岛素受体 A 的亲和力 (% HI)
42	95.9
43	49.6
44	45.4
45	62.9
46	61.0
47	151.7
48	117.7
49	73.1
50	156.5
51	104.6
52	119.3
53	11.5
54	.4
55	37.8
56	44.3
57	7.3
58	12.7
59	7.2
60	160.4
61	52.0
62	11.4
63	14.5
64	21.3
65	86.2
66	12.1
67	10.7
68	14.2
69	32.0
70	57.9
71	36.4
72	42.3
73	46.6
74	37.1
75	13.2
76	102.5
77	55.7
78	10.0
79	4.8
80	16.0
81	4.0
82	12.0
83	3.2

[1178]

来自实施例#的胰岛素类似物	相对于人胰岛素受体 A 的亲和力 (% HI)
84	6.6
85	203.6
86	44.8
A14E, B25H, desB30 人胰岛素 (现有技术)	25.0
A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素 (现有技术)	5.4

[1179] 实施例88使用十二指肠腔酶使胰岛素类似物降解:

[1180] 采用来自SPD大鼠的十二指肠腔酶(通过过滤十二指肠腔内容物制备)使胰岛素类似物降解。

[1181] 该测定由机器人(Gilson液体处理站)在96孔板(2ml)中进行,其中16孔用于胰岛素类似物和标准品。37℃时在100 mM Hepes, pH=7.4中胰岛素类似物~15 μ M与十二指肠酶孵育,在1, 15, 30, 60, 120和240 min后取样并通过加入TFA使反应淬灭。通过RP-HPLC确定各时间点的完整胰岛素类似物的浓度。通过数据的指数拟合确定降解半衰期(例如,单一的指数式衰减,2个参数,Sigma Plot版本11,Systat软件)并归一到各测定中参照胰岛素或人胰岛素的测定的半衰期。按照胰岛素类似物在大鼠十二指肠中的降解半衰期除以相同试验中参照胰岛素的降解半衰期给出结果(相对降解速率)。

[1182]

来自实施例#的 胰岛素类似物	相对于人胰岛素的十 二指肠降解稳定性
1	1.5
2	1.7
3	2.2
4	2.2
5	2.2
6	1.1
11	14.3
14	2.8
21	8.8
22	5.0
24	9.4
54	20.9
55	53.6
56	>100
60	3.9
61	9.4
62	68.2
63	7.0
67	>100
71	81.4
72	74.8
73	13.2
74	15.4
75	6.6
81	52.8
85	2.2
86	>100
A14E, B25H, desB30 人胰岛素 (现有技术)	11
A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素 (现有技术)	10

[1183] 实施例89熔点测定

[1184] 差示扫描量热法(DSC)。

[1185] 使用VP-DSC差示扫描微量热仪(MicroCal, LLC, Northampton, MA)进行数据收集。在参照室中以1 °C/min的扫描速率从10 °C至110 °C和0.21 MPa的超压用2 mM磷酸盐缓冲液进行所有的蛋白扫描(~200 mM胰岛素类似物)。在临使用前,将所有样品和参照脱气。在浓度归一化之前,从每次样品扫描中减去缓冲液-缓冲液参照。

[1186] DSC数据如图1中所示。

[1187] 实施例90原纤化趋势的测定

[1188] 硫磺素T(ThT)原纤化测定的通用方法:

[1189] 原理:

[1190] 肽的低物理稳定性可以导致淀粉样原纤维的形成,这被观察为样品中非常有序的、线状大分子结构,最终导致凝胶的形成。这在传统上通过目视检查样品而测定。然而,这种测定是非常主观的,取决于观察者。因此,小分子指示探针的应用要优选得多。硫磺素T(ThT)是这种探针,当结合原纤维时具有独特的荧光信号(Naiki等. Anal. Biochem. 177, 244-249, 1989; Le-Vine, Methods Enzymol. 309, 274-284, 1999)。原纤维形成的时程可以通过以下列表示的S形曲线来描述(Nielsen等. Biochemistry 40, 6036-6046, 2001):

[1191]
$$F = f_i + m_f t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}}$$
 方程(1)

[1192] 在这里,F是在时间t的ThT荧光。常数 t_0 是达到最大荧光的50%所需要的时间。描述原纤维形成的两个重要参数是通过 $t_0-2\tau$ 计算的滞后时间(lag-time)和表观速率常数 $k_{app}=1/\tau$ 。

[1193] 提示肽的部分折叠中间体的形成是原纤化的一般开始机制。那些中间体中的一些成核(nucleate)而形成模板,在该模板上进一步的中间体可以装配,原纤化进行。滞后时间对应间隔,在该间隔中,建立核的临界量(critical mass),表观速率常数是原纤维本身形成的速率。

[1194] 样品制备:

[1195] 每次测定之前新鲜制备样品。每种类似物溶解在7 mM磷酸钠,pH=7.4中。将硫磺素T加入来自水中的储存溶液的样品中至1 μ M的终浓度。将200 μ l样品等份置于96孔微量滴定板(Packard Optiplate™-96, 白色聚苯乙烯)中。通常将每份样品的4份重复(对应于一个测试条件)置于一列孔中。用Scotch Pad (Qiagen)密封该板。

