



(21)申請案號：108145067

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl.：

C07D213/82 (2006.01)**C07D239/22 (2006.01)****C07K14/62 (2006.01)****A61K31/44 (2006.01)****A61K31/505 (2006.01)****A61P3/10 (2006.01)**

(30)優先權：2018/12/11

歐洲專利局

18306657.0

2018/12/11

歐洲專利局

18306658.8

2018/12/11

歐洲專利局

18306659.6

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：曼德茲佩雷斯 瑪麗安 MENDEZ PEREZ, MARIA (ES)；拉克曼 尼爾斯

RACKELMANN, NILS (DE)；比利 勞倫特 BIALY, LAURENT (DE)；蓋斯雷根

史蒂芬 GUESSREGEN, STEFAN (DE)；威爾 馬丁 WILL, MARTIN (DE)；貝

姆 湯瑪士 BOEHME, THOMAS (DE)；維拉加雷亞 安娜 VILLAR GAREA, ANA

(ES)；科恩 馬庫斯 KORN, MARCUS HERMANN (DE)；貝塞尼烏斯 梅麗莎

BESENIUS, MELISSA (AU)；里德爾 詹森 RIEDEL, JENS (DE)；維爾納 烏爾

里希 WERNER, ULRICH (DE)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：8 共 230 頁

(54)名稱

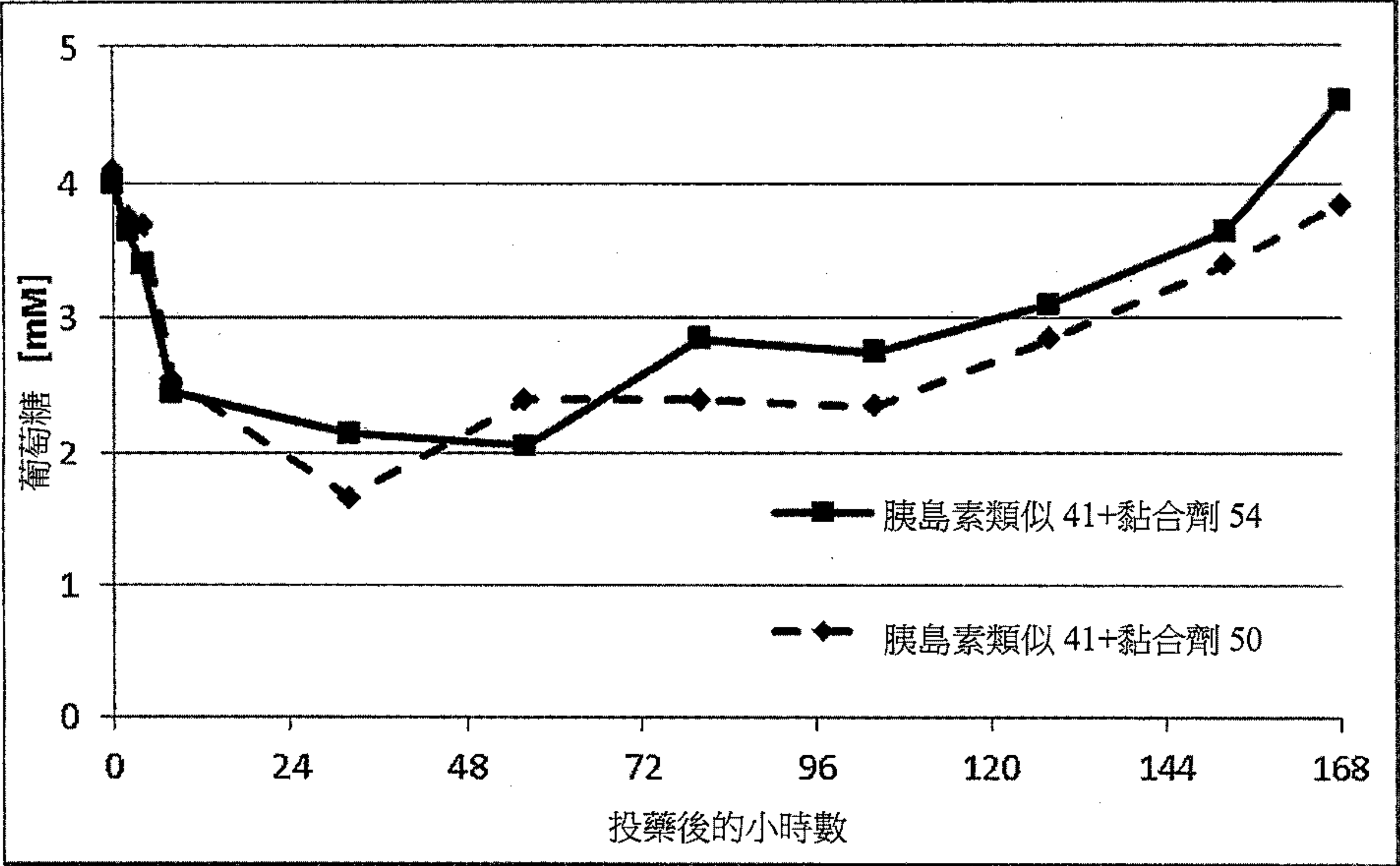
胰島素接合物

(57)摘要

本發明是有關包含式(I)之磺醯胺及活性醫藥成分(諸如相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物)的接合物，其中該胰島素類似物包含一個在位置 B16 處被疏水性胺基酸取代的突變及/或一個在位置 B25 處被疏水性胺基酸取代的突變。本發明進一步是有關式(A)的磺醯胺。此外，本發明是有關相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物。

The present invention relates to a conjugate comprising a sulfonamide of formula (I) and an active pharmaceutical ingredient such as an insulin analog comprising at least one mutation relative to the parent insulin, wherein the insulin analog comprises a mutation at position B16 which is substituted with a hydrophobic amino acid and/or a mutation at position B25 which is substituted with a hydrophobic amino acid. The present invention further relates to a sulfonamide of formula (A). Moreover, the present invention relates to an insulin analog comprising at least one mutation relative to the parent insulin.

指定代表圖：



【圖1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 胰島素接合物

【英文發明名稱】 INSULIN CONJUGATES

【中文】

本發明是有關包含式(I)之磺醯胺及活性醫藥成分(諸如相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物)的接合物，其中該胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。本發明進一步是有關式(A)的磺醯胺。此外，本發明是有關相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物。

【英文】

The present invention relates to a conjugate comprising a sulfonamide of formula (I) and an active pharmaceutical ingredient such as an insulin analog comprising at least one mutation relative to the parent insulin, wherein the insulin analog comprises a mutation at position B16 which is substituted with a hydrophobic amino acid and/or a mutation at position B25 which is substituted with a hydrophobic amino acid. The present invention further relates to a sulfonamide of formula (A). Moreover, the present invention relates to an insulin analog comprising at least one mutation relative to the parent insulin.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 胰島素接合物

【英文發明名稱】 INSULIN CONJUGATES

【技術領域】

【0001】 本文提供包含式(I)之磺醯胺及活性醫藥成分(諸如相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物)的接合物，其中胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。本文進一步提供式(A)磺醯胺及相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物，其中胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。

【先前技術】

【0002】 在全世界，超過4億人罹患第1型或第2型糖尿病。第1型糖尿病是用胰島素取代予以治療。與第1型糖尿病相反，在第2型糖尿病中基本上沒有胰島素缺乏症，但是在很多情況下，尤其是在晚期時，使用胰島素治療第2型糖尿病患者。

【0003】 在健康的人體內，由胰臟釋放的胰島素與血糖濃度密切相關。血糖水平升高(諸如發生在飯後)，並藉由胰島素分泌對應增加而迅速得到抵銷。在禁食狀態下，血漿胰島素水平下降至足以確保將葡萄糖持續供應給胰島素敏感性器官和組織並在夜間保持低水平肝葡萄糖生成的基礎值。通常，藉由外源性(主要是皮下投藥)胰島素來取代內源性胰島素分泌並不能達到生理調節上述血糖的特質。血糖可能出現向上或向下的偏離，最嚴重的形式可能危及生命。要由此

衍生出一種經過改善的糖尿病治療方法，其主要旨在將血糖盡可能維持接近在生理範圍內。

【0004】 人類胰島素是一個具有51個胺基酸的多肽，分為2個胺基酸鏈：具有21個胺基酸之A鏈，及具有30個胺基酸之B鏈。兩條鏈是藉著2個二硫橋接而彼此連接。在A鏈的位置6和11處的半胱胺酸之間存在第三個二硫橋接。目前用於治療糖尿病的一些產品含有為胰島素類似物，即其序列與人類胰島素序列在A鏈中及/或在B鏈中有一或多個胺基酸取代差異的胰島素變異體。

【0005】 像許多其他肽激素一樣，人類胰島素在活體內的半衰期很短。故而要經常施用，這與患者的不適有關。因此，期望具有活體內半衰期增長並因此延長作用持續時間的胰島素類似物。

【0006】 目前有不同方法用以延長胰島素的半衰期。

【0007】 一種方法是基於在低pH下開發可溶性配方，但是相對於天然胰島素在生理pH下的溶解度降低。透過將兩個精胺酸添加至B鏈的C端來增加胰島素類似物的等電點。添加兩個精胺酸加上在A21處的甘胺酸取代(甘精胰島素(insulin glargine))提供具有更長作用持續時間的胰島素。在注射到皮下部位後，於鋅的存在下胰島素類似物沉澱並緩慢溶解，造成甘精胰島素持續存在。

【0008】 WO 2016/006963揭示與人類胰島素相比，胰島素受體媒介的廓清率降低的胰島素類似物。

【0009】 WO 2018/056764揭示與人類胰島素相比，胰島素受體媒介的廓清率降低的胰島素類似物。

【0010】 WO 2008/034881揭示對蛋白酶穩定(protease stabilized)的胰島素類似物。

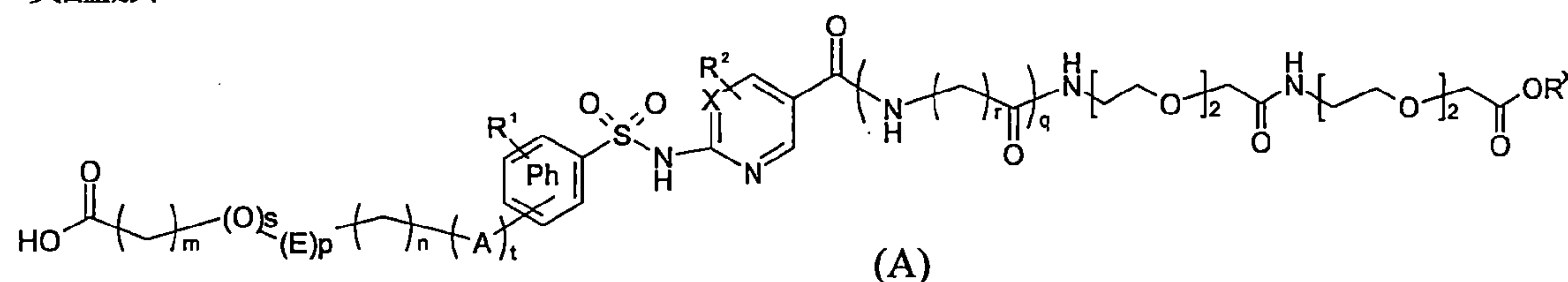
【0011】 在另一種方法中，長鏈脂肪酸基團與胰島素之LysB29的 ϵ 胺基基團接合。這個基團的存在允許胰島素透過非共價可逆結合來與血清白蛋白附

接。因此，這個胰島素類似物相對於人類胰島素具有顯著延長的時間-作用曲線(參見例如Mayer et al., Inc. Biopolymers (Pept Sci) 88: 687-713, 2007；或WO 2009/115469)。

【發明內容】

【0012】 本文提供了長效胰島素類似物。所提供的長效胰島素類似物具有非常低的結合親和力(因此廓清率較低)，同時仍保持了高度信號轉導。胰島素類似物描述於以下A段中。

【0013】 本文提供了血清白蛋白結合部分(在本文中也稱為「白蛋白黏合劑」或「黏合劑」)，當其與肽(諸如上文提供的胰島素類似物)偶接時，導致該肽的藥效學及/或藥動學性質獲得改善，例如在血液及/或血漿中的藥動學半衰期延長及/或作用曲線延長，即血糖水平持續降低。所提供的白蛋白黏合劑是式(A)磺醯胺



【0014】 血清白蛋白結合部分描述於以下B段中。

【0015】 本文還提供了包含活性醫藥成分(諸如在A段中定義的胰島素類似物)和胰島素黏合劑(諸如B段中定義的式(A)磺醯胺)的接合物。接合物描述於以下C段中。

【圖式簡單說明】

【0016】

圖1顯示分別在(哥廷根(Göttingen))小型豬(12-18 kg, n=3)中, s.c.施用胰島素類似物41與黏合劑no. 50和黏合劑 no. 54的接合物後的降血糖效用。兩種化合物均以(18 nmol/kg)的劑量進行測試。

圖2顯示分別在(哥廷根)小型豬(19-20 kg, n=3)中, s.c.施用胰島素與胰島素接合物後的降血糖效用: 人類胰島素+黏合劑no. 5 (18 nmol/kg)、人類胰島素(3 nmol/kg)、胰島素類似物41+黏合劑no. 5 (18 nmol/kg)、胰島素類似物41 (3 nmol/kg)。

圖3顯示皮下投與胰島素接合物1至5 (參見實例10中的表7)後的血糖水平[相對於安慰劑的%]。

圖4顯示胰島素接合物1至5 (參見實例10中的表7)的正規化血漿濃度[ng/ml]-時間[h]曲線。

圖5顯示胰島素接合物No. 1 (更多細節參見實例10)。A鏈的序列(SEQ ID NO: 47)和B鏈的序列(SEQ ID NO: 48)以三字母代碼表示, 但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合到黏合劑(經由離胺酸殘基的 ϵ 胺基酸)。

圖6顯示胰島素接合物No. 2 (更多細節參見實例10)。A鏈的序列(SEQ ID NO: 47)和B鏈的序列(SEQ ID NO: 48)以三字母代碼表示, 但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合到黏合劑(經由離胺酸殘基的 ϵ 胺基酸)。

圖7顯示胰島素接合物No. 3 (更多細節參見實例10)。A鏈的序列(SEQ ID NO: 77)和B鏈的序列(SEQ ID NO: 78)以三字母代碼表示, 但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合到黏合劑(經由離胺酸殘基的 ϵ 胺基酸)。

圖8顯示胰島素接合物No. 4 (更多細節參見實例10)。A鏈的序列(SEQ ID NO：43)和B鏈的序列(SEQ ID NO：44)以三字母代碼表示，但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合到黏合劑(經由離胺酸殘基的 ϵ 胺基酸)。

【實施方式】

A段：胰島素類似物

【0017】 為了增加藥物作用的持續時間，半衰期扮演重要的角色。半衰期($t_{1/2}$)與分佈體積除以廓清率成正比。在人類胰島素的情況下，廓清率主要受到與胰島素受體的結合、內化和隨後的降解所驅使。

【0018】 因此，需要具有胰島素受體結合活性降低，並因而受體媒介的廓清率降低，但是具有信號轉導活性(其允許充分降低活體內血糖水平)的胰島素類似物。

【0019】 出乎意料地，在構成本發明之研究的上下文中，於人類胰島素的位置B16及/或B25處用疏水性胺基酸(諸如白胺酸、異白胺酸、纈胺酸，丙胺酸與色胺酸)取代會導致胰島素受體結合活性降低(如與親本胰島素的胰島素受體結合活性相比，參見實例)。觀察到用支鏈胺基酸(白胺酸、異白胺酸及纈胺酸)取代對於胰島素受體結合活性的影響最為強烈。有趣的是，在這些位置處(諸如在位置B25處)帶有這些取代的胰島素類似物顯示出比依據其胰島素受體同功型B (IR-B)結合親和力所預期的信號傳導增強多達6倍(參見實例)。此外，所測試的一些胰島素類似物顯示出對抗 α -胰凝乳蛋白酶，組織蛋白酶D和胰島素降解酶的蛋白水解穩定性獲得改善(參見實例)。

【0020】 因此，本文提供相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物，其中胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變，及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。

【0021】 如本文所用，詞句「胰島素類似物」是指一種肽，其具有在形式上可能衍生自天然胰島素(在本文中被稱為「親本胰島素」，例如人類胰島素)之結構的分子結構，相差在於天然胰島素中出現至少一個胺基酸殘基缺失及/或取代，及/或添加至少一個胺基酸殘基。添加及/或交換的胺基酸殘基可能是可編碼胺基酸殘基或其他天然殘基或純合成胺基酸殘基。如本文所指的類似物能夠在活體內(諸如在人類個體體內)降低血糖水平。

【0022】 在一些具體例中，本文提供的胰島素類似物包含兩條肽鏈，A鏈和B鏈。通常，兩條鏈是藉由半胱胺酸殘基之間的二硫橋接而連接。例如，在一些具體例中，本文提供的胰島素類似物包含三個二硫橋接：一個二硫橋接在位置A6和A11處的半胱胺酸之間，一個二硫橋接在A鏈的位置A7處的半胱胺酸和在B鏈的位置B7處的半胱胺酸之間，以及一個二硫橋接在A鏈的位置A20處的半胱胺酸和B鏈的位置B19處的半胱胺酸之間。因此，本文提供的胰島素類似物可在位置A6、A7、A11、A20，B7和B19處包含半胱胺酸殘基。

【0023】 在本文提供的一些具體例中，胰島素類似物是單鏈胰島素。單鏈胰島素是單條多肽鏈，其中胰島素B鏈是經由未裂解的連接肽與胰島素A鏈連續地連接。

【0024】 胰島素的突變(即親本胰島素的突變)在本文中是藉由鏈(即類似物的A鏈或B鏈)，在A鏈或B鏈中的突變胺基酸殘基位置(諸如A14，B16和B25)，以及取代親本胰島素之天然胺基酸之胺基酸的三個字母代碼來表示。術語「desB30」係指相對於親本胰島素缺少B30胺基酸的類似物(即，不存在位置B30處的胺基酸)。例如，Glu(A14)Ile(B16)desB30人類胰島素是人類胰島素的類似

物，其中人類胰島素A鏈的位置14處的胺基酸殘基(A14)被麩胺酸取代，B鏈的位置16處的殘基(B16)被異白胺酸取代，B鏈的位置30處的胺基酸缺失(即不存在)。

【0025】 本文提供的胰島素類似物相對於親本胰島素包含至少一個突變(胺基酸的取代，缺失或添加)。如本文所用，術語「至少一個」是指一或超過一個，例如「至少兩個」、「至少三個」、「至少四個」、「至少五個」等。在一些具體例中，本文提供的胰島素類似物包含至少一個在B鏈中的突變，以及至少一個在A鏈中的突變。在另一個具體例中，本文提供的胰島素類似物包含至少兩個在B鏈中的突變，以及至少一個在A鏈中的突變。例如，胰島素類似物可包含在位置B16處的取代，在位置B30處的缺失及在位置A14處的取代。或者，胰島素類似物可包含在位置B25處的取代，在位置B30處的缺失和在位置A14處的取代。此外，胰島素類似物可包含在位置B16處的取代、在位置B25處的取代，在位置B30處的缺失及在位置A14處的取代。

【0026】 除了上述突變外，本文提供的胰島素類似物還可包含突變。在一些具體例中，突變數目不超過某個數目。在一些具體例中，胰島素類似物相對於親本胰島素包含少於十二個突變(即缺失、取代、添加)。在另一個具體例中，該類似物相對於親本胰島素包含少於十個突變。在另一個具體例中，該類似物相對於親本胰島素包含少於八個突變。在另一個具體例中，該類似物相對於親本胰島素包含少於七個突變。在另一個具體例中，該類似物相對於親本胰島素包含少於六個突變。在另一個具體例中，該類似物相對於親本胰島素包含少於五個突變。在另一個具體例中，該類似物相對於親本胰島素包含少於四個突變。在另一個具體例中，該類似物相對於親本胰島素包含少於三個突變。

【0027】 如本文所用，詞句「親本胰島素」是指天然胰島素，即未經突變的野生型胰島素。在一些具體例中，親本胰島素是動物胰島素，諸如哺乳動物胰島素。例如，親本胰島素可以是人類胰島素，豬胰島素或牛胰島素。

【0028】 在一些具體例中，親本胰島素是人類胰島素。人類胰島素的序列是本技藝中眾所周知的，並顯示在實例段的表4中。人類胰島素包含具有如SEQ ID NO：1中所示之胺基酸序列(GIVEQCCTSI~~C~~SLYQLENYCN)的A鏈，以及具有如 SEQ ID NO：2 中 所 示 之 胺 基 酸 序 列 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT)的B鏈。

【0029】 在另一個具體例中，親本胰島素是牛胰島素。牛胰島素的序列是本技藝中眾所周知的。牛胰島素包含具有如SEQ ID NO：81中所示之胺基酸序列(GIVEQCCASVCSLYQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：82中所示之胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVC-GERGFFYTPKA)的B鏈。

【0030】 在另一個具體例中，親本胰島素是豬胰島素。豬胰島素的序列是本技藝中眾所周知的。豬胰島素包含具有如SEQ ID NO：83中所示之胺基酸序列(GIVEQCCTSI~~C~~SLYQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：84中所示之胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFFYTPKA)的B鏈。

【0031】 人類，牛和豬胰島素包含三個二硫橋接：一個在位置A6和A11處的半胱胺酸之間，一個在A鏈的位置A7處的半胱胺酸和B鏈的位置B7處的半胱胺酸之間，以及一個在A鏈的位置A20處的半胱胺酸和B鏈的位置B19處的半胱胺酸之間。

【0032】 與對應親本胰島素(例如人類胰島素)的胰島素受體結合親和力相比，本文提供的胰島素類似物之胰島素受體結合親和力降低。

【0033】 胰島素受體可以是任何哺乳動物胰島素受體，例如牛，豬或人類胰島素受體。在一些具體例中，胰島素受體是人類胰島素受體，例如人類胰島素受體同功型A或人類胰島素受體同功型B (其使用於實例段中)。

【0034】 有利的是，與人類胰島素對人類胰島素受體的結合親和力相比，本文提供的人類胰島素類似物對人類胰島素受體的結合親和力明顯降低(參見實

例)。因此，該等胰島素類似物具有非常低的廓清率，即非常低的胰島素受體媒介的廓清率。

【0035】 在一些具體例中，與其親本胰島素相比，胰島素類似物對相應胰島素受體具有(即表現出)小於20%的結合親和力。在另一個具體例中，與其親本胰島素相比，本文提供的胰島素類似物對相應胰島素受體具有小於10%的結合親和力。在另一個具體例中，與其親本胰島素相比，本文提供的胰島素類似物對相應胰島素受體具有小於5%的結合親和力，諸如與其親本胰島素相比具有小於3%的結合親和力。例如，與其親本胰島素相比，本文提供的胰島素類似物對相應的胰島素受體可具有0.1%至10%之間，諸如0.3%至5%之間的結合親和力。同樣地，與其親本胰島素相比，本文提供的胰島素類似物對相應胰島素受體可具有0.5%至3%之間，諸如0.5%至2%之間的結合親和力。

【0036】 測定胰島素類似物對胰島素受體之結合親和力的方法是本技藝中眾所周知的。例如，胰島素受體結合親和力可以透過基於評估經[125I]標記的親本胰島素(諸如經[125I]標記的人類胰島素)與(未經標記的)胰島素類似物競爭結合至胰島素受體的閃爍接近分析來測定。胰島素受體可以存在於過度表現重組胰島素受體的細胞的(例如CHO (中國倉鼠卵巢)細胞)的細胞膜中。在一個具體例中，如實例段中所述來測定胰島素受體結合親和力。

【0037】 天然胰島素或胰島素類似物結合至胰島素受體會活化胰島素信號傳導路徑。胰島素受體具有酪胺酸激酶活性。胰島素結合至其受體誘發了構型改變，從而刺激酪胺酸殘基上的受體自磷酸化。胰島素受體的自磷酸化刺激了受體的酪胺酸激酶對涉及信號轉導的細胞內受質的活性。胰島素受體因為胰島素類似物而起的自磷酸化因而被認為是由該類似物引起的信號轉導的量度。

【0038】 對實例段表4中的胰島素類似物進行自磷酸化分析。有趣的是，基於胰島素受體結合親和力，在位置B16和B25處具有脂族取代的胰島素類似物

引起比預期還高的胰島素受體自磷酸化。因此，本文提供的胰島素類似物具有低結合活性，並因而具有較低的受體媒介的廓清率，但是仍然能夠引起相對高的信號轉導。因此，本文提供的胰島素類似物可以用作為長效胰島素。在一些具體例中，相對於親本胰島素(例如人類胰島素)，本文提供的胰島素類似物能夠引起1至10% (諸如2至8%)的胰島素受體自磷酸化。此外，在一些具體例中，相對於親本胰島素(諸如人類胰島素)，本文提供的胰島素類似物能夠引起3至7% (諸如5至7%)的胰島素受體自磷酸化。可以如實例段中所述測定相對於親本胰島素的胰島素受體自身磷酸化。

【0039】 對本文提供的胰島素類似物進行蛋白酶穩定性分析。如表6中所示，與人類胰島素相比，本文提供的胰島素類似物對至少一些測試的蛋白酶具有更高的穩定性。觀察到對 α -胰凝乳蛋白酶，組織蛋白酶D和胰島素降解酶(IDE)的蛋白水解穩定性有所增進。因此，本文提供的胰島素類似物通常是蛋白水解穩定性胰島素類似物。因此，相對於親本胰島素，它們受到蛋白酶降解較慢。在一些具體例中，與親本胰島素相比，本文提供的胰島素類似物經穩定化以抵抗 α -胰凝乳蛋白酶，組織蛋白酶D和胰島素降解酶(IDE)的降解。

【0040】 如上文所述，與親本胰島素相比，胰島素類似物包含至少一個突變。

【0041】 在一些具體例中，本文提供的胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變。因此，在位置B16處的胺基酸(人類，牛和豬胰島素中的酪胺酸)被疏水性胺基酸置換。

【0042】 在另一個具體例中，本文提供的胰島素類似物包含一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。因此，在位置B25處的胺基酸(人類，牛和豬胰島素中的苯丙胺酸)被疏水性胺基酸置換。

【0043】 在另一個具體例中，本文提供的胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變，以及一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。

【0044】 疏水性胺基酸可以是任何疏水性胺基酸。例如，疏水性胺基酸可以是脂族胺基酸，諸如支鏈胺基酸。

【0045】 在本文提供之胰島素類似物的一些具體例中，用於在位置B16及/或B25處取代的疏水性胺基酸是異白胺酸、纈胺酸、白胺酸、丙胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、脯胺酸、甘胺酸，苯丙胺酸或酪胺酸(或前述胺基酸的衍生物)。

【0046】 幾個親本胰島素(諸如人類，牛和豬的胰島素)包含在位置B16處的酪胺酸，以及在位置B25處的苯丙胺酸。因此，親本胰島素在位置B16處的胺基酸可以被異白胺酸、纈胺酸、白胺酸、丙胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、脯胺酸，甘胺酸或苯丙胺酸(或上述胺基酸的衍生物)取代。此外，親本胰島素在位置B25處的胺基酸可以被異白胺酸、纈胺酸、白胺酸、丙胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、脯胺酸，甘胺酸或酪胺酸(或上述胺基酸的衍生物)取代。

【0047】 前述胺基酸的衍生物是本技藝中已知的。

【0048】 白胺酸的衍生物包括，但不限於同-白胺酸和三級白胺酸。因此，在位置B16及/或B25處的胺基酸可以被同-白胺酸或三級白胺酸取代。

【0049】 纈胺酸的衍生物是，例如，3-乙基正纈胺酸。因此，在位置B16及/或B25處的胺基酸可以被3-乙基正纈胺酸取代。

【0050】 甘胺酸的衍生物包括，但不限於環己基-甘胺酸、環丙基甘胺酸和三氟乙基甘胺酸。

【0051】 丙胺酸的衍生物包括，但不限於 β -第三丁基丙胺酸、環丁基丙胺酸，環丙基丙胺酸和同環己基丙胺酸。

【0052】 在一些具體例中，用於在位置B16及/或B25處取代的疏水性胺基酸是異白胺酸、纈胺酸、白胺酸，丙胺酸或色胺酸。

【0053】 在一些具體例中，脂族胺基酸不是丙胺酸。因此，用於在位置B16及/或B25處取代的疏水性胺基酸可以是異白胺酸、纈胺酸，白胺酸或色胺酸。

【0054】 在一些具體例中，用於在位置B16及/或B25處取代的疏水性胺基酸是異白胺酸，纈胺酸或白胺酸。

【0055】 在一些具體例中，本文所提及的胺基酸是L-胺基酸(諸如L-異白胺酸、L-纈胺酸或L-白胺酸)。因此，用於例如在位置B16，B25及/或A14處取代的胺基酸(或其衍生物)通常是L-胺基酸。

【0056】 在一些具體例中，疏水性胺基酸是脂族胺基酸。因此，本文提供的胰島素類似物包含一個在位置B16處被脂族胺基酸取代的突變，以及一個在位置B25處被脂族胺基酸取代的突變(以及視情況，包括但不限於Des(B30)和Glu(A14)之其他突變)。

【0057】 脂族胺基酸是包含脂族側鏈官能基的非極性胺基酸和疏水性胺基酸。疏水性隨著烴鏈上的碳原子數目增加而增加。脂族的疏水性的量度是依據Kyte和Doolittle標度的疏水性指數，其例如可以如Kyte J. *et al.* Journal of Molecular Biology. 1982 157 (1): 105-32所揭示般進行測定。在一些具體例中，脂族胺基酸是疏水性指數(依據Kyte和Doolittle標度)大於2.0 (諸如大於3.0或大於3.5)的脂族胺基酸。

【0058】 脂族胺基酸包括，但不限於異白胺酸、纈胺酸、白胺酸，丙胺酸和甘胺酸。例如，脂族胺基酸可以是選自異白胺酸、纈胺酸，白胺酸和甘胺酸的胺基酸，例如選自異白胺酸，纈胺酸和白胺酸的胺基酸。

【0059】 異白胺酸，纈胺酸和白胺酸是支鏈胺基酸(縮寫為BCAA)。因此，脂族胺基酸可以是支鏈胺基酸。在一些具體例中，本文提供的胰島素類似物包

含一個在位置B16處被支鏈胺基酸取代的突變，以及一個在位置B25處被支鏈胺基酸取代的突變(以及視情況，包括但不限於Des(B30)和Glu(A14)之其他突變)。

【0060】 BCAA是諸如異白胺酸，纈胺酸和白胺酸的胺基酸，是具有非線性脂族側鏈的胺基酸，即支鏈胺基酸是具有帶有支鏈之脂族側鏈的胺基酸(中心碳原子與三個或更多碳原子連結)。

【0061】 支鏈胺基酸可以是蛋白BCAA (即在轉譯期間透過生物合成方式併入蛋白質的胺基酸)，也可以是非蛋白BCAA (即在任何生物體的遺傳密碼子中非天然編碼或未被發現過的胺基酸)。例如，蛋白BCAA是白胺酸，異白胺酸和纈胺酸。因此，疏水性/脂族胺基酸支鏈胺基酸可以是白胺酸，異白胺酸或纈胺酸(或白胺酸，異白胺酸或纈胺酸的衍生物，諸如如上所示的白胺酸或纈胺酸的衍生物)。

【0062】 在一些具體例中，支鏈胺基酸是異白胺酸。在一些具體例中，支鏈胺基酸是纈胺酸。在一些具體例中，支鏈胺基酸是白胺酸。

【0063】 除了如上所述在位置B16處的突變及/或在位置B25處的突變之外，本文提供的胰島素類似物可相對於親本胰島素包含更多突變。

【0064】 例如，胰島素類似物可進一步包含一個在位置A14處的突變。已知此類突變會增加蛋白酶穩定性(參見例如WO 2008/034881)。在一些具體例中，在位置A14處的胺基酸被麩胺酸(Glu)取代。在一些具體例中，在位置A14處的胺基酸被天冬胺酸(Asp)取代。在一些具體例中，在位置A14處的胺基酸被組胺酸(His)取代。

【0065】 此外，本文提供的胰島素類似物可包含一個在位置B30處的突變。在一些具體例中，在位置B30處的突變是親本胰島素在位置B30處的蘇胺酸缺失(也稱為Des(B30)突變)。

【0066】 此外，本發明的胰島素類似物可進一步包含一個在位置B3處被麩胺酸(Glu)取代的突變，及/或一個在位置A21處被甘胺酸(Gly)取代的突變。

【0067】 在一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：22中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPK)或由其組成。

【0068】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：24中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)或由其組成。

【0069】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：44中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK)或由其組成。

【0070】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：48中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)或由其組成。

【0071】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：50中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)或由其組成。

【0072】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：58中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK)或由其組成。

【0073】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：60中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK)或由其組成。

【0074】在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：64中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK)或由其組成。

【0075】在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：66中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK)或由其組成。

【0076】在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：70中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFYTPK)或由其組成。

【0077】在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：78中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)或由其組成。

【0078】在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的B鏈包含SEQ ID NO：80中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)或由其組成。

【0079】上文概述的B鏈包含Des(B30)突變。因此，存在於親本胰島素的位置B30處的胺基酸(人類胰島素中為蘇胺酸，而豬和牛胰島素中為丙胺酸)缺失，意即不存在。然而，還設想本發明類似物的B鏈不包含此突變，即在位置30處包含蘇胺酸。因此，本發明的胰島素類似物的B鏈可以包含選自以下組成之群的胺基酸序列或由其組成：

- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPKT (SEQ ID NO: 85)
- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 86)
- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFYTPKT (SEQ ID NO: 87)
- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 88)

- FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 89)
- FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (SEQ ID NO: 90)
- FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (SEQ ID NO: 91)
- FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 92)
- FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 93)
- FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPKT (SEQ ID NO: 94)
- FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 95)
- FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 96)
- FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 97)

【0080】 在一個具體例中，本發明的胰島素類似物的A鏈包含SEQ ID NO：1中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLYQLENYCN)或由其組成。

【0081】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的A鏈包含SEQ ID NO：43中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)或由其組成。

【0082】 在另一個具體例中，本發明的胰島素類似物的A鏈包含SEQ ID NO：45中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCG)或由其組成。

【0083】 通常，本發明的胰島素類似物包含如上文所述的A鏈和B鏈。

【0084】 例如，本發明的胰島素類似物選自由以下組成之群：

Leu(B16)-胰島素(例如人類胰島素，即Leu(B16)-人類胰島素)，

Val(B16)-胰島素(例如人類胰島素，即Val(B16)-人類胰島素)，

Ile(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，

Leu(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，

Val(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，

Ile(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，

Leu(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，

Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
Leu(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Leu(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Ile(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Val(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Leu(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，

Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，以及
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)。

【0085】 在另一個具體例中，本文提供的胰島素類似物選自由以下組成之群：

Asp(A14)Leu(B16)Des(B30)- 胰 島 素 (例 如 人 類 胰 島 素 ， 即
 Asp(A14)Leu(B16)Des(B30)-人類胰島素)，
 Asp(A14)Ile(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Leu(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Ile(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Leu(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Leu(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，

Asp(A14)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Ile(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Ile(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 Asp(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，以及
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)。

【0086】 在另一個具體例中，本文提供的胰島素類似物選自由以下組成之群：

His(A14)Leu(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，

His(A14)Val(B16)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Leu(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Val(B16)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Leu(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Leu(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Ile(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，

His(A14)Val(B16)Ile(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，
 His(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)，以及
 His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-胰島素(例如人類胰島素)。

【0087】 在另一個具體例中，胰島素類似物是Leu(B25)Des(B30)-胰島素(諸如Leu(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物11)。例如，Leu(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：21中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLYQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：22中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPK)的B鏈。

【0088】 在另一個具體例中，胰島素類似物是Val(B25)Des(B30)-胰島素(諸如Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物12)。例如，Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：23中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLYQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：24中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)的B鏈。

【0089】 在另一個具體例中，胰島素類似物是Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(諸如Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物22)。例如，Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：43中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：44中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK)的B鏈。

【0090】 在另一個具體例中，胰島素類似物是Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素(諸如Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物24)。例如，Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：47中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)

的 A 鏈，以及具有如 SEQ ID NO：48 中所示胺基酸序列 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK) 的 B 鏈。

【0091】在另一個具體例中，胰島素類似物是 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)- 胰島素（諸如 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素）。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表 4 中（參見類似物 25）。例如，Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如 SEQ ID NO：49 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCG) 的 A 鏈，以及具有如 SEQ ID NO：50 中所示胺基酸序列 (FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK) 的 B 鏈。

【0092】在另一個具體例中，胰島素類似物是 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)- 胰島素（諸如 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素）。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表 4 中（參見類似物 29）。例如，Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如 SEQ ID NO：57 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) 的 A 鏈，以及具有如 SEQ ID NO：58 中所示胺基酸序列 (FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFFIYTPK) 的 B 鏈。

【0093】在另一個具體例中，胰島素類似物是 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)- 胰島素（諸如 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素）。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表 4 中（參見類似物 30）。例如，Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如 SEQ ID NO：56 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) 的 A 鏈，以及具有如 SEQ ID NO：60 中所示胺基酸序列 (FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFFIYTPK) 的 B 鏈。

【0094】在另一個具體例中，胰島素類似物是 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)- 胰 島 素 (諸 如 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物32)。例如，Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：63中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：64中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK)的B鏈。

【0095】在另一個具體例中，胰島素類似物是 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)- 胰 島 素 (諸 如 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物33)。例如，Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：65中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCG)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：66中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK)的B鏈。

【0096】在另一個具體例中，胰島素類似物是 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)- 胰 島 素 (諸 如 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物35)。例如，Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：69中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：70中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPK)的B鏈。

【0097】在另一個具體例中，胰島素類似物是 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)- 胰 島 素 (諸 如

Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物38)。例如，Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：75中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：76中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)的B鏈。

【0098】在另一個具體例中，胰島素類似物是Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(諸如Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物39)。例如，Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：77中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：78中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)的B鏈。

【0099】在另一個具體例中，胰島素類似物是Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(諸如Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物40)。例如，Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：79中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCG)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：80中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)的B鏈。

【0100】胰島素類似物可以藉由任何被認為合適的方法來製備。例如，可以藉由重組方法或藉由固相合成來製備胰島素類似物。

【0101】上文提供的定義和說明比照適用於以下內容。

【0102】 本文提供胰島素B鏈(即胰島素B鏈肽)，如上文關於本文提供之胰島素類似物的B鏈所定義。因此，本文提供了相對於親本胰島素的胰島素B鏈包含至少一個突變的胰島素B鏈，其中該等B鏈包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變，及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的一個突變。胰島素B鏈可包含如上面本文所述的其他突變，例如des(B30)缺失。

【0103】 本文還提供了包含本文提供的胰島素類似物的胰島素A鏈及/或胰島素B鏈的胰島素原(proinsulins)。B鏈可以是如本文上面針對本文提供的胰島素類似物所定義的任何B鏈。例如，本文提供了包含胰島素A鏈和胰島素B鏈的胰島素原，其中該B鏈相對於親本胰島素的B鏈包含至少一個突變，其中該突變是在位置B16處被疏水性胺基酸取代及/或其中突變是在位置B25處被疏水性胺基酸取代。胰島素B鏈可包含如本文上面針對B鏈所述的更多突變。

【0104】 本文提供的胰島素原所包含的A鏈可以是本文上面針對本文提供的胰島素類似物所定義的任何A鏈。在一些具體例中，該胰島素原的A鏈包含一個在位置A14處被選自以下的胺基酸取代的突變：麩胺酸(Glu)，天冬胺酸(Asp)和組胺酸(His)。

【0105】 除了胰島素A鏈及/或胰島素B鏈，本文提供的胰島素原可以包含其他要素，例如前導序列或C-肽。在一些具體例中，胰島素原可以進一步包含位於胰島素B鏈和胰島素A鏈之間的C-肽。C-肽的長度為4至10個胺基酸，諸如4至9個胺基酸。定向可以如下(從N端到C端)：B鏈、C肽、A鏈。

【0106】 本文提供了編碼本文提供之胰島素類似物，胰島素B鏈和胰島素原的多核苷酸。該多核苷酸可以可操作地連接至容許該多核苷酸表現的啟動子。在一些具體例中，啟動子相對於該多核苷酸是異源的。在一些具體例中，啟動子是組成型啟動子。在另一個具體例中，啟動子是誘導型啟動子。

【0107】 此外，本文提供包含編碼本文提供之胰島素類似物的多核苷酸的載體。在一些具體例中，該載體是表現載體。

【0108】 本文提供包含編碼本文提供之胰島素類似物，胰島素B鏈和胰島素原的核酸，多核苷酸及/或載體的宿主細胞。在一些具體例中，宿主細胞是細菌細胞，諸如屬於大腸菌屬的細胞(例如大腸桿菌細胞)。在另一個具體例中，宿主細胞是酵母細胞，例如巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)細胞或乳酸克魯維酵母(*Klyveromyces lactis*)細胞。

【0109】 本文提供包含醫藥有效量之本文提供的胰島素類似物及醫藥上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

【0110】 本文提供治療疾病的方法，其包含向個體投與醫藥有效量的一或多種本文提供之胰島素類似物或其藥物組合物。

【0111】 在一些具體例中，該疾病是糖尿病，諸如第II型糖尿病。

【0112】 本文提供了用於醫學上的胰島素類似物或其醫藥組合物。

【0113】 本文提供了用於治療糖尿病(諸如第II型糖尿病)的胰島素類似物或其醫藥組合物。

【0114】 最後，本文提供了本文提供之胰島素類似物或其醫藥組合物在製備用於治療糖尿病(諸如第II型糖尿病)的藥劑或藥物的用途。

【0115】 藉由以下各自從屬和反向參考所指明的具體例和具體例組合，進一步說明了A段中描述的胰島素類似物、胰島素B鏈，胰島素原和用途。上文提供的定義和說明比照適用於以下內容。

【0116】 1. 一種胰島素類似物，其相對於親本胰島素包含至少一個突變，其中該胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。

- 【0117】 2. 如具體例1之胰島素類似物，其中該親本胰島素是人類胰島素，豬胰島素或牛胰島素。
- 【0118】 3. 如具體例1及2之胰島素類似物，其中在位置B16及/或位置B25處的疏水性胺基酸是脂族胺基酸。
- 【0119】 4. 如具體例1至3中任一項之胰島素類似物，其中在位置B16及/或位置B25處的該脂族胺基酸是支鏈胺基酸，諸如選自由纈胺酸(Val)，異白胺酸(Ile)和白胺酸(Leu)組成之群的支鏈胺基酸。
- 【0120】 5. 如具體例1至3中任一項之胰島素類似物，其中該胰島素類似物進一步包含一個在位置A14處被選自以下組成之群的胺基酸取代的突變：麩胺酸(Glu)，天冬胺酸(Asp)及組胺酸(His)。
- 【0121】 6. 如具體例1至5中任一項之胰島素類似物，其中該胰島素類似物進一步包含一個在位置B30處的突變，例如其中在位置B30處的突變是在親本胰島素位置30處的胺基酸缺失(Des(B30)-突變)。
- 【0122】 7. 如具體例1至6中任一項之胰島素類似物，其中該胰島素類似物進一步包含一個在位置B3處被麩胺酸(Glu)取代的突變。
- 【0123】 8. 如具體例1至7中任一項之胰島素類似物，其中該胰島素進一步包含一個在位置A21處被甘胺酸(Gly)取代的突變。
- 【0124】 9. 如具體例1至8中任一項之胰島素類似物，其中該胰島素類似物的B鏈包含選自以下組成之群的胺基酸序列或由其組成：
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPK (SEQ ID
NO: 22)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK (SEQ ID NO: 44)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK (SEQ ID NO: 48)

FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK (SEQ ID NO: 50)

FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK (SEQ ID NO: 58)

FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK (SEQ ID NO: 60)

FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK (SEQ ID NO: 64)

FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK (SEQ ID NO: 66)

FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPK (SEQ ID NO: 70)

FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK (SEQ ID NO: 76)

FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK (SEQ ID NO: 78)

FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK (SEQ ID NO: 80)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPKT (SEQ ID NO: 85)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 86)