[1196] 孵育和荧光测定:

[1197] 在Fluoroskan Ascent FL或Varioskan荧光板检测仪(thermo Labsystems)中进行在给定温度的孵育,振荡和ThT荧光发射的测定。将温度调节至37℃。在所有给出的数据中,将轨道振荡调整至960 rpm,幅度为1 mm。使用通过444 nm过滤器的激发和通过485nm过滤器的发射测定进行荧光测定。

[1198] 通过在测定温度将板孵育10分钟而开始每次运行。每20分钟测定板,通常持续45小时。每次测定之间,如上所述振荡并加热该板。

[1199] 数据处理:

[1200] 以Microsoft Excel格式保存测定数据点用于进一步处理,使用GraphPad Prism进行曲线绘制及拟合。在原纤维不存在的情况下来自ThT的背景发射是可以忽略的。数据点典型地是四份样品的平均值。只有在相同的实验(即在相同板上的样品)中获得的数据表示在相同的图中,确保一次测定中个别样品之间的原纤化的相对量度,而不是不同的测定之间的比较。

[1201] 可以将数据组拟合至方程(1)。然而,因为在测定时间期间通常没有获得完整的S形曲线,将原纤化的程度表示为在各个时间点计算为四份样品的平均值并以标准偏差显示的ThT荧光。

[1202] 人胰岛素(现有技术)的典型的滞后时间为<2h。

[1203]

来自实施例#的 胰岛素类似物	0 h	2 h	20 h	45 h
人胰岛素 (现有技术)	28±1	1567±46	1780±40	1732±48
1	31 ± 0.1	25.4 ± 1	24.5 ± 0.8	26.2 ± 1.1
2	32.2 ± 0.8	24.2 ± 1.4	25.5 ± 1.2	27.2 ± 2.8
3	20.7 ± 0.5	18.2 ± 0.6	19.2 ± 0.8	19.8 ± 1
4	16.6 ± 0.1	16.7 ± 0.1	16.9 ± 0.1	16.9 ± 0.2
5	17.6 ± 0.2	17.8 ± 0.2	17.9 ± 0.1	17.9 ± 0.1
6	17.3 ± 0.3	17.4 ± 0.3	17.6 ± 0.4	17.6 ± 0.3
8	34.1±1.2	27.2±2.5	22.4±3.3	20.6±3.3
28	35.8 ± 0.9	29.4 ± 1	27.6 ± 0.8	25 ± 0.7
55	32.5 ± 1.3	31 ± 0.6	29.4 ± 0.4	27.2 ± 0.3
56	67.1 ± 1.2	65.7 ± 3.3	65.8 ± 6.7	68.7 ± 7.8
60	29 ± 1	23.9 ± 0.5	23.6 ± 2.5	24.6 ± 3.2
61	26.2 ± 0.6	22.3 ± 0.3	26.1 ± 0.2	26.5 ± 0.4
62	26.9 ± 1	24.1 ± 0.5	23.6 ± 0.4	25.4 ± 0.7
63	32.8 ± 0.1	30.7 ± 0.2	30 ± 0.2	31 ± 0.2
67	37.2 ± 0.7	25.9 ± 1.1	24.1 ± 2.7	22.4 ± 2.8
71	30.2±0.6	20.9±0.8	21±0.8	20.1±0.8
72	31.6±1.1	23.4±0.9	22.3±0.7	21.3±0.8
73	35.4±0.6	24.8±0.4	22.9±0.4	21.5±0.4
74	30.5±0.5	24.7±0.3	23.9±0.2	22.8±0.4
75	28.8±1.1	22±0.6	19.9±0.6	18.3±0.7
81	26.6 ± 1.4	20.9 ± 0.2	19.3 ± 0.8	19.2 ± 0.3
85	28.4±0.8	22.8±0.4	23±0.3	22.5±0.3
86	29.1 ± 0.9	21.6 ± 0.3	21.4 ± 0.7	20.4 ± 0.6

[1204] 显而易见的是,在ThT测定中测试原纤化倾向的本发明的胰岛素都没有显示作为时间的函数的增加的荧光(的不存在)所见的任何原纤化的迹象。这是非常不寻常的,这强调了本发明的类似物的实用性。

[1205] 原纤化倾向如图2中所示。

[1206] 实施例91本本发明的胰岛素类似物的化学稳定性:

[1207] 在2 mM磷酸盐, pH=7.5中在37℃孵育胰岛素类似物最长达8周后评价胰岛素类似物的化学稳定性。在0,2,4和任选的8周后通过SEC HPLC分析测定高分子量产物(HMWP)的形成。SEC方法的结果表示为在37℃和5℃时HMWP形成之间的差异,开始样品作为在215nm处的总吸光度的百分比。在0,2,4和任选的8周后通过RP HPLC分析测定化学降解产物。RP方法的结果表示为在37℃和5℃时观察到的化学降解之间的差异,开始样品作为在215nm处的总吸光度的百分比。