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPKT	(SEQ	ID
NO: 87)		
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT	(SEQ	ID
NO: 88)		
FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT	(SEQ	ID
NO: 89)		
FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT	(SEQ	ID
NO: 90)		
FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT	(SEQ	ID
NO: 91)		
FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT	(SEQ	ID
NO: 92)		
FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT	(SEQ	ID
NO: 93)		
FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPKT	(SEQ	ID
NO: 94)		
FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT	(SEQ	ID
NO: 95)		
FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT	(SEQ	ID
NO: 96)	， 及	
FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT	(SEQ	ID
NO: 97)	。	

【0125】 10. 如具體例1至9中任一項之胰島素類似物，其包含

- (a) 具有如 SEQ ID NO : 43 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) 的 A 鏈，及具有如 SEQ ID NO : 44 中所示胺基酸序列 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK) 的 B 鏈，
- (b) 具有如 SEQ ID NO : 47 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) 的 A 鏈，及具有如 SEQ ID NO : 48 中所示胺基酸序列 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK) 的 B 鏈，
或
- (c) 具有如 SEQ ID NO : 77 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) 的 A 鏈，及具有如 SEQ ID NO : 78 中所示胺基酸序列 (FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK) 的 B 鏈。

【0126】 11. 一種選自由以下組成之群的胰島素類似物

- Leu(B16)-人類胰島素，
Val(B16)-人類胰島素，
Ile(B16)-人類胰島素，
Leu(B16)Des(B30)-人類胰島素，
Val(B16)Des(B30)-人類胰島素，
Ile(B16)Des(B30)-人類胰島素，
Leu(B25)-人類胰島素，
Val(B25)-人類胰島素，
Ile(B25)-人類胰島素，
Leu(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Leu(B16)-人類胰島素，
Glu(A14)Ile(B16)-人類胰島素，
Glu(A14)Val(B16)-人類胰島素，
Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Leu(B25)-人類胰島素，
Glu(A14)Ile(B25)-人類胰島素，
Glu(A14)Val(B25)-人類胰島素，
Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)- 人 類
胰島素，

Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-人類胰島素，

Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-人類胰島素，

Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-人類胰島素，

Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-人類胰島素，

Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-人類胰島素，

Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-人類胰島素，

Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素，

Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素，及

Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素。

【0127】 12. 一種胰島素B鏈，其相對於親本胰島素的B鏈包含至少一個突變，其中該B鏈包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變，及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。

【0128】 13. 如具體例12之胰島素B鏈，其中該親本胰島素是人類胰島素，豬胰島素或牛胰島素。

【0129】 14. 如具體例12及13之胰島素B鏈，其中在位置B16及/或位置B25處的疏水性胺基酸是脂族胺基酸。

【0130】 15. 如具體例12至14中任一項之胰島素B鏈，其中該脂族胺基酸為支鏈胺基酸，諸如選自以下組成之群的支鏈胺基酸：纈胺酸(Val)，異白胺酸(Ile)及白胺酸(Leu)。

【0131】 16. 如具體例12至15中任一項之胰島素B鏈，其中該胰島素B鏈進一步包含一個在位置B3處被麩胺酸(Glu)取代的突變。

- 【0132】 17. 如具體例12至16中任一項之胰島素B鏈，其中該胰島素B鏈進一步包含一個在位置B30處的突變，其中在位置B30處的突變是親本胰島素位置B30處的胺基酸缺失(Des(B30)突變)。
- 【0133】 18. 一種包含胰島素A鏈和胰島素B鏈的胰島素原，其中該胰島素B鏈相對於親本胰島素的B鏈包含至少一個突變，其中該B鏈包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變及/或一個位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。
- 【0134】 19. 如具體例18之胰島素原，其中該胰島素原的胰島素A鏈包含一個在位置A14處被選自以下的胺基酸取代的突變：麩胺酸(Glu)，天冬胺酸(Asp)和組胺酸(His)。
- 【0135】 20. 如具體例18及19之胰島素原，其中該親本胰島素是人類胰島素，豬胰島素或牛胰島素。
- 【0136】 21. 如具體例18至20中任一項之胰島素原，其中在位置B16及/或位置B25處的疏水性胺基酸是脂族胺基酸。
- 【0137】 22. 如具體例18至21中任一項之胰島素原，其中該脂族胺基酸為支鏈胺基酸，諸如選自由以下組成之群的支鏈胺基酸：纈胺酸(Val)，異白胺酸(Ile)及白胺酸(Leu)。
- 【0138】 23. 如具體例18至22中任一項之胰島素原，其中該胰島素原進一步包含一個在位置B3處被麩胺酸(Glu)取代的突變。
- 【0139】 24. 如具體例18至23中任一項之胰島素原，其中該胰島素原進一步包含一個在位置B30處的突變，其中在位置B30處的突變是親本胰島素位置B30處的胺基酸缺失(Des(B30)-突變)。

【0140】 25. 一種多核苷酸，其編碼具體例1至11中任一項之胰島素類似物，具體例12至17中任一項之胰島素B鏈，及/或具體例18至24中任一項之胰島素原。

【0141】 26. 一種表現載體，其包含具體例25之多核苷酸。

【0142】 27. 一種宿主細胞，其包含具體例1至11中任一項之胰島素類似物、具體例12至17中任一項之胰島素B鏈、具體例18至24中任一項之胰島素原，具體例25之多核苷酸及/或具體例26之表現載體。

【0143】 28. 一種治療患有糖尿病之患者的方法，其包含向該患者投與一或多種如具體例1至11中任一項所定義的胰島素類似物。

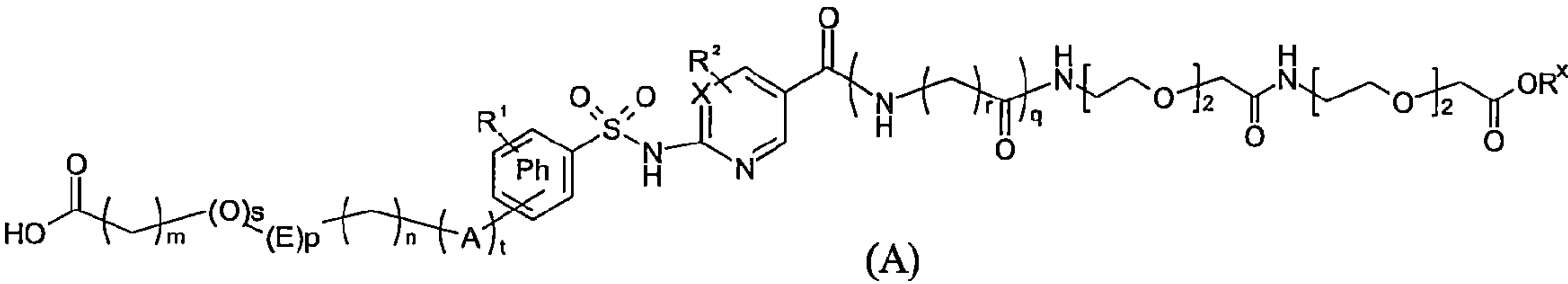
【0144】 29. 如具體例1至11中任一項所定義之胰島素類似物，其用於治療糖尿病。

B段：血清白蛋白結合部分

【0145】 本文提供了血清白蛋白結合部分(在本文中也稱為「白蛋白黏合劑」或「黏合劑」)，當其與肽(諸如上文提供的胰島素類似物)偶接時，導致該肽的藥效學及/或藥動學性質獲得改善，例如在血液及/或血漿中的藥動學半衰期延長及/或作用曲線延長，即血糖水平持續降低。所提供的血清白蛋白結合部分是如本文下面所述的磺醯胺。

【0146】 出乎意料地，發現到可以使用可用於肽接合物的特定磺醯胺來提供此等肽接合物。所得到的肽接合物在血液及/或血漿中展現出有利的半衰期且作用曲線延長。可以證明，與未接合的肽相比，所得到的肽接合物的藥動學半衰期($t_{1/2}$)增加且平均滯留時間(MRT)增加。此外，相對於未接合的肽，該肽接合物的活體內作用持續時間明顯延長。

【0147】 因此，本文提供式(A)的磺醯胺



其中

- A 選自由氧原子、-CH₂CH₂-基團，-OCH₂-基團和-CH₂O-基團組成之群；
- E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；
- X 表示氮原子或-CH-基團；
- m 為範圍5至17的整數；
- n 為零或範圍1至3的整數；
- p 為零或1；
- q 為零或1；
- r 為範圍1至6的整數；
- s 為零或1；
- t 為零或1；
- R¹ 表示至少一個選自由氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基及鹵代C1至C3烷基組成之群的殘基；
- R² 表示至少一個選自由氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基組成之群的殘基；
- R^x 表示氮原子或活化基團，視情況選自由7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU [1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧化六氟磷酸]或 HBTU [3-[雙(二甲基胺基)甲基]-3H-苯并三唑-1-氧化六氟磷酸])，4-硝基苯和 N-琥珀醯亞胺基基團組成之群的活化基團，其中R^x 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團。

【0148】 在一些具體例中，排除s為1，p為零，n為零，A為氧原子和t為1的組合。在一些具體例中，s為零，其中其餘殘基和標號具有如上式(A)所指的含義。

【0149】 例如，R¹的鹵化C1至C3烷基及/或R²的鹵化C1至C3烷基被部分鹵化或全鹵化。在一些具體例中，R¹的鹵化C1至C3烷基及/或R²鹵化C1至C3烷基被全鹵化。

【0150】 如本文所使用，術語「式(A)的磺醯胺」包含式(A)的磺醯胺，其醫藥上可接受的鹽及所有醫藥上可接受經同位素標記之式(A)的磺醯胺，其中一或多個原子被置換成具有相同原子數，但原子質量或質量數與自然界中占主導地位的原子質量或質量數不同的原子。這同樣適用於式(A)的磺醯胺的所有亞型，即分別適用於如下所詳述的式(A-1)至(A-5)的磺醯胺及其亞結構，例如式(A-1-1)的磺醯胺。也就是說，術語「式(A-...)的磺醯胺」表示如下詳述的式(A-1)至(A-5)的磺醯胺的編號及其亞結構，包含化合物本身，其醫藥上可接受之鹽及所有醫藥上可接受經同位素標記的化合物。

【0151】 式(A)的磺醯胺的醫藥上可接受之鹽包括鹼鹽。合適的鹼鹽是由形成無毒鹽之鹼所形成的。實例包括鋁鹽、精胺酸鹽、苄星青黴素鹽、鈣鹽、膽鹼鹽、二乙胺鹽、雙(2-羥乙基)胺(二乙醇胺)鹽、甘胺酸鹽、離胺酸鹽、鎂鹽、葡甲胺鹽、2-胺基乙醇(乙醇胺)鹽、鉀鹽、鈉鹽、2-胺基-2-(羥甲基)丙烷-1,3-二醇(tris或三木甲胺)和鋅鹽。有關合適的鹽的綜述，參見Stahl and Wermuth的Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Wiley-VCH, 2002)。

【0152】 式(A)的磺醯胺及其醫藥上可接受之鹽可呈未溶劑化和溶劑化形式存在。本文中使用的術語「溶劑化物」被用來描述包含式(A)的磺醯胺或其醫

藥上可接受之鹽與一或多種醫藥上可接受之溶劑分子(例如乙醇)的分子複合物。當該溶劑是水時，則採用術語「水合物」。

【0153】 適於納入式(A)的磺醯胺中的同位素的實例包括以下的同位素：氫(諸如²H和³H)、碳(諸如¹¹C，¹³C和¹⁴C)、氯(諸如³⁶Cl)、氟(諸如¹⁸F)，碘(諸如¹²³I和¹²⁵I)、氮(諸如¹³N和¹⁵N)、氧(諸如¹⁵O，¹⁷O和¹⁸O)，以及硫(諸如³⁵S)。

【0154】 某些經同位素標記之式(A)的磺醯胺(例如那些併入放射性同位素者)可用於藥物及/或受質組織分佈研究。有鑑於併入容易且檢測方式簡單，放射性同位素氚(即³H)和碳-14 (即¹⁴C)尤其適用於此目的。

【0155】 用更重的同位素(諸如氘，即²H)取代可能因為代謝穩定性更高(例如活體內半衰期增加或劑量需求減低)而產生某些治療優勢。

【0156】 用正電子發射性同位素(例如¹¹C、¹⁸F，¹⁵O和¹³N)取代可用於正電子發射斷層掃描儀(PET)研究中，以供檢驗受質受體佔用率。

【0157】 經同位素標記的式(A)的磺醯胺通常可以透過那些習於技藝者已知的常規技術來製備。

【0158】 依據本發明，醫藥上可接受的溶劑化物包括那些其中結晶溶劑可以被同位素取代者，例如D₂O、d₆-丙酮，d₆-DMSO。

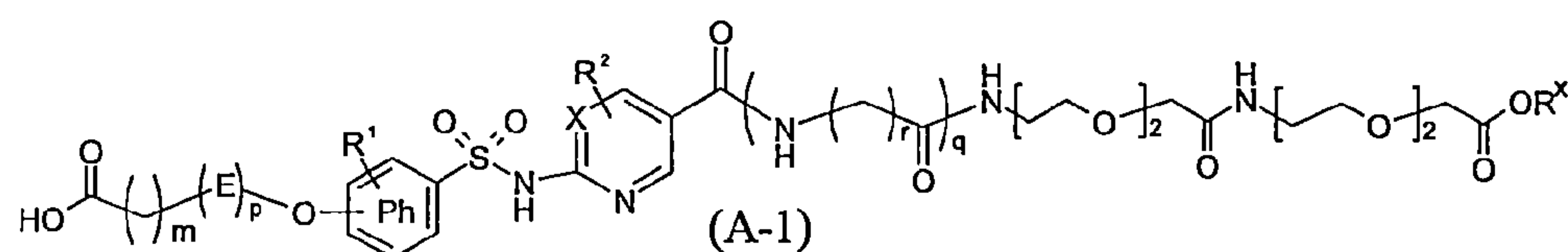
【0159】 為了鑑定合適的黏合劑分子(當結合至肽(諸如胰島素)時能夠增進血漿半衰期並延長作用曲線)，基於親和力層析使用血清白蛋白管柱(意即具有固定型血清白蛋白的管柱)建立一個系統。

【0160】 依據以下公式計算黏合劑(樣品)的淨滯留時間：

$$\text{淨滯留時間} = \text{RetTime}_{\text{樣本}} - \text{RetTime}_{t_0 \text{標記}}$$

【0161】 式(A)的磺醯胺的淨滯留在範圍9至19內，例如在範圍9.5至18內，並因而被認為是可用於肽接合物(諸如胰島素接合物)的黏合劑。

【0162】 依據一個具體例，磺醯胺具有式(A-1)



其中

E 表示 $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ 基團，其中 R 為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群，例如為氟原子；

X 表示氮原子或 $-\text{CH}-$ 基團；

p 為零或 1；

q 為零或 1；

r 為範圍 1 至 6 的整數

R^1 表示選自氫原子和鹵素原子之群的至少一個殘基，其中鹵素原子為例如氟或氯原子；

R^2 表示選自氫原子，C1 至 C3 烷基和鹵化 C1 至 C3 烷基之群的至少一個殘基，其中 C1 至 C3 烷基為例如甲基，而鹵化 C1 至 C3 烷基為例如全鹵化，諸如三氟甲基；

R^x 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自 HATU 或 HBTU)，4-硝基苯和 N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^x 視情況為 N-琥珀醯亞胺基基團；若 p 為零，則 m 為範圍 5 至 15 的整數；若 p 為 1，則 m 為範圍 7 至 15 的整數。

【0163】在磺醯胺的一個具體例中， R^1 和 R^2 為氫原子。

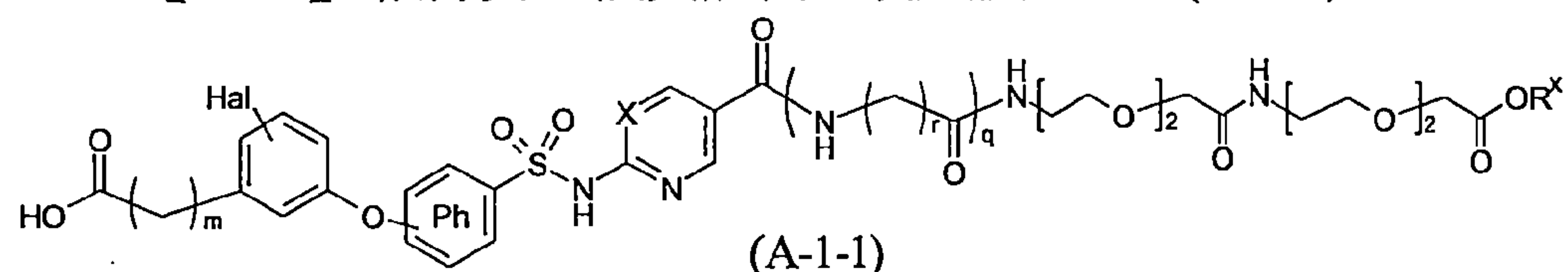
【0164】在磺醯胺的一個具體例中，X 表示氮原子。

【0165】依據磺醯胺的另一個具體例，式 (A) 的 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-(\text{E})_p-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_t$ 基團，或式 (A-1) 的 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{E})_p-\text{O}-$ 基團係位於苯環 Ph 上相對於 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 基團的間位或對位。

【0166】 依據磺醯胺的另一個具體例，若p為1，則 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s$ -基團和 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_r$ -基團位於式(A)的 $(\text{E})_p$ 上的間位或對位，或 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m$ -基團和-O-位於式(A-1)的 $(\text{E})_p$ 上的間位或對位。

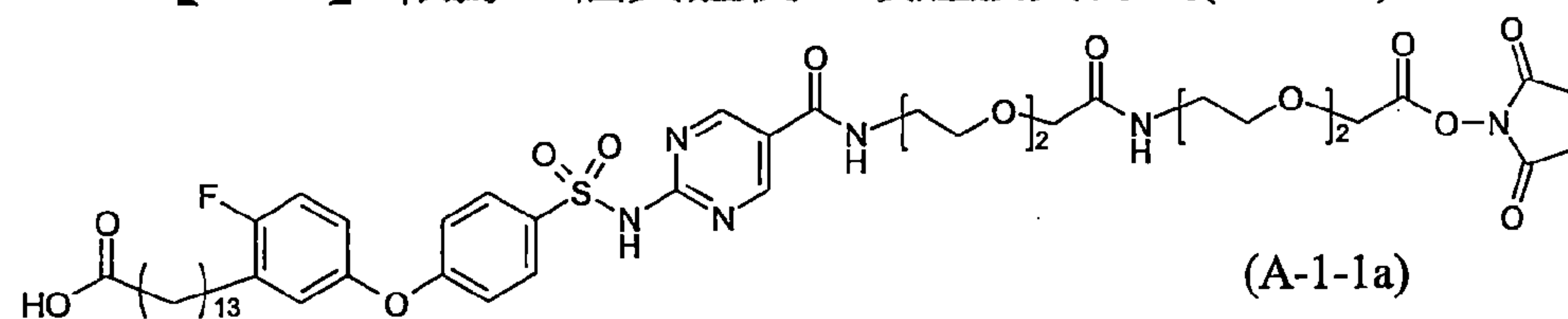
【0167】 依據磺醯胺的另一個具體例，q為零。

【0168】 依據另一個具體例，磺醯胺具有式(A-1-1)

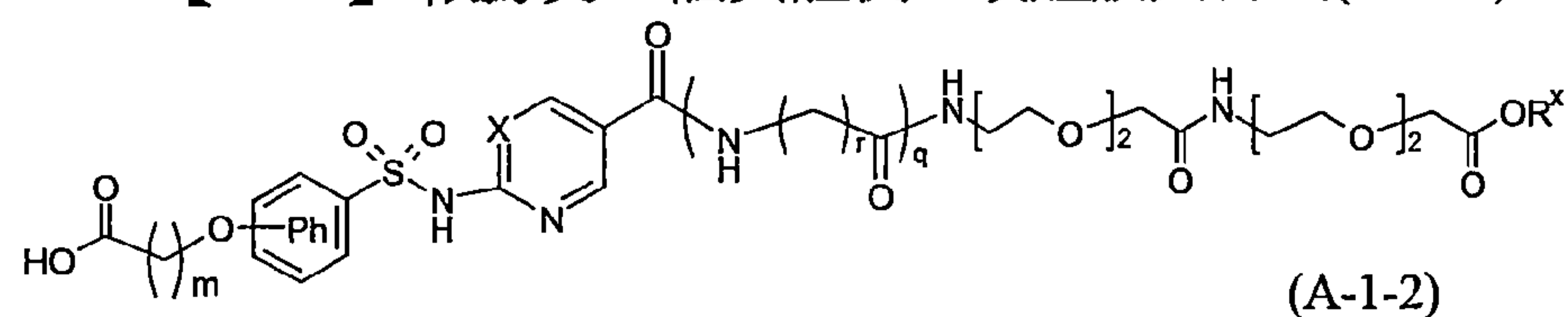


其中X為氮原子或-CH-基團，例如氮原子；m為範圍7至15的整數；r為範圍1至6的整數；q為零或1，例如零；Hal是選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群的鹵素原子，例如氟原子； R^x 為氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^x 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；且 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}_6\text{H}_3\text{Hal}-\text{O}$ -基團相對於 $-\text{S}(\text{O})_2$ -基團位於苯環Ph上的間位或對位。

【0169】 依據一個具體例，磺醯胺具有式(A-1-1a)



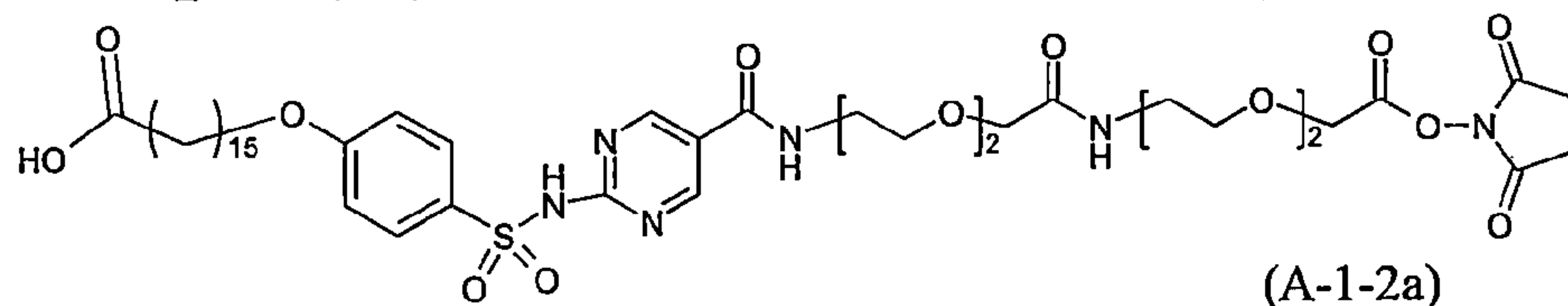
【0170】 依據另一個具體例，磺醯胺具有式(A-1-2)



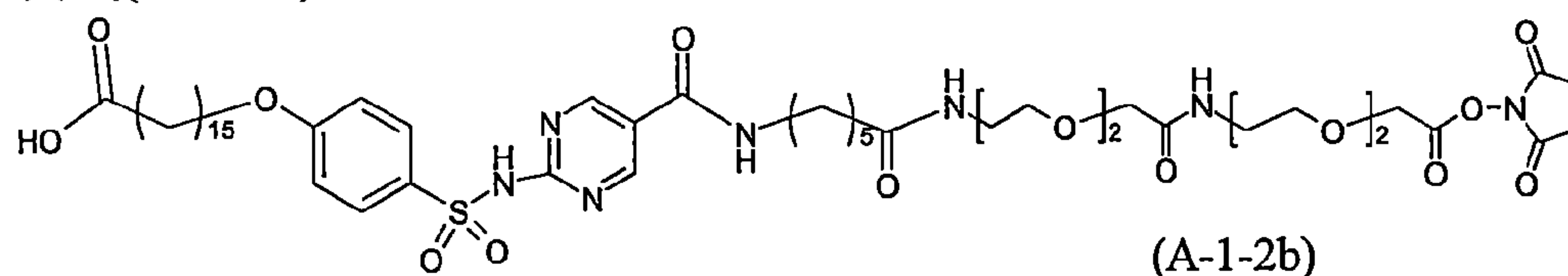
其中X為氮原子或-CH-基團，例如氮原子；m為範圍5至15的整數；r為範圍1至6的整數；q為零或1，例如零； R^x 為氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成的群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯

和N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^X 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；且 $HOOC-(CH_2)_m$ -O-基團係位於苯環Ph上相對於 $-S(O)_2-$ 基團的間位或對位。

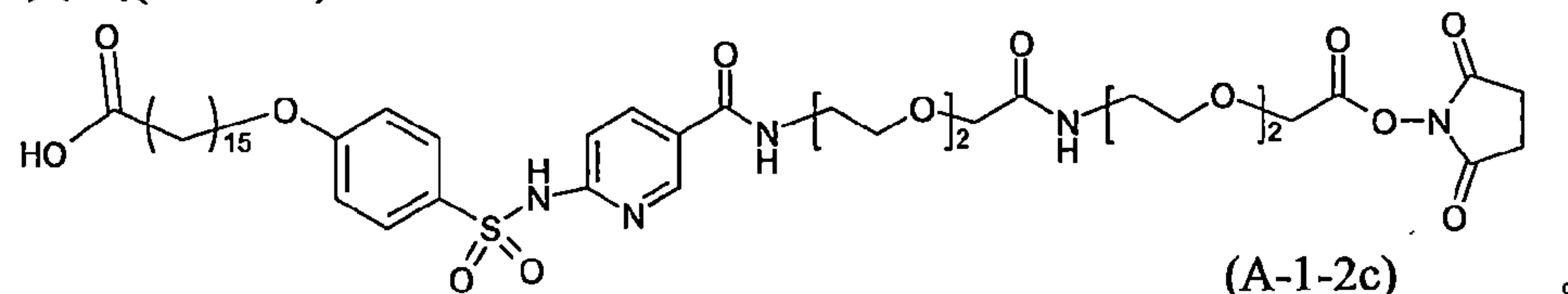
【0171】依據一個具體例，磺醯胺具有式(A-1-2a)



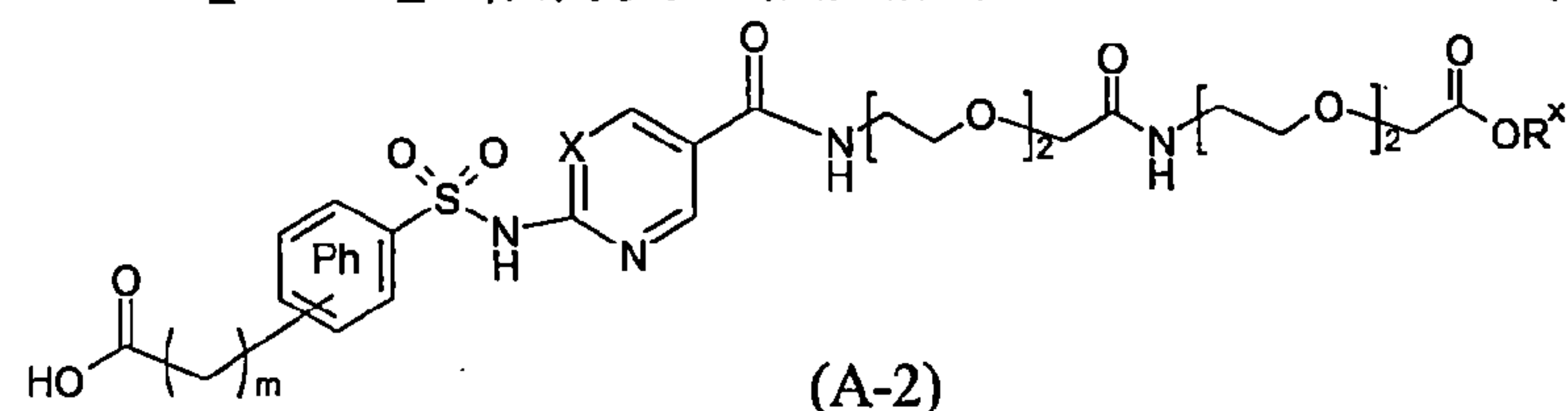
或式(A-1-2b)



或式(A-1-2c)



【0172】依據另一個具體例，磺醯胺具有式(A-2)



其中

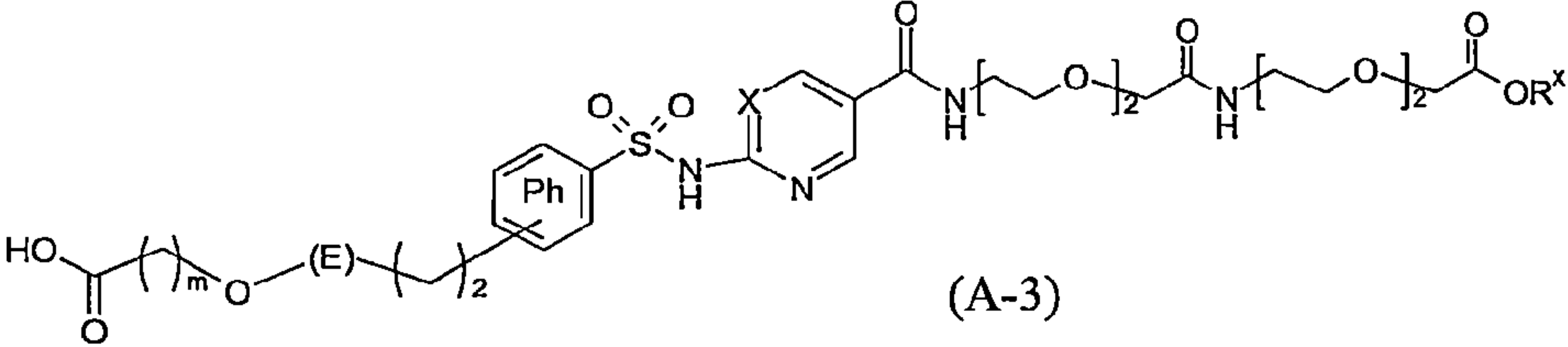
X 表示氮原子或-CH-基團；

R^X 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自從HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^X 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；及

m 為範圍5至17的整數，例如範圍11至17的整數。

【0173】依據式(A-2)的磺醯胺的一個具體例， $HOOC-(CH_2)_m$ -基團係位於苯環Ph上相對於 $-S(O)_2-$ 基團的間位或對位。

【0174】 依據另一個具體例，磺醯胺具有式(A-3)



其中

E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；

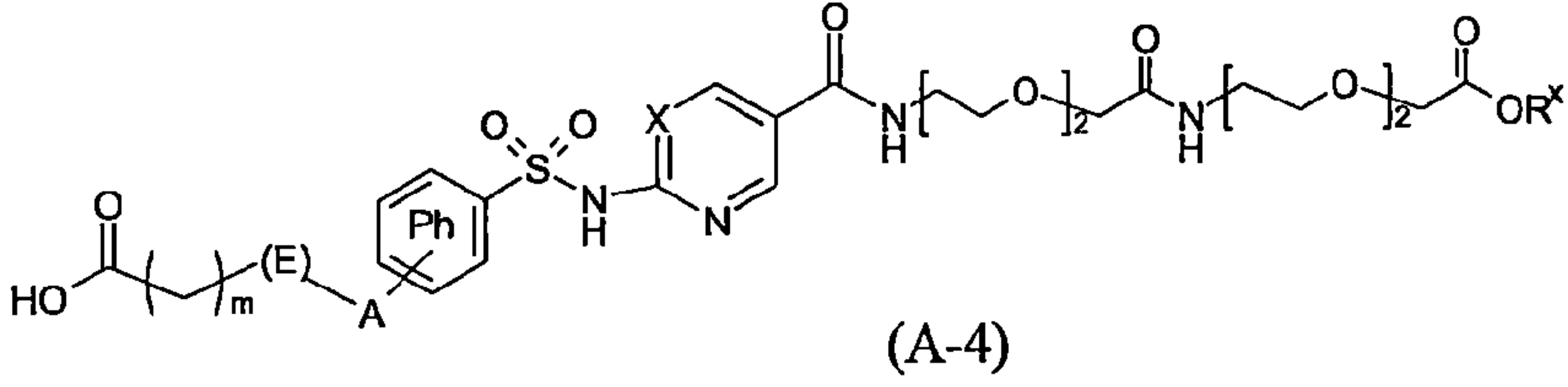
X 表示氮原子或-CH-基團；

R^x 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團；7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中R^x視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；及

m 為範圍5到17的整數，例如11。

【0175】 依據式(A-3)的磺醯胺的一個具體例，HOOC-(CH₂)_m-O-基團和-(CH₂)₂-基團位於式(A-3)的(E)上的對位，而HOOC-(CH₂)_m-O-(E)-(CH₂)₂-基團係位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的對位。

【0176】 依據另一個具體例，磺醯胺具有式(A-4)



其中

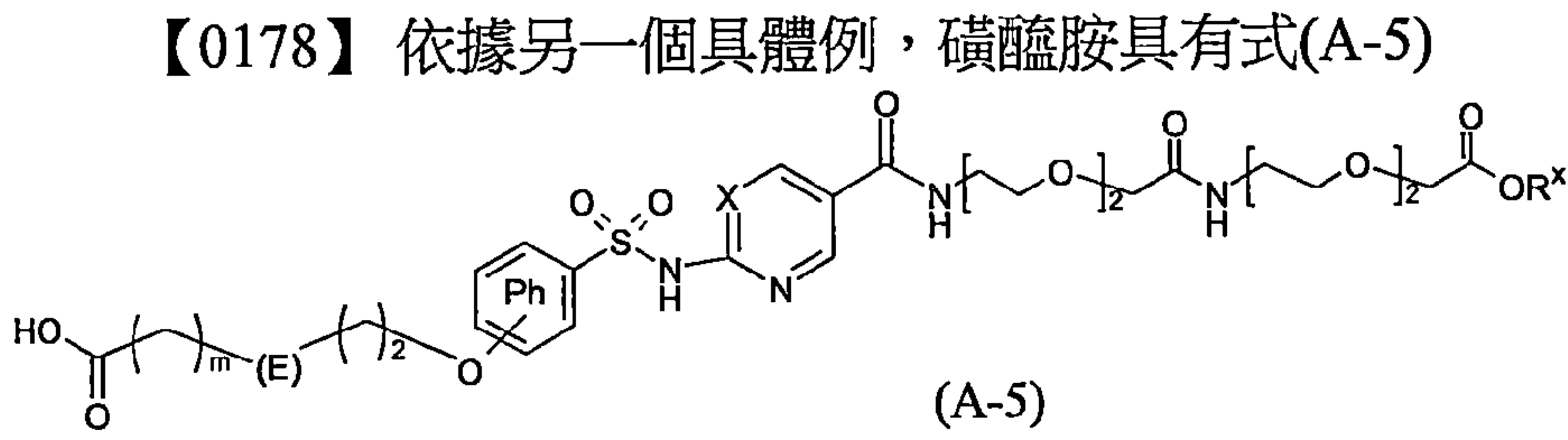
A 為-OCH₂-基團或-CH₂O-基團；

E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或-CH-基團；

R^X 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^X 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；及
 m 為範圍5至17的整數，例如範圍9至13的整數。

【0177】 依據式(A-4)的磺醯胺的一個具體例， $HOOC-(CH_2)_m$ -基團和-A-基團位於式(A-4)的(E)上的對位，而-A-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的對位。



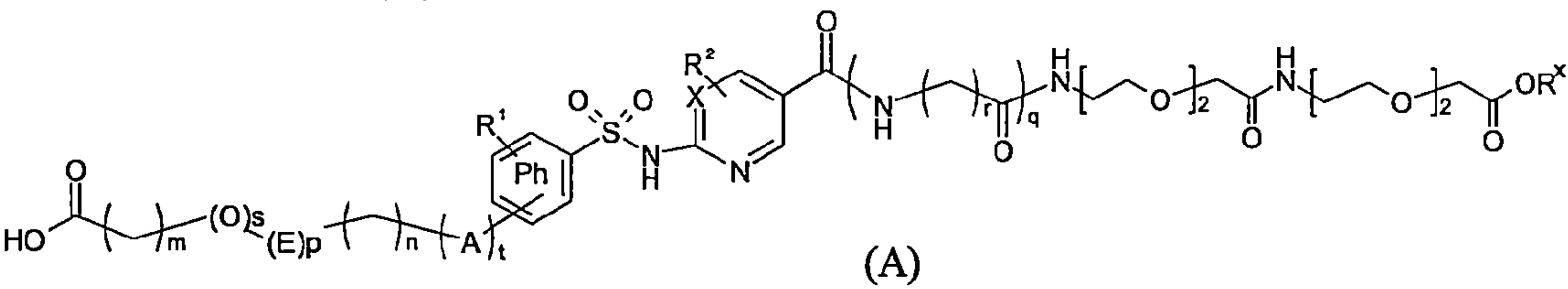
其中
E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；
X 表示氮原子或-CH-基團；
 R^X 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^X 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；及
 m 為範圍5至17的整數，例如範圍7至9的整數。

【0179】 依據式(A-5)的磺醯胺的一個具體例， $HOOC-(CH_2)_m$ -基團和-(CH₂)₂-基團位於式(A-5)的(E)上的對位，而 $HOOC-(CH_2)_mE-(CH_2)_2-O$ -基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的對位。

【0180】 藉由以下各自從屬和反向參考所指明的具體例和具體例組合，進一步說明B段中所述的白蛋白黏合劑。特別應注意，在提到具體例範圍的每種情

況下，例如在諸如「如具體例1至4中任一項之...」的術語的上下文中，這個範圍內的每個具體例對於本技藝中習於技藝者將會是明確揭示，即技藝中具有通常技術者理解此術語與「如具體例1、2，3和4中任一者之...」同義。

【0181】 1. 式(A)的磺醯胺



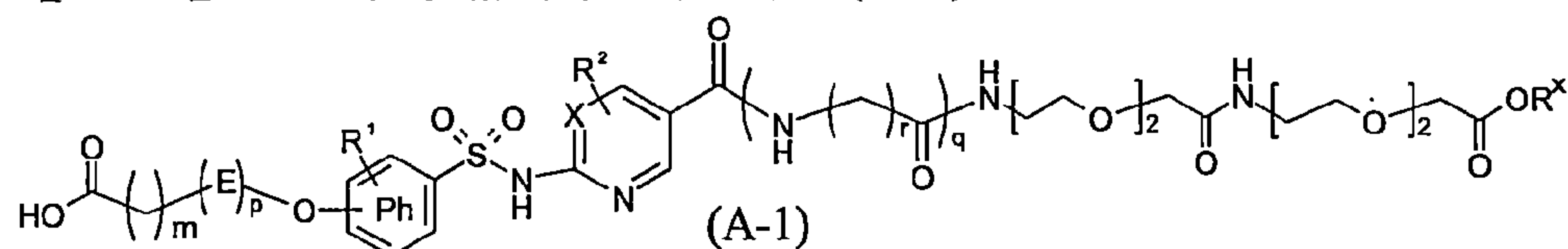
其中：

- A 選自由氧原子、-CH₂CH₂-基團，-OCH₂-基團和-CH₂O-基團組成之群；
- E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；
- X 表示氮原子或-CH-基團；
- m 為範圍5至17的整數；
- n 為零或範圍1至3的整數；
- p 為零或1；
- q 為零或1；
- r 為範圍1至6的整數；
- s 為零或1；
- t 為零或1；
- R¹ 表示選自由氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基組成之群的至少一個殘基；
- R² 表示選自由氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基組成之群的至少一個殘基；

R^X 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：

7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^X 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團。

【0182】 2. 如具體例1之具有式(A-1)的磺醯胺



其中：

E 表示 $-C_6H_3R-$ 基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或 $-CH-$ 基團；

p 為零或1；

q 為零或1；

r 為範圍1至6的整數；

R^1 表示選自氫原子和鹵素原子之群的至少一個殘基；

R^2 表示選自氫原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群中的至少一個殘基；

R^X 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：

7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^X 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；及

若p為零，則m為範圍5至15的整數；若p為1，則m為範圍7至15的整數。

【0183】 3. 如具體例1或2之磺醯胺，其中 R^1 和 R^2 為氫原子。

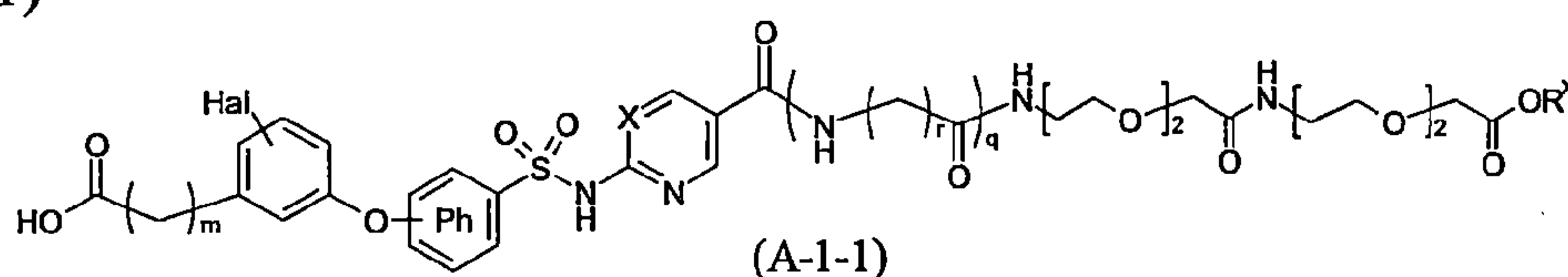
【0184】 4. 如具體例1至3中任一項之磺醯胺，其中X表示氮原子。

【0185】 5. 如具體例 1 至 4 中任一項之磺醯胺，其中式 (A) 的 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-(\text{E})_p-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_r$ -基團或者式 (A-1) 的 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{E})_p-\text{O}$ -基團位於苯環 Ph 上相對於 $-\text{S}(\text{O})_2$ -基團的間位或對位。

【0186】 6. 如具體例 1 至 5 中任一項之磺醯胺，其中若 p 為 1，則 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s$ -基團和 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_r$ -基團位於式 (A) 的 $(\text{E})_p$ 上的間位或對位，或 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m$ -基團和 $-\text{O}$ -位於式 (A-1) 的 $(\text{E})_p$ 上的間位或對位。

【0187】 7. 如具體例 1 至 6 中任一項之磺醯胺，其中 q 為零。

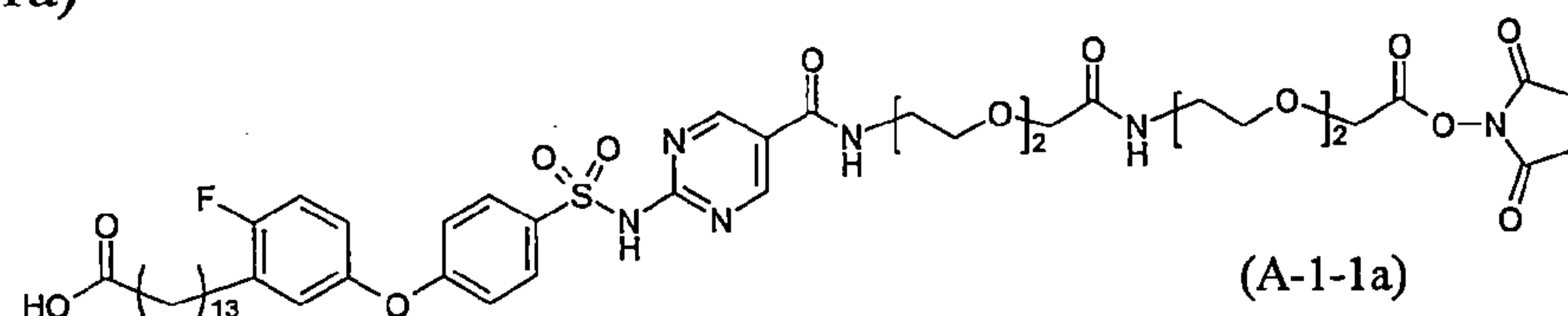
【0188】 8. 如具體例 1 至 7 中任一項之磺醯胺，其中該磺醯胺具有式 (A-1-1)