[1208] SEC-HPLC方法:

[1209] 溶剂: 500 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 5 mM H₃PO₄, 50% (v/v) 2-异丙醇

[1210] 流速: 0.5 ml/min

[1211] 运行时间: 30min

[1212] UV检测: 215nm

- [1213] 柱： 来自Waters的胰岛素HMWP柱7.8x300mm
- [1214] 温度： 50℃
- [1215] RP-HPLC方法：
- [1216] 溶剂 A： 0.09M磷酸盐缓冲液 pH 3.6（磷酸氢二铵）,10% MeCN（v/v）
- [1217] 溶剂 B： 80% MeCN（v/v%）
- [1218] 流速： 0.3 ml/min
- [1219] 运行时间： 33 min
- [1220] UV检测： 215 nm
- [1221] 柱： Waters Acquity BEH130 C18柱 1.7 μm, 150x2.1mm
- [1222] 温度： 50℃
- [1223] 梯度：
- [1224]

时间,min	流速,ml/min	%A	%B
0	0.3	95	5
2	0.3	95	5
25	0.3	45	55
27	0.3	20	80
28	0.3	20	80
29	0.3	95	5
33	0.3	95	5

来自实施例#的 胰岛素类似物	化学降解(%) (4周 37℃ - 0周 5℃)	HMWP 形成(%) (4周 37℃ - 0周 5℃)
		* (8周 37℃ - 0周 5℃) 给出值
1	6.8	0.8
2	19.0	3.6
3	3.6	1.5
4	23.5	19.2
5	4.0	2.7
6	3.0	1.2
8	9.7	2.0
11	8.8	0.5
14	5.5	4.3
21	78.5	33.5
22	19.4	4.8
24	12.5	1.6
55	11.9	0.7 [#]
56	9.8	1.6
60	18.7	15.1
61	4.6	2.7
62	2.4	0.1 [#]
63	4.1	1.2
67	2.4	1.2
71	14.1	0.7
72	9.3	1.0
73	8.2	3.0
74	36.0	7.6 [#]
75	60.9	40.0 [#]
81	1.9	1.2
85	10.2	16.3
86	2.5	0.6
B28D 人胰岛素 (现有技术)	22.3	2.9

[1226] 可以得出结论,具有至B3的二硫键的类似物通常比具有至B4的二硫键的类似物更稳定,具有至B2或B1的二硫键的类似物稳定性更差。

[1227] 实施例92,本发明的胰岛素类似物的疏水性:

[1228] 通过在等强度条件下运行的反相HPLC发现胰岛素类似物的疏水性。在相同条件下将胰岛素类似物的洗脱时间与人胰岛素(本文中称为HI)或具有已知亲水性的另一种类似物的洗脱时间相比较。如 $k'_{rel_{\text{衍生物}}} = ((t_{\text{衍生物}} - t_0) / (t_{\text{参照}} - t_0)) * k'_{rel_{\text{参照}}}$ 计算疏水性 k'_{rel} 。使用HI作为参照: $k'_{rel_{\text{参照}}} = k'_{rel_{\text{HI}}} = 1$ 。通过注射5 μ l 0.1 mM NaNO₃测定HPLC系统的空白时间(void time) t_0 。运行条件:

[1229] 柱: Lichrosorb RP-C18, 5 μ m, 4 x 250 mm

[1230] 缓冲液A: 0.1 M磷酸钠pH 7.3, 10体积% CH₃CN

[1231] 缓冲液B: 50 体积% CH₃CN

[1232] 注射体积: 5 μ l

[1233] 运行时间： 最多60 分钟。

[1234] 运行初始梯度后,选择用于运行类似物和参照 (例如HI)的等强度水平,在上述方
程中使用在等强度条件下所述类似物和参照的洗脱时间来计算 k'_{rel} 衍生物。

来自实施例#的胰岛素类似物	k'_{rel} (人胰岛素)
1	0.0627
2	0.0489
3	0.0349
4	0.0467
5	0.1090
6	0.1620
8	0.0136
11	0.0103
14	0.0668
21	0.0053
22	0.0046
24	0.0109
28	0.0810
60	0.0375
A14E, B25H, desB30 (现有技术)	0.0649
A14E, B16H, B25H, desB30 (现有技术)	0.0331

[1236] 实施例93,大鼠药代动力学,静脉内大鼠PK:

[1237] 以各种剂量将胰岛素类似物静脉内(i.v.)给药于麻醉大鼠并在给药后以4小时或更长的特定间隔使用免疫测定或质谱测定所用化合物的血浆浓度。随后用WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)计算药代动力学参数。

[1238] 使用称重为约200克的未禁食雄性Wistar大鼠(Taconic)。

[1239] 测量体重并随后用Hypnorm/多美康(Dormicum)(每种化合物分别在无菌水中以1:1 稀释,然后混合;在实验的当日新鲜制备)麻醉大鼠。使用2 ml/kg Hypnorm/Doricum混合物开始sc麻醉,然后以30 min间隔给予两次1 ml/kg sc维持剂量以及以45 min 间隔给予两次1 ml/kg sc维持剂量。如果需要,为了保持大鼠始终轻度麻醉,提供1-2 ml/kg sc的进一步剂量。在大鼠容纳室进行称重和初始麻醉以避免将动物从一个房间移到另一房间使它们紧张。

[1240] 实施例94, 血糖降低效果,静脉内大鼠PK:

[1241] 使用Hypnorm-多美康(0.081 mg/ml枸橼酸芬太尼和1.25 mg/ml咪达唑仑)将雄性饲养的Wistar大鼠(250-350 g)麻醉,2 ml/kg作为初次剂量(时间=-35 min),时间=测试物质给药前-5 min给予额外的1 ml/kg,然后每45分钟给予1 ml/kg(4次)。

[1242] 大鼠分为5组,以两次剂量(1.6 nmol/kg和3.6 nmol/kg)施用每组中被施用人胰岛素和胰岛素类似物的4-6只大鼠。在尾静脉中以媒介(5mM磷酸盐缓冲液,140 mM NaCl,70 ppm聚山梨酯20,pH 7.4)或胰岛素的静脉内注射(1 ml/kg)给药于动物。为了确定全血血糖浓度,在给药前和给药后的时间点,通过将尾尖的毛细血管进行穿刺,将血液样品收集在肝素化的10 μ l玻璃管中。在分析缓冲液(500 μ l)中稀释之后,通过固定化的葡萄糖氧化酶方法,采用Biosen自动分析仪(EKF Diagnostic, Germany),测定血糖浓度。

[1243] PD特征如图3中所示。

[1244] 实施例95,大鼠药代动力学,肠内注射后的大鼠PK:

[1245] 将胰岛素类似物肠内(到空肠)给药于麻醉的大鼠。给药后以4小时或更长的特定间隔测定所用化合物的血浆浓度及血糖变化。随后用WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)计算药代动力学参数。

[1246] 使用Hypnorm-多美康s.c.(0.079 mg/ml枸橼酸芬太尼,2.5 mg/ml氟阿尼酮和1.25 mg/ml咪达唑仑)将雄性Sprague-Dawley大鼠(Taconic)(称重250-350 g,禁食~18 h)麻醉,2 ml/kg作为初次剂量(测试物质给药前-60 min的时间点),20 min之后给予1 ml/kg,随后每40 min给予1 ml/kg。

[1247] 根据下列组成(以重量%)配制在肠内注射模型中待测试的胰岛素:

[1248] 45%丙二醇 (Merck)

[1249] 33% Capmul MCM C10 (Abitec)

[1250] 11% 泊洛沙姆407 (BASF)

[1251] 11% 超聚乙二醇3350 (Fluka)。

[1252] 从Capmul MCM C10, 泊洛沙姆407和PEG 3350均等地减去但不从丙二醇减去加入的胰岛素的量,以保持丙二醇的量独立于药物负载,恒定为45%。

[1253] 将麻醉的大鼠置于稳定在37℃的恒温垫上。用胰岛素制剂或媒介充满安装1 ml注射器的20 cm聚乙烯导管。在腹壁进行一个4-5 cm中线切口。通过穿过肠壁将导管从盲肠轻轻插入空肠中间~ 50 cm处。如果存在肠内内容物,将施用部位移动±10 cm。将导管尖头置于肠段的腔内约2 cm处并在不使用结扎的情况下将其固定。将肠小心地再次放入腹腔内并在各层中用自动夹封闭腹壁和皮肤。在时间0时,通过导管将0.4 ml/kg测试化合物或媒介给药于大鼠。

[1254] 为了确定全血血糖浓度,通过将尾尖的毛细血管进行穿刺,将血液样品收集在肝素化的10 µl 毛细管中。在500 µl分析缓冲液中稀释之后,通过葡萄糖氧化酶方法,采用Biosen自动分析仪(EKF Diagnostic GmbH, Germany)测定血糖浓度。对于每种化合物,得到平均血糖浓度进程(平均值±SEM)。

[1255] 收集样品以确定血浆胰岛素浓度。将100 µl血液样品吸入包含EDTA的冷管内。将样品保持在冰上直到离心(7000 rpm, 4℃, 5 min),将血浆移液到Micronic管中并在20℃冷冻直到测定。在认为对个别类似物合适或有效的免疫测定中测定胰岛素类似物的血浆浓度。

[1256] 在t=-10(仅对血糖), t=-1(临给药前)和给药后以4小时或更长的特定间隔收集血液样品。

[1257] 实施例96,相对于人胰岛素的本发明的胰岛素类似物的效力,静脉内稳态夹钳。

[1258] 将称重为238-383g的Sprague Dawley雄性大鼠在实验的当天用于夹钳实验。在可控的环境条件下,使大鼠自由接触饲料,并且禁食过夜(从3 pm),之后进行夹钳实验。