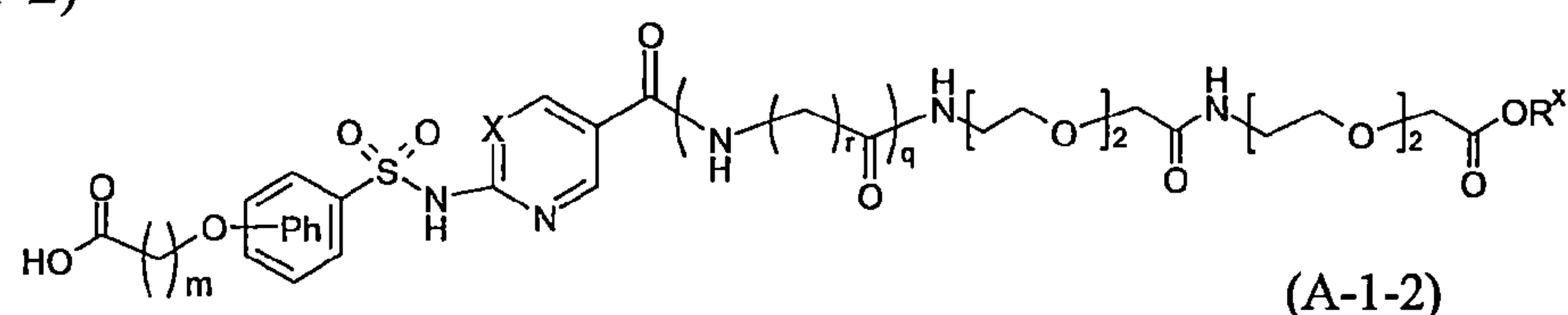
其中 X 是氮原子或 $-\text{CH}-$ 基團； m 為範圍 7 至 15 的整數； r 為範圍 1 至 6 的整數； q 為零或 1； Hal 是選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群的鹵素原子； R^X 表示氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自 HATU 或 HBTU)，4-硝基苯和 N-琥珀醯亞胺基基團，其中 R^X 視情況為 N-琥珀醯亞胺基-基團；

且相對於 $-\text{S}(\text{O})_2$ -基團， $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}_6\text{H}_3\text{Hal}-\text{O}$ -基團位於苯環 Ph 上的間位或對位。

【0189】 9. 如具體例 1 至 8 中任一項之磺醯胺，其中該磺醯胺具有式 (A-1-1a)

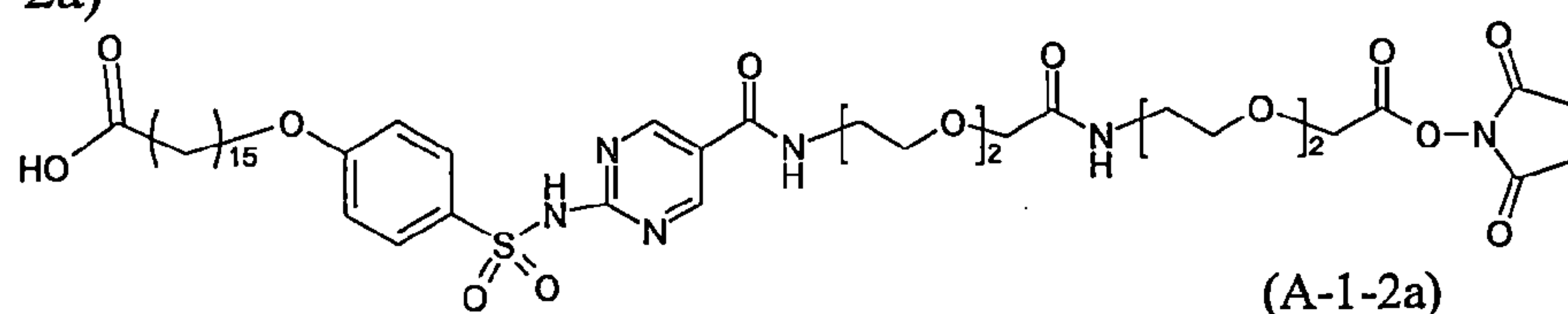


【0190】 10. 如具體例1至7中任一項之磺醯胺，其中該磺醯胺具有式 (A-1-2)

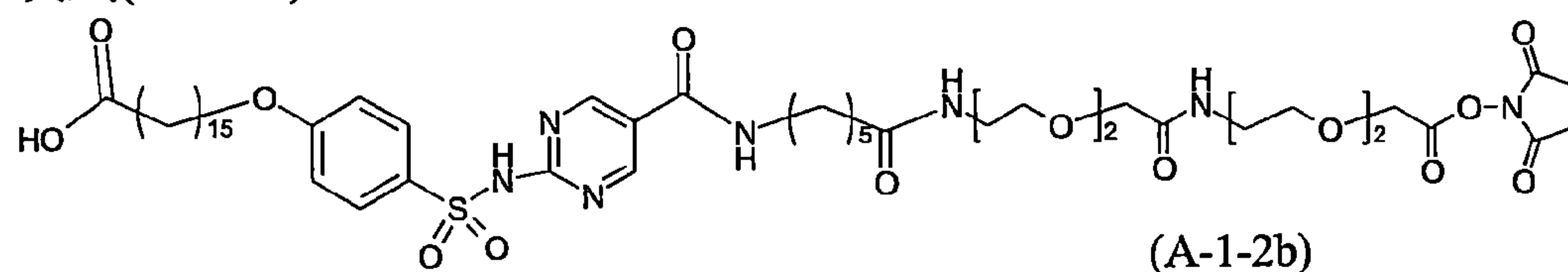


其中X是氮原子或-CH-基團；m為範圍5至15的整數；r為範圍1至6的整數；q為零或1；且HOOC-(CH₂)_m-O-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的間位或對位。

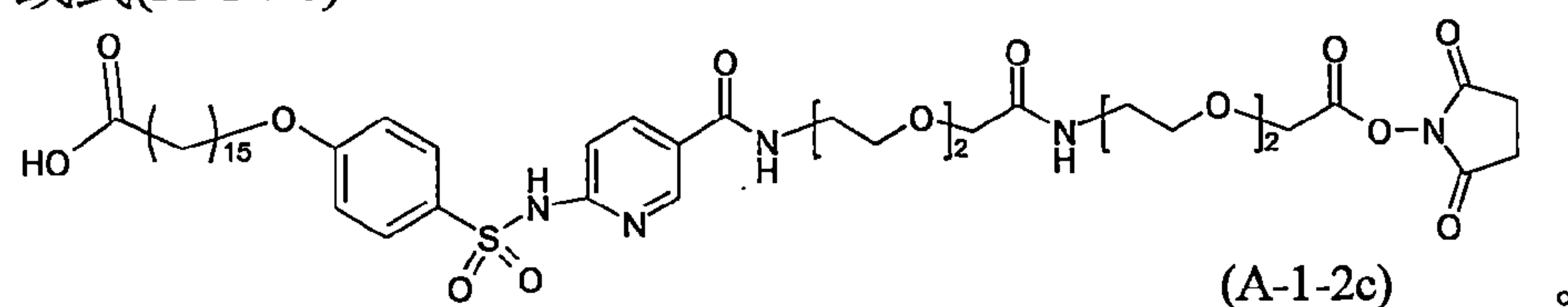
【0191】 11. 如具體例1至7或10中任一項之磺醯胺，其中該磺醯胺具有式 (A-1-2a)



或式(A-1-2b)



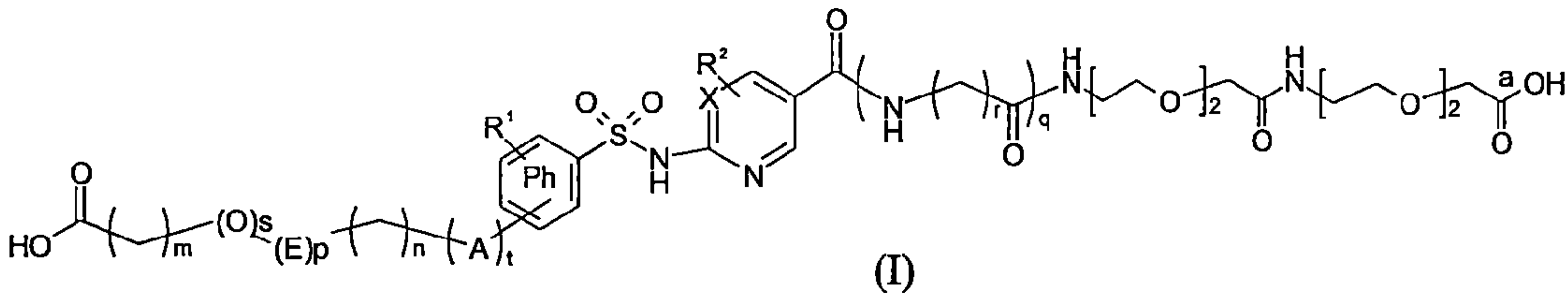
或式(A-1-2c)



C段：接合物

【0192】 本文提供了包含白蛋白黏合劑及活性醫藥成分或診斷化合物的接合物。在一個具體例中，白蛋白黏合劑是如上面B段中所定義的白蛋白黏合劑，而活性醫藥成分是如上面A段中所定義的胰島素類似物。

【0193】 本文提供了包含式(I)的磺醯胺及活性醫藥成分或診斷化合物的接合物



其中在式(I)的磺醯胺中：

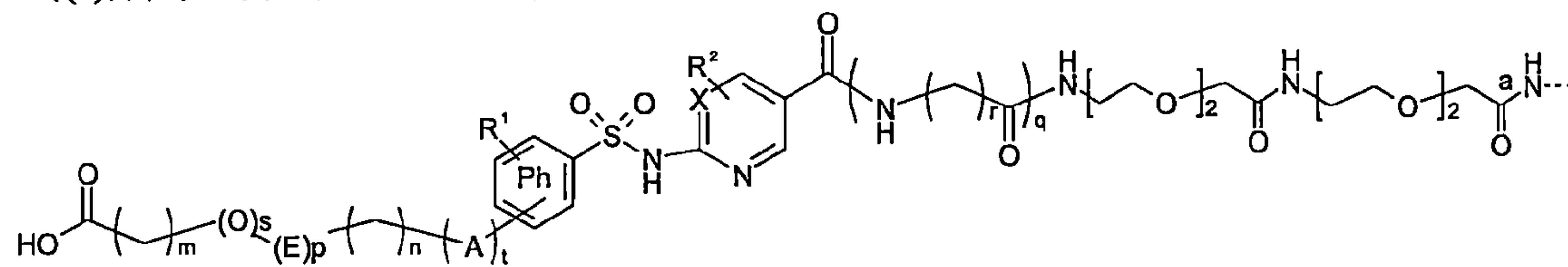
- A 選自由氧原子、-CH₂CH₂-基團，-OCH₂-基團和-CH₂O-基團組成之群；
- E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；
- X 表示氮原子或-CH-基團；
- m 為範圍5至17的整數；
- n 為零或範圍1至3的整數；
- p 為零或1；
- q 為零或1；
- r 為範圍1至6的整數；
- s 為零或1；
- t 為零或1；
- R¹ 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；
- R² 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

其中式(I)的磺醯胺共價結合至活性醫藥成分或診斷化合物。

【0194】 在一些具體例中，針對式(I)的磺醯胺，排除s為1，p為零，n為零，A為氧原子及t為1的組合。在一些具體例中，s為零，其中其餘殘基和標號具有如

上式(I)所示的含義。

【0195】 在一些具體例中，式(I)的磺醯胺共價結合至活性醫藥成分或診斷化合物，其在於式(I)的磺醯胺的末端羧基「a」共價結合至活性醫藥成分或診斷化合物的合適官能基團，例如結合至活性醫藥成分或診斷化合物的胺基或羥基。舉例來說，活性醫藥成分是肽，其中肽和式(I)的磺醯胺是例如透過醯胺鍵連接，例如在式(I)的磺醯胺的末端羧基「a」與肽的胺基之間形成的醯胺鍵。不用說，在醯胺鍵的情況下，羧基「a」以羰基-C(=O)-形式存在於接合物中，如下所示，其中所有殘基E、A、R¹和R²，X以及標號m、s、p、n、t，r和q具有如上式(I)所示的含義，且NH---基團已經是肽之胺基的其餘部分：



【0196】 在一些具體例中，式(I)的磺醯胺的R¹的鹵代C1至C3烷基及/或R²的鹵代C1至C3烷基被部分鹵化或被全鹵化。在一些具體例中，式(I)的磺醯胺的R¹的鹵代C1至C3烷基及/或R²的鹵代C1至C3烷基被全鹵化。

【0197】 如上文已討論的，出乎意料地發現，該等接合物在血液及/或血漿中展現出有利的半衰期和延長的作用曲線，這例如在臨床前動物模型中已獲得證實。

【0198】如本文所用，術語「活性醫藥成分」(API)包括提供某些藥理作用並用於治療或預防病況之任何醫藥活性化學品或生物化合物，及其醫藥上可接受之鹽及其任何混合物。如本文所用，術語「活性醫藥成分」、「活性劑」、「活性成分」，「活性物質」和「藥物」意指為同義詞，即具有相同的含義。

【0199】如本文所用，術語「包含式(I)的磺醯胺及活性醫藥成分或診斷化合物的接合物」，包含接合物本身，其醫藥上可接受之鹽及醫藥上可接受之經同

位素標記的接合物，其中一或多個原子被置換成具有相同原子數，但原子質量或質量數與自然界中占主導地位的原子質量或質量數不同的原子。這同樣適用於接合物的所有亞型，即適用於包含如下所詳述的式(I-1)至(I-5)的磺醯胺及其亞結構的接合物，例如包含式(I-1-1)的磺醯胺的接合物。這同樣適用於式(I)的磺醯胺的所有亞型，即適用於如下所詳述的式(I-1)至(I-5)的磺醯胺及其亞結構，例如式(I-1-1)的磺醯胺。也就是說，術語「包含式(I-...)的磺醯胺的接合物」表示如下詳述的式(I-1)至(I-5)的磺醯胺的數目及其亞結構，包含接合物本身，其醫藥上可接受之鹽及所有醫藥上可接受經同位素標記的化合物。

【0200】 接合物的醫藥上可接受之鹽包括酸加成鹽和鹼鹽。合適的酸加成鹽是由形成無毒鹽的酸所形成。實例包括乙酸鹽、己二酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、碳酸氫鹽/碳酸鹽、硫酸氫鹽/硫酸鹽、硼酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環己胺磺酸鹽、乙二磺酸鹽、乙磺酸鹽、甲酸鹽、富馬酸鹽、葡庚糖酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、六氟磷酸鹽、羥苯醯苯酸鹽、氫氯化物/氯化物、氫溴化物/溴化物、氫碘化物/碘化物、羥乙磺酸鹽、乳酸鹽、蘋果酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、甲基硫酸鹽、萘酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸酸鹽、硝酸鹽、乳清酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、羥萘酸鹽、磷酸鹽/磷酸/磷酸二氫鹽、焦麩胺酸鹽、蔗糖酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、單寧酸鹽、酒石酸鹽、甲苯磺酸鹽、三氟乙酸鹽、1,5-萘二磺酸和萘酚酸鹽。合適的鹼鹽是由形成無毒鹽之鹼所形成的。實例包括鋁鹽、精胺酸鹽、苧星青黴素鹽、鈣鹽、膽鹼鹽、二乙胺鹽、雙(2-羥乙基)胺(二乙醇胺)鹽、甘胺酸鹽、離胺酸鹽、鎂鹽、葡甲胺鹽、2-胺基乙醇(乙醇胺)鹽、鉀鹽、鈉鹽、2-胺基-2-(羥甲基)丙烷-1,3-二醇(tris或三木甲胺)和鋅鹽。也可以形成酸與鹼的半鹽，例如半硫酸鹽以及半鈣鹽。有關合適的鹽的綜述，參見Stahl and Wermuth的Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Wiley-VCH, 2002)。

【0201】接合物及其醫藥上可接受之鹽可呈未溶劑化和溶劑化形式存在。本文中使用的術語「溶劑化物」被用來描述包含式I的化合物或其醫藥上可接受之鹽以及一或多種醫藥上可接受之溶劑分子(例如乙醇)的分子複合物。當該溶劑是水時，則採用術語「水合物」。

【0202】適於納入接合物中的同位素的實例包括以下的同位素：氫(諸如²H和³H)、碳(諸如¹¹C，¹³C和¹⁴C)、氯(諸如³⁶Cl)、氟(諸如¹⁸F)，碘(諸如¹²³I和¹²⁵I)、氮(諸如¹³N和¹⁵N)、氧(諸如¹⁵O，¹⁷O和¹⁸O)，以及硫(諸如³⁵S)。

【0203】某些經同位素標記之接合物(例如那些併入放射性同位素者)可用於藥物及/或受質組織分佈研究。有鑑於併入容易且檢測方式簡單，放射性同位素氚(即³H)和碳-14(即¹⁴C)尤其適用於此目的。

【0204】用更重的同位素(諸如氘，即²H)取代可能因為代謝穩定性更高(例如活體內半衰期增加或劑量需求減低)而產生某些治療優勢。

【0205】用正電子發射性同位素(例如¹¹C、¹⁸F，¹⁵O和¹³N)取代可用於正電子發射斷層掃描儀(PET)研究中，以供檢驗受質受體佔用率。

【0206】經同位素標記的接合物通常可以透過那些習於技藝者已知的常規技術來製備。

【0207】依據本發明，醫藥上可接受的溶劑化物包括那些其中結晶溶劑可以被同位素取代者，例如D₂O、d₆-丙酮、d₆-DMSO。

【0208】在一個具體例中，活性醫藥成分選自包含以下之群：抗糖尿病劑、抗-肥胖劑、食慾調節劑、抗高血壓劑，用於治療及/或預防由於糖尿病或與糖尿病有關之併發症的藥劑，以及用於治療及/或預防由於肥胖或與肥胖有關的併發症和病症的藥劑。這些活性醫藥成分的實例為：胰島素、磺醯脲類、雙胍類、美格列奈(meglitinides)、葡萄糖苷酶抑制劑、升糖素拮抗劑、DPP-IV (二肽基肽酶-IV)抑制劑、參與刺激葡萄糖新生及/或肝糖分解之肝酶的抑制劑、葡萄

糖攝取調節劑、調節脂質代謝的化合物(諸如作為HMG CoA抑制劑(他汀類(statins)的抗高血脂劑)、胃抑制性多肽(GIP類似物)、降低食物攝取的化合物、RXR 促效劑和作用於細胞ATP- 依賴性鉀通道的藥劑；考來烯胺(cholestyramine)、考來替泊(colestipol)、氯貝特(clofibrate)、吉非貝齊(gemfibrozil)、洛伐他汀(lovastatin)、普伐他汀(pravastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、普羅布考(probucol)、右旋甲狀腺素、奈格列奈(neteglinide)、瑞格列奈(repaglinide)； α -阻斷劑、諸如阿普洛爾(alprenolol)、阿替洛爾(atenolol)、噻嗎洛爾(timolol)、吲哚洛爾(pindolol)、普萘洛爾(propranolol)和美托洛爾(metoprolol)；ACE (血管收縮素轉換酶)抑制劑，諸如貝那普利(benazepril)、卡托普利(captopril)、依那普利(enalapril)、福辛普利(fosinopril)、賴諾普利(lisinopril)、阿曲普利(alatriopril)、喹那普利(quinapril)和雷米普利(ramipril)；鈣通道阻斷劑，諸如硝苯地平(nifedipine)、非洛地平(felodipine)、尼卡地平(nicardipine)、伊拉地平(isradipine)、尼莫地平(nimodipine)、地爾硫卓(diltiazem)和維拉帕米(verapamil)；及 α -阻斷劑，諸如多沙唑嗪(doxazosin)、烏拉地爾(urapidil)、哌唑嗪(prazosin)和特拉唑嗪(terazosin)；CART (古柯鹼安非他命調節的轉錄)促效劑、NPY (神經肽Y)拮抗劑、PYY促效劑、PYY2促效劑、PYY4促效劑、混合型PPY2/PYY4促效劑、MC4 (黑皮質素4)促效劑、食慾激素拮抗劑、TNF (腫瘤壞死因子)促效劑、CRF (促皮質素釋放因子)促效劑、CRF BP (促皮質素釋放因子結合蛋白)拮抗劑、尿皮質素促效劑、3促效劑、MSH (黑色素細胞刺激激素)促效劑、MCH (黑色素細胞濃縮激素)拮抗劑、CCK (膽囊收縮素)促效劑、血清素再吸收抑制劑、血清素和正腎上腺素再吸收抑制劑、混合型血清素和正腎上腺素能化合物、5HT (血清素)促效劑、鈴蟾素促效劑、甘丙胺素拮抗劑、生長激素、生長激素釋放化合物、TRH (促甲狀腺素釋放激素)促效劑、UCP 2或3 (解偶聯蛋白2或3)調節劑、瘦素促效劑、DA促效劑(溴隱亭(bromocriptin)、多普瑞辛

(doprexin))、脂肪酶/澱粉酶抑制劑、RXR (類視色素X受體)調節劑、TR促效劑；組織胺H3拮抗劑、促效劑或拮抗劑的胃抑制性多肽(GIP類似物)、胃泌素和胃泌素類似物。在一個具體例中，活性醫藥成分選自由以下組成之群：抗糖尿病劑、抗-肥胖劑、食慾調節劑、抗高血壓劑，用於治療及/或預防由於糖尿病或與糖尿病有關之併發症的藥劑，以及用於治療及/或預防由於肥胖或與肥胖有關的併發症和病症的藥劑。這些活性醫藥成分的實例為：胰島素、磺醯脲類、雙胍類、美格列奈、葡萄糖苷酶抑制劑、升糖素拮抗劑、DPP-IV (二肽基肽酶-IV)抑制劑、參與刺激葡萄糖新生及/或肝糖分解之肝酶的抑制劑、葡萄糖攝取調節劑、調節脂質代謝的化合物(諸如作為HMG CoA抑制劑(他汀類)的抗高血脂劑)、胃抑制性多肽(GIP類似物)、降低食物攝取的化合物、RXR促效劑和作用於細胞ATP-依賴性鉀通道的藥劑；考來烯胺、考來替泊、氯貝特、吉非貝齊、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普羅布考、右旋甲狀腺素、奈格列奈、瑞格列奈；阻斷劑、諸如阿普洛爾、阿替洛爾、噁嗎洛爾、吲哚洛爾、普萘洛爾和美托洛爾；ACE (血管收縮素轉換酶)抑制劑，諸如貝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、賴諾普利、阿曲普利、喹那普利和雷米普利；鈣通道阻斷劑，諸如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地爾硫卓和維拉帕米；及 α -阻斷劑，諸如多沙唑嗪、烏拉地爾、哌唑嗪和特拉唑嗪；CART (古柯鹼安非他命調節的轉錄)促效劑、NPY (神經肽Y)拮抗劑、PYY促效劑、PYY2促效劑、PYY4促效劑、混合型PPY2/PYY4促效劑、MC4 (黑皮質素4)促效劑、食慾激素拮抗劑、TNF (腫瘤壞死因子)促效劑、CRF (促皮質素釋放因子)促效劑、CRF BP (促皮質素釋放因子結合蛋白)拮抗劑、尿皮質素促效劑、3促效劑、MSH (黑色素細胞刺激激素)促效劑、MCH (黑色素細胞濃縮激素)拮抗劑、CCK (膽囊收縮素)促效劑、血清素再吸收抑制劑、血清素和正腎上腺素再吸收抑制劑、混合型血清素和正腎上腺素能化合物、5HT (血清素)促效劑、鈴蟾素促效劑、甘丙胺素拮抗劑、生

長激素、生長激素釋放化合物、TRH (促甲狀腺素釋放激素)促效劑、UCP 2或3 (解偶聯蛋白2或3)調節劑、瘦素促效劑、DA促效劑(溴隱亭、多普瑞辛)、脂肪酶/澱粉酶抑制劑、RXR (類視色素X受體)調節劑、TR促效劑；組織胺H3拮抗劑、促效劑或拮抗劑的胃抑制性多肽(GIP類似物)、胃泌素和胃泌素類似物。

【0209】 在一個具體例中，活性醫藥成分是一種治療活性肽，其中該肽包含至少2個胺基酸。在一些具體例中，該肽包含至少10個胺基酸或至少20個胺基酸。在一些具體例中，該肽包含不超過1000個胺基酸，諸如不超過500個胺基酸，例如不超過100個胺基酸。

【0210】 在接合物的一個具體例中，活性醫藥成分是抗糖尿病藥劑，諸如肽。在一些具體例中，該肽是GLP-1、GLP-1類似物、GLP-1促效劑、雙重GLP-1受體/升糖素受體促效劑；人類FGF21、FGF21類似物、FGF21衍生物；胰島素(例如人類胰島素)，胰島素類似物或胰島素衍生物。

【0211】 依據接合物的一個具體例，活性醫藥成分選自由胰島素、胰島素類似物，GLP-1和GLP-1類似物(例如GLP(-1)促效劑)組成之群。在接合物的一個具體例中，活性醫藥成分選自由胰島素、胰島素類似物，GLP-1和GLP-1類似物(例如GLP(-1)促效劑)組成之群。

【0212】 如本文所用，術語「GLP-1類似物」是指一種肽，其具有在形式上衍生自天然類升糖素肽-1 (GLP-1)(例如人類GLP-1)之結構的分子結構，該分子結構是在透過缺失及/或交換天然GLP-1中出現的至少一個胺基酸殘基，及/或添加至少一個胺基酸殘基。添加及/或交換的胺基酸殘基可以是可編碼胺基酸殘基或其他天然殘基或純合成胺基酸殘基。

【0213】 如本文所用，術語「GLP(-1)促效劑」是指GLP(-1)的類似物，其活化類升糖素肽-1-受體(GLP-1-受體)。GLP(-1)促效劑的實例包括但不限於以

下：利西拉來(lixisenatide)、艾塞那肽/exendin-4、塞馬魯肽(semaglutide)、他沙普魯肽(taspoglutide)、阿比魯肽(albiglutide)、杜拉魯肽(dulaglutide)。

【0214】 利西拉來(lixisenatide)具有以下胺基酸序列(SEQ ID NO：98)：
His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂。

【0215】 艾塞那肽(exenatide)具有以下胺基酸序列(SEQ ID NO：99)：
His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH₂

【0216】 偶聯至Lys(20)的塞馬魯肽(semaglutide)-白蛋白黏合劑具有以下胺基酸序列(SEQ ID NO：100)：
His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(AEEAc-AEEAc-γ-Glu-17-羧基十七醯基)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly。

【0217】 杜拉魯肽(dulaglutide)(經由肽連接子偶聯至fc-片段的GLP-1(7-37))具有以下胺基酸序列(SEQ ID NO：101)：
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly。

【0218】 如本文所用，術語「FGF-21」指「纖維母細胞生長因子21」。FGF-21化合物可以是人類FGF-21，FGF-21的類似物(稱為「FGF-21類似物」)或FGF-21的衍生物(稱為「FGF-21衍生物」)。

【0219】 在一些具體例中，活性醫藥成分是胰島素類似物。胰島素類似物的實例包括，但不限於以下：

- (i) 「天冬胰島素(Insulin aspart)」是人類胰島素，其中胺基酸B28 (即人類胰島素B鏈中第28號胺基酸)(其為脯胺酸)被天冬胺酸置換。
- (ii) 「賴脯胰島素(Insulin lispro)」是人類胰島素，其中在B鏈的C端上，倒數第二個離胺酸和脯胺酸殘基被反置(人類胰島素：ProB28LysB29；insulin lispro：LysB28ProB29)。
- (iii) 「格林辛胰島素(Insulin glulisine)」與人類胰島素不同之處在於，在位置B3處的天冬胺酸被離胺酸置換，而在位置B29中的離胺酸被麩胺酸置換。
- (iv) 「甘精胰島素(Insulin glargine)」與人類胰島素不同之處在於，在位置A21處的天冬胺酸被甘胺酸置換，而B鏈在羧基端處延長兩個精胺酸。

【0220】此外，胰島素類似物可以是「地特胰島素(Insulin detemir)」，其與人類胰島素不同之處在於，在位置B30處的胺基酸蘇胺酸缺失，且脂肪酸殘基(肉荳蔻酸)附接至位置B29中的離胺酸的 ϵ -胺基官能基。或者，胰島素類似物可以是「Insulin degludec」，其與人類胰島素不同之處在於，在位置B30處的胺基酸蘇胺酸缺失，且十六碳二酸經由 γ -L-麩胺醯基連接子接合至胺基酸離胺酸B29。Insulin degludec是一種長效胰島素。

【0221】在一些具體例中，胰島素類似物是上文A段中所述的胰島素類似物。因而適用上文提供的定義和解釋。在一些具體例中，接合物所包含的胰島素類似物是相對於親本胰島素包含至少一個突變的胰島素類似物，其中胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變，及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變。如本文上面A段中所述，胰島素類似物可視情況包含更多突變。例如，親本胰島素(諸如人類胰島素)的A鏈的位置14處的胺基酸殘基(A14)可以被麩胺酸取代，B鏈的位置30處的胺基酸可能缺失(即不存在(desB30突變))。

【0222】 在一些具體例中，接合物所包含的胰島素類似物是 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素(諸如 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物24)。例如，Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：47中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：48中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK)的B鏈。

【0223】 在一些具體例中，接合物所包含的胰島素類似物是 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(諸如 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表4中(參見類似物22)。例如，Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素包含具有如SEQ ID NO：43中所示胺基酸序列(GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，以及具有如SEQ ID NO：44中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFIYTPK)的B鏈。

【0224】 在一些具體例中，接合物所包含的胰島素類似物是 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(諸如 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)。這個類似物的序列例如顯示在實例段的表1中(參見類似物39)。

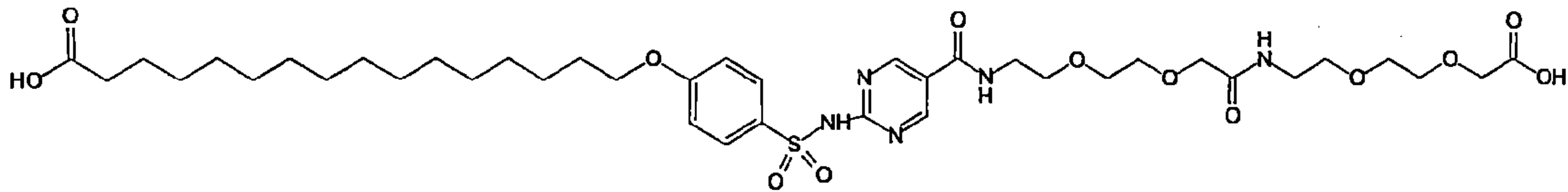
【0225】 依據接合物的一個具體例，活性醫藥成分是胰島素或胰島素類似物，例如如上文所述的胰島素類似物(諸如 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素)或 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素)，其中式(I)之磺醯胺共價結合之肽的胺基基團是一種存在於胰島素或胰島素類似物中之離胺酸的 ϵ 胺基基團，或是胰島素或胰島素類似物的B鏈的N-端胺基基團。例如，胰島素或胰島素類似物具有一個在A鏈及/或B鏈中的離胺酸。在一些具體例中，胰島素或胰島素類似物具有一個在A鏈與B鏈中的離胺酸。

【0226】 依據接合物的一個具體例，式(I)之磺醯胺共價結合之肽的胺基基團是存在於位置B26至B29處(例如人類胰島素或人類胰島素類似物之B鏈的B29)之離胺酸的 ϵ 胺基基團。

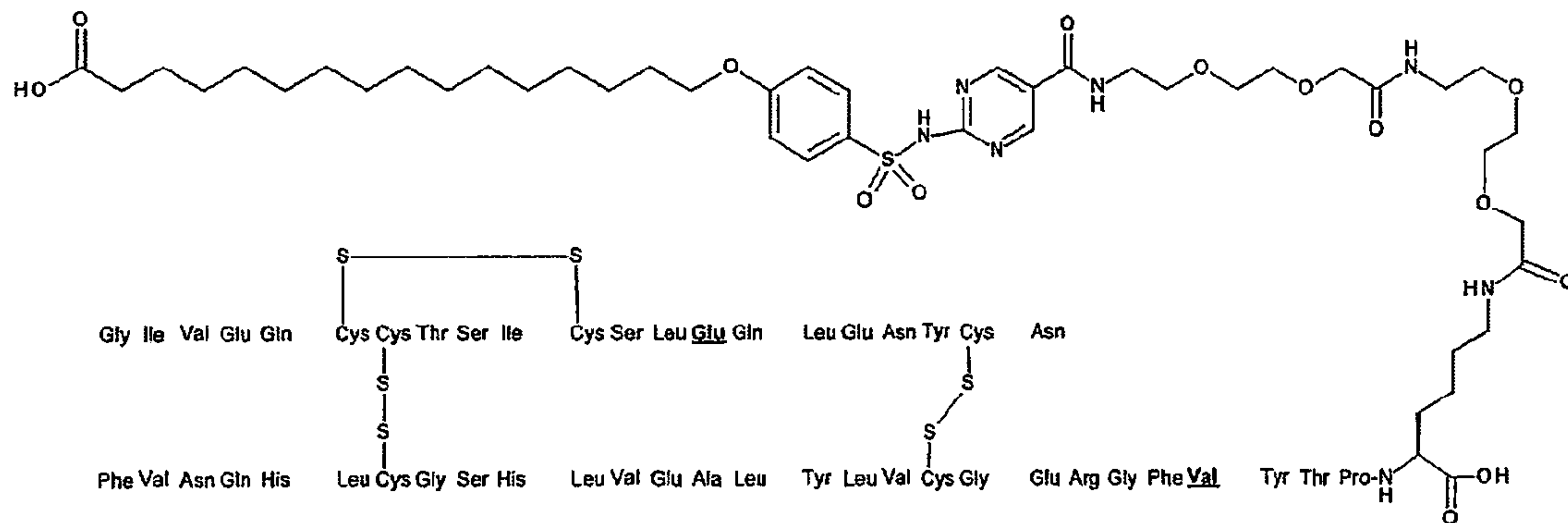
【0227】 在一些具體例中，上面A段中所提供的胰島素類似物存在單個離胺酸殘基。例如，Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素)和Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素在位置B29處具有一個離胺酸殘基。該離胺酸殘基是在B鏈的C端處的末端胺基酸，因為在位置B30處的胺基酸不存在。在本文提供之接合物的一些具體例中，式(I)的磺醯胺通常經由醯胺鍵共價結合至該離胺酸殘基的 ϵ 胺基基團。

【0228】 例示性接合物顯示於圖5至圖8中，並且於實例段，例如實例10中說明。

【0229】 在本文提供之接合物的一些具體例中，接合物包含 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素(作為胰島素類似物)和下式的磺醯胺(作為白蛋白黏合劑)：

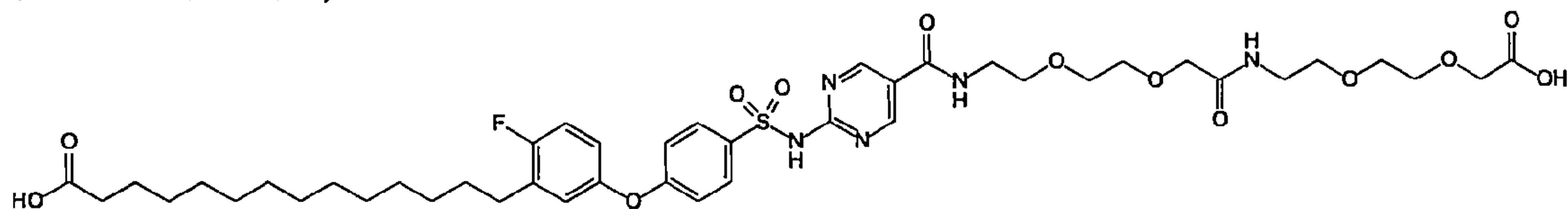


【0230】 上述接合物可具有以下結構(亦參見圖5，接合物1)：

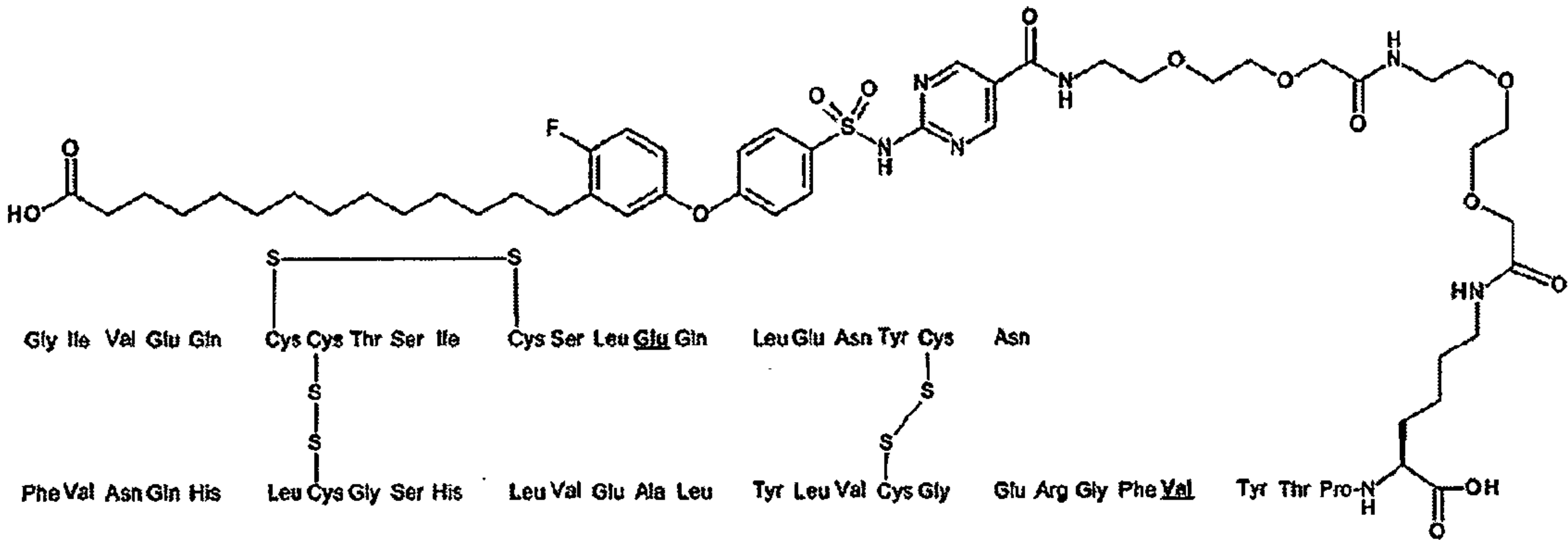


【0231】 A鏈的序列(SEQ ID NO：47)和B鏈的序列(SEQ ID NO：48)以三字母代碼表示，但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合至黏合劑(經由離胺酸殘基的ε-胺基酸)。

【0232】 在本文提供之接合物的一些具體例中，接合物包含 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素(作為胰島素類似物)和下式的磺醯胺(作為白蛋白黏合劑)：

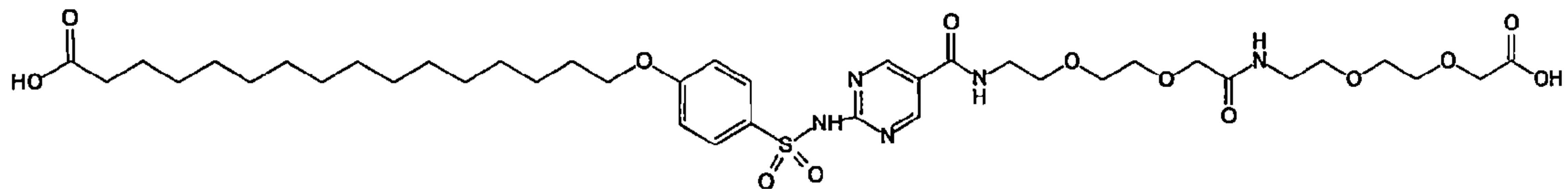


【0233】 上述接合物可具有以下結構(亦參見圖6，接合物2)：

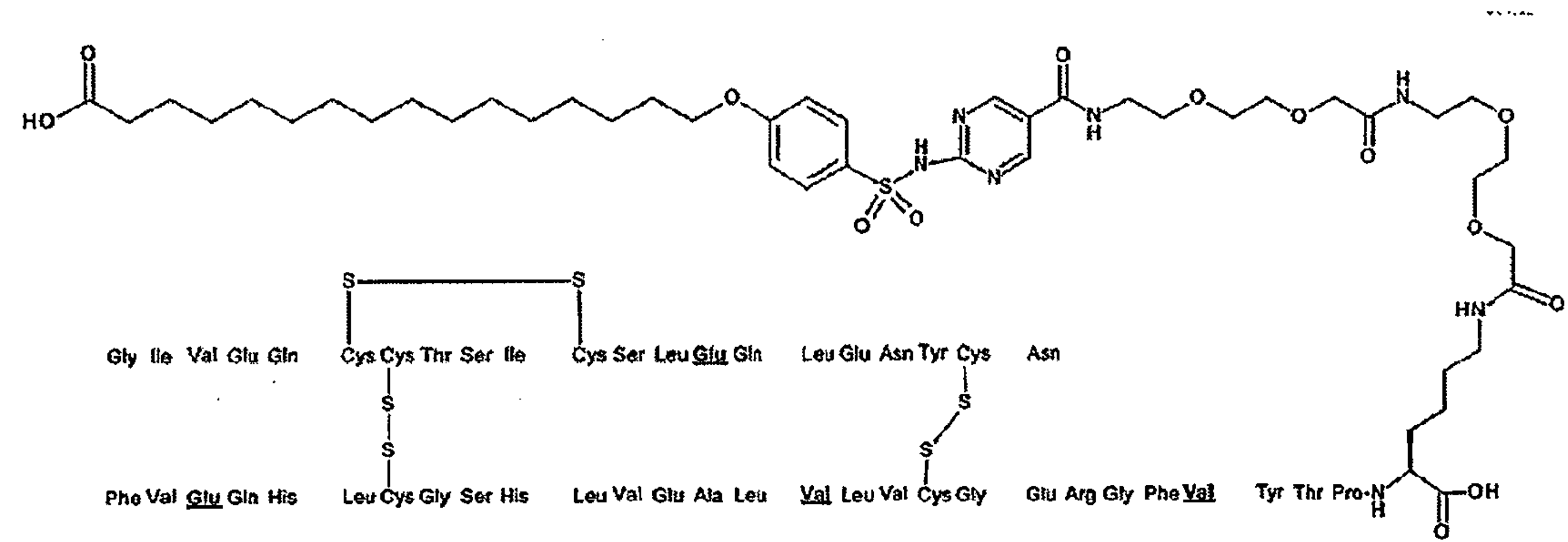


【0234】 A鏈的序列(SEQ ID NO：47)和B鏈的序列(SEQ ID NO：48)以三字母代碼表示，但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合至黏合劑(經由離胺酸殘基的ε-胺基酸)。

【0235】 在本文提供之接合物的一些具體例中，接合物包含 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素(作為胰島素類似物)和下式的磺醯胺(作為白蛋白黏合劑)：