[1259] 实验方案:

[1260] 在进行外科手术之前,使大鼠在动物装置中适应至少1周。在夹钳实验之前约1周,在氟烷麻醉下,将Tygon导管插入到颈静脉(用于输注)和颈动脉(用于采血)中,并且在颈部背后外置并固定。外科手术后将Streptocilin vet.(Boehringer Ingelheim;0.15 ml/大

鼠,i.m.) 给予大鼠,在恢复期间将大鼠置于动物护理单元(25℃)中。为了获得镇痛,在麻醉期间施用Anorphin(0.06 mg/大鼠,s.c.),从麻醉中完全恢复(2-3小时)之后,施用Rimadyl(1.5 mg/kg,s.c.),再次每日施用一次,持续2天。

[1261] 在实验当天的7 am,将禁食过夜(从前一天的3 pm开始)的大鼠称重,并与取样注射器和输注系统(Harvard 22 Basic泵,Harvard,和Perfectum Hypodermic玻璃注射器,Aldrich)连接,然后放入独立的夹钳笼中,其中使它们休息约45 min,而后开始实验。在整个实验期间,大鼠能够自由地在其常见的寝具上移动,并且可以自由地接触饮用水。30 min基本时间(在此期间,以10 min间隔测量血浆葡萄糖水平)之后,将待测的胰岛素类似物和人胰岛素(每只大鼠一个剂量水平,每剂量水平n=6-7)以恒速输注(i.v.)300 min。为了达到血浆的快速稳态水平,任选地施用待测胰岛素类似物的初次大剂量输注。基于从i.v.大剂量药代动力学所获得的清除数据,药代动力学领域的技术人员可以计算初次大剂量输注的剂量。为了保持血糖正常(euglycemia),以10 min间隔全程测量血浆葡萄糖水平,并且相应地调节20%葡萄糖水溶液的输注。合并来自每只大鼠的重悬的红细胞样品,并且通过颈动脉导管返还约½ ml体积。

[1262] 在每次实验的当天,在夹钳实验之前和结束时,获取待测试的各胰岛素类似物溶液和人胰岛素溶液的样品,并通过HPLC验证肽的浓度。在该研究之前的相关时间点和结束时,测定大鼠胰岛素和C-肽以及待测试的胰岛素类似物和人胰岛素的血浆浓度。在实验结束时,使用过度剂量的戊巴比妥将大鼠处死。

[1263] 实施例97,大鼠脂肪细胞中的脂肪生成

[1264] 作为本发明的胰岛素体外效力的量度,可以使用脂肪生成。

[1265] 从附睾的脂肪垫(epididymale fat pads)分离原代大鼠脂肪细胞,在包含,例如,1 %无脂肪HAS以及或标准品(人胰岛素,HI)或本发明的胰岛素的缓冲液中与3H-葡萄糖孵育。以剂量依赖的方式将标记的葡萄糖转化为可提取的脂质,产生全剂量响应曲线。结果表示为本发明的胰岛素与标准品(HI)相比的具有95%置信区间的相对效力(%)。

来自实施例#的胰岛素类似物	脂肪生成(相对于HI的效力)
1	16.96
2	114.38
3	28.02
4	57.28
5	37.01
6	1.9
8	34.98
11	30.06
14	23.83
21	45.99
22	46.74
24	37.81
28	25.3
55	35.9
56	55.27
60	107.0
61	43.16
62	4.37
63	7.47
67	10.5
71	34.62
72	27.51
81	1.7
A14E, B25H, desB30 (现有技术)	29.3
A14E, B16H, B25H, desB30 (现有技术)	13.1

[1267] 对于大多数本发明的类似物,在获得的脂肪生成数据和胰岛素受体结合数据之间有非常好的一致性,因此验证了受体结合被翻译为受体激活。

[1268] 实施例98盐酸胍变性

[1269] 为了测定解折叠的自由能,可以根据圆二色性(CD)色谱法进行选择的包含二硫键的胰岛素类似物的盐酸胍变性。蛋白变性后,远UV范围(240-218-nm)内的负CD逐渐减小,与伴随蛋白解折叠的有序的二级结构的损失一致。人胰岛素的远UV CD谱对蛋白解折叠和自结合(self-association)都敏感(Holladay等, 1977 Biochim.Biophys.Acta 494, 245-254.; Melberg & Johnson, 1990, Biochim.Biophys.Acta 494, 245-254.)。为了在pH 8分开这些现象,在不同的蛋白浓度,例如,3、37和250 μ M进行GuHCl滴定。在这些浓度,胰岛素类似物主要作为单体,二聚体以及二聚体和更高的聚集体的混合物存在。在近UV范围(330-250-nm)内的胰岛素CD谱反映了具有来自二硫键的贡献的酪氨酸发色团的环境(Morris等, 1968, Biochim.Biophys. Acta. 160, 145-155.; Wood等, 1975, Biochim. Biophys. Acta. 160, 145-155.; Strickland & Mercola, 1976, Biochemistry 15,3875-3884.)。产生作为变性剂浓度的函数在近UV和远UV区的摩尔椭圆率(molar ellipticity)的变化的图。以前从用两种状态模型拟合的这种胰岛素变性曲线计算了解折叠的自由能(Kaarsholm, N.C.,等 1993 Biochemistry, 32, 10773-8)。

[1270] 通过UV吸收和/或RP-HPLC和/或SEC-HPLC测定蛋白浓度。通过用10mM Tris/C104-缓冲液, pH8.0组合不同比例的蛋白和GuHCl储存溶液而制备变性样品。蛋白储存溶液通常为10 mM Tris/C104-, pH 8.0中的1.5mM.GuHCl储存溶液为10 mM Tris/C104-, pH 8.0中的8.25 M(通过折光率确定)。在25℃记录所有的CD谱。从250至218 nm扫描远UV CD变性样品。典型的室通路长度和蛋白浓度分别为0.2 cm和37 pM。使用1-cm通路长度和典型地75 pM蛋白从330至250 nm扫描近UV CD变性样品。在减去适当的溶剂空白之前通过傅立叶变换算法平滑处理所有的谱。在远UV范围内, $\Delta\epsilon$ 基于肽键的摩尔浓度, 而在近UV内, 将 $\Delta\epsilon$ 归一化至胰岛素单体的摩尔浓度。

[1271] 通过假定折叠/解折叠转换是两种状态的而分析GuHCl变性曲线, 在这种情况下, 可以使用 $K = (\Delta\epsilon_N - \Delta\epsilon) / (\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_U)$ 在每个变性剂浓度获得平衡常数, 其中 $\Delta\epsilon$ 是CD的观察值, $\Delta\epsilon_N$ 和 $\Delta\epsilon_U$ 分别代表在给定的GuHCl浓度对于天然的和解折叠形式的CD值(Pace, C. N. (1975) CRC Crit. Rev. Biochem. 3, 1-43.)。通过将转换之前和之后的基线线性外推至转换区域而获得转换区域中在GuHCl 浓度的 $\Delta\epsilon_N$ 和 $\Delta\epsilon_U$ 值, 即, $\Delta\epsilon_N = \Delta\epsilon_N^0 + m_N$ [GuHCl]以及 $\Delta\epsilon_U = \Delta\epsilon_U^0 + m_U$ [GuHCl], 其中 $\Delta\epsilon_N^0$ 和 $\Delta\epsilon_U^0$ 分别是截距, m_N 和 m_U 分别是转换之前和之后的基线的斜率。通过 $\Delta G = -RT \ln K$ 给出转换区中在给定的变性剂浓度的解折叠的自由能。我们假设 ΔG 对变性剂浓度的线性依赖: $\Delta G = \Delta G_{H2O} - m$ [GuHCl], 其中 ΔG_{H2O} 是在变性剂不存在的情况下 ΔG 的值, m 是 ΔG 对变性剂浓度的依赖的量度。因此, 可以将转换区中从 K 衍生的 ΔG 值回推至0 M变性剂以得到 ΔG_{H2O} 。对于完全的解折叠曲线的 $\Delta\epsilon$ 和[GuHCl]之间的关系如方程1中所示(Santoro, M. M., & Bolen, D. W. (1988) Biochemistry 27,8063-8068.):

[1272]
$$\Delta\epsilon = \{(\Delta\epsilon_N^0 + m_N[\text{GuHCl}]) + (\Delta\epsilon_U^0 + m_U[\text{GuHCl}]) \exp[-(\Delta G_{H2O} - m[\text{GuHCl}])/RT]\} / \{(1 + \exp[-(\Delta G_{H2O} - m[\text{GuHCl}])/RT])\}$$

[1273] 以 $\Delta\epsilon$ 作为响应, [GuHCl]作为独立变量, 使用, 例如, PC SAS(SAS Inc., Cary, NC)的NLIN程序将这个方程进行非线性最小二乘方分析(nonlinear least-squares analysis)。然后六参数描述了变性曲线: $\Delta\epsilon_N^0$, $\Delta\epsilon_U^0$, m_N , m_U , m 和 ΔG_{H2O} 。此外, 通过 $\Delta G_{H2O}/m$ 给出变性曲线的中点的GuHCl浓度 C_{mid} 。然后从 $\Delta\Delta G_{H2O} = \Delta G_{H2O}(\text{突变型}) - \Delta G_{H2O}(\text{野生型})$ 计算人胰岛素和突变型胰岛素之间解折叠的自由能的差异。