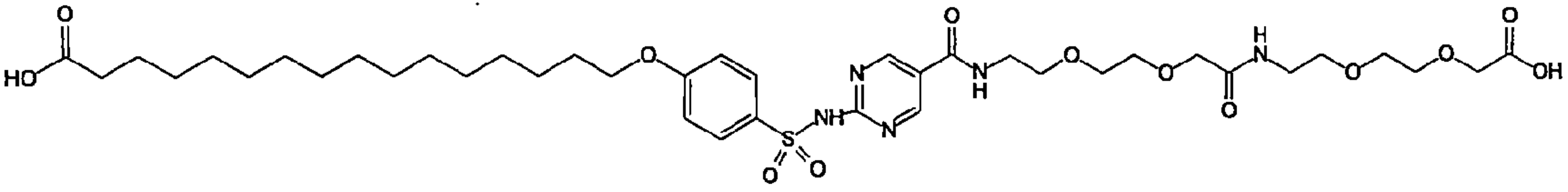


【0236】 上述接合物可具有以下結構(亦參見圖7，接合物3)：

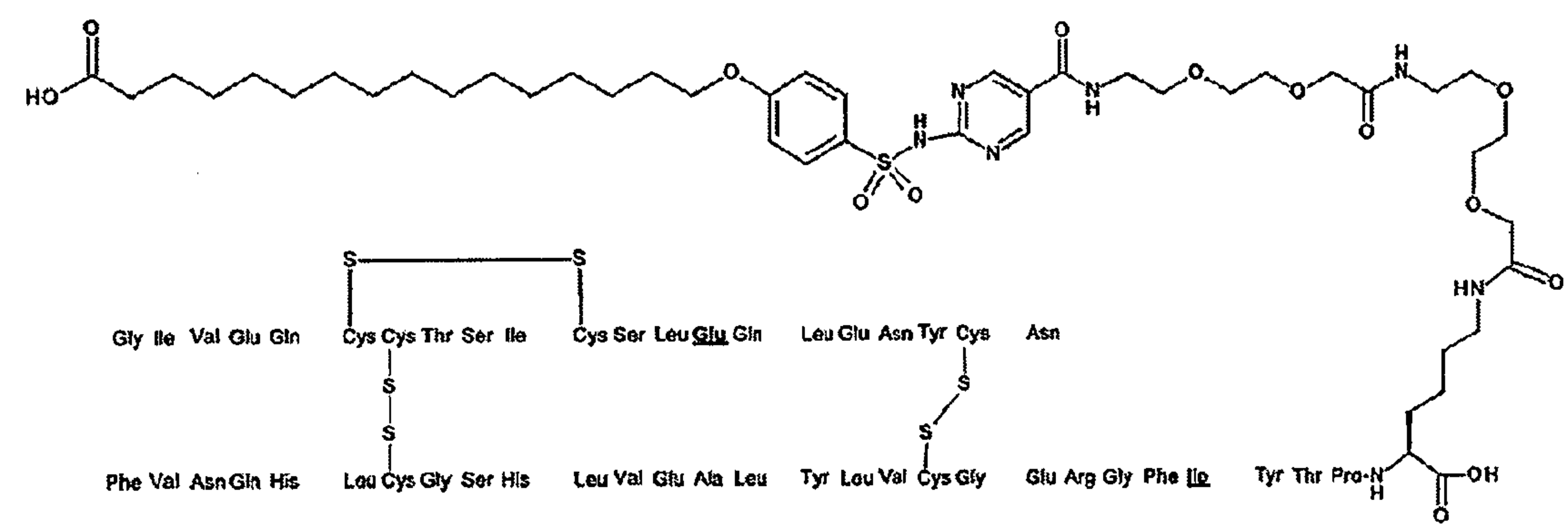


【0237】 A鏈的序列(SEQ ID NO：77)和B鏈的序列(SEQ ID NO：78)以三字母代碼表示，但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合至黏合劑(經由離胺酸殘基的ε-胺基酸)。

【0238】 在本文提供之接合物的一些具體例中，接合物包含 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素(作為胰島素類似物)和下式的磺醯胺(作為白蛋白黏合劑)：



【0239】 上述接合物可具有以下結構(亦參見圖8，接合物4)：



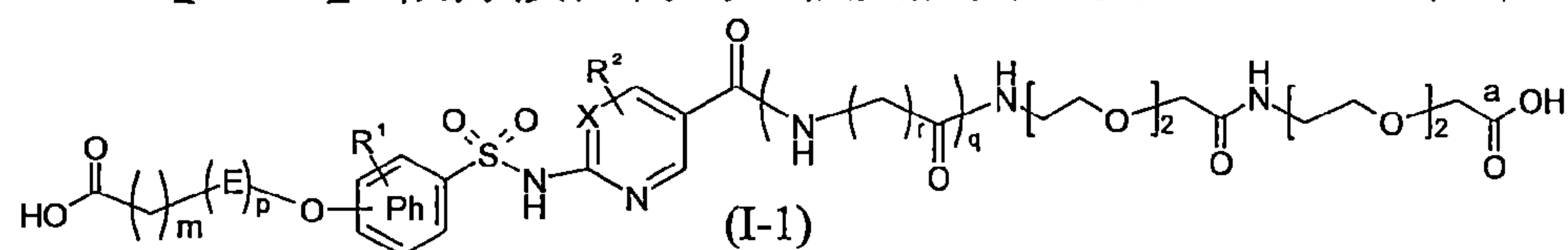
【0240】 A鏈的序列(SEQ ID NO：43)和B鏈的序列(SEQ ID NO：44)以三字母代碼表示，但B鏈中的最後一個胺基酸(位置B29處的離胺酸)除外。顯示離胺酸殘基的結構。離胺酸殘基共價結合至黏合劑(經由離胺酸殘基的ε-胺基基團)。

【0241】 本文還提供包含診斷化合物的接合物。在接合物的一些具體例中，診斷化合物是造影劑，諸如放射性造影劑。在一些具體例中，造影劑是基於釷或碘的磁共振成像(MRI)造影劑。在一些具體例中，造影劑是釷噴酸二甲葡胺(gadopentetate dimeglumine)、釷噴酸葡胺(gadoterate meglumine)、釷貝葡胺(gadobenate dimeglumine)、釷特醇(gadoteridol)、釷雙胺(gadodiamide)、釷弗塞胺(gadoversetamide)、釷塞酸二鈉(gadoxetate disodium)、泛影酸(amidotrizoate)或泛影酸之鹽(例如泛影酸的甲葡胺(meglumine)鹽，鈉鹽及/或離胺酸鹽)、碘海醇(iohexol)((5-[乙醯基(2,3-二羥丙基)胺基]-1-N,3-N-雙(2,3-二羥丙基)-2,4,6-三碘苯-1,3-二甲醯胺))、碘帕醇(iopamidol)((1-N,3-N-雙(1,3-二羥丙烷-2-基)-5-[[((2S)-2-羥基丙醯基]胺基]-2,4,6-三碘苯-1,3-二甲醯胺))、碘普羅胺(iopromide)((1-N,3-N-雙(2,3-二羥丙基)-2,4,6-三碘-5-[(2-甲氧基乙醯基)胺基]-3-N-甲基-苯-1,3-二甲醯胺))或碘克沙醇(ioxidanol)((5-[乙醯基-[3-[乙醯基-[3,5-雙(2,3-二羥丙基胺基甲醯基)-2,4,6-三碘-苯基]胺基]-2-羥基-丙基]胺基]-N,N'-雙(2,3-二羥丙基)-2,4,6-三碘苯-1,3-二羧醯胺))。在一些具體例中，造影劑是選自由以下組成之組：釷噴酸二甲葡胺、釷噴酸葡胺、釷貝葡胺、釷特醇、釷雙胺、釷弗塞胺、釷塞酸二鈉、泛影酸或泛影酸之鹽(例如泛影酸的甲葡胺鹽，鈉鹽及/或離胺酸鹽)、碘海醇(5-[乙醯基(2,3-二羥丙基)胺基]-1-N,3-N-雙(2,3-二羥丙基)-2,4,6-三碘苯-1,3-二甲醯胺)、碘帕醇(1-N,3-N-雙(1,3-二羥丙烷-2-基)-5-[[((2S)-2-羥基丙醯基]胺基]-2,4,6-三碘苯-1,3-二甲醯胺)、碘普羅胺((1-N,3-N-雙(2,3-二羥丙基)-2,4,6-三碘-5-[(2-甲氧基乙醯基)胺基]-3-N-甲基-苯-1,3-二甲醯胺)或碘克沙醇(5-[乙醯基-[3-[乙醯基-[3,5-雙(2,3-二羥丙基胺基甲醯基)-2,4,6-三碘-苯基]胺基]-2-羥基-丙基]胺基]-N,N'-雙(2,3-二羥丙基)-2,4,6-三碘苯-1,3-二羧醯胺)。

【0242】 如上文所討論，式(I)的磺醯胺共價結合至診斷化合物，其在於式(I)的磺醯胺的末端羧基「a」共價結合至診斷化合物的合適官能基團。合適的官

能基團可以是例如診斷化合物的胺基(一級或二級)或羥基。

【0243】 依據接合物的一個具體例，磺醯胺具有式(I-1)



其中

E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群，並例如為氟原子；

X 表示氮原子或-CH-基團；

p 為零或1；

q 為零或1；

r 為範圍1至6的整數；

R¹ 表示選自氫原子和鹵素原子之群的至少一個殘基，其中鹵素原子為例如氟或氯原子；

R² 表示選自氫原子，C1至C3烷基和鹵化C1至C3烷基之群的至少一個殘基，其中C1至C3烷基為例如甲基，而鹵化C1至C3烷基為例如全鹵化，例如三氟甲基；

若p為零，則m為範圍5到15的整數若p為1，則m為範圍7到15的整數。

【0244】 在接合物的一個具體例中，磺醯胺的殘基R¹和R²為氫原子。

【0245】 在接合物的一個具體例中，磺醯胺的殘基X表示氮原子。

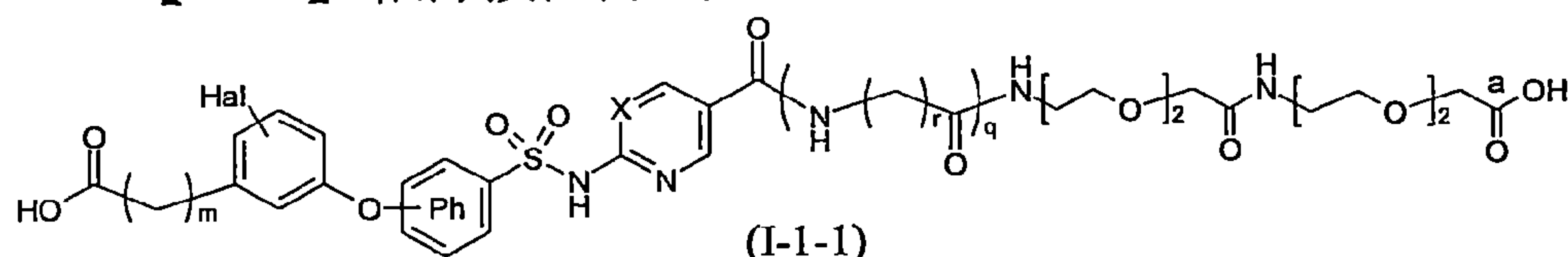
【0246】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺的式(I)的HOOC-(CH₂)_m-(O)_s-(E)_p-(CH₂)_n-(A)_r-基團或式(I-1)的HOOC-(CH₂)_m-(E)_p-O-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的間位或對位。

【0247】 依據接合物的另一個具體例，如果p為1，則HOOC(CH₂)_m-(O)_s-基

團和 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_r$ 基團位於式(I)的磺醯胺的 $(\text{E})_p$ 上的間位或對位，或 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m$ -基團位於式(I-1)的 $(\text{E})_p$ 上的間位或對位。

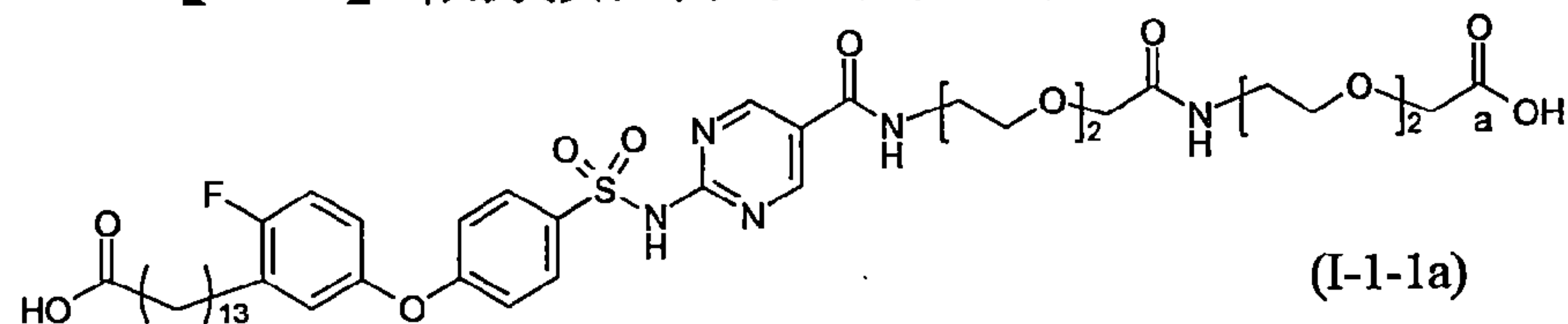
【0248】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺的指數 q 為零。

【0249】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺具有式(I-1-1)

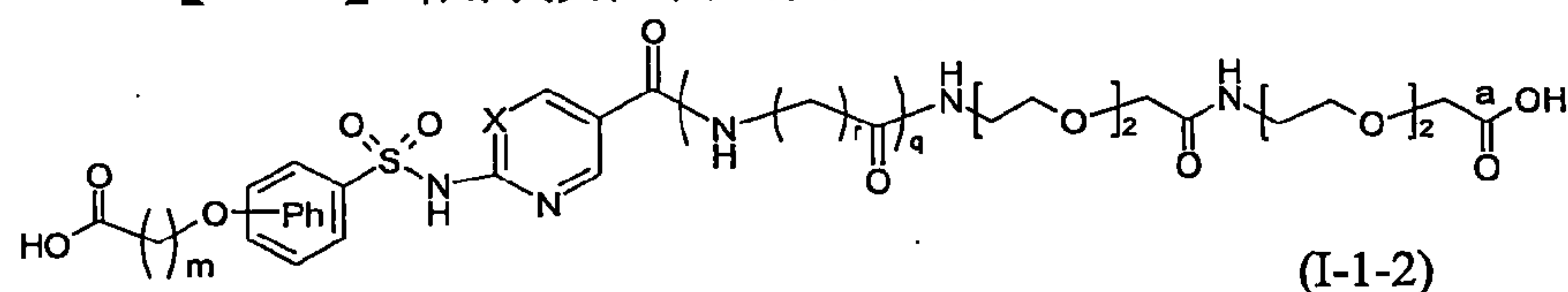


其中 X 是氮原子或 $-\text{CH}-$ 基團，例如氮原子； m 為範圍 7 至 15 的整數； r 為範圍 1 至 6 的整數； q 為零或 1，例如零； Hal 是選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群的鹵素原子，例如氟原子；且 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}_6\text{H}_3\text{Hal}-\text{O}-$ 基團相對於 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 基團位於苯環 Ph 上的間位或對位。

【0250】 依據接合物的一個具體例，磺醯胺具有式(I-1-1a)

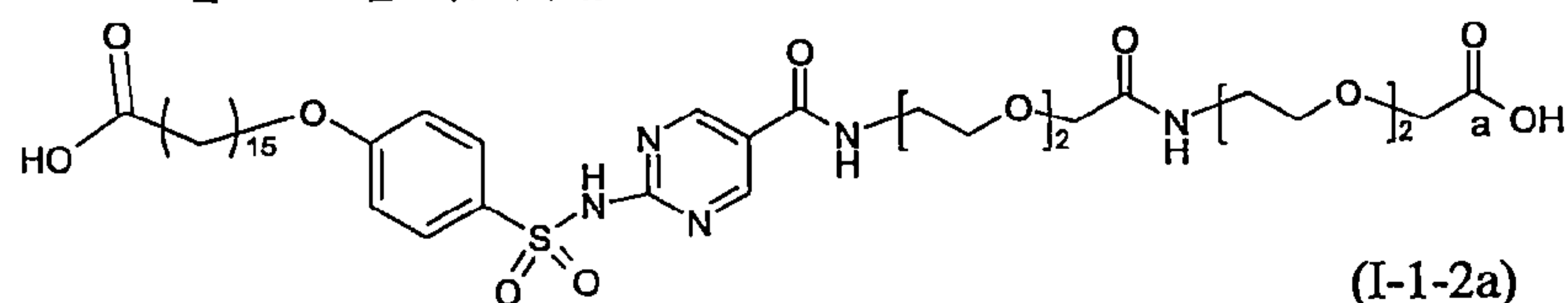


【0251】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺具有式(I-1-2)

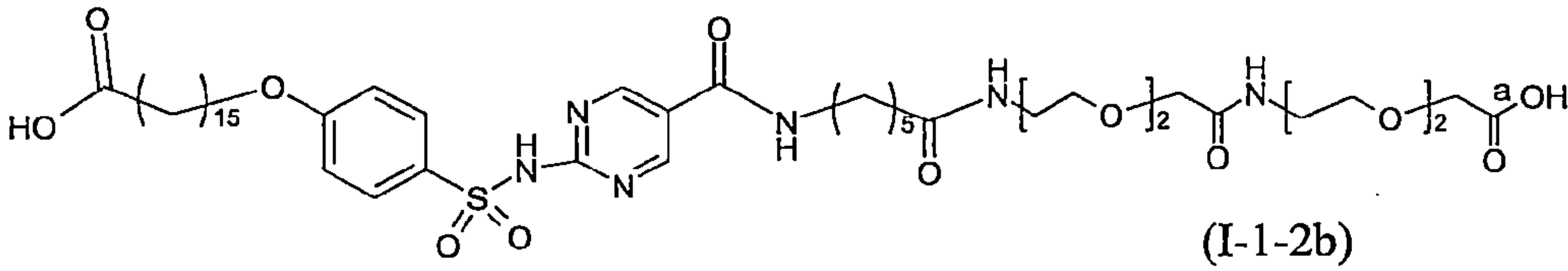


其中 X 是氮原子或 $-\text{CH}-$ 基團，例如氮原子； m 為範圍 5 至 15 的整數； r 為範圍 1 至 6 的整數； q 為零或 1，例如零；且 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ 基團相對於 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 基團位於苯環 Ph 上的間位或對位。

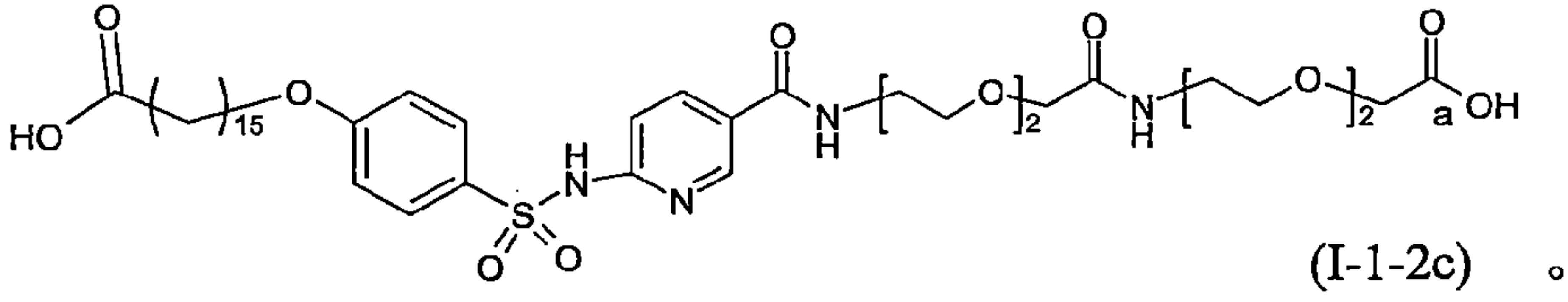
【0252】 依據接合物的一個具體例，磺醯胺具有式(I-1-2a)



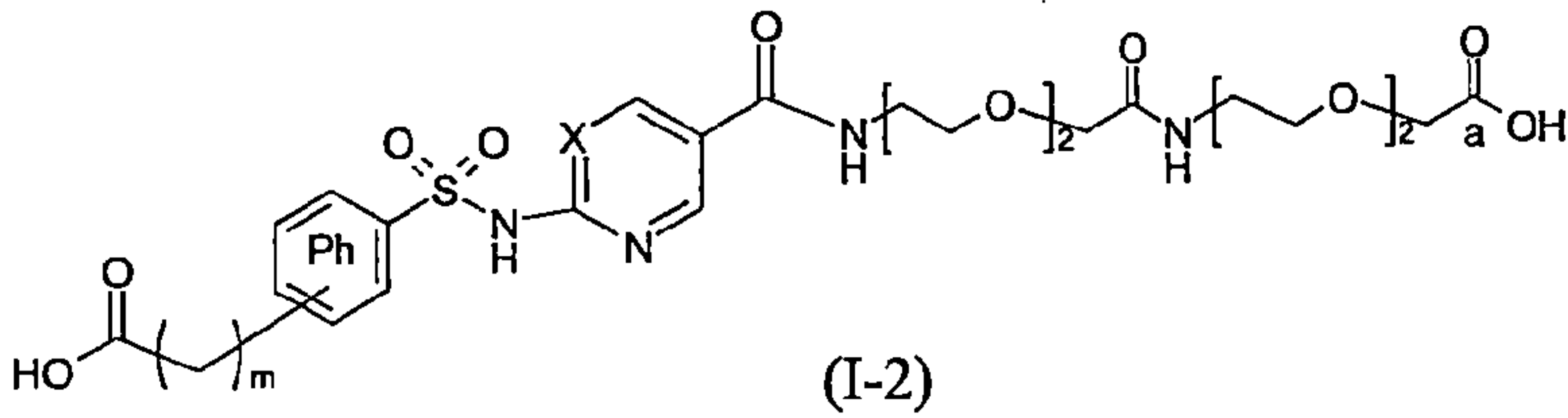
或式(I-1-2b)



或式(I-1-2c)



【0253】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺具有式(I-2)



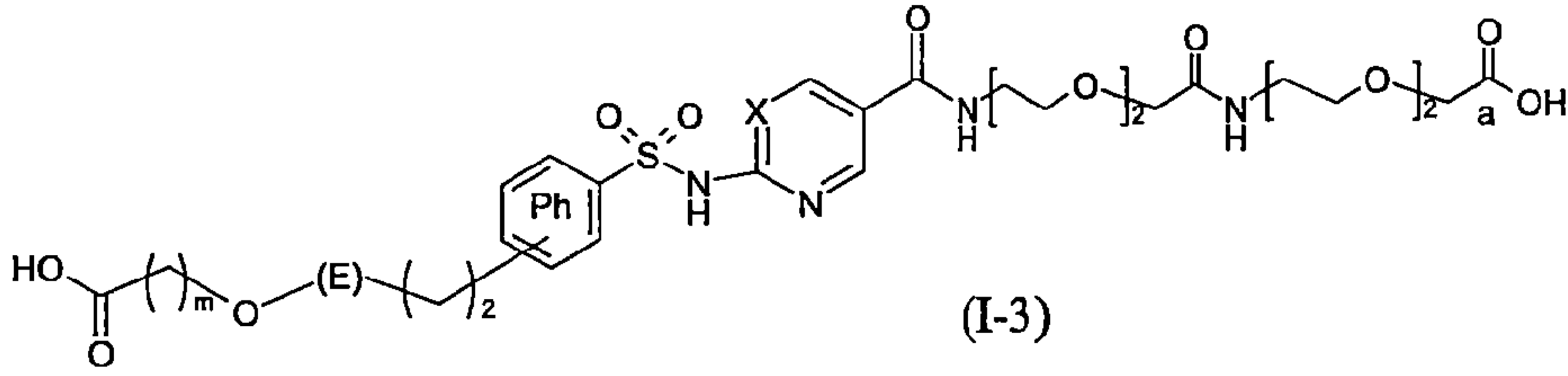
其中

X 表示氮原子或-CH-基團；且

m 為範圍5至17的整數，例如範圍11至17的整數。

【0254】 依據接合物的一個具體例，式(I-2)的磺醯胺的HOOC-(CH₂)_m-基團位於苯基環Ph上相對於-S(O)₂-基團的間位或對位。

【0255】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺具有式(I-3)



其中

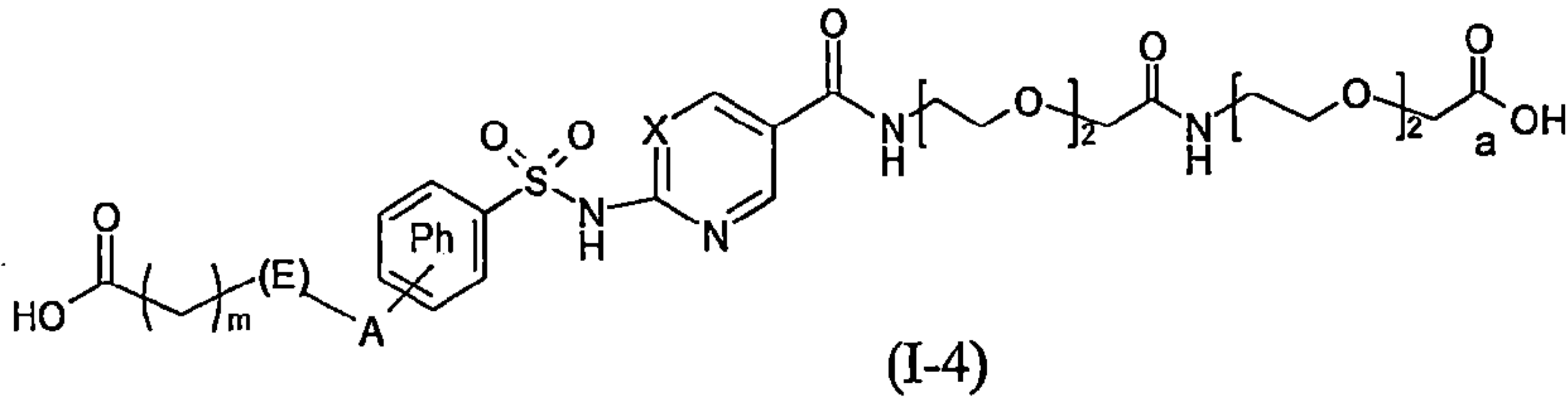
E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，
溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或-CH-基團；

m 為範圍5到17的整數，例如11。

【0256】 依據接合物的一個具體例，式(I-3)的磺醯胺的HOOC-(CH₂)_m-O-基團和-(CH₂)₂-基團位於式(I-3)之(E)上的對位，而HOOC-(CH₂)_m-O-(E)-(CH₂)₂-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的對位。

【0257】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺具有式(I-4)



其中

A 為OCH₂-基團或-CH₂O-基團；

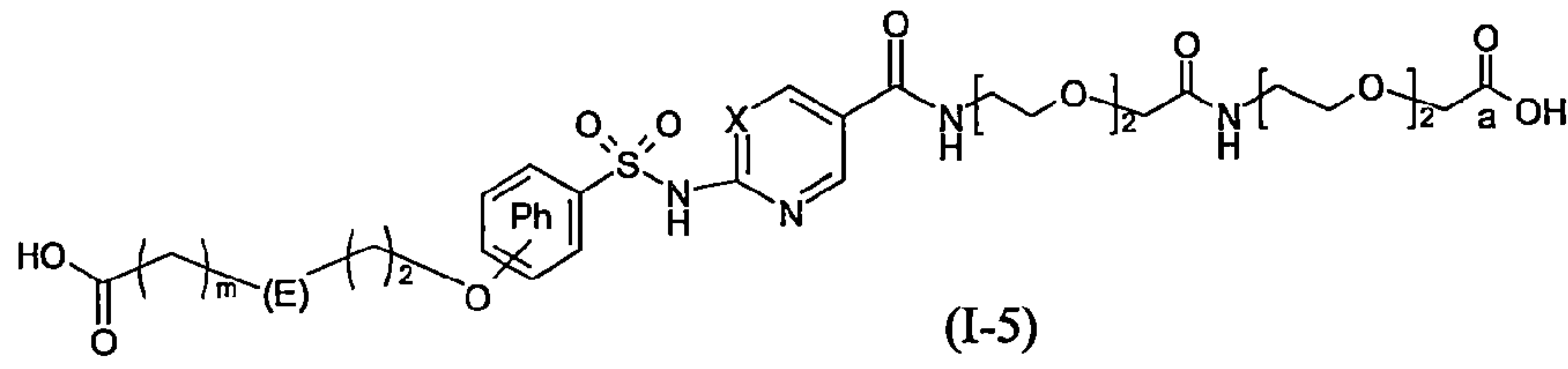
E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，
溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或-CH-基團；

m 為範圍5至17的整數，例如範圍9至13的整數。

【0258】 依據接合物的一個具體例，式(I-4)的磺醯胺的HOOC-(CH₂)_m-基團和-A-基團位於式(I-4)的(E)上的對位，而-A-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的對位。

【0259】 依據接合物的另一個具體例，磺醯胺具有式(I-5)



其中

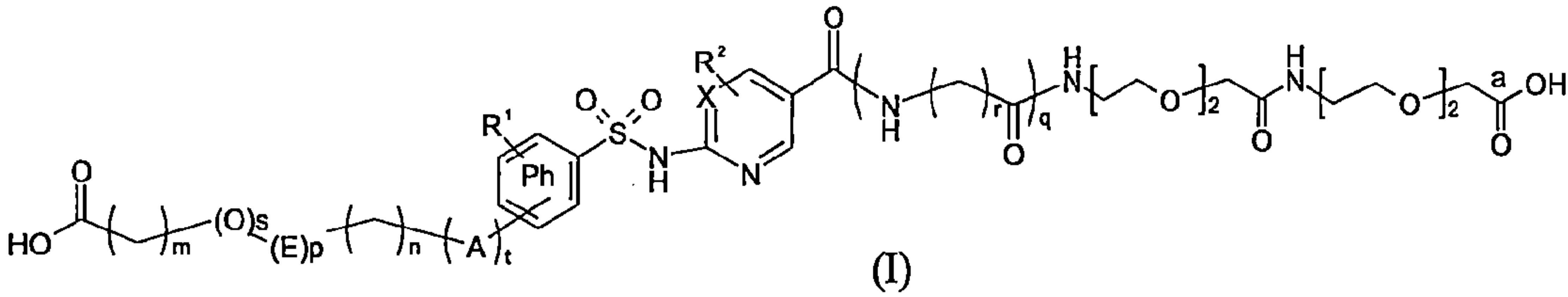
E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，
溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或-CH-基團；
m 為範圍5至17的整數，例如範圍7至9的整數。

【0260】 依據接合物的一個具體例，式(I-5)的磺醯胺的HOOC-(CH₂)_m-基團和-(CH₂)₂-基團位於式(I-5)之(E)上的對位，而HOOC-(CH₂)_m(E)-(CH₂)₂-O-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的對位。

製備接合物的方法

【0261】 本文提供了製備上文C段中所述之接合物的方法。因此，本文提供了製備包含式(I)的磺醯胺及活性醫藥成分之接合物的方法



其中在式(I)的磺醯胺中：

- A 選自由氧原子、-CH₂CH₂-基團，-OCH₂-基團和-CH₂O-基團組成之群；
- E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；
- X 表示氮原子或-CH-基團；
- m 為範圍5至17的整數；
- n 為零或範圍1至3的整數；
- p 為零或1；
- q 為零或1；
- r 為範圍1至6的整數；
- s 為零或1；
- t 為零或1；
- R¹ 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一

個殘基；

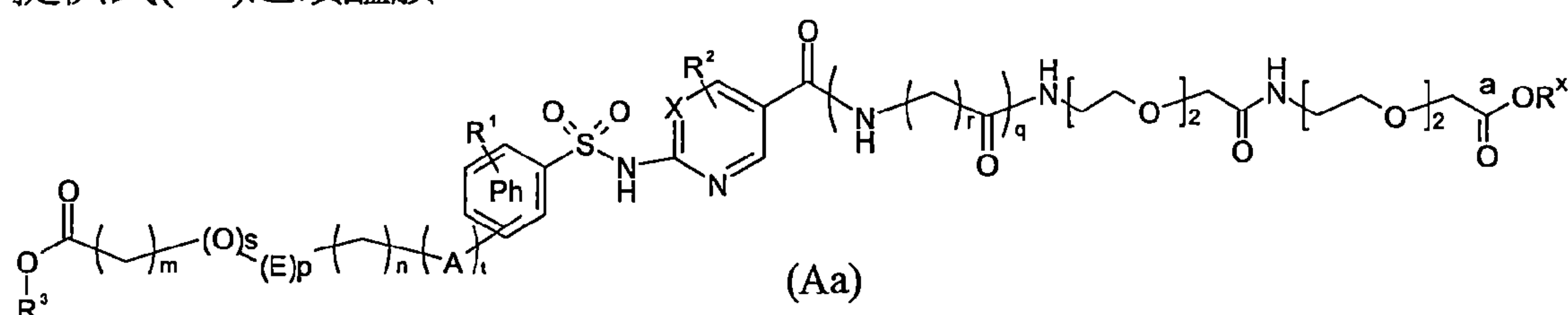
R^2 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一

個殘基；

其中式(I)的磺醯胺共價結合至活性醫藥成分，在於式(I)之磺醯胺的末端羧基「a」

共價結合至活性醫藥成分的胺基基團；

(a) 提供式(Aa)之磺醯胺



其中X、Y、A、E、 R^1 ， R^2 和標號m、n、p、q、r、s、t具有如上文相對於式

(I)所定義的含義， R^x 是氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的

活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-

琥珀醯亞胺基基團，其中 R^x 視情況為N-琥珀醯亞胺基基團，

且 R^3 為保護基或氫原子，視情況為氫原子；以及具有受保護或未受保護之C

端的活性醫藥成分；

(b) 在適合於在式(Aa)之磺醯胺的游離或經活化(視情況經活化)羧基「a」與具有

受保護或未受保護C端之活性醫藥成分的胺基基團之間形成醯胺鍵的條件

下，使式(Aa)磺醯胺與具有受保護或未受保護之C端的活性醫藥成分反應；

(c) 視情況移除一或兩個保護基，例如移除兩個保護基。

【0262】 在該方法的一些具體例中，對於式(I)的磺醯胺以及對於式(Aa)的

磺醯胺，排除s為1，p為零，n為零，A為氧原子且t為1的組合。在一些具體例中，

對於式(I)的磺醯胺以及對於式(Aa)的磺醯胺，s是零，其中其餘殘基和標號分別

具有上文式(I)和(Aa)所指明的含意。

【0263】也可以如本文上面C段中所述藉由包含以下的方法來製備接合物：

- a) 提供式(Aa)的磺醯胺，其中 R^x 表示活化基團(R^x =活化基團)；
- b) 提供活性醫藥成分的水溶液，其中該水溶液視情況包含醇；
- c) 使b)的水溶液與a)的式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)接觸；及
- d) 使式(Aa)的磺醯胺與活性醫藥成分反應，獲得包含磺醯胺和活性醫藥成分之接合物的溶液，其中該磺醯胺共價結合至該活性醫藥成分。

【0264】在這個方法中，活性醫藥成分視情況是具有游離胺基基團的胰島素多肽，視情況是上文A段中的胰島素類似物或其前體，其各自具有游離胺基基團，其中胰島素類似物的前體包含額外的連接子肽，其長度為至少兩個胺基酸，或長度範圍在2至30個胺基酸，或長度範圍在4至9個胺基酸。在這個方法中，a)中提供的水溶液的pH值範圍為9至12，或範圍為9.5至11.5，或範圍為10至11，其中依據ASTM E 70：2007使用pH敏感性玻璃電極來測定pH值；其中視情況透過添加以下將pH值調整在對應範圍內：鹼；或選自由鹼金屬氫氧化物(氫氧化鋰、氫氧化鈉、氫氧化鉀)，烷基胺及其兩者或更多者的混合物組成之群的鹼；或選自三級烷基胺 $N(C1至C5烷基)_3$ 、一級烷基胺 $H_2N-C(C1至C5烷基)_3$ 及其兩者或更多者的混合物組成之群，其中三級胺與一級烷基胺的C1至C5烷基各自獨立地選自支鏈或直鏈C1至C5烷基，且其中每個C1至C5烷基具有至少一個選自氫原子，羥基和羧基之群的取代基；或選自以下之群：三級烷基胺 $N(C1至C3烷基)_3$ ，一級烷基胺 $H_2N-C(C1至C3烷基)_3$ 及其兩者或更多者的混合物，其中三級胺與一級胺的C1至C3烷基各自獨立地選自支鏈或直鏈C1至C3烷基，且其中每個C1至C3烷基具有至少一個選自氫原子，羥基和羧基之群的取代基；或選自二羥乙甘胺酸、三甲胺，叁(羥甲基)胺基甲烷及其兩者或更多者之群的混合物；其中該鹼視情況至少包含三乙胺。

【0265】在這個方法的一個變化形式中，依據步驟c)，使b)的水溶液與式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)接觸，因為式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)以式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)的溶液被添加至b)的水溶液，其中式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)的溶液視情況為有機溶液，視情況為包含式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)和極性非質子有機溶劑的溶液，視情況於標準條件下(T：20-25°C，p：1013 mbar)具有辛醇-水分配係數(K_{ow})範圍在1至5或範圍在2至4的極性非質子有機溶劑；或選自由四氫呋喃、乙腈、二甲基甲醯胺，及其兩者或更多者的混合物組成之群；或選自由四氫呋喃，乙腈及四氫呋喃與乙腈的混合物之群。

【0266】在這個方法的一個變化形式中，依據步驟c)，使b)的水溶液與式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)接觸，因為式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)以固體形式，或至少部分以結晶形式或至少90重量%的結晶形式添加至b)的水溶液中。

【0267】在這個方法中，步驟d)視情況包含：d.1)使該式(Aa)的磺醯胺(R^x =活化基團)與胰島素類似物的前體在pH範圍為9至12，或範圍為9.5到11.5，或範圍為10至11下反應，獲得包含式(I)的磺醯胺和胰島素類似物前體的前接合物，其中該式(I)的磺醯胺藉由在式(I)的磺醯胺的-C(=O)-O(R)與胰島素類似物的前體的胺基基團之間形成的醯胺鍵C(=O)-NH-共價結合至連接胰島素類似物前體；d.2)酶促消化，視情況在範圍小於9的pH下或範圍在7-9的pH下，對依據d.1)獲得之前接合物的胰島素類似物前體進行消化，得到包含式(I)的磺醯胺和胰島素類似物的接合物的溶液。該方法進一步視情況包含：e)從在d)或d.2)中獲得的溶液分離式(I)的磺醯胺和胰島素類似物的接合物。

【0268】在這個方法中，式(Aa)的磺醯胺的活化基團 R^x 視情況選自由7-氮雜苯并三唑(衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團組成之群，其中 R^x 更視情況為N-琥珀醯亞胺基基團。

【0269】在該方法的一個變化形式中，依據b)之胰島素類似物前體的水溶液包含選自由C1至C4一元醇以及其兩者或更多者之混合物組成之群的醇，或選自由以下組成之群的醇：甲醇、乙醇、丙-2-醇、丙-1-醇、丁-1-醇及其兩者或多者的混合物，或選自由乙醇，丙-2-醇，丙-1-醇及其兩者或更多者的混合物組成之群。視情況，醇是以範圍0.0001至35體積%，或範圍0.001至30體積%，或範圍0.01至25體積%，或範圍0.1至20體積%之量存在於水溶液中，其各自是基於水與醇的總體積。在這個方法中，依據d.2)的酶促消化包含使用至少一種選自由胰蛋白酶、TEV蛋白酶(煙草蝕刻病毒蛋白酶)及其兩者或更多者之混合物組成之群的酶。在這個方法中，胰島素類似物是如上面A段及/或在本文C段中所述的胰島素類似物。在這個方法中，式(I)的磺醯胺藉由分別藉由式(I)之磺醯胺的 $-C(=O)-O(R^3)$ 和胰島素類似物及其前體的游離胺基基團之間各自形成醯胺鍵 $C(=O)-NH-$ 而共價結合至胰島素類似物及其前體，其中胰島素類似物及其前體的游離胺基基團分別為視情況包含在胰島素類似物及其前體中之離胺酸的胺基基團，視情況末端離胺酸，視情況分別存在於胰島素類似物及其前體之C端處的離胺酸，視情況存在於B鏈之C端處的離胺酸。

【0270】本文提供了用於製備包含式(I)之磺醯胺及診斷化合物之接合物的方法，其中該診斷化合物依據上述用於與活性醫藥成分鍵結之方法利用適當的官能基團共價結合至式(Aa)之磺醯胺的游離或經活化(視情況經活化)羧基基團「a」。

【0271】本文提供得自或可得自如上所述方法的接合物，其包含式(I)之磺醯胺，及活性醫藥成分或診斷化合物。

【0272】本文提供了醫藥組合物，其包含醫藥或診斷有效量，該接合物包含如上所述之式(I)之磺醯胺及活性醫藥成分或診斷化合物。

【0273】 本文提供如上所述包含式(I)的磺醯胺及用作藥劑之活性醫藥成分的接合物。

【0274】 一個具體例是有關於如上所述包含式(I)之磺醯胺和及用作藥劑之活性醫藥成分的接合物，以供治療選自由妊娠糖尿病、第1型糖尿病、第2型糖尿病及高血糖症組成之群的疾病，及/或降低血糖水平。在一些具體例中，該疾病是第2型糖尿病。

【0275】 本文提供治療患有選自以下組成之群的疾病及/或需要降低血糖水平的患者的方法：妊娠糖尿病、第1型糖尿病，第2型糖尿病和高血糖症；該方法包含投與治療有效量之如上所述包含式(I)之磺醯胺及活性醫藥成分的接合物。

【0276】 本文提供如上所述包含式(I)的磺醯胺及活性醫藥成分之接合物用於製造供治療選自由以下組成之群的疾病及/或供降低血糖水平的用途：妊娠糖尿病、第1型糖尿病，糖尿病2型糖尿病和高血糖症。

【0277】 本文提供了如上所述包含式(I)之磺醯胺及診斷化合物的接合物供用作為診斷劑。

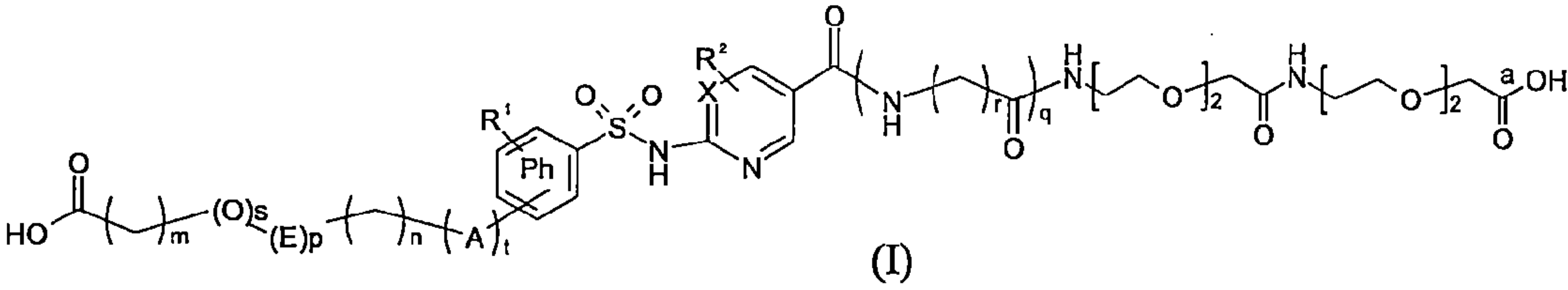
【0278】 本文提供了在患者體內診斷疾病(例如選自心血管疾病和癌症之群的疾病)的方法，或用於確定患者發生疾病(例如選自心血管疾病和癌症之群的疾病)之風險的方法，其包含投與診斷有效量之如上所述包含式(I)之磺醯胺及診斷化合物的接合物。