[1274] 实施例99盐酸胍变性

[1275] 下面给出了结晶条件的例子, 然而, 对于不同类似物的确切条件是不同的, 可以通过筛选不同的条件发现最佳条件。通过坐滴气相扩散法(the sitting drop vapor diffusion method)从, 例如, 包含0.8 M K/Na酒石酸盐, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.5% PEG MME 5000的储存溶液获得晶体。使用配备MarCCD检测器的旋转阳极(Rigaku, MicroMax-007HF)收集数据并通过XDS (J Appl Crystallogr 26:795-800)处理。使用具有作为搜索模型的内部结构(in house structure)的Molrep (J Appl Crystallogr 30:1022-1025.)解析结构。使用程序Refmac (Acta Crystallogr D 53:240-255.)和Coot (Acta Crystallogr D 60:2126-2132.)进行数据精炼和模型建立。

[1276] 实施例100胰岛素的大小排阻色谱法分析

[1277] 柱 来自GE healthCare的superose 12, 10/300GL柱

[1278] 溶剂流速 在环境温度(22℃±1℃)时0.8 ml/min

- [1279] 运行缓冲液 140 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.7
- [1280] 运行时间 30 min
- [1281] 标准品 HSA (MW 66,5 kDa), 已知大小的胰岛素类似物
- [1282] 检测 276nm
- [1283] 样品 在中性PO4缓冲液中的0.6 mM胰岛素
- [1284] 注射体积 50 μ l
- [1285] 测定胰岛素类似物的保留时间。通过与已知结合特性的胰岛素类似物的比较确定胰岛素类似物的结合状态。鉴定具有成为单体的增强的趋势(形成二聚体的趋势最小)的胰岛素类似物。
- [1286] 实施例101近UV圆二色性
- [1287] 在不同浓度内(从 $\sim$ 1 μ M至 $\sim$ 10mM的范围内的至少5个浓度)对于给定的胰岛素类似物测定在276 nm处的近UV-CD谱。在276 nm处的摩尔椭圆率(molar ellipticity)的变化表明二聚体界面(dimer interface)的变化。通过与已知二聚化特性的胰岛素类似物的比较来评价胰岛素类似物的二聚体形成趋势是可能的。