【0279】 本文提供如上所述包含式(I)之磺醯胺及診斷化合物之接合物的用途，其用於製造供診斷疾病(例如選自心血管疾病和癌症之群的疾病)的診斷劑。

【0280】 藉由以下各自從屬和反向參考所指明的具體例和具體例組合，進一步說明C段中所述的組合物，醫藥組合物和用途。在A，B和C段中，上文提供

的定義和解釋比照適用於以下具體例。

【0281】 1. 一種包含胰島素類似物和式(I)的磺醯胺的接合物



其中

A 選自由氧原子、-CH₂CH₂-基團，-OCH₂-基團和-CH₂O-基團組成之群；

E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，
溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或-CH-基團；

m 為範圍5至17的整數；

n 為零或範圍1至3的整數；

p 為零或1；

q 為零或1；

r 為範圍1至6的整數；

s 為零或1；

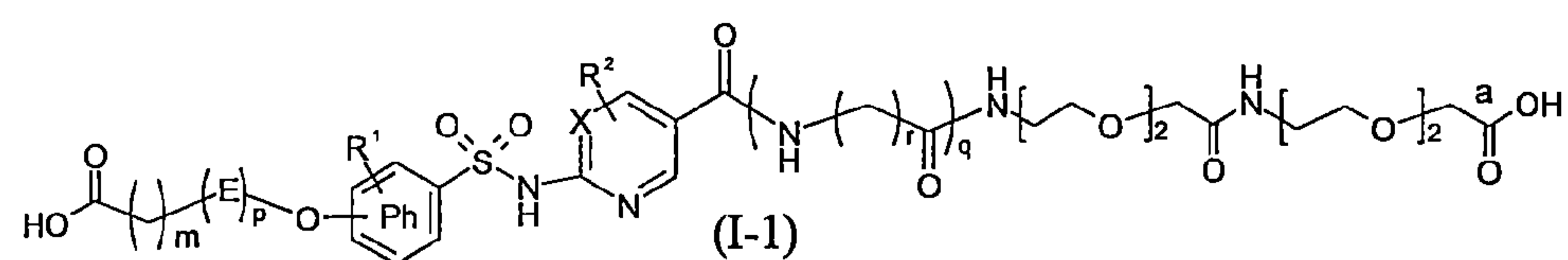
t 為零或1；

R¹ 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

R² 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

其中式(I)的磺醯胺共價結合至胰島素類似物，在於式(I)的磺醯胺的末端羧基「a」共價結合至胰島素類似物的胺基基團。

【0282】 2. 如具體例1之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1)



其中

E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，
溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或-CH-基團；

p 為零或1；

q 為零或1；

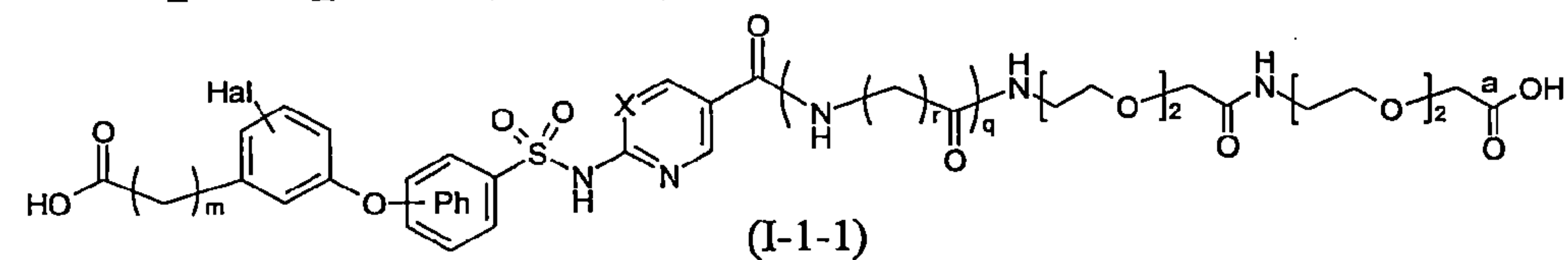
r 為範圍1至6的整數；

R¹ 表示選自氫原子和鹵素原子之群的至少一個殘基；

R² 表示選自氫原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群中的至少一個殘基；

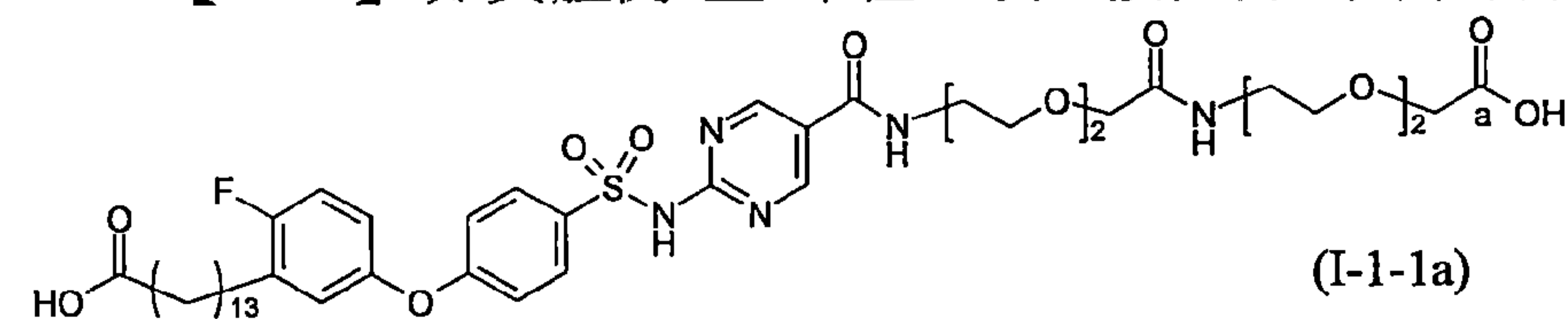
若p為零，則m為範圍5至15的整數；或若p為1，則m為範圍7至15的整數。

【0283】 3. 如具體例1或2之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1-1)

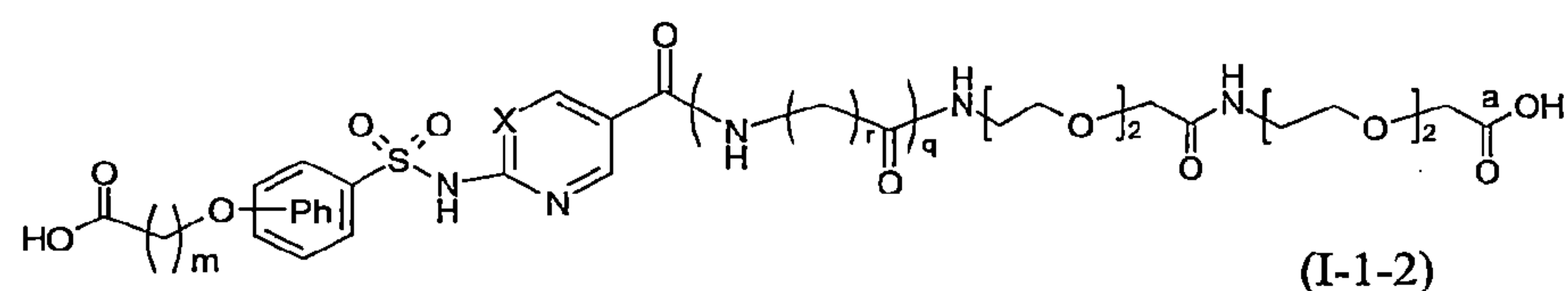


其中X為氮原子或-CH-基團；m為範圍7至15的整數；r為範圍1至6的整數；q為零
或1；Hal是選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群的鹵素原子；且
HOOC-(CH₂)_m-C₆H₃Hal-O-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的間位或對位。

【0284】 如具體例1至3中任一項之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1-1a)

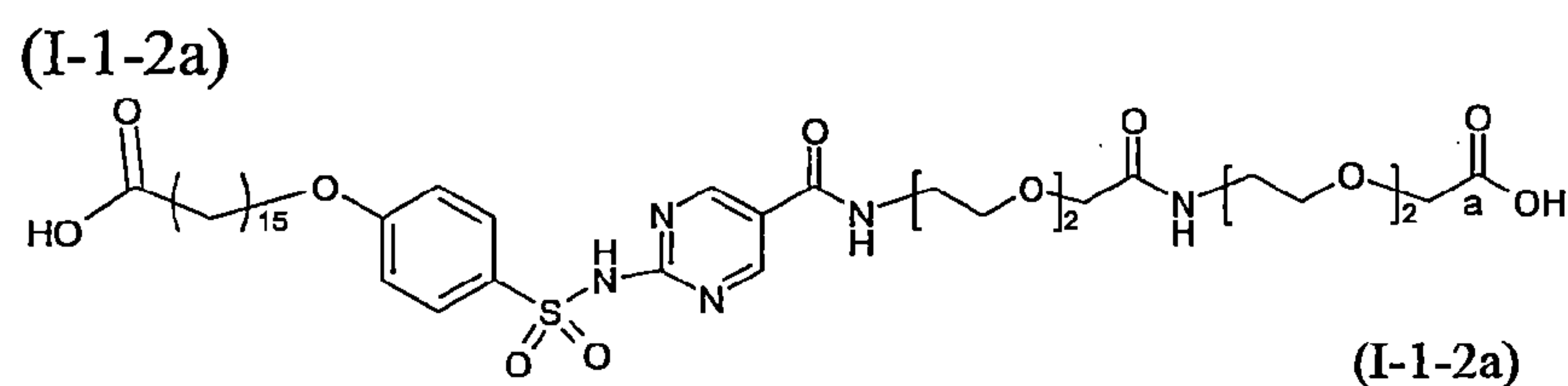


【0285】 如具體例1或2之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1-2)

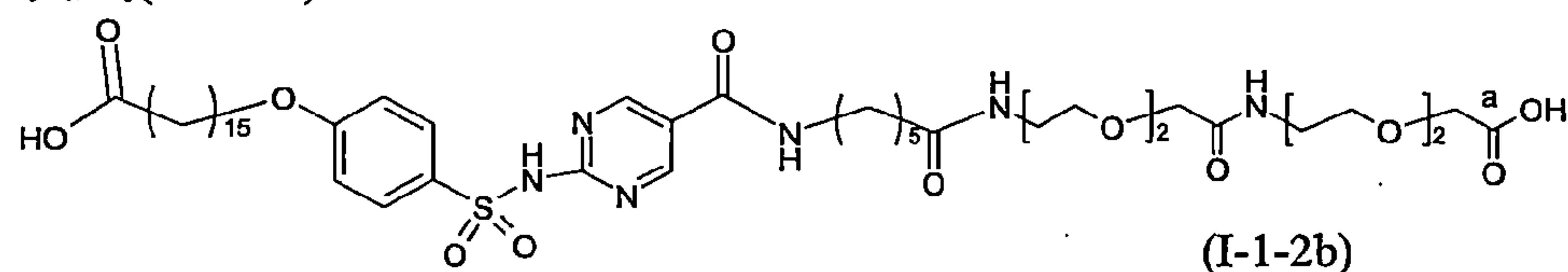


其中X為氮原子或-CH-基團；m為範圍5至15的整數；r為範圍1至6的整數；q為零或1；且HOOC-(CH₂)_m-O-基團位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的間位或對位。

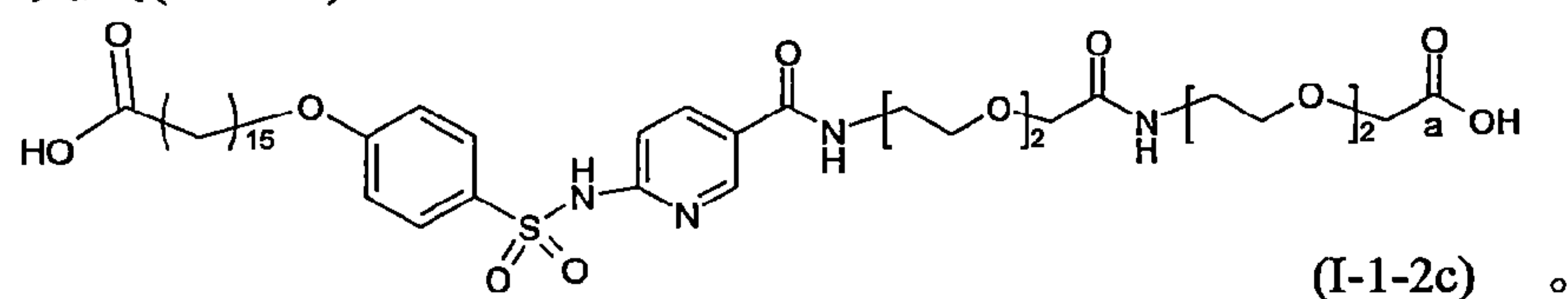
【0286】如具體例1至2或5中任一項之接合物，其中該磺醯胺具有式



或式(I-1-2b)



或式(I-1-2c)



【0287】 7. 如具體例1至6中任一項之接合物，其中胰島素類似物相對於親本胰島素包含至少一個突變，其中該胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變，及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變，且視情況，其中該胰島素類似物進一步包含一個在位置A14處被選自由麩胺酸(Glu)，天冬胺酸(Asp)及組胺酸(His)組成之群的胺基酸取代的突變及/或在位置B30處的突變。

【0288】 8. 如具體例7之接合物，其中該親本胰島素是人類胰島素，豬胰島素或牛胰島素。

【0289】 9. 如具體例7與8之接合物，其中疏水性胺基酸是支鏈胺基酸，諸如選自由纈胺酸(Val)，異白胺酸(Ile)和白胺酸(Leu)組成之群的支鏈胺基酸。

【0290】 10. 如具體例1至9中任一項之接合物，其中該胰島素類似物選自

Leu(B16)-人類胰島素，

Val(B16)-人類胰島素，

Ile(B16)-人類胰島素，

Leu(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Val(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Ile(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Leu(B25)-人類胰島素，

Val(B25)-人類胰島素，

Ile(B25)-人類胰島素，

Leu(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Leu(B16)-人類胰島素，

Glu(A14)Ile(B16)-人類胰島素，

Glu(A14)Val(B16)-人類胰島素，

Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Leu(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素，及
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素。

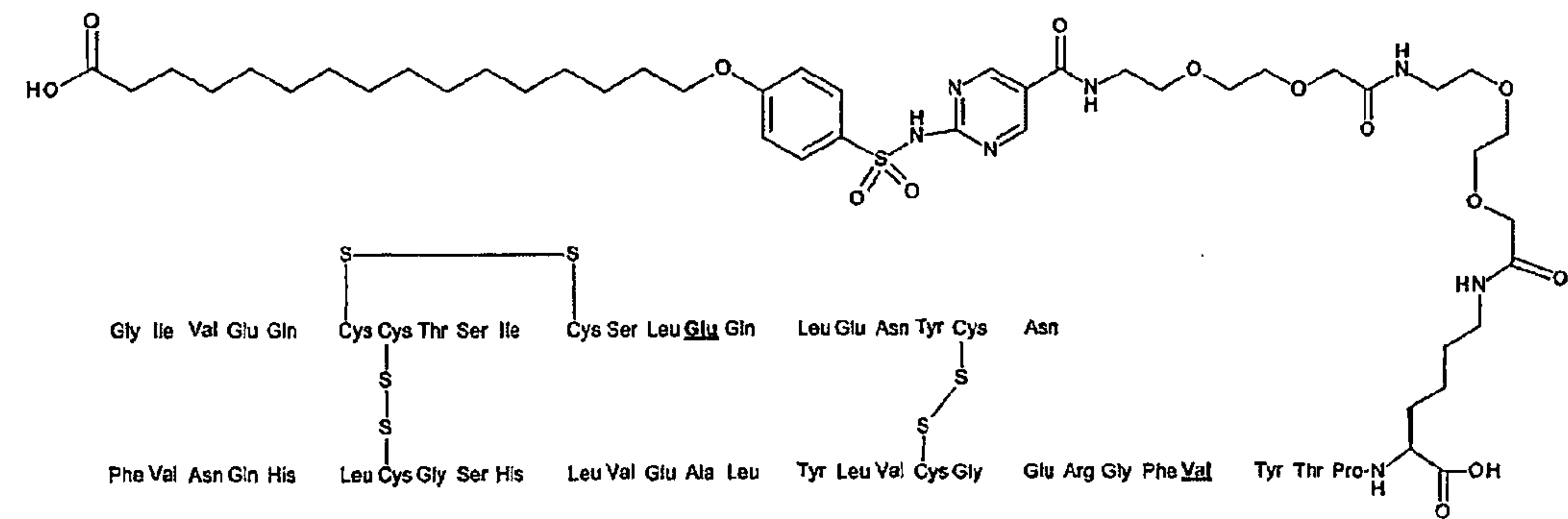
【0291】 如具體例1至10中任一項之接合物，其中該胰島素類似物包含

- (a) 具有如 SEQ ID NO : 43 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，及具有如SEQ ID NO : 44 中所示胺基酸序列 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK)的B鏈，
- (b) 具有如 SEQ ID NO : 47 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，及具有如SEQ ID NO : 48 中所示胺基酸序列 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)的B鏈，或
- (c) 具有如 SEQ ID NO : 77 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，及具有如SEQ ID NO : 78 中所示胺基酸序列 (FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)的B鏈。

【0292】 如具體例1至11中任一項之接合物，其中式(I)的磺醯胺共價結合之胰島素類似物的胺基基團是存在於胰島素類似物中的離胺酸的ε胺基基團，或胰島素或胰島素類似物的B鏈的N端胺基基團。

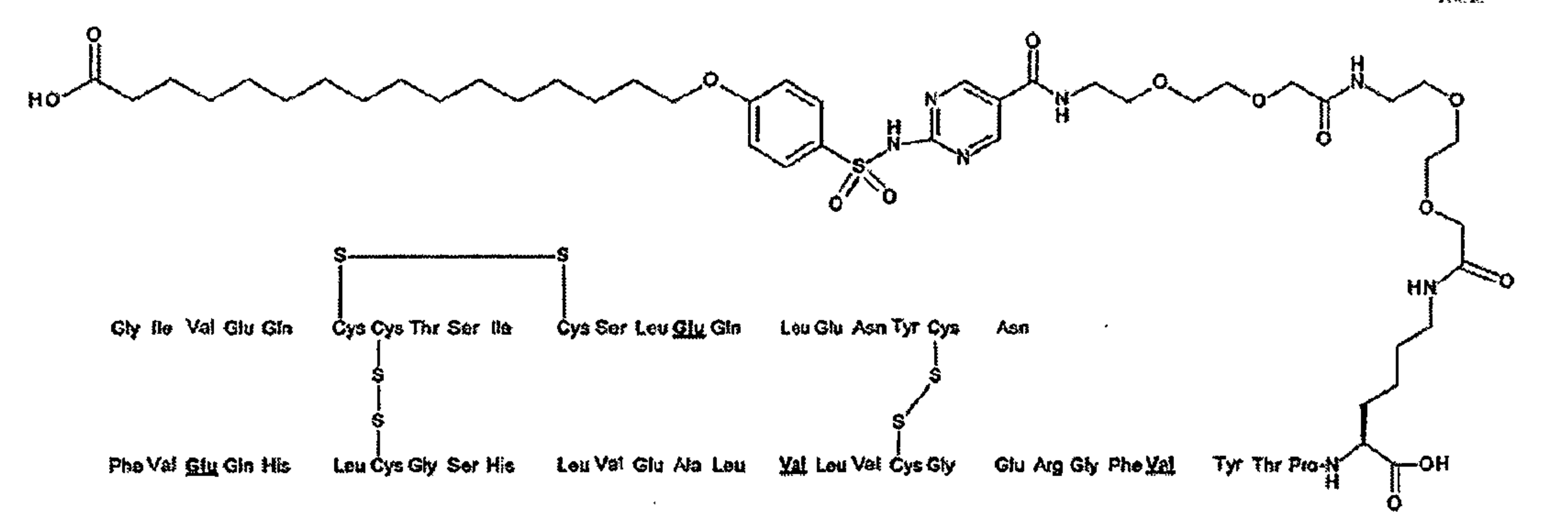
【0293】 如具體例12之接合物，其中該胺基基團是存在於B鏈的位置B29處的離胺酸的ε胺基基團。

【0294】 如具體例1至13中任一項之接合物，其中該接合物為接合物1 (A鏈序列：SEQ ID NO: 47；B鏈序列：SEQ ID NO: 48)：



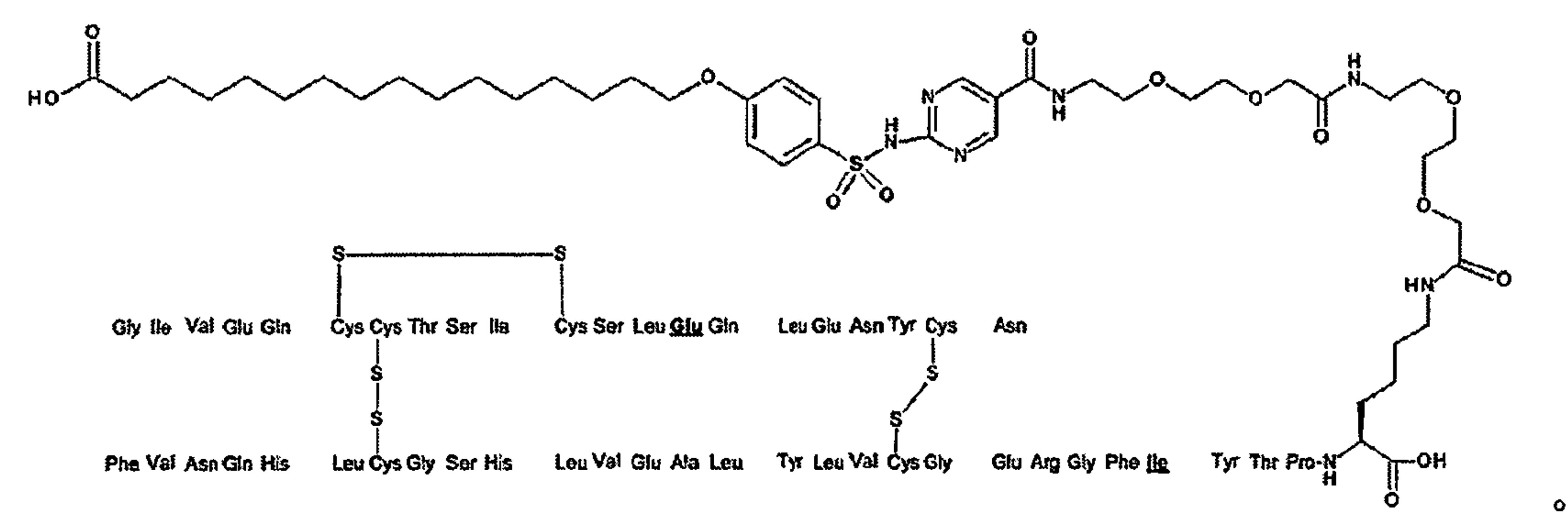
或

接合物3 (A鏈序列：SEQ ID NO: 77；B鏈序列：SEQ ID NO: 78)：

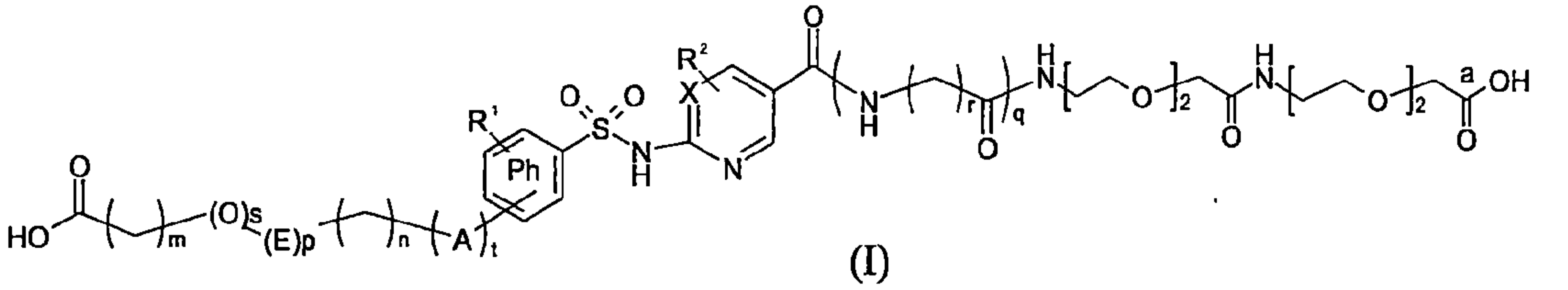


或

接合物4 (A鏈序列：SEQ ID NO: 43；B鏈序列：SEQ ID NO:44)：



【0295】 一種製備包含式(I)的磺醯胺及胰島素類似物之接合物的方法



其中在式(I)的磺醯胺中：

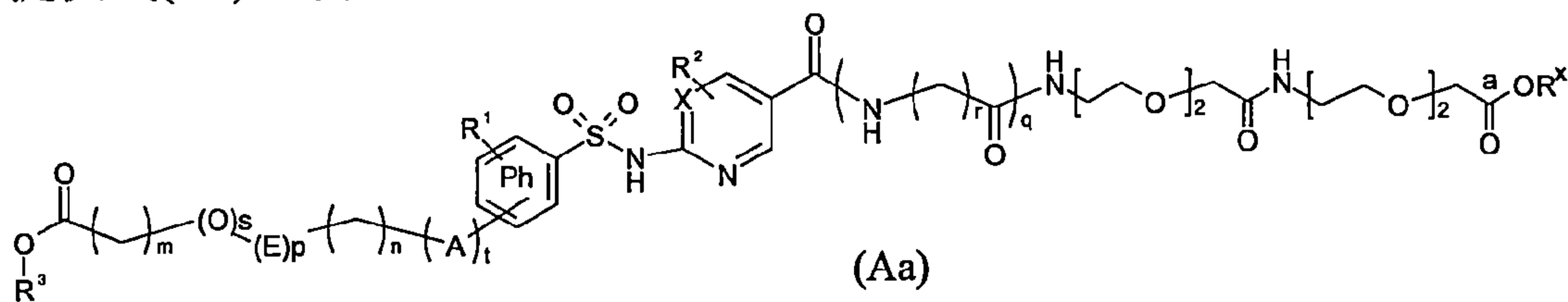
- A 選自由氧原子、-CH₂CH₂-基團，-OCH₂-基團和-CH₂O-基團組成之群；
- E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群，視情況為氟原子；
- X 表示氮原子或-CH-基團；
- m 為範圍5至17的整數；

- n 為零或範圍1至3的整數；
- p 為零或1；
- q 為零或1；
- r 為範圍1至6的整數；
- s 為零或1；
- t 為零或1；
- R¹ 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；
- R² 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

其中式(I)的磺醯胺共價結合至活性醫藥成分，在於式(I)的磺醯胺的末端羧基「a」共價結合至活性醫藥成分的胺基基團；

該方法包含：

(a) 提供式(Aa)之磺醯胺



- 其中X、Y、A、E、R¹，R²和標號m、n、p、q、r、s、t具有如具體例1中所定義的含義，R^x是氫原子或一個活化基團，視情況選自由以下組成之群的活化基團：7-氮雜苯并三唑(視情況衍生自HATU或HBTU)，4-硝基苯和N-琥珀醯亞胺基基團，其中R^x視情況為N-琥珀醯亞胺基基團；且R³為保護基或氫原子，視情況為氫原子；以及具有受保護或未受保護之C端的胰島素類似物；
- (b) 在適合於在式(Aa)之磺醯胺的游離或經活化(視情況經活化)羧基「a」與具有受保護或未受保護之C端的胰島素類似物的胺基基團之間形成醯胺鍵的條件

下，使式(Aa)磺醯胺與具有受保護或未受保護之C端的胰島素類似物反應；
(c) 視情況移除一或兩個保護基。

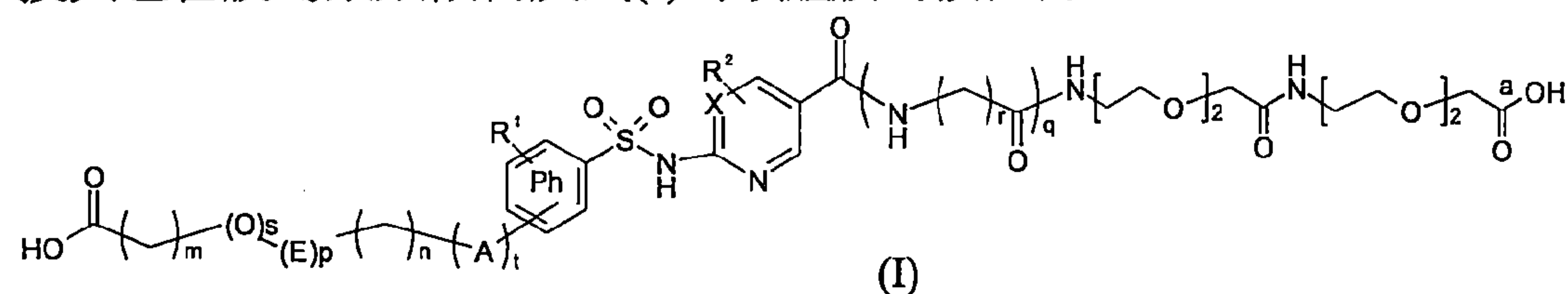
【0296】 16. 一種得自或可得自具體例15之方法的包含式(I)的磺醯胺以及胰島素類似物的接合物。

【0297】 17. 一種醫藥組合物，其包含呈醫藥有效量之如具體例1至15或如具體例16中任一項之包含式(I)的磺醯胺以及胰島素類似物的接合物。

【0298】 18. 如具體例1至15或如具體例16中任一項之包含式(I)的磺醯胺以及胰島素類似物的接合物，其用作藥劑。

【0299】 19. 如具體例1至15或如具體例16中任一項之包含式(I)的磺醯胺以及胰島素類似物的接合物，其用作供治療選自由妊娠糖尿病、第1型糖尿病、第2型糖尿病及高血糖症組成之群的疾病，及/或降低血糖水平的藥劑。

【0300】 20. 一種治療選自由妊娠糖尿病、第1型糖尿病、第2型糖尿病及高血糖症組成之群的疾病，及/或降低血糖水平的方法，其包含向有需要的患者投與包含胰島素類似物及式(I)的磺醯胺的接合物



其中：

A 選自由氧原子、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 基團， $-\text{OCH}_2-$ 基團和 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 基團組成之群；

E 表示 $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ 基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或 $-\text{CH}-$ 基團；

m 為範圍5至17的整數；

n 為零或範圍1至3的整數；

p 為零或1；

q 為零或1；

r 為範圍1至6的整數；

s 為零或1；

t 為零或1；

R¹ 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

R² 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

其中式(I)的磺醯胺共價結合至胰島素類似物，在於式(I)的磺醯胺的末端羧基「a」共價結合至胰島素類似物的胺基基團，

從而治療該疾病。

【0301】 透過以下實例進一步說明本發明。

實例

1. 所使用縮寫的列表：

Ac	乙醯基
Boc	第三丁基氧基羰基
DCM	二氯甲烷
DIAD	偶氮二甲酸二異丙酯
DIPEA	N,N-二異丙基乙胺
DMAP	4-二甲基胺基吡啶
DMF	二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞砜
EA	乙酸乙酯
HMPA	六甲基磷醯胺
HPLC	高效液相層析

LC	液相層析
LCMS	液相層析/質譜
MeCN	MeCN
NMM	<i>N</i> -甲基嗎啉
NMP	<i>N</i> -甲基-2-吡咯啉酮
PE	石油醚
RP	逆相
RT	室溫(25°C)
TEA	三乙胺
TEMPO	2,2,6,6-四甲基哌啶- <i>N</i> -氧化物
TFA	三氟乙酸
TFAA	三氟乙酸酐
TMS	三甲基矽基
Ts	甲苯磺醯基
TSTU	O-(<i>N</i> -琥珀醯亞胺基 1)- <i>N,N,N,N</i> -四甲基脲四氟硼酸酯

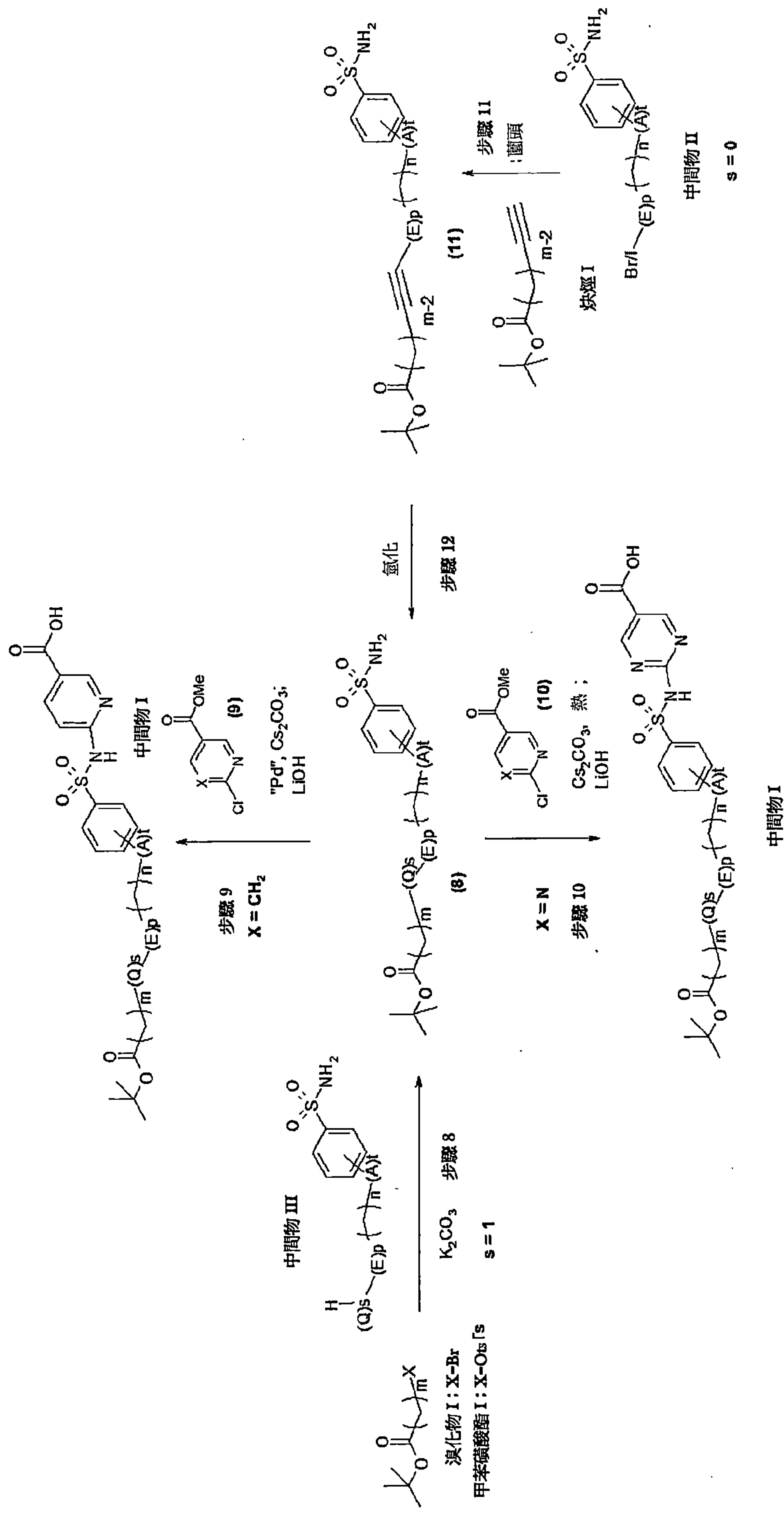
【0302】 適用於製備式(I)化合物的一般性方法描述於下。式I化合物是透過不同的化學方法來製備。除非另有明確定義它們，否則在以下方法中(尤其是在方案中)提及的基團和標號具有上述式(I)所表示的含義。

2. 式(I)化合物的一般性合成

【0303】 從對應的中間物I開始來合成式(I)的化合物(方案1)。用TSTU活化後，中間物I與胺基酸(4)(步驟3)或化合物(2)(步驟2)偶合，分別得到物質(3)和(6)。在步驟3中使用烷基酯(R＝烷基)的情況下，利用LiOH達到皂化。用TSTU活化兩個羧酸(6)和(7)，並與(2)偶合而得到物質(3)。為了要完成式(I)化合物的合成，(3)的第三丁酯(3)在最終步驟7中透過用CF₃CO₂H處理而裂解。中間物I的合成顯示於方案2中。

2.1 中間物I的一般性合成

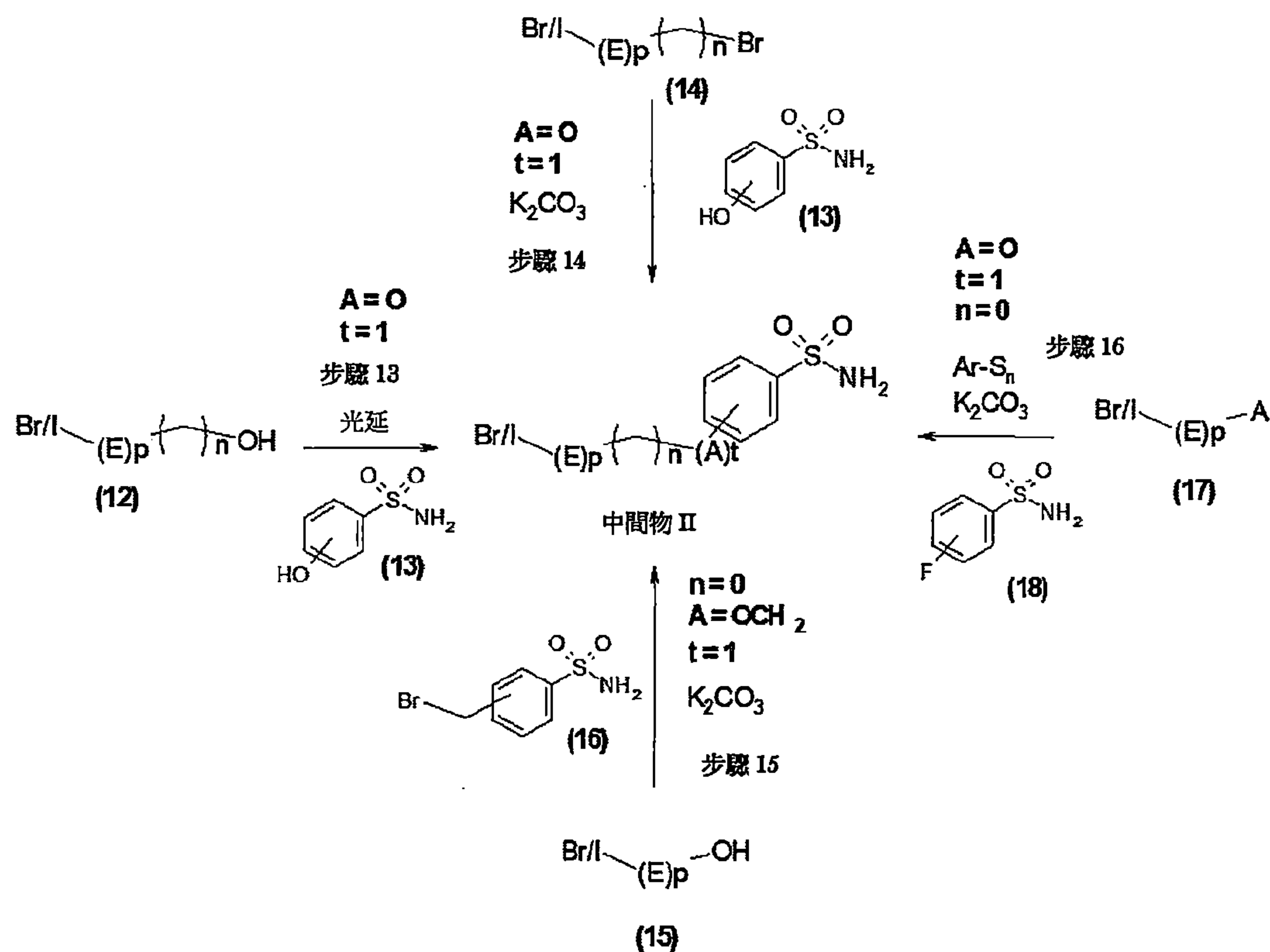
【0304】如方案2中所示來合成中間物I。在 K_2CO_3 存在下，從溴化物I或甲
苯磺酸酯I開始，來達到中間物III的烷基化(步驟8)。或者，在從炔烴I和中間物II
的蘭頭反應開始(步驟11)，然後在分別由鈀和鉑催化的氫氣氣氛下將所得的(11)
氫化(步驟11)的一系列反應之後分離出物質(8)。之後，在鈀催化的反應中，將物
質(8)與2-氯吡啶(9)進行縮合(步驟9)，或與2-氯嘧啶(10)進行熱縮合(步驟10)。在
這兩種情況下，隨後將烷基酯用LiOH水解以獲得所需的中間物I。



方案2

2.2 中間物II的一般性合成

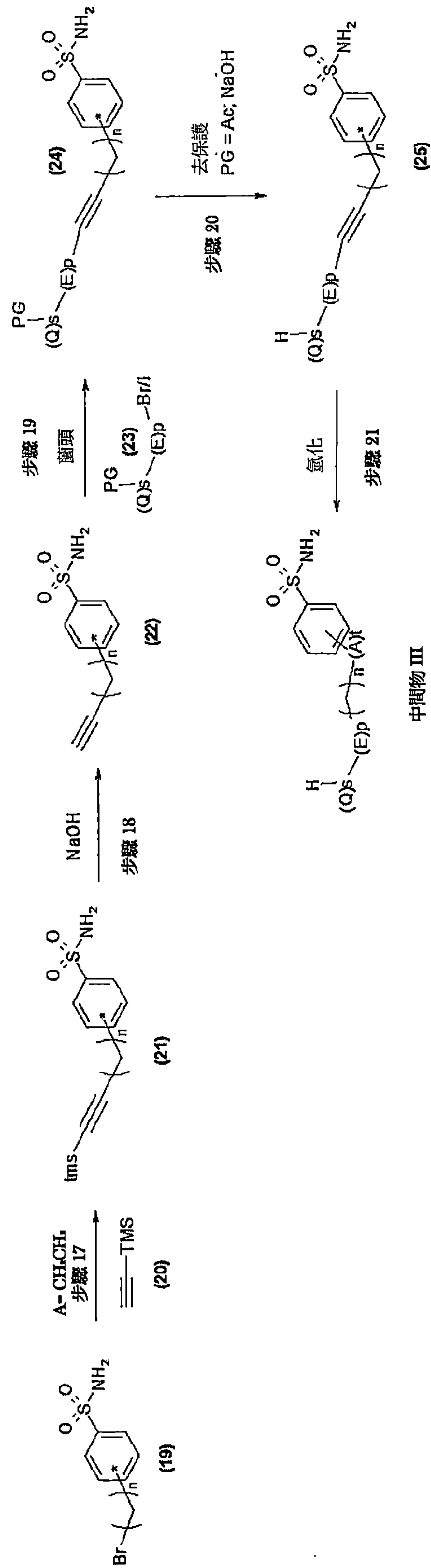
【0305】 如方案3中所示，在苯酚(13)和醇(12)的光延反應之後分離中間物II (步驟13)。或者，在K₂CO₃存在下經由苯酚(13)(步驟14)或苯酚(15)(步驟15)的烷基化來合成中間物II。合適的烷基化劑分別為(14)和(16)。氟化物(18)用苯酚(17)的親核芳香族取代也產生了中間物II (步驟16)。



方案3

2.3 中間物III的一般性合成

【0306】 如方案4中所述，在線性反應順序之後獲得中間物III。從炔烴(20)與溴(19)的烷基化開始，分離出受TMS保護的炔烴(21)。在鹼性條件下，使用NaOH對炔烴(21)進行去保護。經分離的炔烴(22)與對應芳族鹵化物(23)的隨後蘭頭反應(步驟19)產生物質(24)。物質(24)的合適保護基是例如乙醯基(PG = Ac)，其在用NaOH處理後裂解(步驟20)。在H₂氣氛下，藉由鈀或鉑催化最終的氫化步驟21，以提供所需的中間物III。