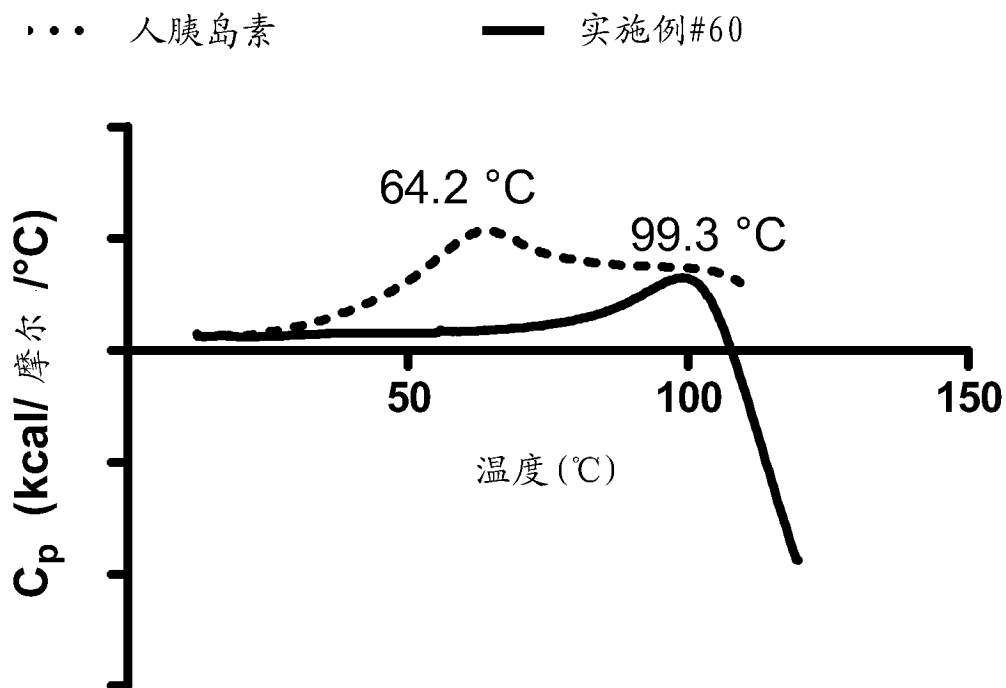


图 1

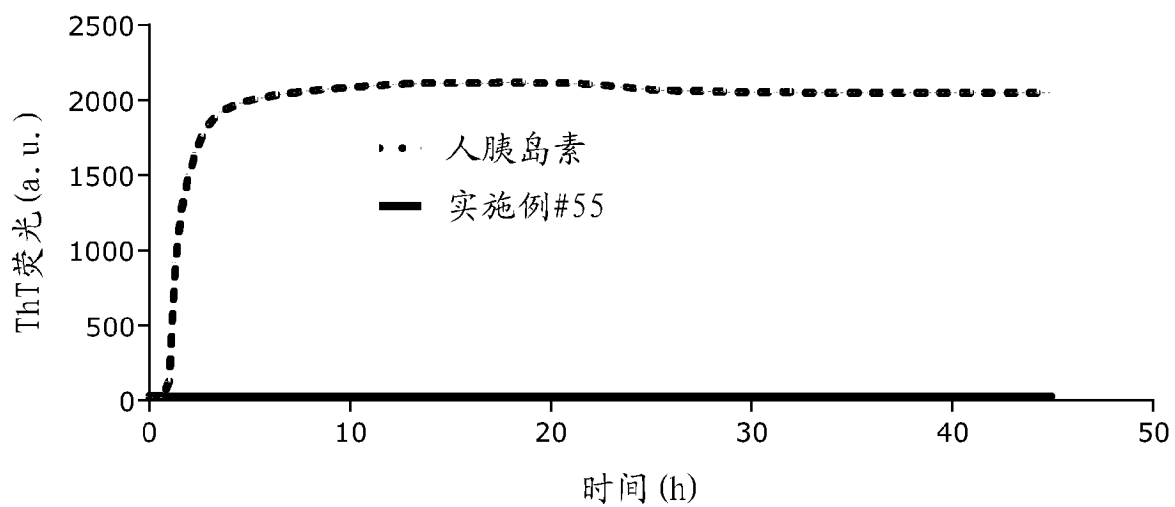


图 2

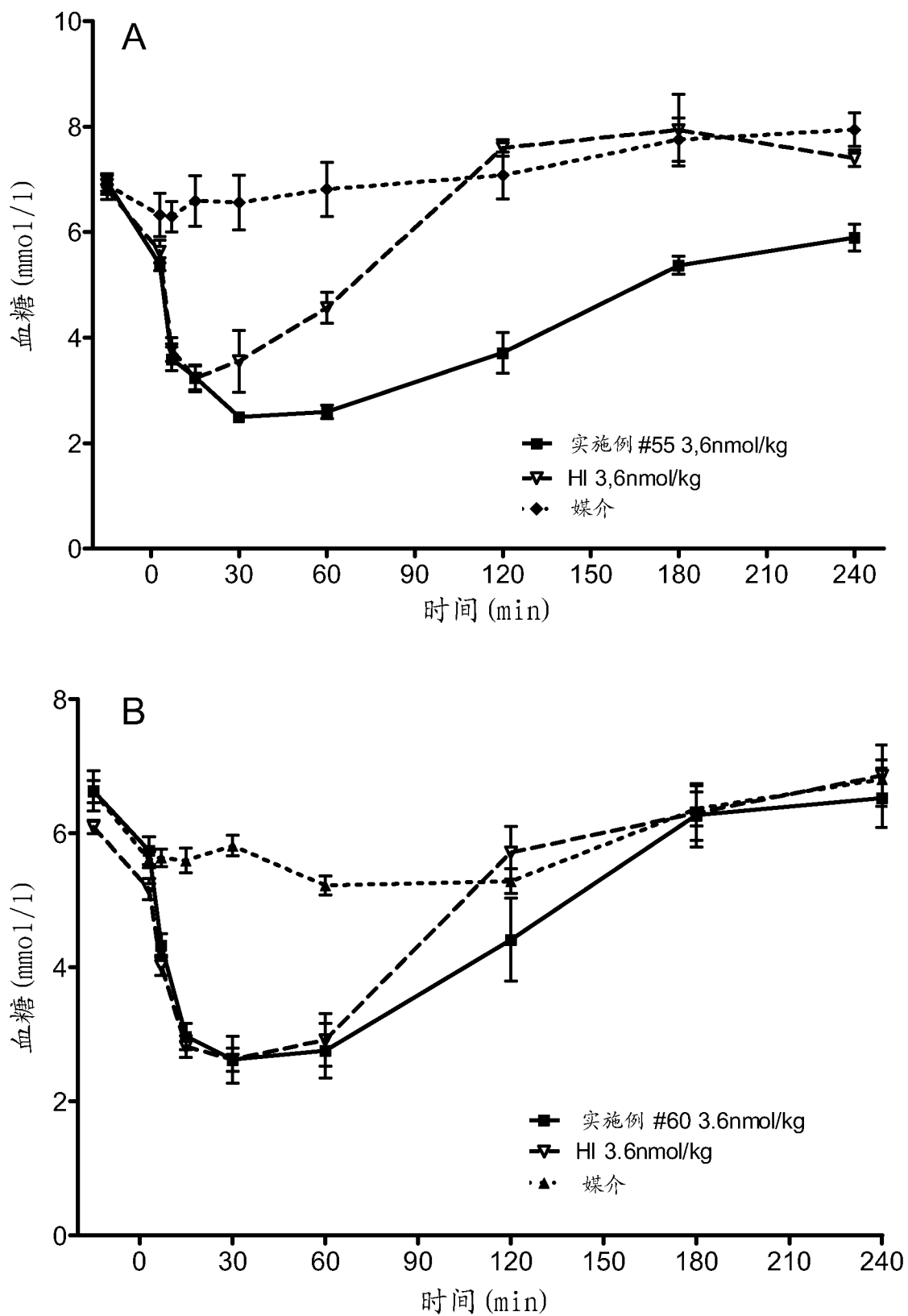


图 3