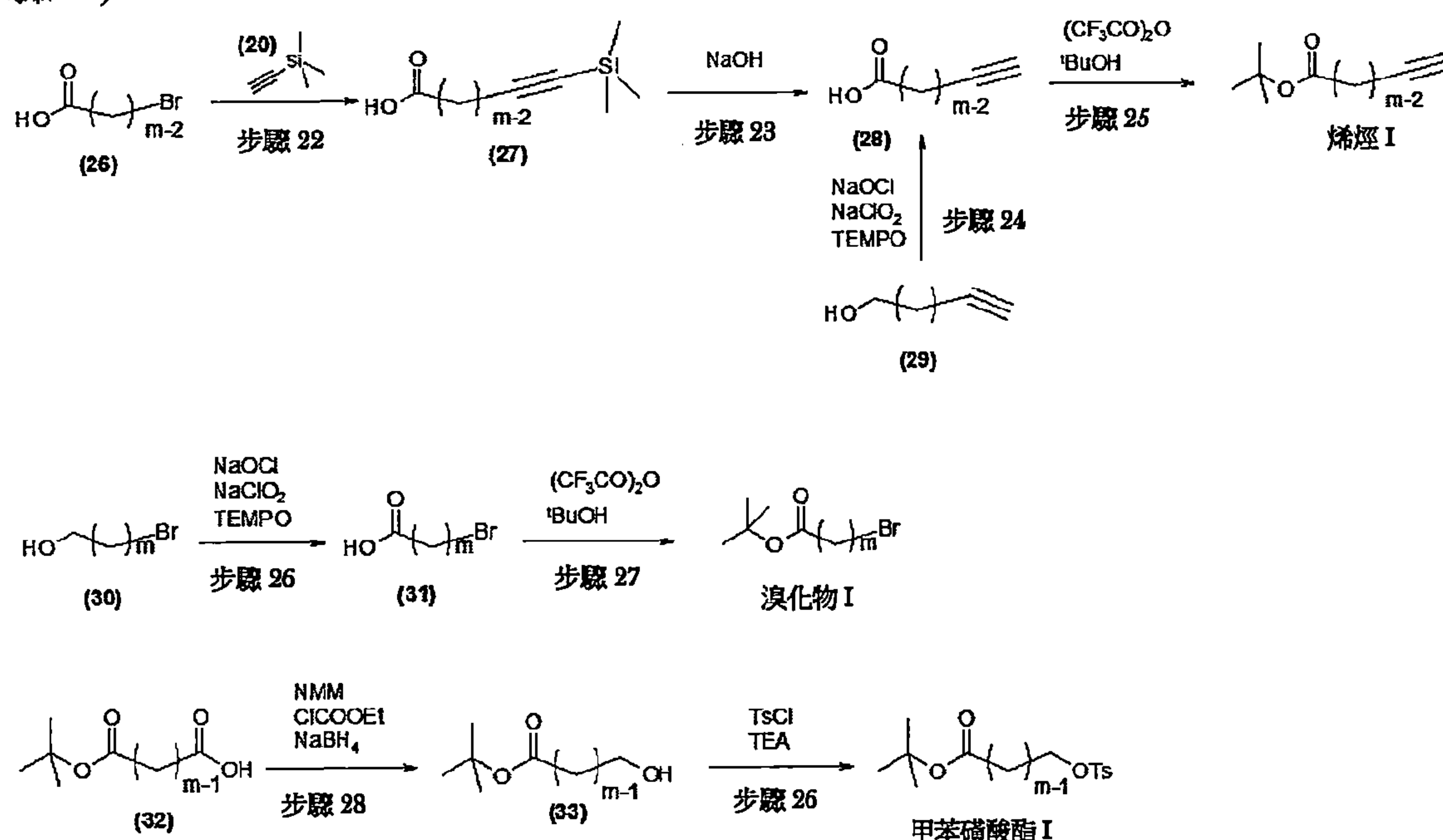
方案4

2.4 炔烴I和溴化物I的一般性合成

【0307】如方案5中所示，合成起始材料溴化物I和炔烴I。關於炔烴I，採用了兩種不同的合成路徑。在醇(29)氧化後分離出甲酸(28)-所述氧化是透過NaOCl和NaClO₂的混合物在催化量的TEMPO存在下(步驟24)-或透過溴化物(26)的烷基化/去保護順序而實現。關於所使用的烷基化劑(20)。然後將分離的產物(27)用NaOH處理以裂解TMS保護基。在用(CF₃CO)₂O活化並且與第三丁醇反應之後，實現將甲酸(28)必要保護為第三丁酯以得到所需炔烴I。

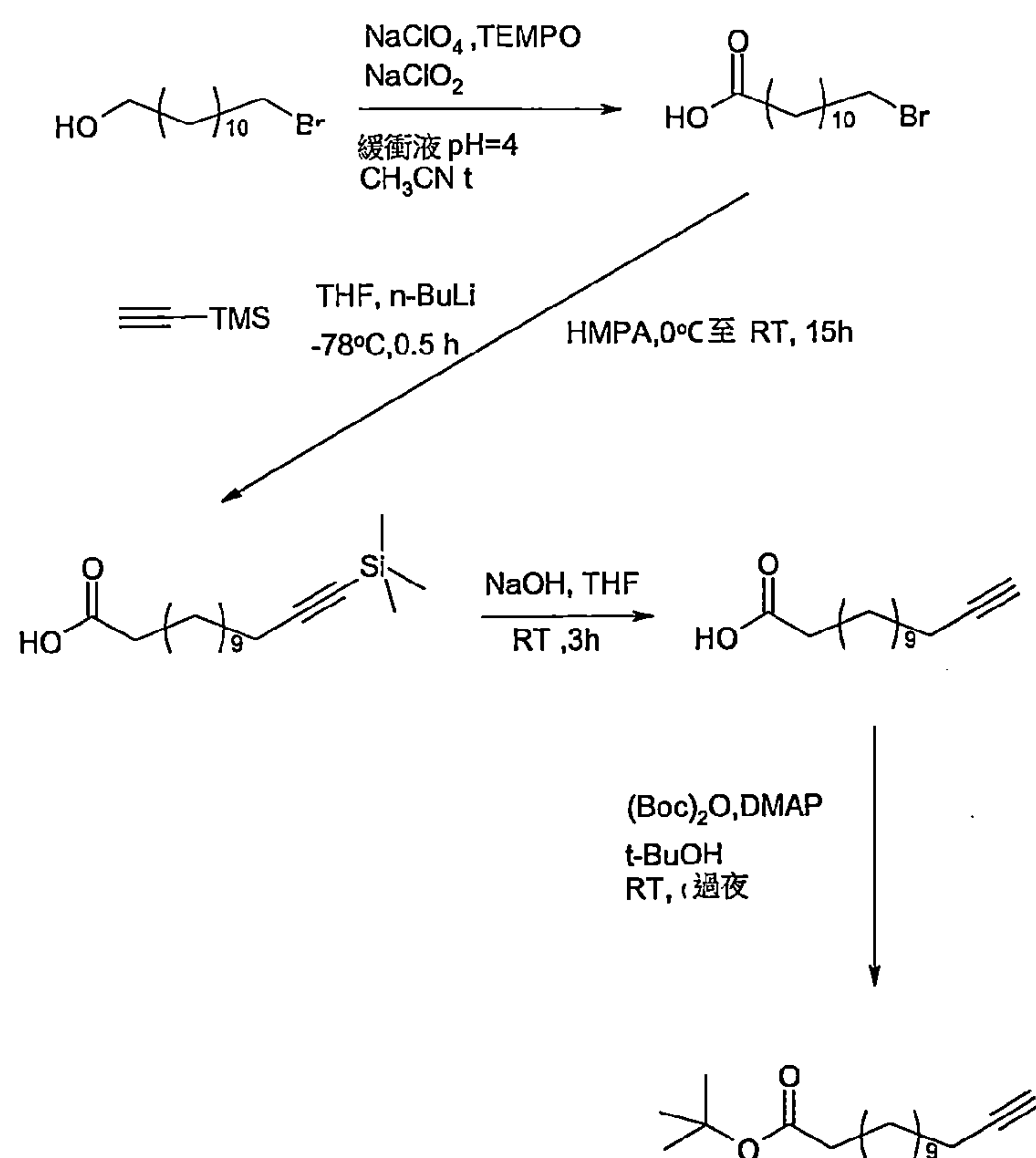
【0308】關於合成溴化物I，使用了將(29)轉化為炔烴I所述的類似順序(步驟24和25)。氧化醇(30)且隨後保護所得的甲酸(31)，得到所需的溴化物I。

【0309】甲苯磺酸酯I可以藉由對醇(33)進行甲苯磺酸化來合成(步驟29)。還原甲酸(32)後分離(33)，將其原位轉移到混合酸酐中，且接著用NaBH₄還原(步驟28)。

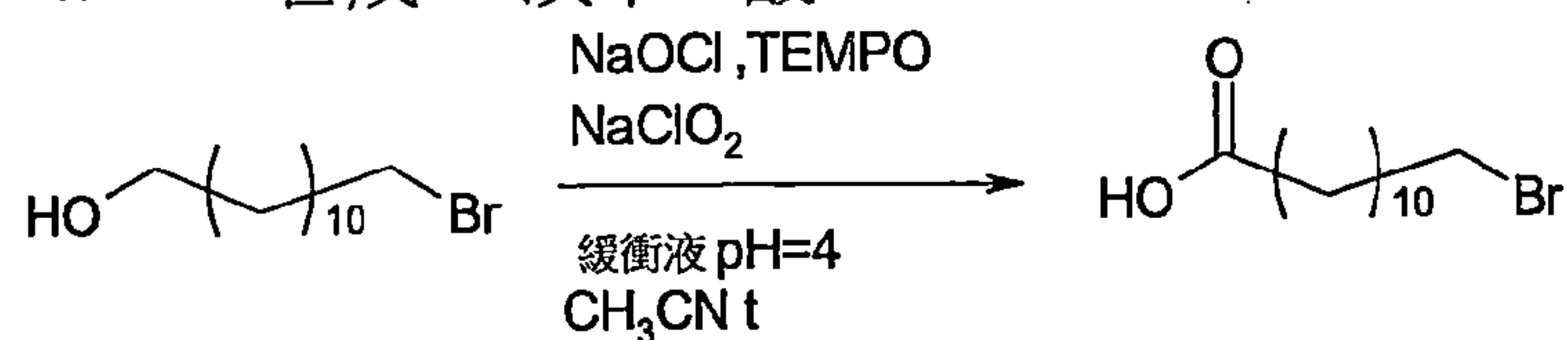


方案5

2.5 依據方案5合成炔烴I和溴化物I的實例



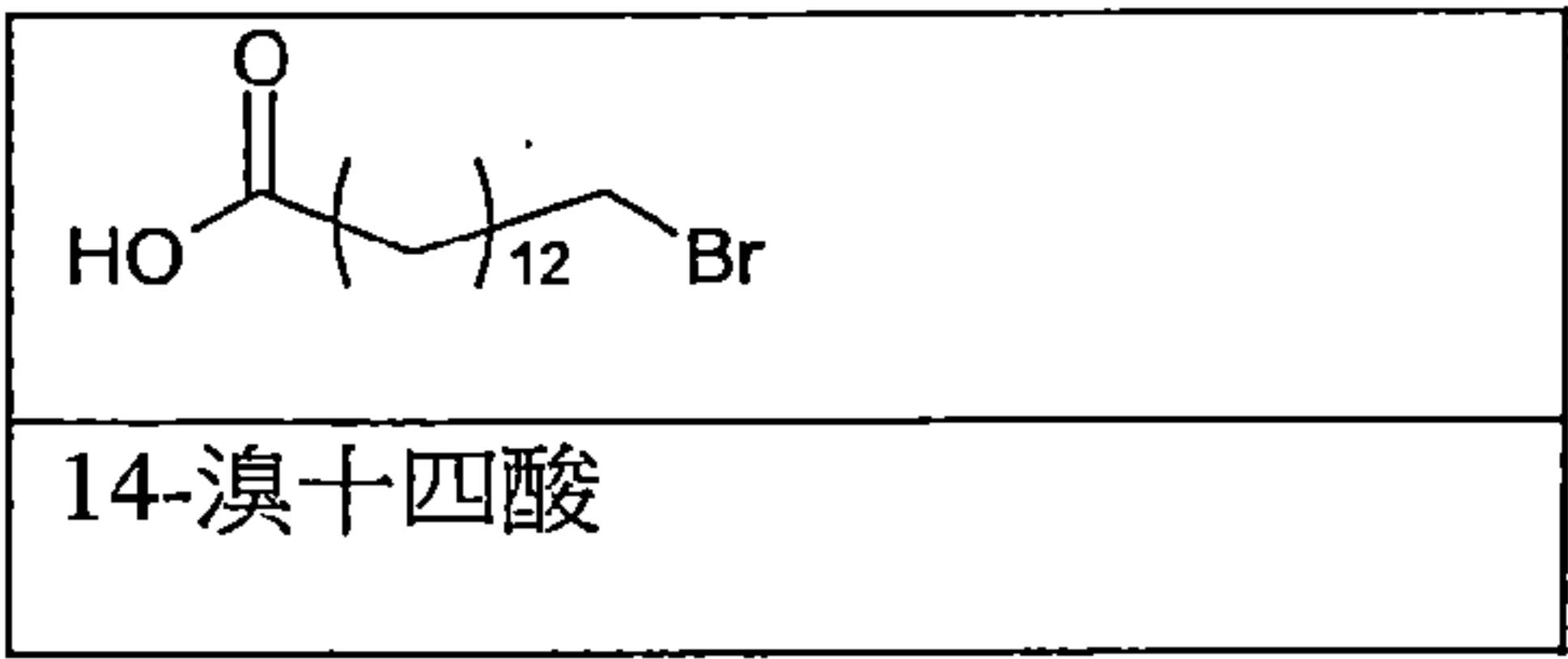
2.5.1 合成12-溴十二酸



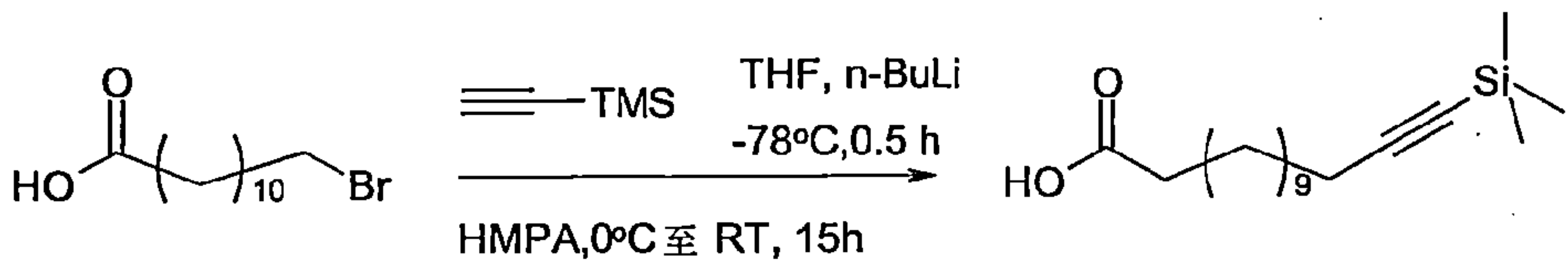
【0310】 將 NaClO_2 (37.5 g, 414.8 mmol)於 H_2O (60 ml)中的溶液，以及10% NaOCl (28 g, 37.7 mmol)的溶液同時添加到12-溴十二-1-醇(20 g, 75.4 mmol)和TEMPO (5.9 g, 37.7 mmol)於 CH_3CN (400 ml)和pH 4-緩衝液(60 ml)中的溶液。將反應混合物在室溫下攪拌過夜。將混合物用EA (1200 ml)稀釋，用水(1000 ml)和鹽水洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥並在真空下濃縮，得到如黃色固體狀的所需產物12-溴十二酸(20 g, 71.6 mmol, 產率95%)。

【0311】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.96 (s, 1H), 3.52 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.85 – 1.72 (m, 2H), 1.55 – 1.43 (m, 2H), 1.37 (s, 2H), 1.21 (d, $J = 32.6$ Hz, 12H)。

【0312】 對應合成以下化合物：

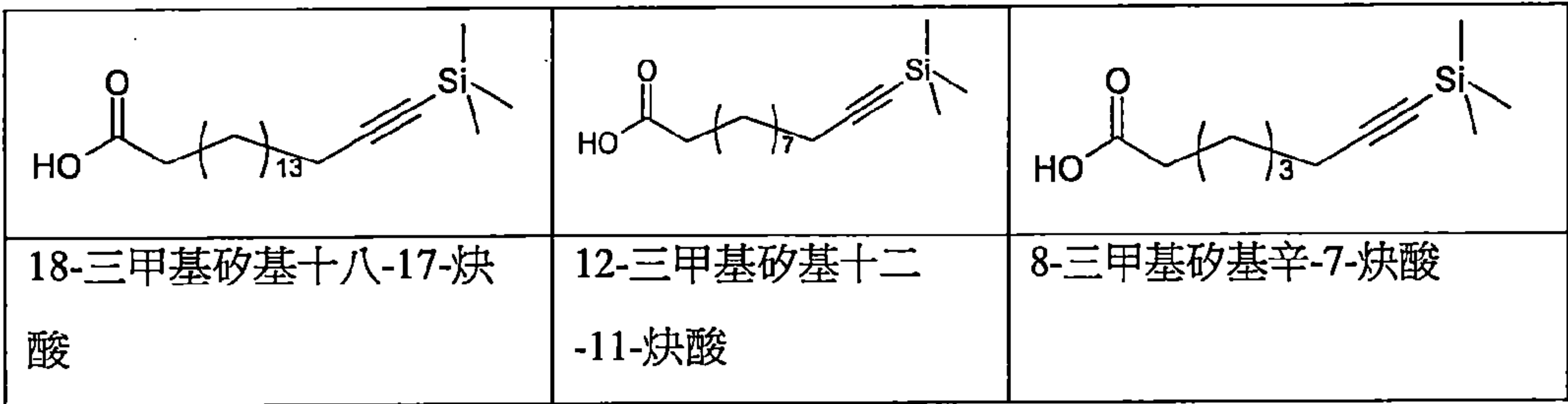


2.5.2 合成14-(三甲基矽基)十四-13-炔酸

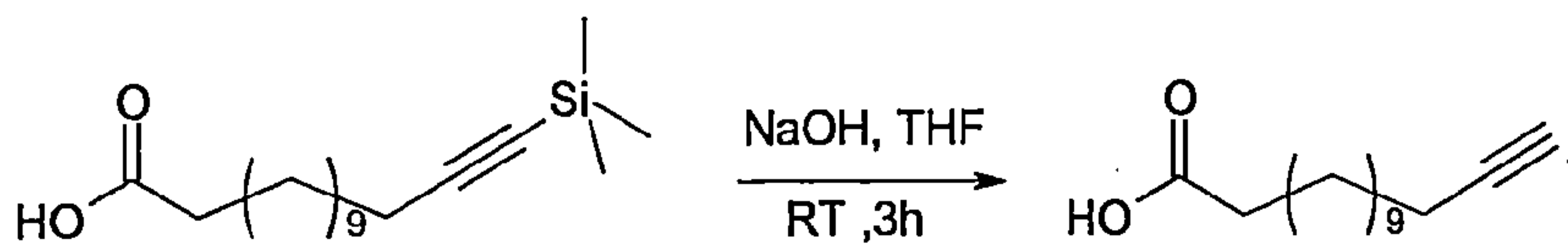


【0313】 在-78℃及N₂下，向乙炔基-三甲基-矽烷(63.3 g，644.7 mmol)在THF (300 ml)的混合物中添加正丁基鋰(2.5 M在己烷中)(258 ml，644.7mmol)。在10分鐘後，添加HMPA (115.5 g，644.7 mmol)，並將混合物溫熱至0℃歷時30分鐘。然後加入在THF (300 ml)中的12-溴十二酸(30 g，107.45 mmol)。接著將混合物在室溫下攪拌過夜。將水(1200 ml)在0℃下緩慢添加至混合物中，然後用HCl水溶液將pH值調整到3，用EA (800 ml)萃取。有機相用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥，在真空下濃縮以得到如棕色油狀物的粗產物14-(三甲基矽基)十四-13-炔酸(35 g)並用於下一個步驟。

【0314】 對應合成以下化合物：



2.5.3 合成十四-13-炔酸



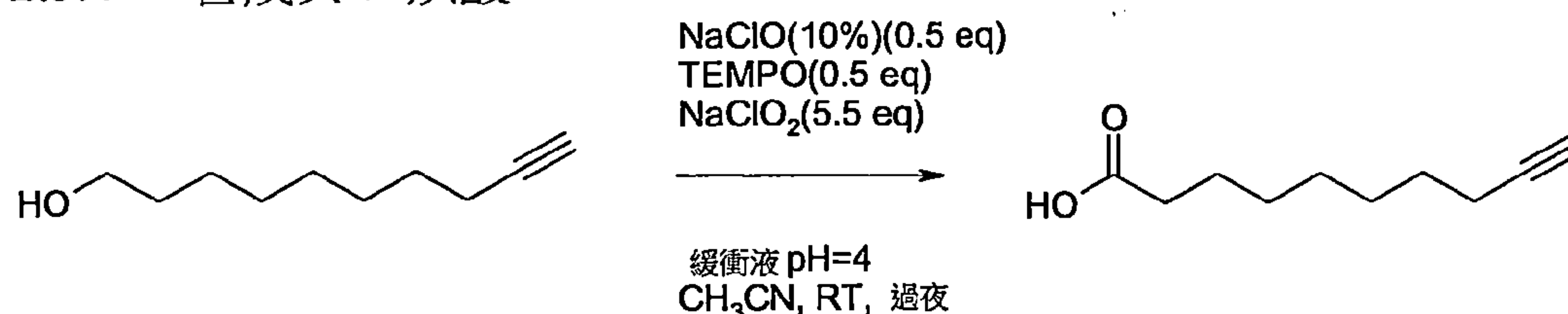
【0315】將NaOH (8.6 g, 214.9 mmol)添加至14-(三甲基矽基)十四-13-炔酸 (35 g, 107.45 mmol)於H₂O (150 ml)和THF (150 ml)的混合物中。然後在室溫下攪拌混合物歷時3h。接著用HCl水溶液將pH值調整至4，用EA萃取(2×300 ml)。有機相用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥，在真空下濃縮。藉由矽膠層析(PE：EA = 4：1)純化粗產物，得到呈黃色固體狀的所需產物十四-13-炔酸(23 g, 102.5 mmol，兩步驟產率：95%)。

【0316】¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.96 (s, 1H), 2.73 (s, 1H), 2.17 (dd, J = 16.3, 8.9 Hz, 4H), 1.51 - 1.21 (m, 18H)。

【0317】對應合成以下化合物：

十八-17-炔酸	十二-11-炔酸	辛-7-炔酸

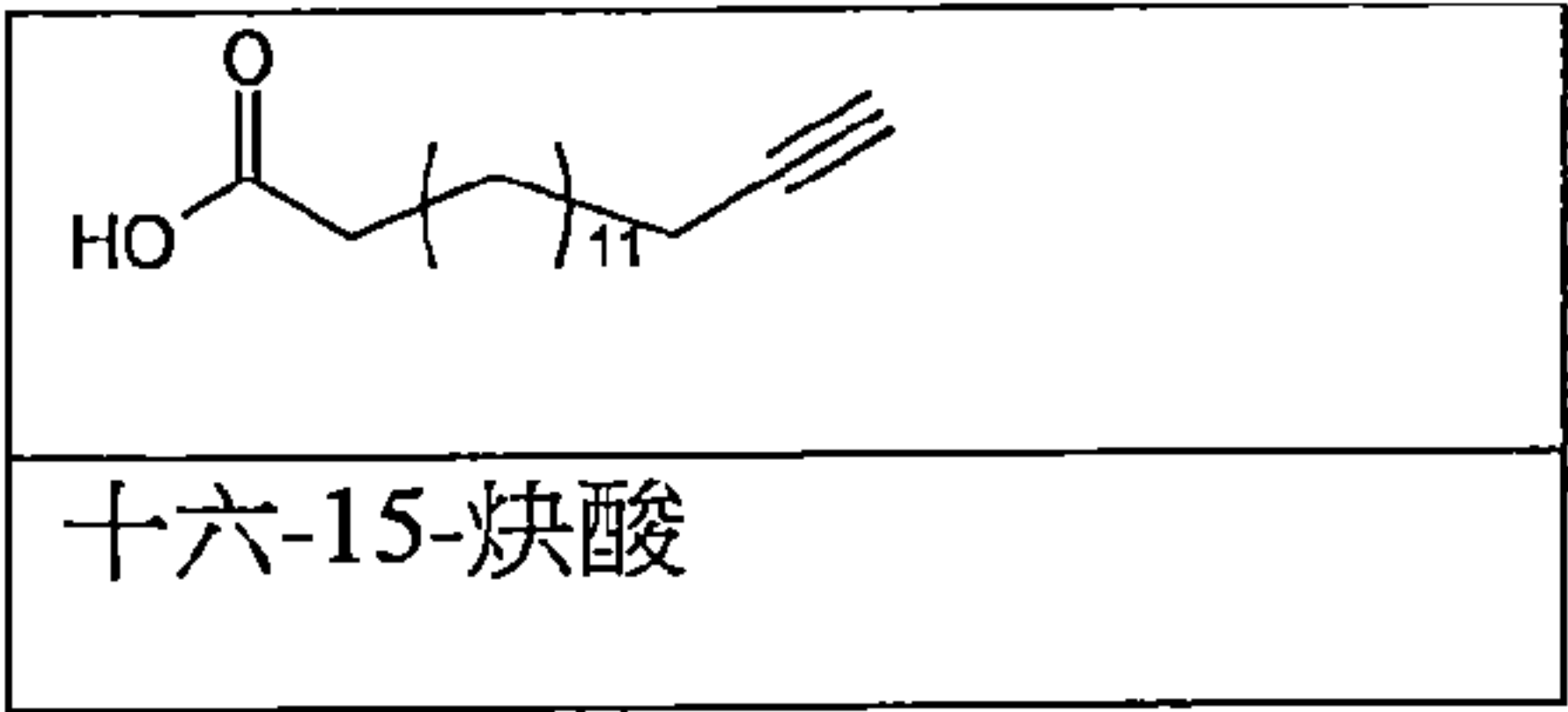
2.5.4 合成癸-9-炔酸



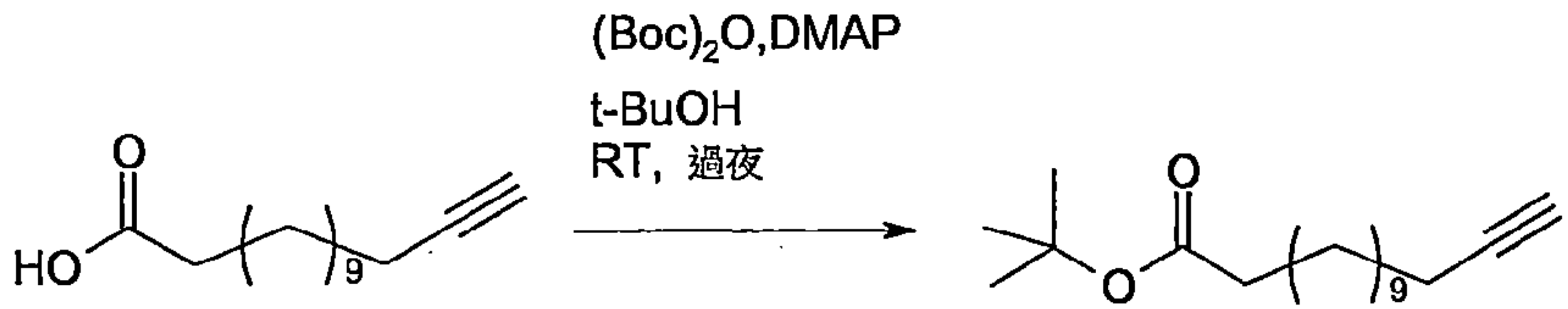
【0318】將NaClO₂ (48.2 g, 536 mmol)和NaOCl (36.0 g, 48.7 mmol)的溶液同時添加至癸-9-炔-1-醇(15 g, 97.4 mmol)和TEMPO (7.6 g, 48.7 mmol)在CH₃CN (300 ml)和pH 4-緩衝液(75 ml)的溶液中。將反應混合物在室溫下攪拌過夜，用EA (900 ml)稀釋、用水(900ml)和鹽水洗滌並經Na₂SO₄乾燥，在真空下濃縮。藉由矽膠層析(PE/EA = 1/1)純化粗產物，得到呈無色油狀物的癸-9-炔酸(20 g, 粗產物)。

【0319】¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.36 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.18 (td, J = 6.9, 2.3 Hz, 2H), 1.93 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 1.72 - 1.59 (m, 2H), 1.54 (td, J = 14.1, 7.2 Hz, 2H), 1.48 - 1.30 (m, 6H) ppm。

【0320】 對應合成以下化合物：



2.5.5 合成十四-13-炔酸第三丁酯



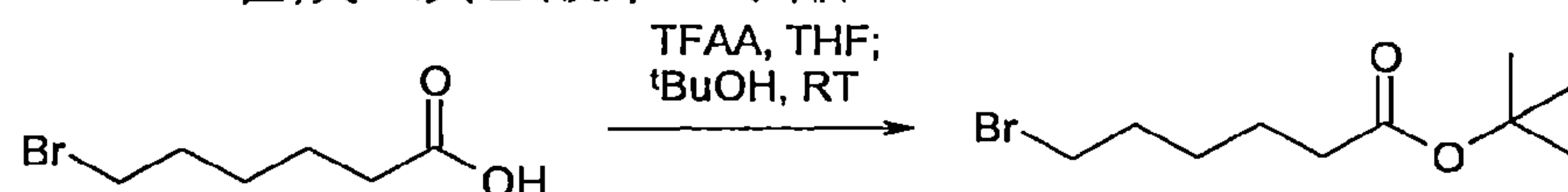
【0321】 將(BOC)₂ (33.6 g，153.8 mmol)和DMAP (3.7 g，30.7 mmol)添加至十四-13-炔酸(23 g，102.5 mmol)於t-BuOH(200 ml)中的混合物。然後將混合物在室溫下攪拌過夜。在真空下移除溶劑。將水(400 ml)加入混合物中，並用EA (400 ml)萃取。有機相用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。殘餘物藉由矽膠層析(PE：EA=30:1)純化，得成黃色液體狀的預期產物十四-13-炔酸第三丁酯(23.5 g，83.8 mmol，82%產率)。

【0322】 ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 2.72 (s, 1H), 2.15 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 1.49 - 1.21 (m, 27H)。

【0323】 對應合成以下化合物：

十八-17-炔酸第三丁酯	十二-11-炔酸第三丁酯	十六-15-炔酸第三丁酯
辛-7-炔酸第三丁酯	癸-9-炔酸第三丁酯	

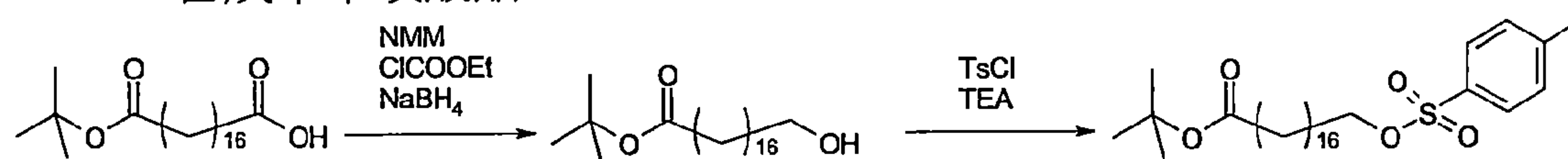
2.5.6 合成6-溴己酸第三丁酯



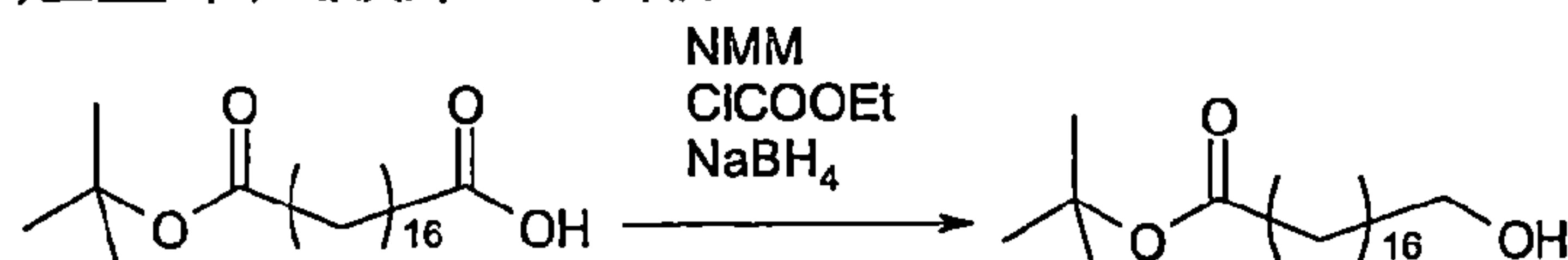
【0324】將6-溴己酸(6.0 g, 31 mmol)、TFAA (26.0 g, 124 mmol)添加至THF (60 ml)中，混合物在室溫下反應1小時。然後將第三丁醇(30 ml)加入到混合物中，並在室溫下攪拌16h。然後，用NaHCO₃溶液將反應混合物的pH調整至pH=8，將混合物用EA (3× 150 ml)萃取、經Na₂SO₄乾燥、濃縮，得到目標化合物6-溴己酸第三丁酯(7.6 g, 30.4 mmol, 98%產率)。

【0325】¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 3.52 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.20 (dd, *J* = 15.0, 7.8 Hz, 2H), 1.85 - 1.74 (m, 2H), 1.52 (ddd, *J* = 19.3, 10.9, 5.7 Hz, 2H), 1.44 - 1.32 (m, 9H)。

2.5.6 合成甲苯磺酸酯I



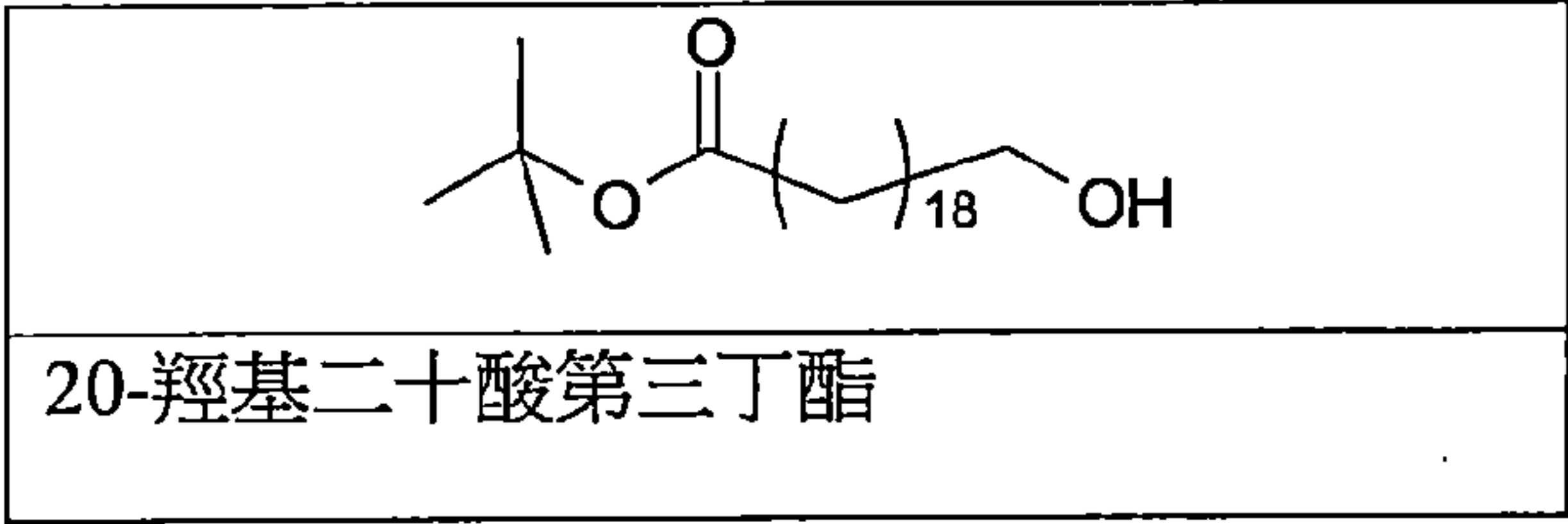
2.5.7 合成18-羥基十八酸第三丁酯



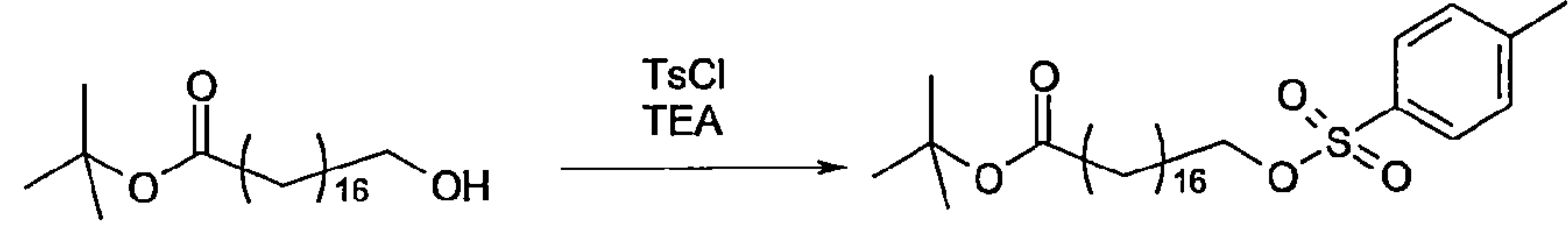
【0326】將N-甲基嗎啉(1638 mg, 16.5 mmol)添加至18-第三丁氧基-18-側氧基-十八酸(5 g, 13.5 mmol)於THF (150 ml)中的溶液。將混合物冷卻至-25℃，然後逐滴添加氯甲酸乙酯(1277 mg, 13.5 mmol)。將混合物在-25℃下攪拌歷時20分鐘，並藉由過濾移除固體。將該溶液在0℃下小心地添加到NaBH₄ (770 mg, 20.25 mmol)於水(15 mL)中的溶液。將混合物在室溫下攪拌歷時1小時。在真空下移除THF，並將水相用EA (3×50 mL)萃取。合併的有機相經MgSO₄乾燥，並在真空下濃縮，得到呈白色固體狀的18-羥基十八酸第三丁酯(4.7 g, 99.8%)。

【0327】 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.63 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.19 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.57 (dd, J = 13.0, 6.5 Hz, 4H), 1.43 (d, J = 3.9 Hz, 9H), 1.38 -1.20 (m, 27H)。

【0328】 對應合成以下化合物：

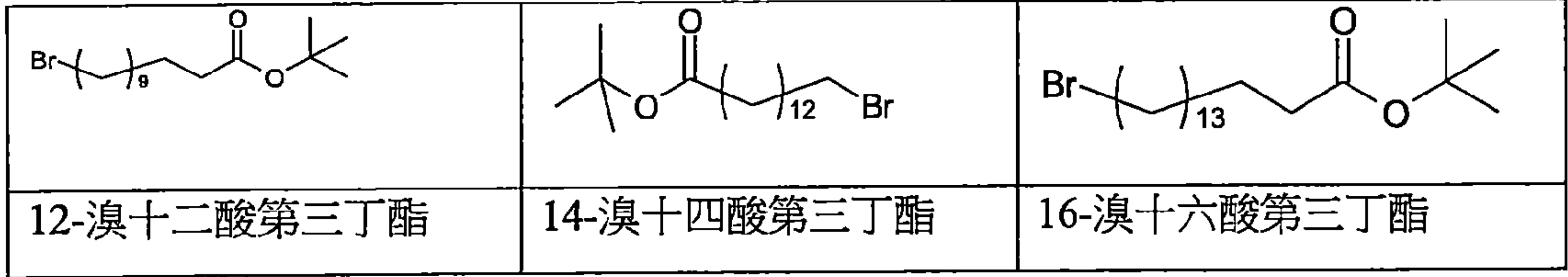


2.5.8 合成18-(對甲苯磺醯基氧基)十八酸第三丁酯

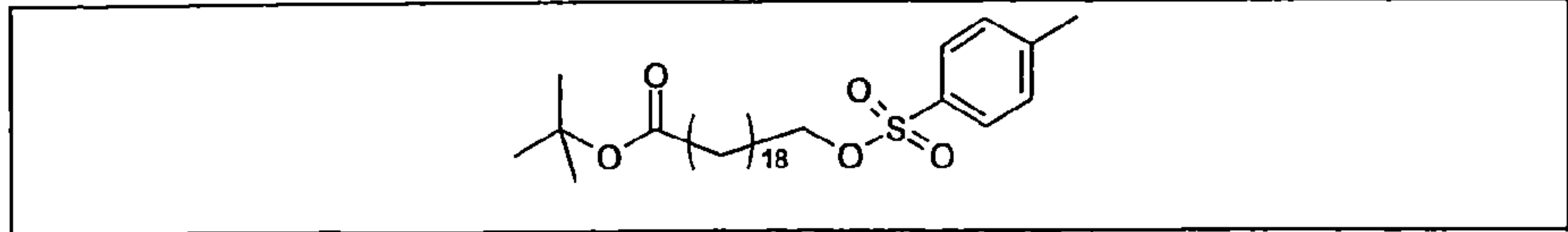


【0329】 將TEA (400 mg，39.6 mmol)添加至18-羥基十八酸第三丁酯(4700 mg，13.2 mmol)和TsCl (2508 mg，13.2 mmol)於DCM (100 mL)中的溶液。將反應混合物在室溫下攪拌過夜。添加水(50 mL)，並用DCM萃取(2× 50 ml)。合併的有機相用鹽水(100 mL)洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮。藉由矽膠管柱純化粗產物(EA/正己烷=1：20)，得到18-(對甲苯磺醯基氧基)十八酸第三丁酯(4.5 g，67%產率)。

【0330】 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.02 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.20 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.69 - 1.57 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.25 (t, J = 12.1 Hz, 24H)。

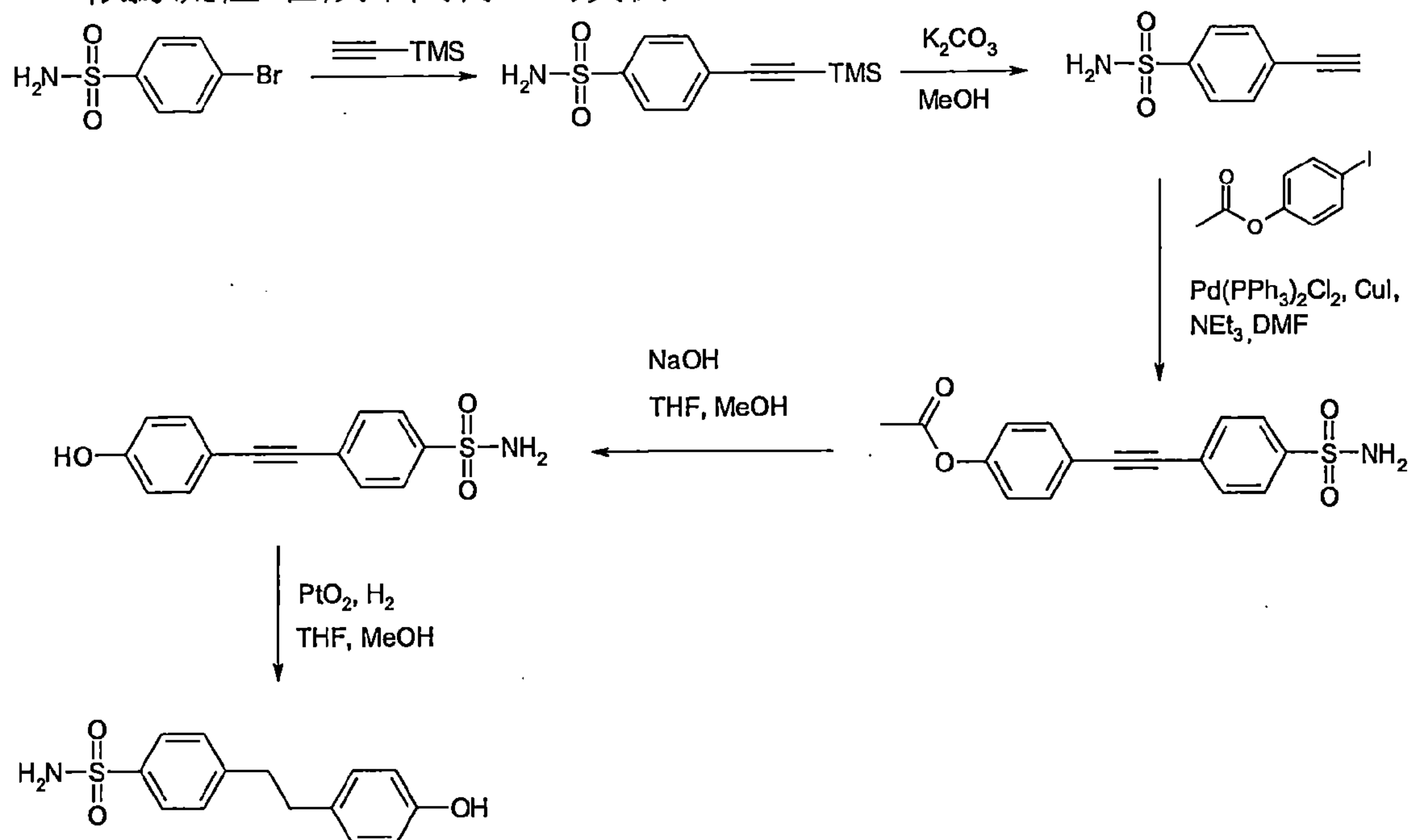


【0331】 對應合成以下化合物：

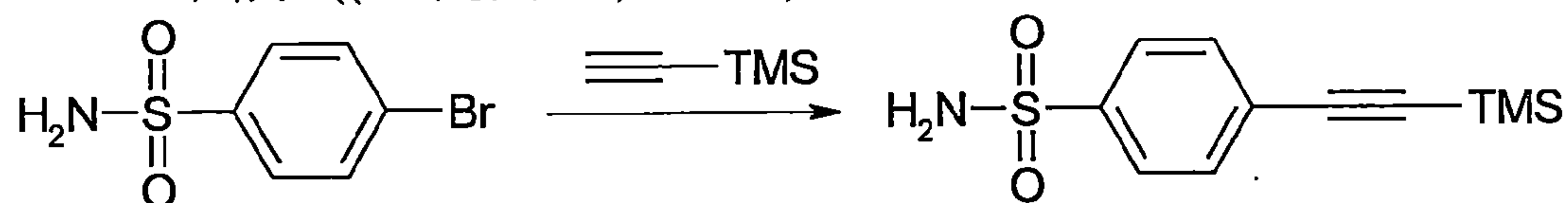


20-(對甲苯磺醯基氧基)二十酸第三丁酯

2.6 依據流程4合成中間物III的實例



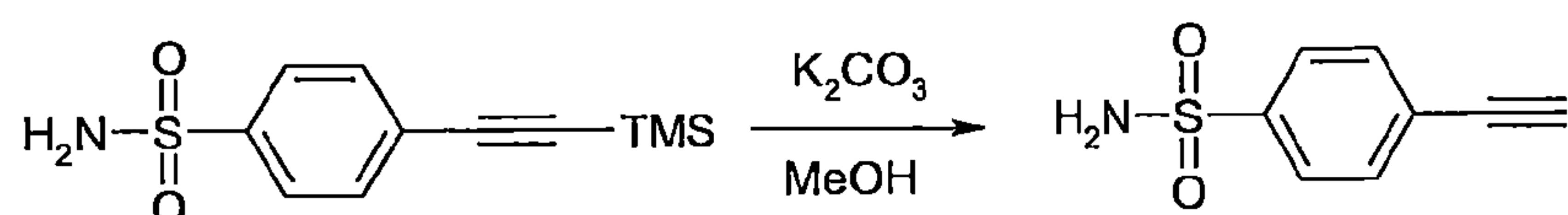
2.6.1 合成4-((三甲基矽基)乙炔基)苯磺醯胺



【0332】 將4-溴苯磺醯胺(61 g, 260 mmol)、三甲基矽基乙炔(38.2 g, 0.09 mol)、肆(三苯基膦)鈰(7.5 g, 6.5 mmol)和碘化銅(2.5 g, 13 mmol)在三乙胺(500 ml)中的混合物在氮氣氣氛下加熱至80°C歷時8小時。將混合物在真空下濃縮，並用EA (300 ml)萃取。將合併的有機層乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下濃縮。藉由矽膠層析(用於PE中的70% DCM溶析)純化粗產物，得到4-((三甲基甲矽基)乙炔基)苯磺醯胺(50 g, 75%)。

【0333】 LC-質譜法：移動相：A = 10 mM TFA/ H_2O ，B = MeCN；梯度：1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：2.0 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ，50 × 4.6mm，3.5 μm 。LC純度：90 % (214 nm)；質量：在1.98 min處發現峰254.0 ($\text{M} + \text{H}$)⁺。

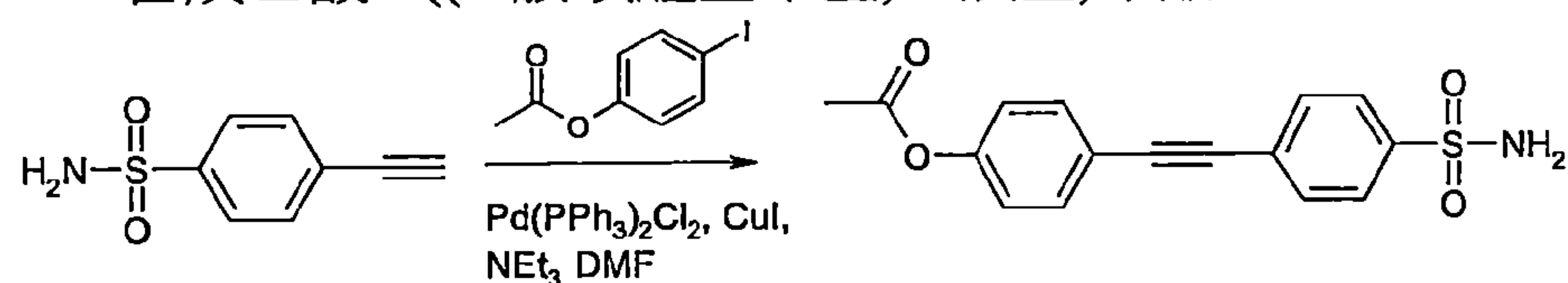
2.6.2 合成4-乙炔基苯磺醯胺



【0334】 將4-((三甲基矽基)乙炔基)苯磺醯胺(40 g, 158 mmol)、 K_2CO_3 (2.2 g, 15.8 mmol)和甲醇(400 ml)在室溫下攪拌12h。反應完成後(依據LCMS監測)，用水(200 ml)稀釋，並用EA (2×200 ml)萃取。將合併的有機層乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下濃縮。藉由矽膠層析(用在PE中的100% DCM溶析)純化粗產物，得到4-乙炔基苯磺醯胺(22 g, 77%)。

【0335】 LC-質譜法：移動相：A = 10 mM TFA/ H_2O ，B = MeCN；梯度：在1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：2.0 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ，50 × 4.6mm，3.5 μm 。LC純度：90 % (214 nm)；質量：在1.65分鐘時發現峰182.1 ($M + H$)⁺。

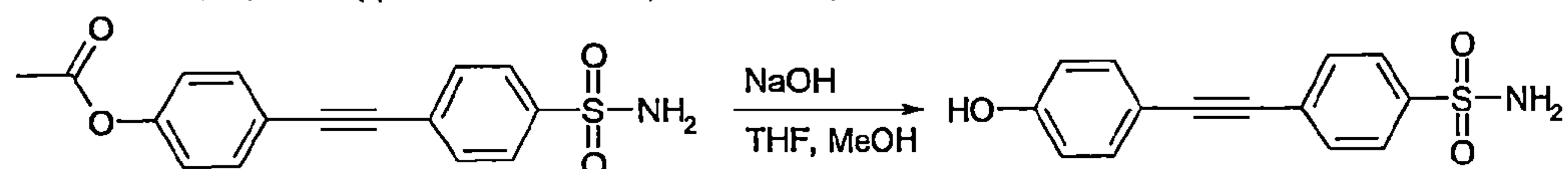
2.6.3 合成乙酸4-((4-胺磺醯基苯基)乙炔基)苯酯



【0336】 $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (5.8 g, 8.3 mmol)、CuI (1.6 g, 8.3 mmol)， Et_3N (25 g, 249 mmol)和(4-碘苯基)乙酸(27 g, 103 mmol)被添加至4-乙炔基苯磺醯胺(15 g, 83 mmol)於DMF(150 ml)中的混合物。將燒瓶抽真空並用 N_2 回填。然後將混合物在室溫下攪拌過夜。將水(200 ml)加入到混合物中，抽濾並在空氣中乾燥，得到呈褐色固體狀的乙酸4-((4-胺磺醯基苯基)乙炔基)苯酯(18 g, 70%)。

【0337】 LC-質譜法：移動相：A = 10 mM TFA/ H_2O ，B = MeCN；梯度：1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：2.0 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ，50 × 4.6mm，3.5 μm 。LC純度：90 % (214 nm)；質量：在1.88分鐘時發現峰338 ($M + Na$)⁺。

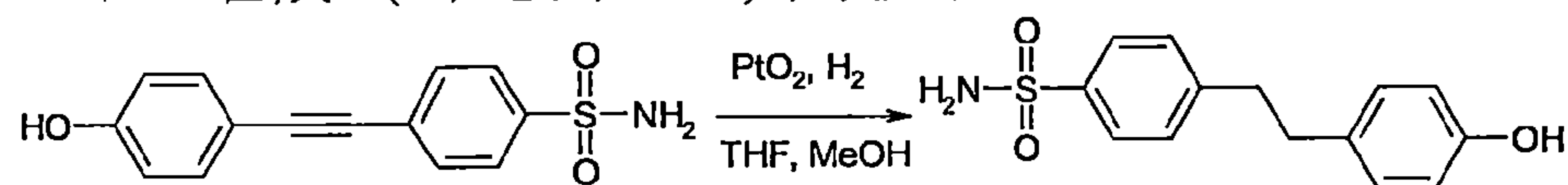
2.6.4 合成4-((4-羥基苯基)乙炔基)苯磺醯胺



【0338】在0℃下，將NaOH (4.5 g, 114 mmol)添加至乙酸4-((4-胺磺基苯基)乙炔基)苯酯於THF (60 ml), MeOH (60 ml)和H₂O (30 ml)中的溶液。將混合物在室溫下攪拌2h。反應完成後(依據LCMS監測)，將溶液用EA (50 ml)稀釋，並用水(20 ml)和飽和NaCl水溶液洗滌，經MgSO₄乾燥。將濾液在真空下濃縮以提供粗產物。將粗產物用DCM製漿。抽濾並在空氣中乾燥，得到呈棕色固體狀的4-((4-羥基苯基)乙炔基)苯磺醯胺(10.9 g, 70%)。

【0339】LC-質譜法：移動相：A = 10 mM TFA/H₂O, B = MeCN；梯度：B = 在1.5分鐘內5% - 95%；流速：2.0 ml/min；管柱：Xbridge-C₁₈, 50 × 4.6mm, 3.5 μm。LC純度：95% (214 nm)；質量：在1.75 min處發現峰296.1 (M + Na)⁺。

2.6.5 合成4-((4-羥基苯基)乙炔基)苯磺醯胺



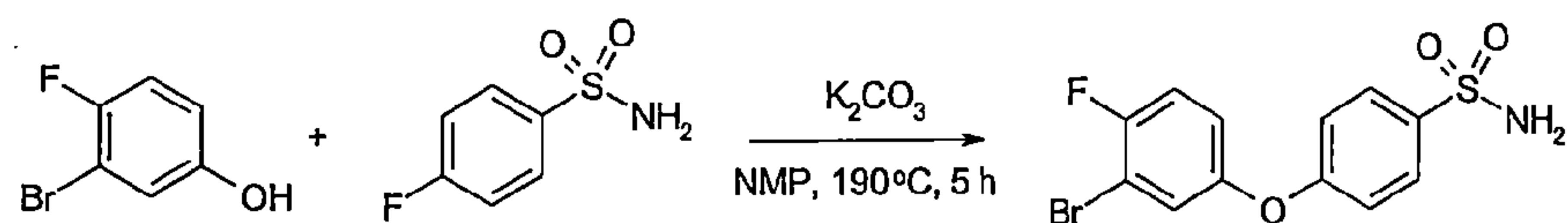
【0340】向4-((4-羥基苯基)乙炔基)苯磺醯胺(10.9 g, 40 mmol)在40ml THF和40 ml MeOH中的溶液加入PtO₂ (1 g)。將反應混合物在室溫下於H₂下攪拌歷時24h。反應完成後(依據LCMS監測)，接著將混合物過濾。在真空下濃縮濾液，得到4-((4-羥基苯基)乙炔基)苯磺醯胺(9.5 g, 86%)。

【0341】LC-質譜法：移動相：A = 10 mM TFA/H₂O, B = MeCN；梯度：在1.5分鐘內B = 5% - 95%；流速：2.0 ml/min；管柱：Xbridge-C₁₈, 50 × 4.6mm, 3.5 μm。LC純度：100% (214 nm)；質量：在1.67分鐘時發現峰278.1 (M + H)⁺。

【0342】¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.14 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.26 (s, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.72 - 6.60 (m, 2H), 2.96 - 2.84 (dd, *J* = 9.2, 6.2 Hz, 2H), 2.77 (dd, *J* = 9.2, 6.3 Hz, 2H)。

2.7 依據流程3合成中間物II的實例

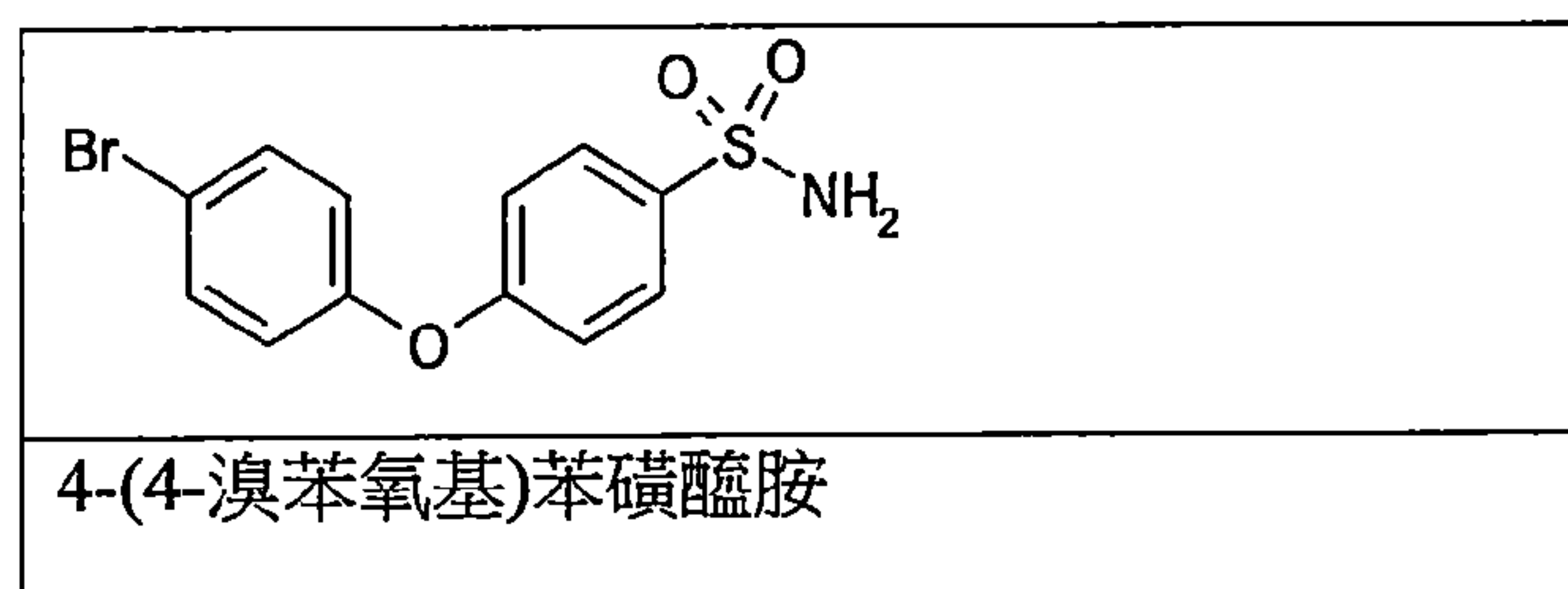
2.7.1 合成4-(3-溴-4-氟苯氧基)苯磺醯胺



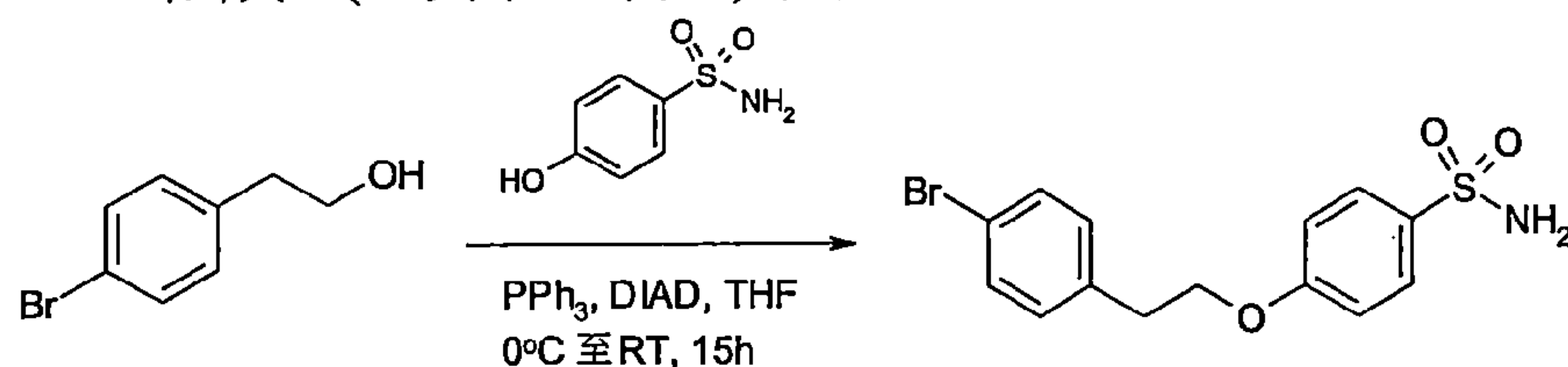
【0343】 將3-溴-4-氟苯酚(12.8 g，66.8 mmol)，4-氟苯磺醯胺(9.00 g，51.4 mmol)和 K_2CO_3 (14.2 g，103 mmol)在NMP (50 ml)中的混合物在190°C下攪拌歷時5小時。將反應混合物用EA (500 ml)稀釋，用水(50 ml)、鹽水(3×50ml)洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥，過濾並濃縮。將殘餘物藉由矽膠急速層析純化(用PE/EA=3/1溶析)，得到呈白色固體狀的4-(3-溴-4-氟苯氧基)苯磺醯胺(10.8 g，31.3 mmol，61%產率)。

【0344】 LC-質譜法：移動相：A = 2.5mM TFA/ H_2O ，B = 2.5mM TFA/MeCN；梯度：在1.0分鐘內B = 10%-95%；流速：1.5 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ，30 × 4.6mm，2.5 μm 。LC (預期產物)純度：88% (214 nm)；在1.74分鐘時發現峰368.0 ($M + Na$)⁺。

【0345】 對應合成以下化合物：



2.7.2 合成4-(4-溴苯乙氧基)苯磺醯胺

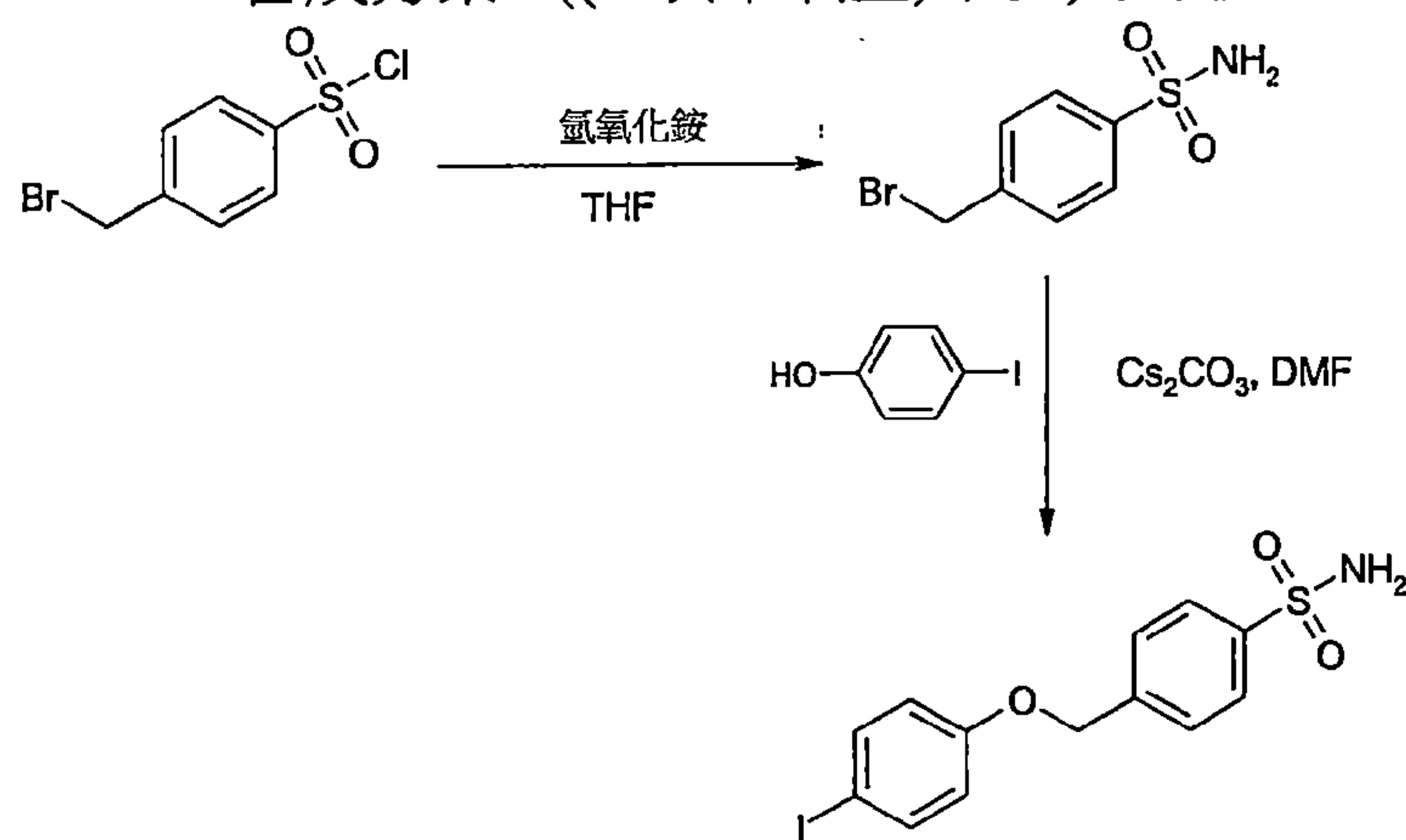


【0346】 在0°C下，將DIAD (11.1 g，54.7 mmol)逐滴加入2-(4-溴苯基)乙醇 (10 g，49.8 mmol)，4-羥基苯磺醯胺(8.6 g，49.8 mmol)和 PPh_3 (14.3 g，54.795 mmol)於無水THF (200 ml)中的溶液。在攪拌歷時20小時下使反應升溫至室溫。在減壓下移除溶劑，並將殘餘物溶於EA (200 ml)中，然後用水(50 ml)和鹽水(50 ml)洗

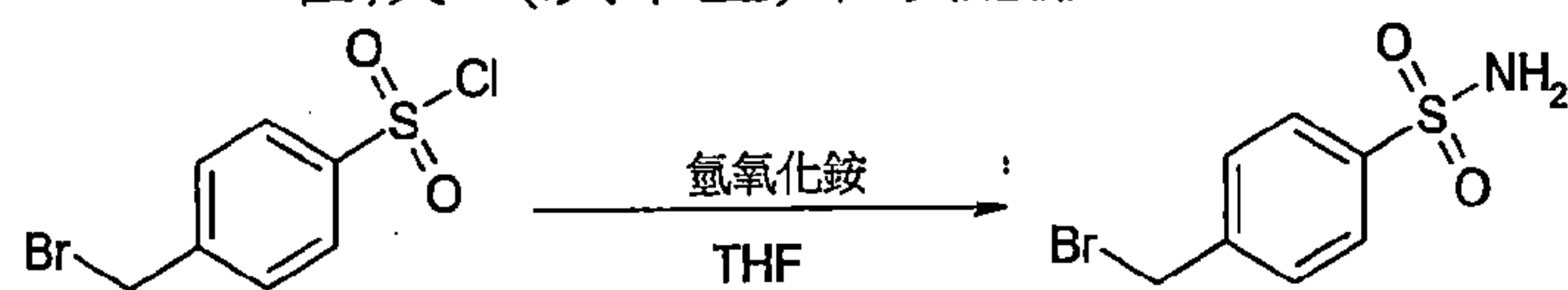
滌。有機相經 Na_2SO_4 乾燥。過濾後，在減壓下移除溶劑，並將殘餘物藉由管柱層析純化(矽膠，用PE中的EA從0至40%溶析)，得到4-(4-溴苯乙氧基)苯磺醯胺(6.8 g，如白色固體)，產率為39%。

【0347】 LC-質譜法：移動相： H_2O (0.01%TFA (A) / MeCN (0.01%TFA)，(B)；梯度：在0.2分鐘內5 % B，在1.3分鐘內增加至95% B；流速：1.8 ml/min；管柱：SunFire， $50 \times 4.6\text{mm}$ ，3.5 μm 。LC純度：95% (214 nm)；質量：在2.08分鐘時發現峰356 ($\text{M} + \text{H}$)⁺。

2.7.3 合成方案4-((4-碘苯氧基)甲基)苯磺醯胺



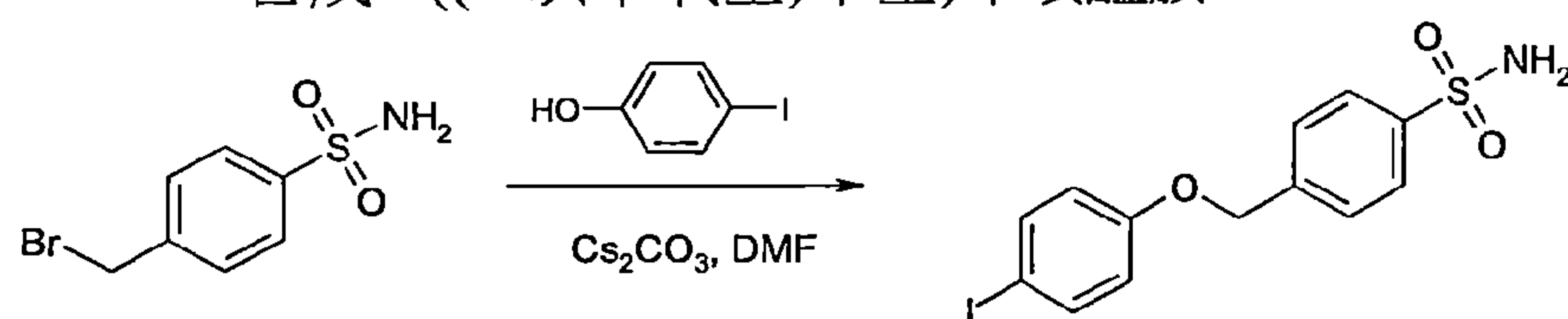
2.7.4 合成4-(溴甲基)苯磺醯胺



【0348】 將4-(溴甲基)苯磺醯氯(7 g，26 mmol)在THF (80 ml)中的溶液冷卻至0°C，向其中加入28%氨水(6.5 ml)，並將混合物在室溫下攪拌歷時2h。濃縮反應溶液，並加入乙酸乙酯(200 ml)。分離有機層，乾燥並濃縮。粗製的4-(溴甲基)苯磺醯胺無需進一步純化即可直接使用。(5.5 克，86%)

【0349】 LC-質譜法：流動相：A = 10 mM TFA/ H_2O ，B = MeCN；梯度：在1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：2.0 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ， $50 \times 4.6\text{mm}$ ，3.5 μm 。LC純度：90 % (214 nm)；質量：在1.64分鐘時發現峰250.1 ($\text{M} + \text{H}$)⁺。

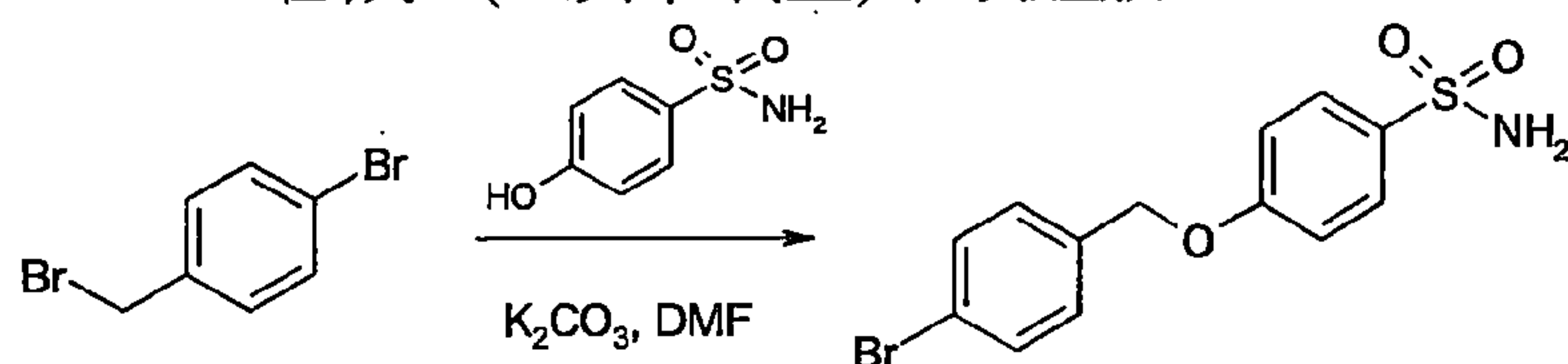
2.7.5 合成4-((4-碘苯氧基)甲基)苯磺醯胺



【0350】 向在DMF (50ml)中的4-(溴甲基)苯磺醯胺(5.5 g, 22 mmol)的混合物加入 Cs_2CO_3 (10.7 g, 33 mmol)和4-碘苯酚(6 g, 27.5 mmol)。然後將混合物在室溫下攪拌12h。將水(200 ml)加到該混合物中，過濾所得固體，然後用 Et_2O (50 ml)製漿。抽濾並在空氣中乾燥，得到呈白色固體狀的所需產物(5.5 g, 65%)。

【0351】 LC-質譜法：方法：移動相：A = 10 mM TFA/ H_2O ，B = MeCN；梯度：在1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：1.8 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ，50 x 4.6mm, 3.5 μm 。LC純度：80% (214 nm)；質量：在1.98分鐘時發現峰389.7 ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

2.7.6 合成4-(4-溴苄氧基)苯磺醯胺

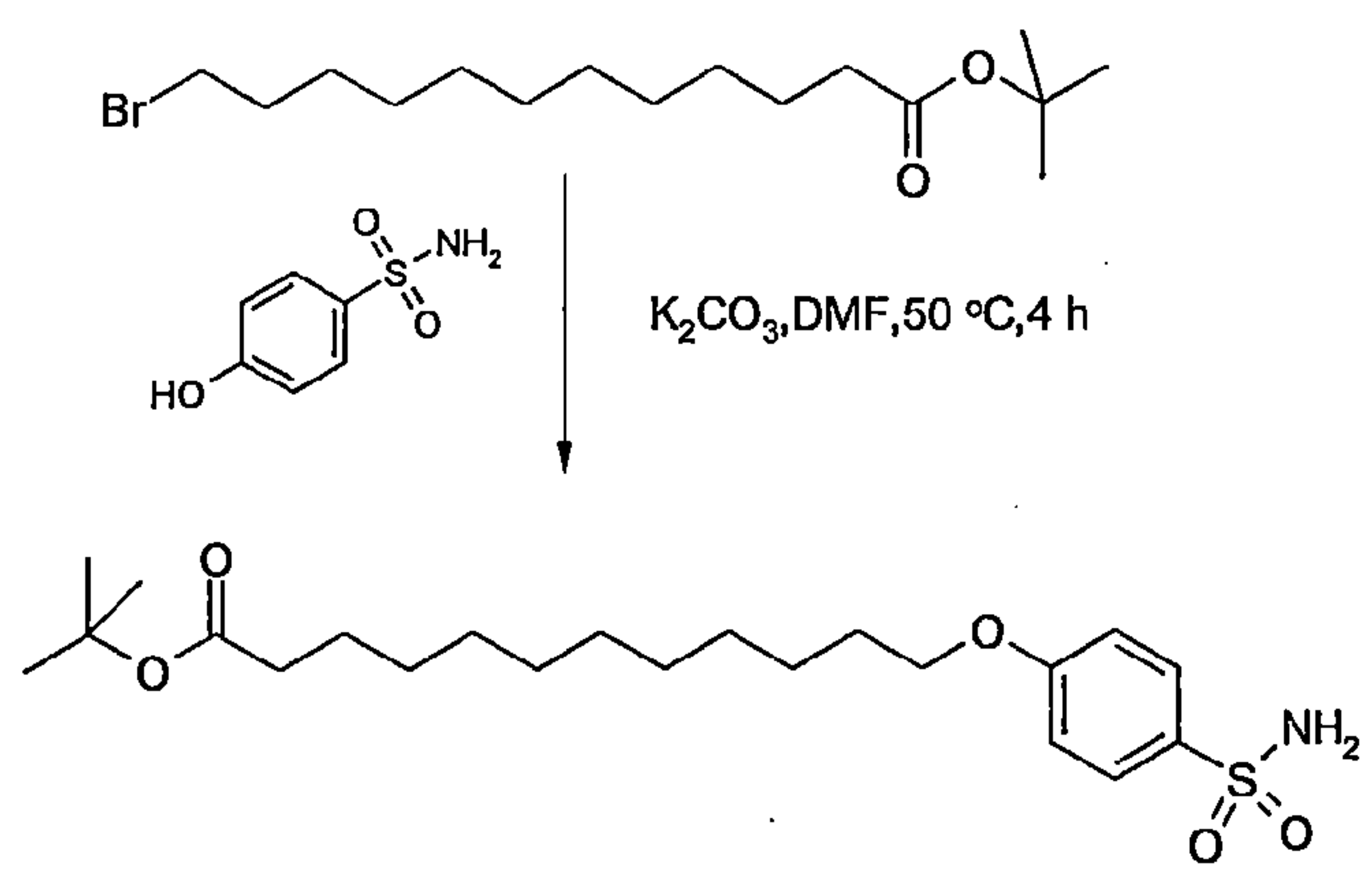


【0352】 向1-溴-4-(溴甲基)苯(6.5 g, 26 mmol)在DMF (50 ml)中的混合物加入 K_2CO_3 (5.5 g, 40 mmol)和4-羥基苯磺醯胺(4.5 g, 26 mmol)。然後將混合物在50°C下攪拌歷時2小時。將水(200 ml)加入到混合物中，過濾固體。然後將固體用PE:EA = 1:2 (50 ml)製漿，抽濾並在空氣中乾燥，得到呈白色固體狀的所需產物(5.3 g, 60%)。

【0353】 LC-質譜法：方法：移動相：A = 10 mM TFA/ H_2O ，B = MeCN；梯度：在1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：1.8 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ，50 x 4.6mm, 3.5 μm 。LC純度：80% (214 nm)；質量：在1.81分鐘時發現峰364 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺。

2.8 依據方案2合成中間物I的實例

2.8.1 合成12-(4-胺磺醯基苯氧基)十二酸第三丁酯



【0354】 將12-溴十二酸第三丁酯(6 g , 18 mmol) , 4-經基苯磺醯胺(3 g , 18 mmol)和 K_2CO_3 (5 g , 36 mmol)在DMF (50 ml)中的混合物加熱至 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 並攪拌4歷時小時。然後加入水(300 ml)。收集所得沉澱物並乾燥 , 得到12-(4-胺磺醯基苯氧基)十二酸第三丁酯 , 將其用EA/PE (1/5 , 100 ml)製漿 , 得到7 g (93%)的12-(4-胺基磺醯基苯氧基)十二酸酯 :

【0355】 LC-質譜方法:移動相:A:水(0.01% TFA) B: MeCN (0.01% TFA) , 梯度: 5%B歷時2分鐘 , 在1.3分鐘內增加至95%B , 95%B歷時1.5分鐘 , 在0.01分鐘內回到5%B ; 流速: 1.8ml/min ; 管柱: Sunfire , $50*4.6\text{mm}$, $3.5\mu\text{m}$ 管柱溫度: $50\text{ }^\circ\text{C}$ 。LC-MS純度: 100% (214 nm) ; 質量: 在2.23分鐘時發現峰450.2 (M + Na)⁺。

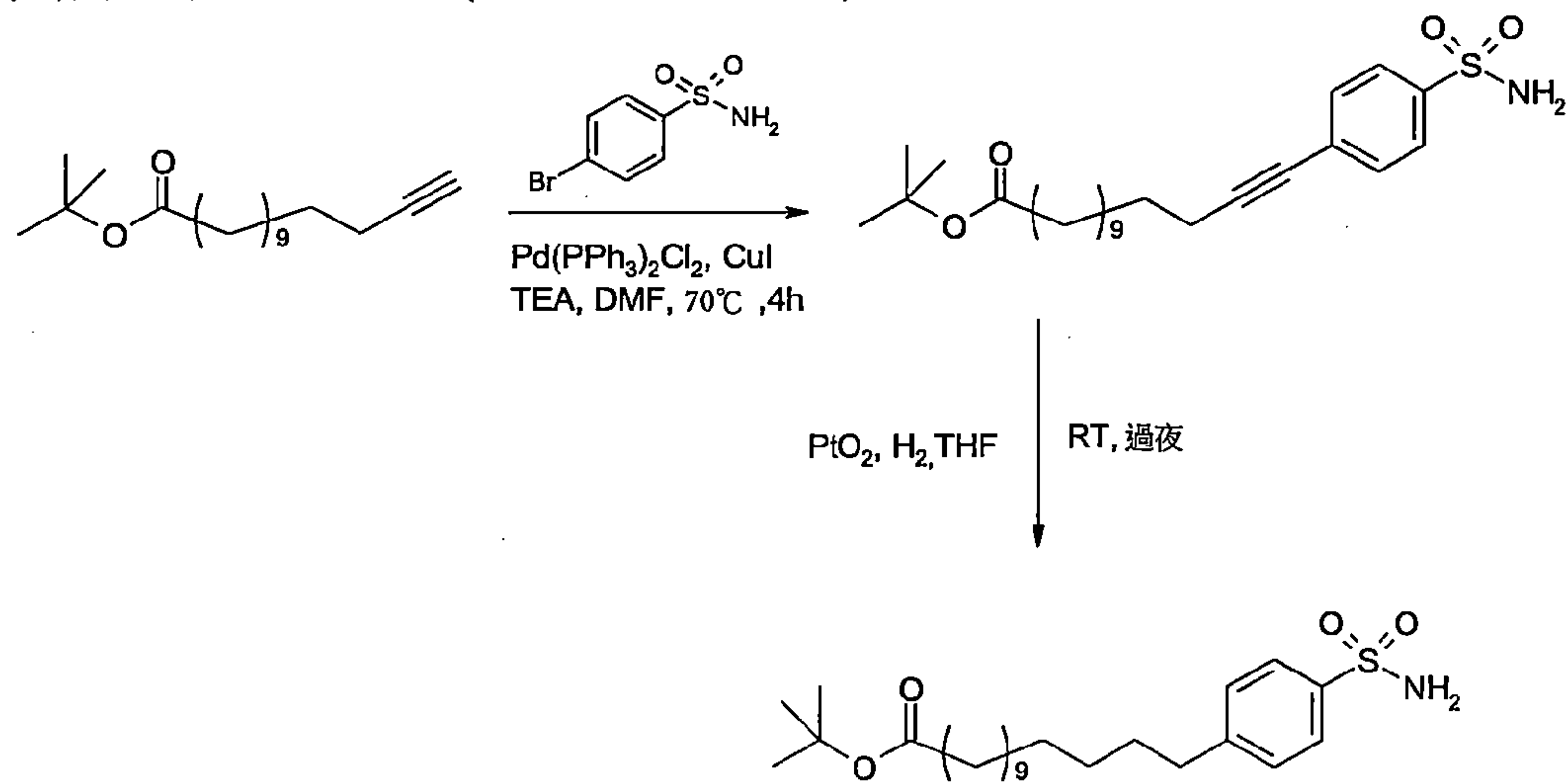
【0356】 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.83 (t, $J = 14.8\text{ Hz}$, 2H), 6.96 (d, $J = 8.8\text{ Hz}$, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.03 (dt, $J = 13.0, 6.6\text{ Hz}$, 2H), 2.20 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 2H), 1.73-1.80 (m, 2H), 1.50-1.57 (m, 2H), 1.40-1.48 (m, 11H), 1.37 -1.19 (m, 12H)。

【0357】 對應合成以下化合物 :

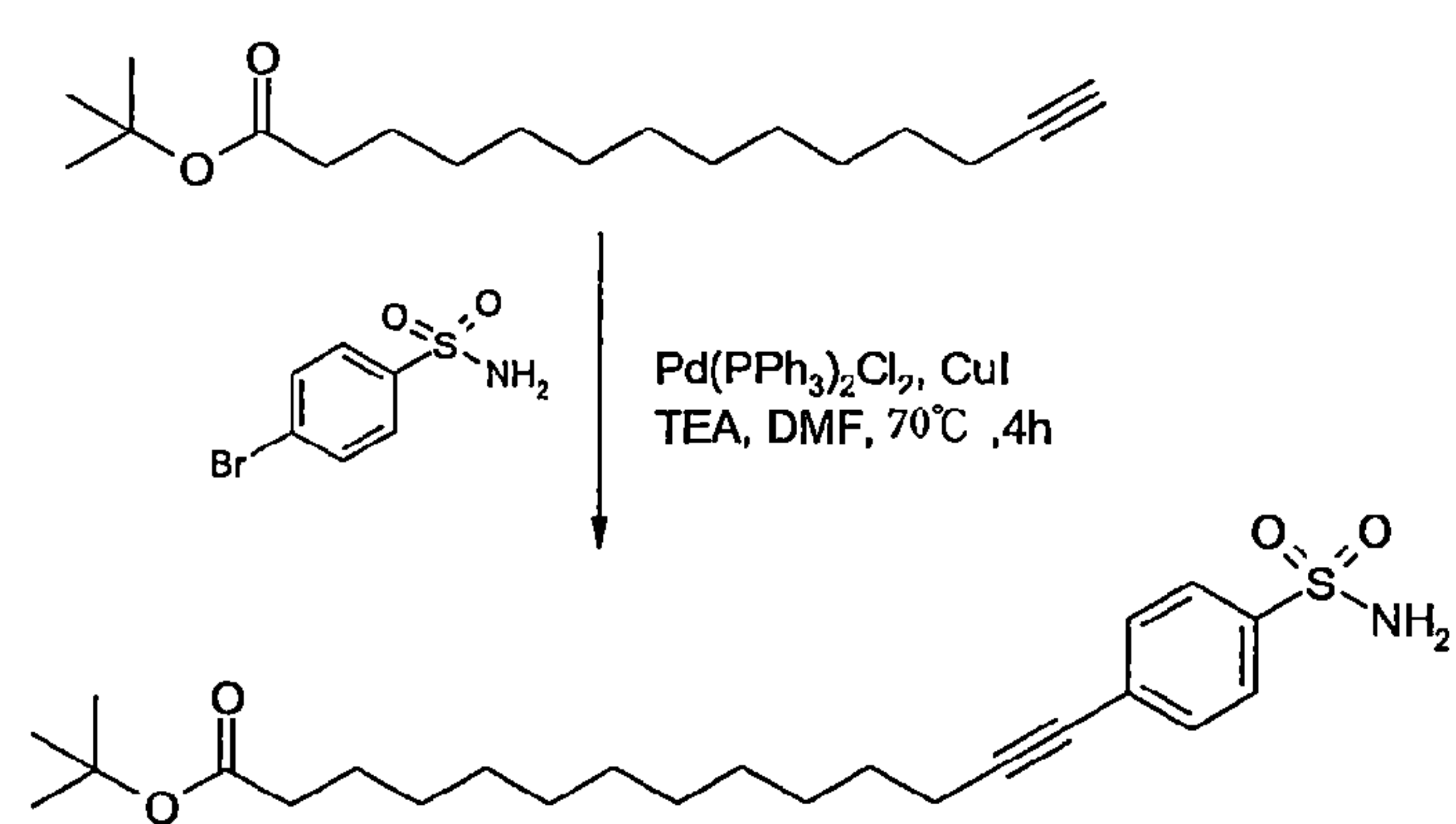
14-(4-胺磺醯基苯氧基)十四酸第三丁酯	16-(4-胺磺醯基苯氧基)十六酸第三丁酯

16-(2-氟-4-胺磺酰基-苯氧基)十六酸第三丁酯	16-(2,3-二氯-4-胺磺酰基-苯氧基)十六酸第三丁酯
12-[4-{2-[4-(4-胺磺酰基苯基)乙基]苯氧基}]十二酸第三丁酯	16-(2-氯-4-胺磺酰基-苯氧基)十六酸第三丁酯
20-(4-胺磺酰基苯氧基)二十酸第三丁酯	18-(4-胺磺酰基-苯氧基)十八酸第三丁酯
16-(3-胺磺酰基苯氧基)十六酸第三丁酯	16-(2,5-二氯-4-胺磺酰基-苯氧基)十六酸第三丁酯

合成方案：合成14-(4-胺磺酰基苯基)十四酸酯



2.8.2 合成14-(4-胺磺酰基苯基)十四-13-炔酸第三丁酯

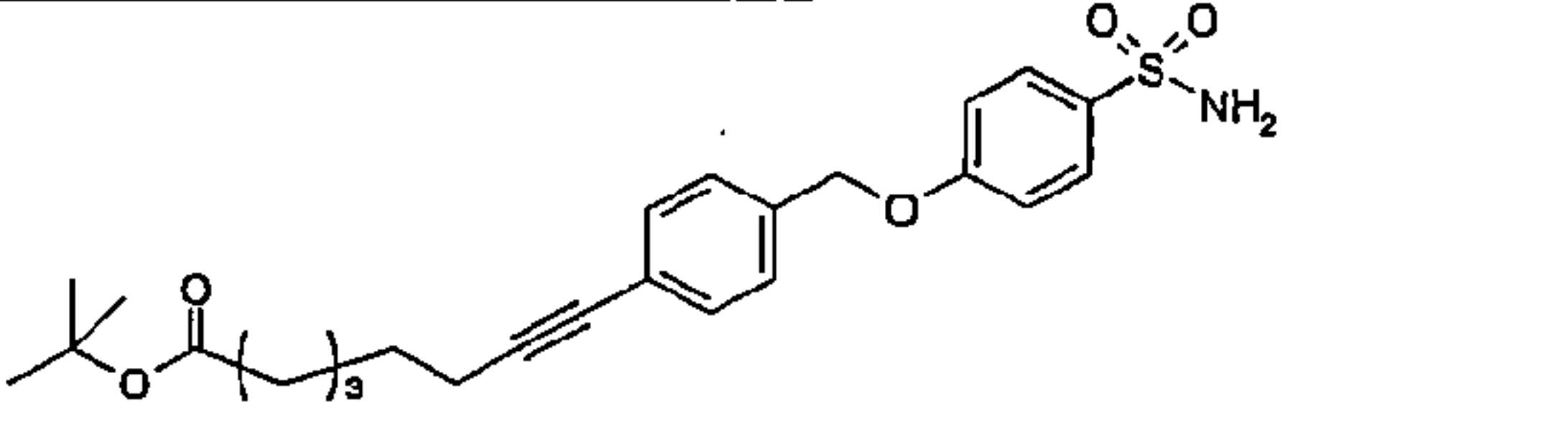
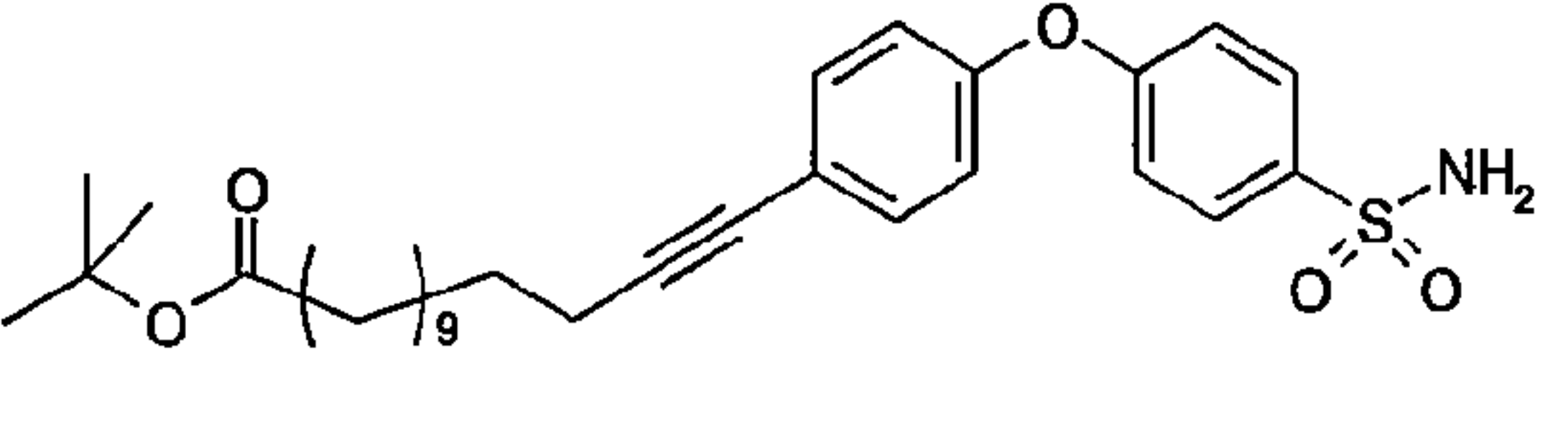
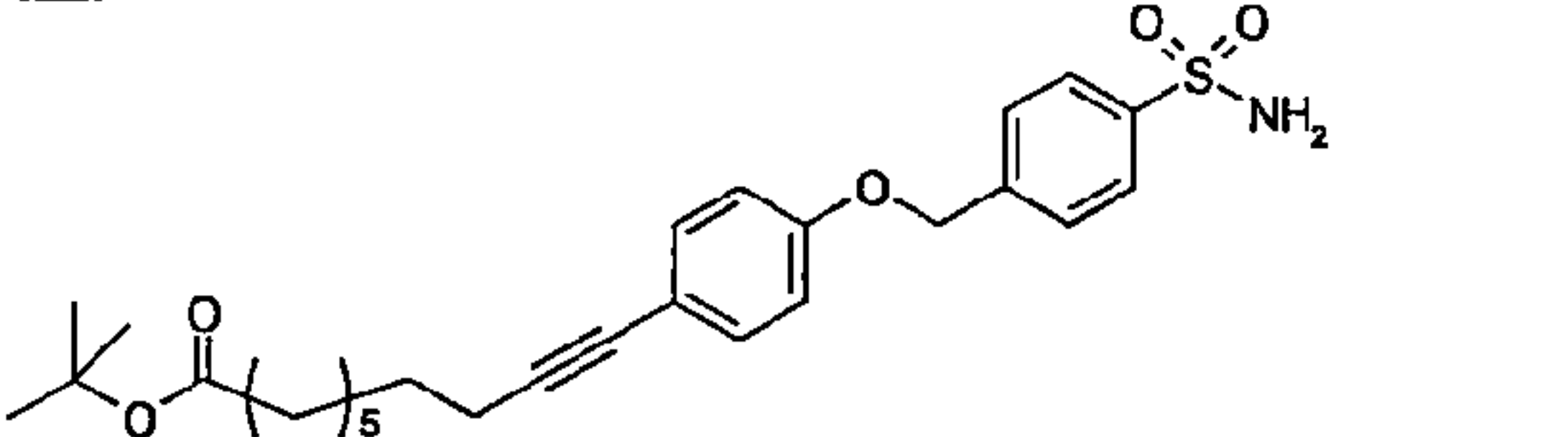
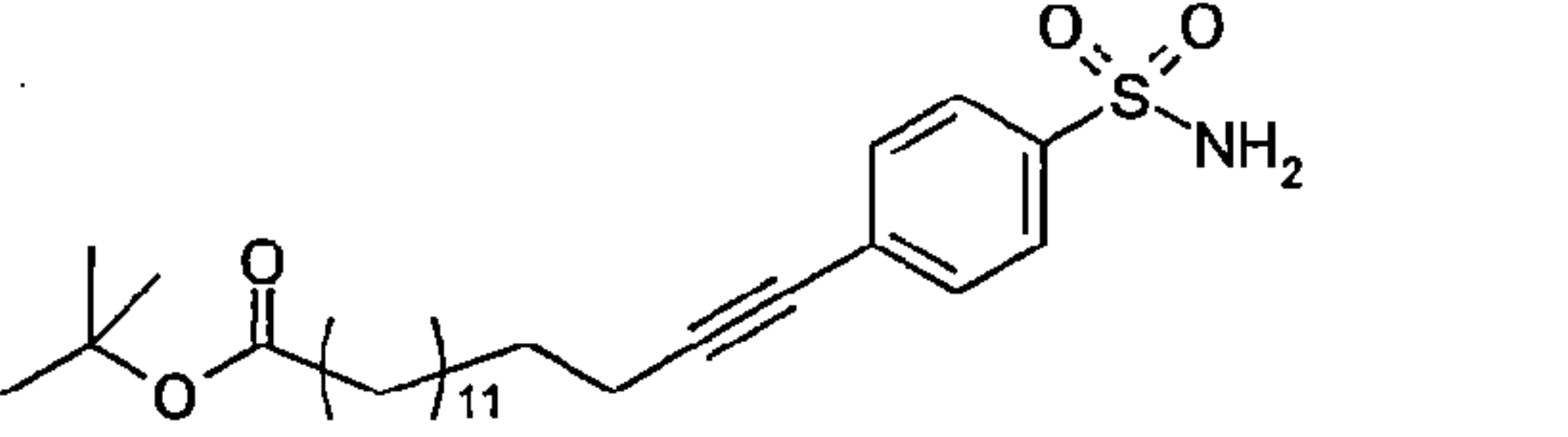
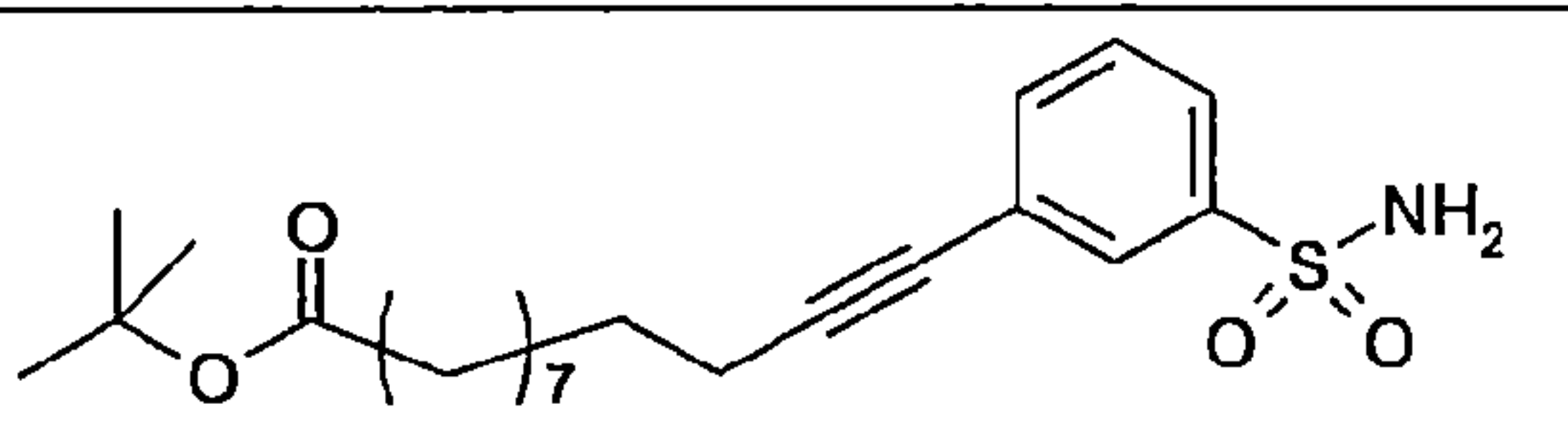
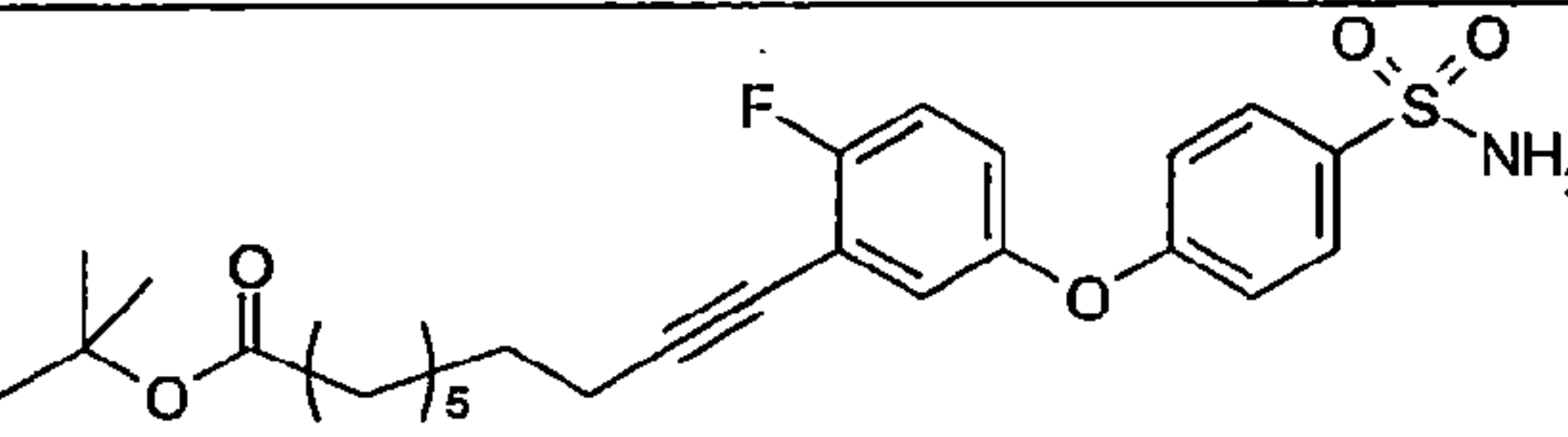
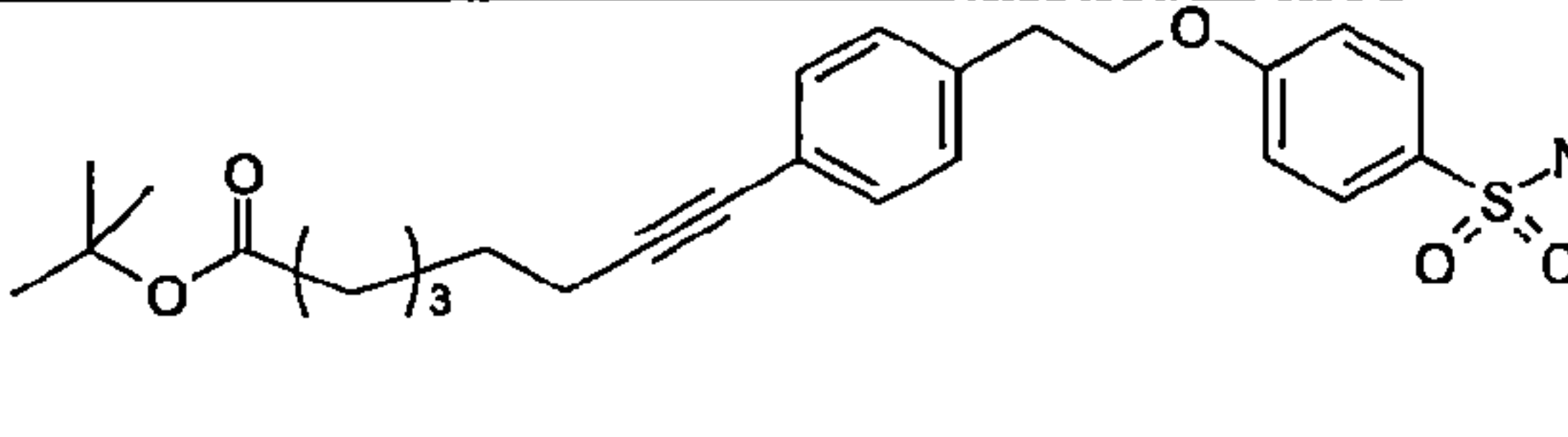
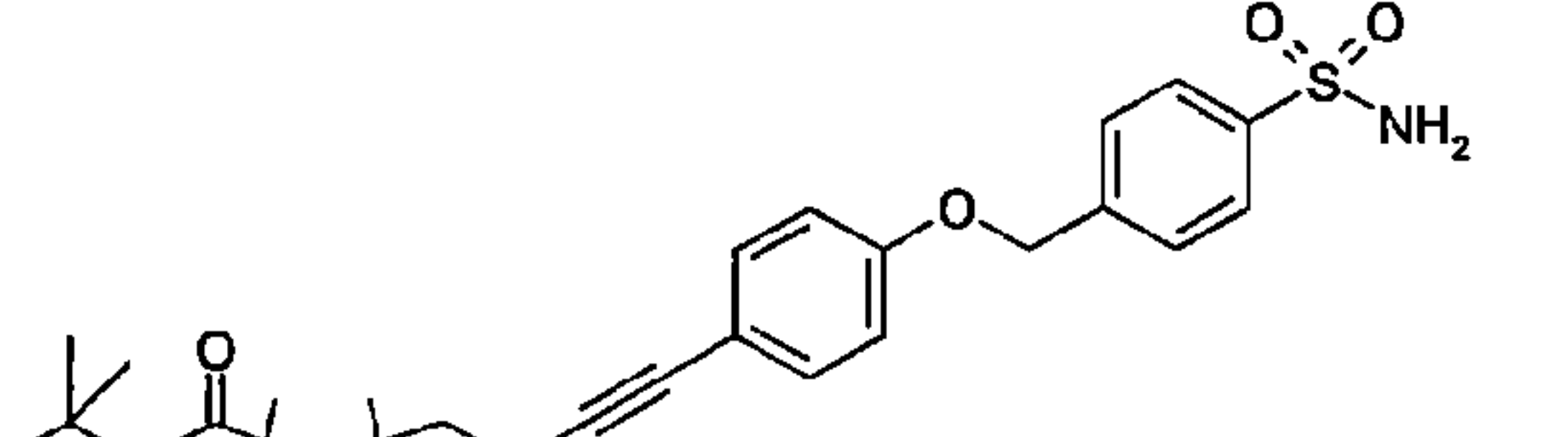
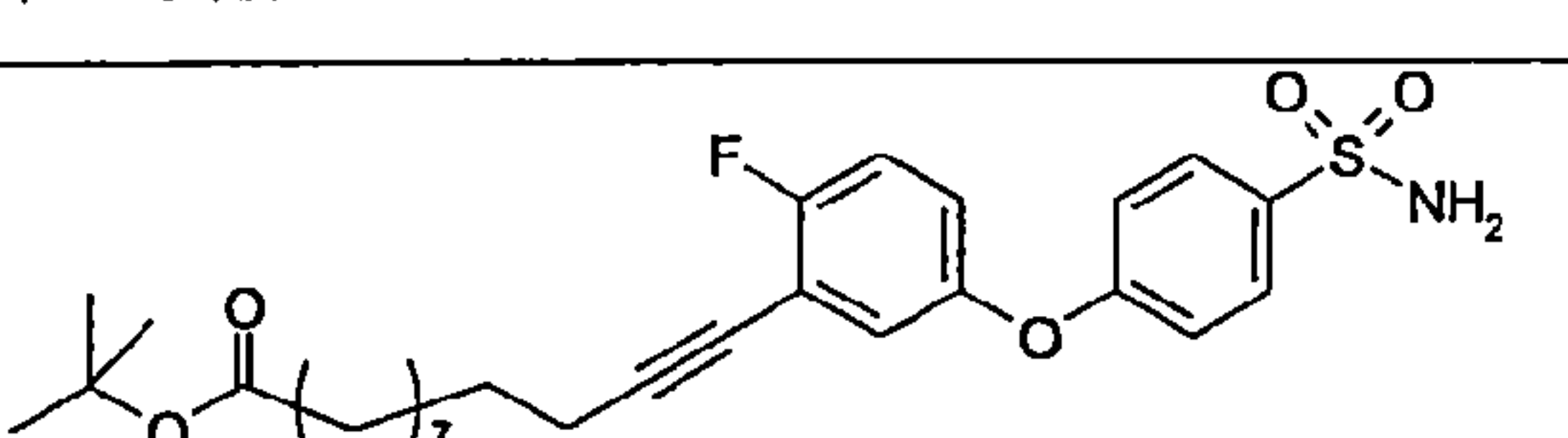
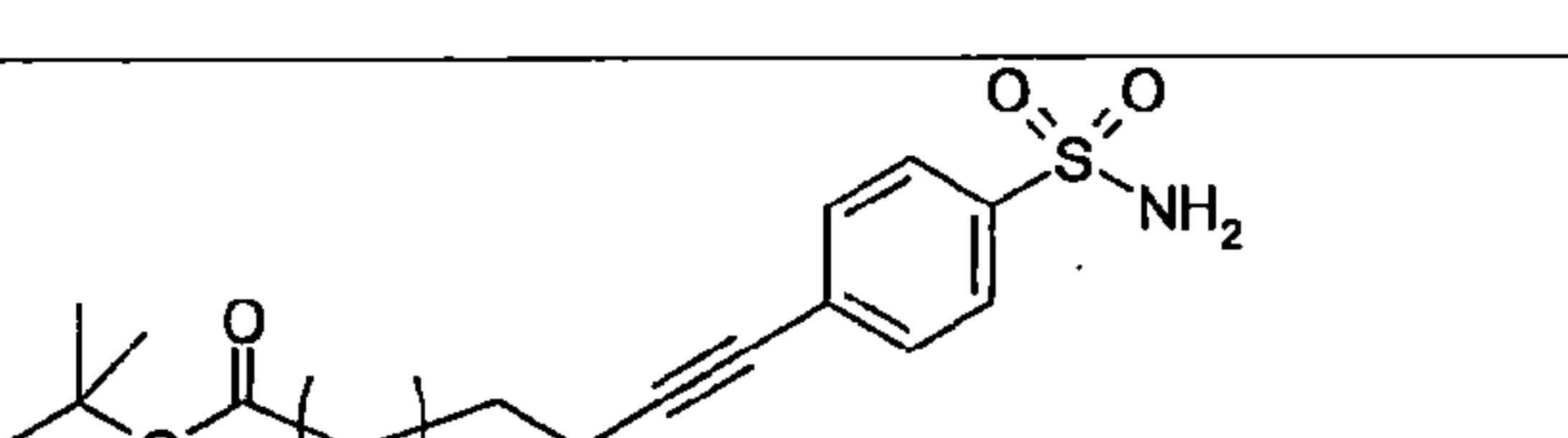
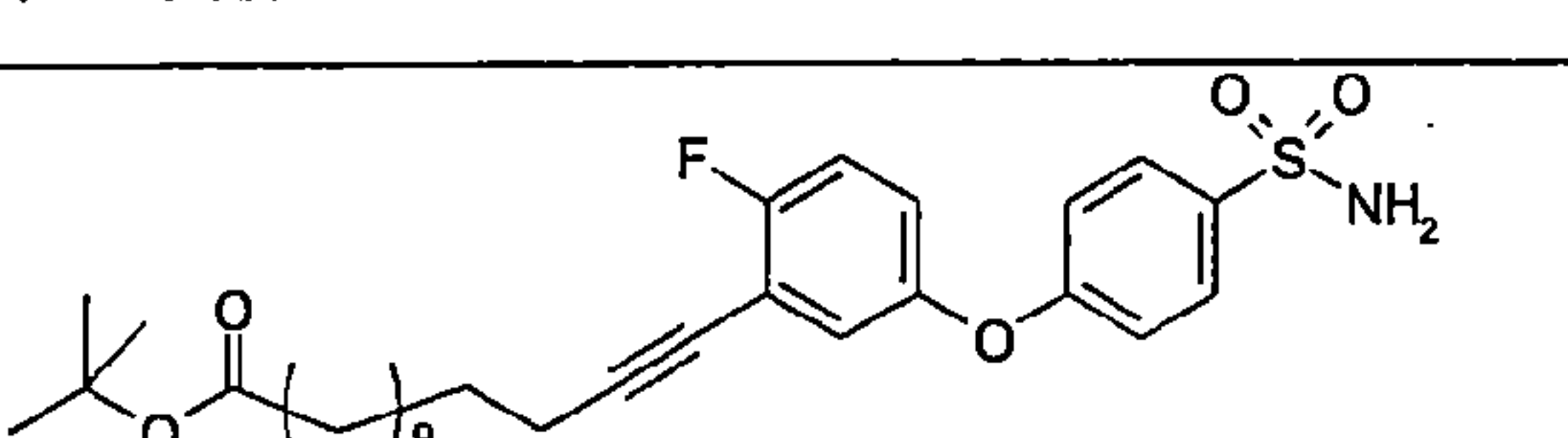
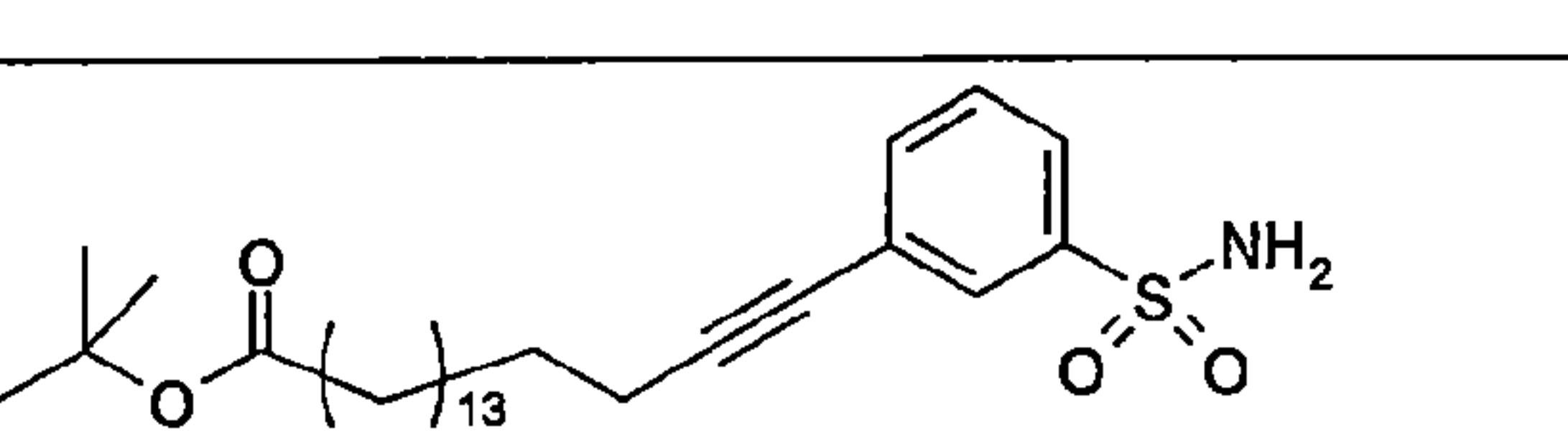
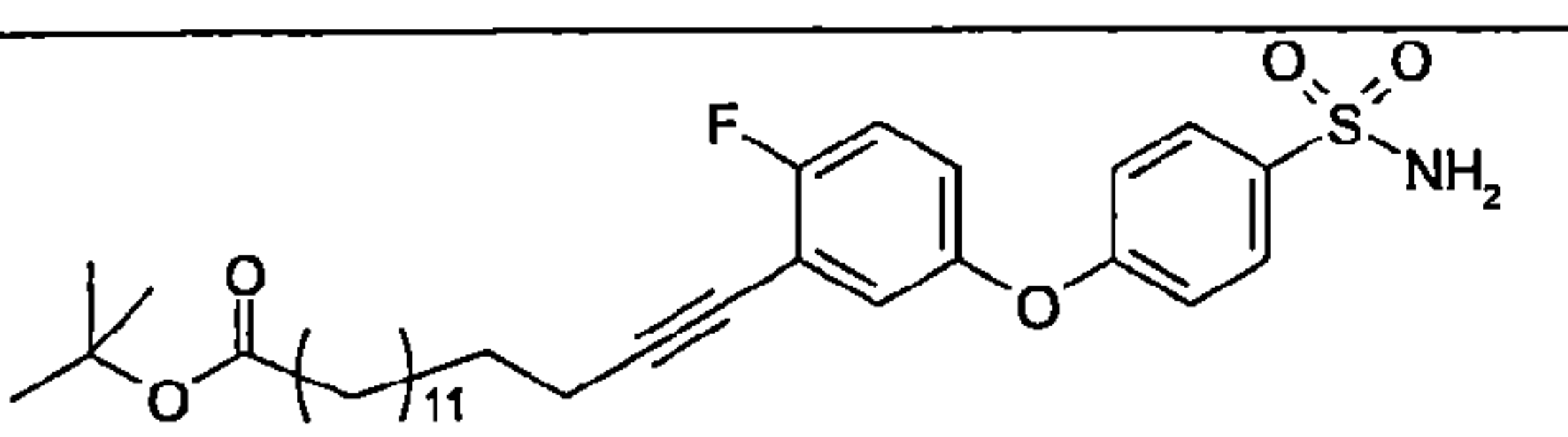
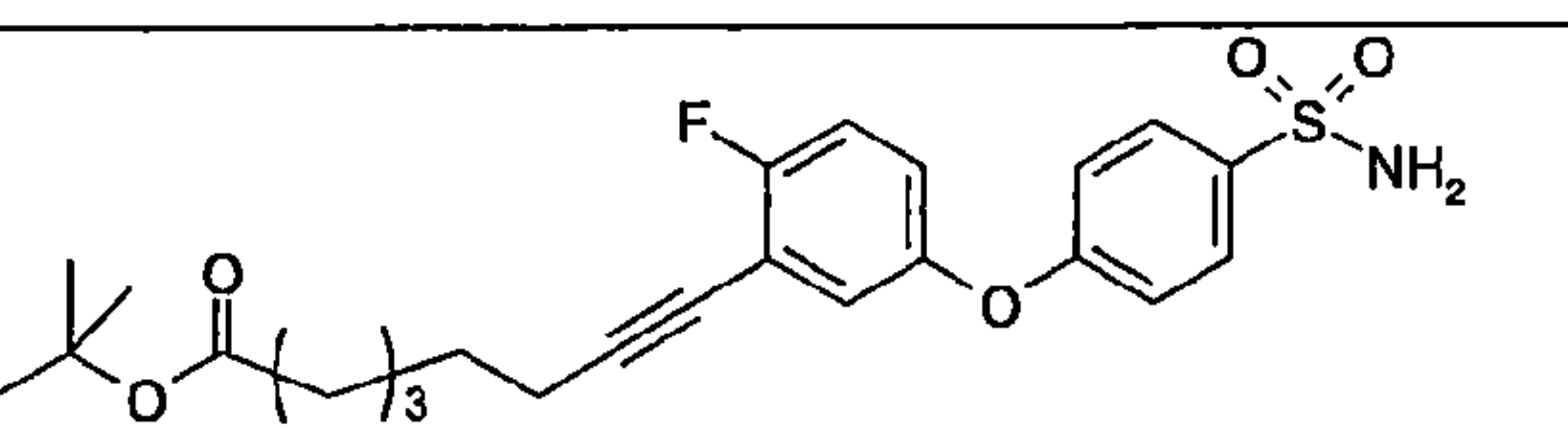


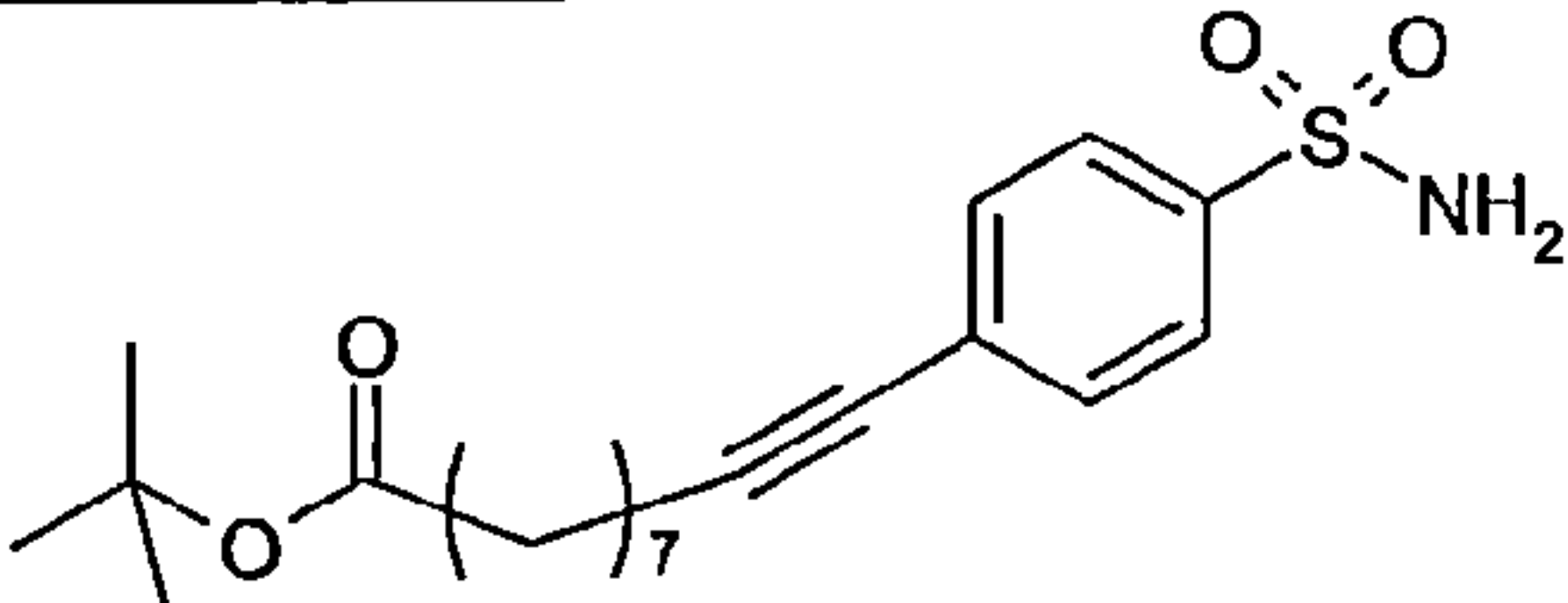
【0358】 將 $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.47 g , 0.68 mmol)、 CuI (0.13 g , 0.68 mmol) , Et_3N (2 g , 20.33 mmol)和十四-13-炔酸第三丁酯(2.2 g , 7.8 mmol)加入4-溴苯磺醯胺(1.6 g , 6.8 mmol)於DMF (20 ml)中的混合物。將燒瓶抽真空並用 N_2 回填。然後將混合物在 70°C 下攪拌歷時4h。將水(80 ml)加入到混合物中，藉由EA (2×80 ml)萃取。合併的有機相用鹽水洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥，在真空下濃縮。藉由矽膠層析 (PE：EA=4：1)純化粗產物，得到呈黃色固體狀的14-(4-胺磺醯基苯基)十四-13-炔酸第三丁酯(2.2 g , 5.05 mmol，產率：76%)。

【0359】 LC-質譜法：方法：流動相：A = 10 mM TFA/ H_2O ，B = MeCN；梯度：在1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：1.8 ml/min；管柱：Xbridge- C_{18} ，50 x 4.6mm，3.5 μm 。LC純度：98% (214 nm)；質量：在2.37分鐘時發現峰458 ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

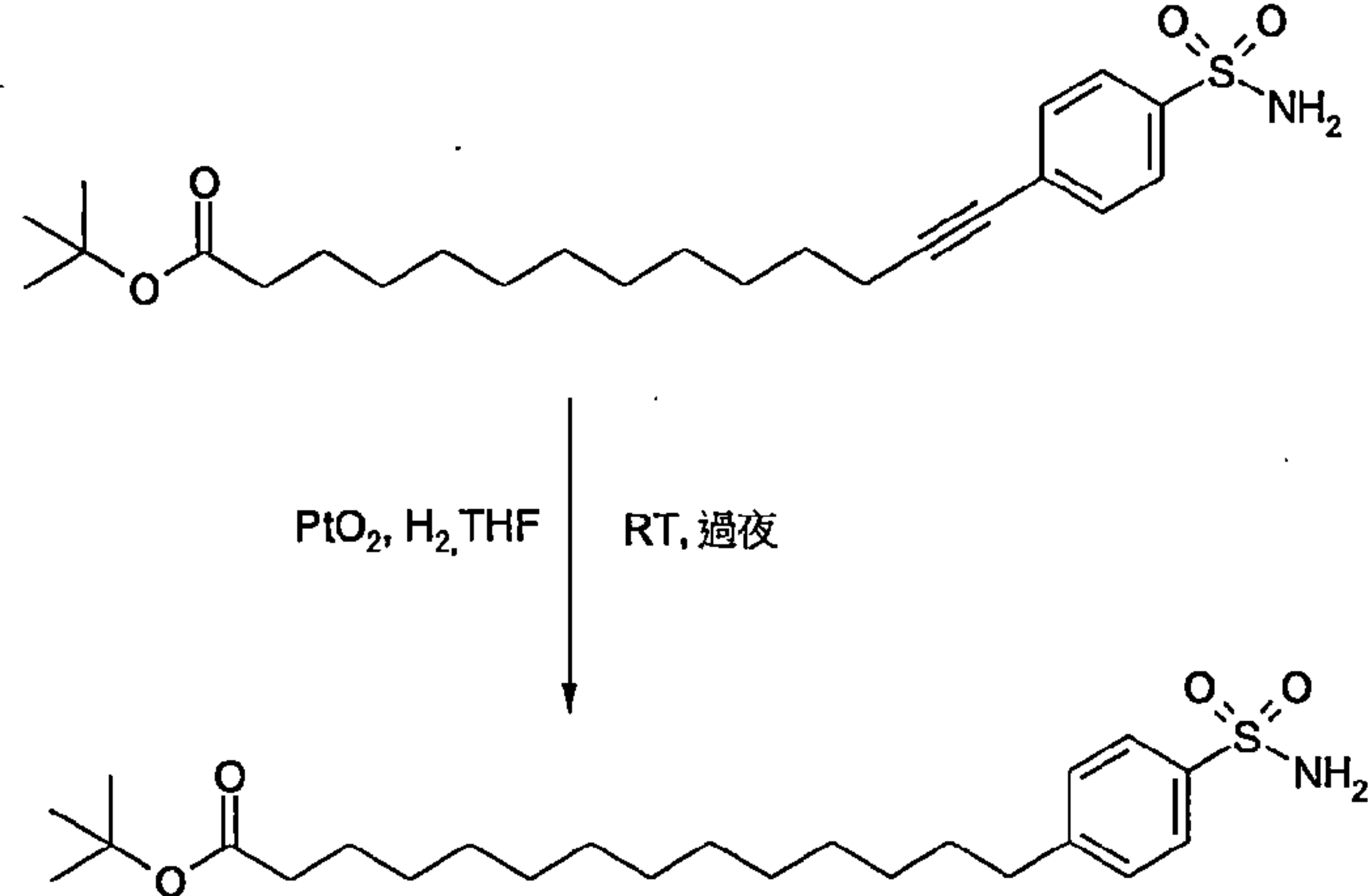
【0360】 對應合成以下化合物：

18-(4-胺磺醯基苯基)十八-17-炔酸第三丁酯	14-(3-胺磺醯基苯基)十四-13-炔酸第三丁酯
12-[4-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十二-11-炔酸第三丁酯	10-[4-[2-(4-胺磺醯基-苯氧基)乙基]苯基]十-9-炔酸第三丁酯

	
8-[4-[(4-胺磺酰基苯氧基)甲基]苯基]辛-7-炔酸第三丁酯	14[4-(4-胺磺酰基苯氧基)苯基]十四-13-炔酸第三丁酯
	
10-[4-[(4-胺磺酰基苯基)甲氧基]苯基]十-9-炔酸第三丁酯	16-(4-胺磺酰基苯基)十六-15-炔酸第三丁酯
	
12-(3-胺磺酰基苯基)十二-11-炔酸第三丁酯	10-[2-氟-5-(4-胺磺酰基苯氧基)苯基]癸-9-炔酸第三丁酯
	
8-[4-[2-[4-(胺磺酰基苯氧基)乙基]苯基]苯基]辛-7-炔酸第三丁酯	14-[4-[(4-胺磺酰基苯基)甲氧基]苯基]十四-13-炔酸第三丁酯
	
12-[2-氟-5-(4-胺磺酰基苯氧基)苯基]十二-11-炔酸第三丁酯	12-(4-胺磺酰基苯基)十二-11-炔酸第三丁酯
	
14-[2-氟-5-(4-胺磺酰基苯氧基)苯基]十四-13-炔酸第三丁酯	18-(3-胺磺酰基苯基)十八-17-炔酸第三丁酯
	

16-[2-氟-5-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十六-15-炔酸第三丁酯	8-[2-氟-5-(4-胺磺醯基-苯氧基)苯基]辛-7-炔酸第三丁酯
	
10-(4-胺磺醯基苯基)癸-9-炔酸第三丁酯	

2.8.3 合成14-(4-胺磺醯基苯基)十四酸第三丁酯

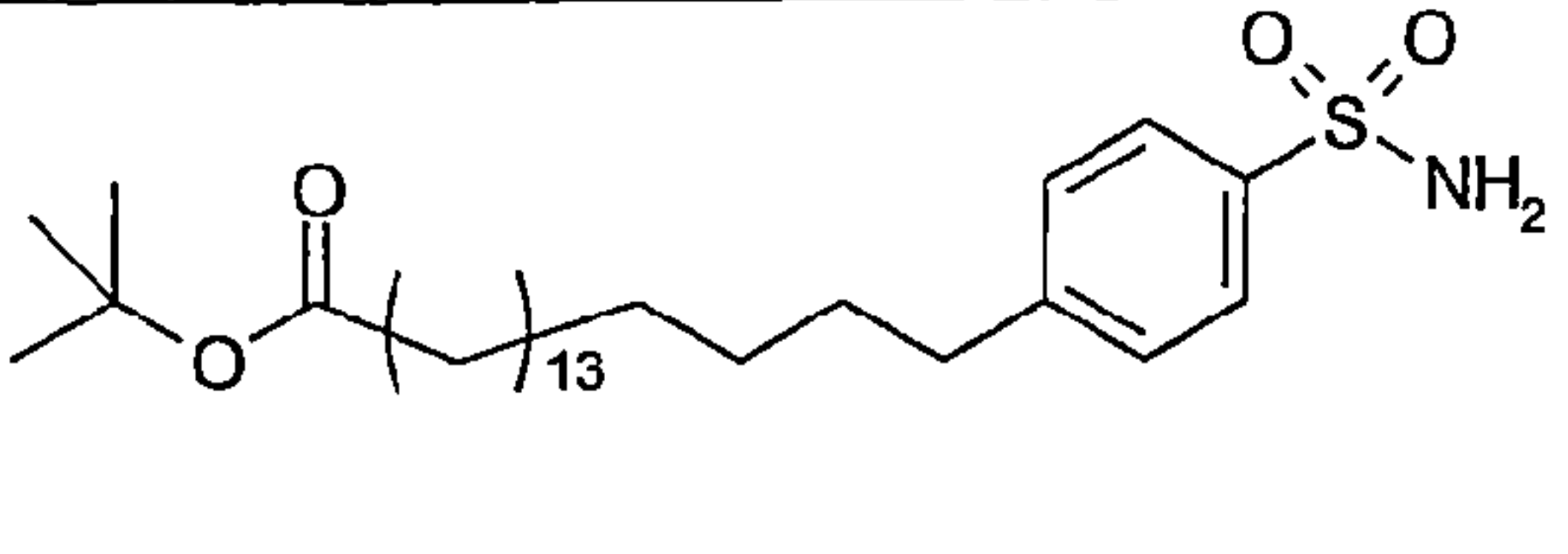
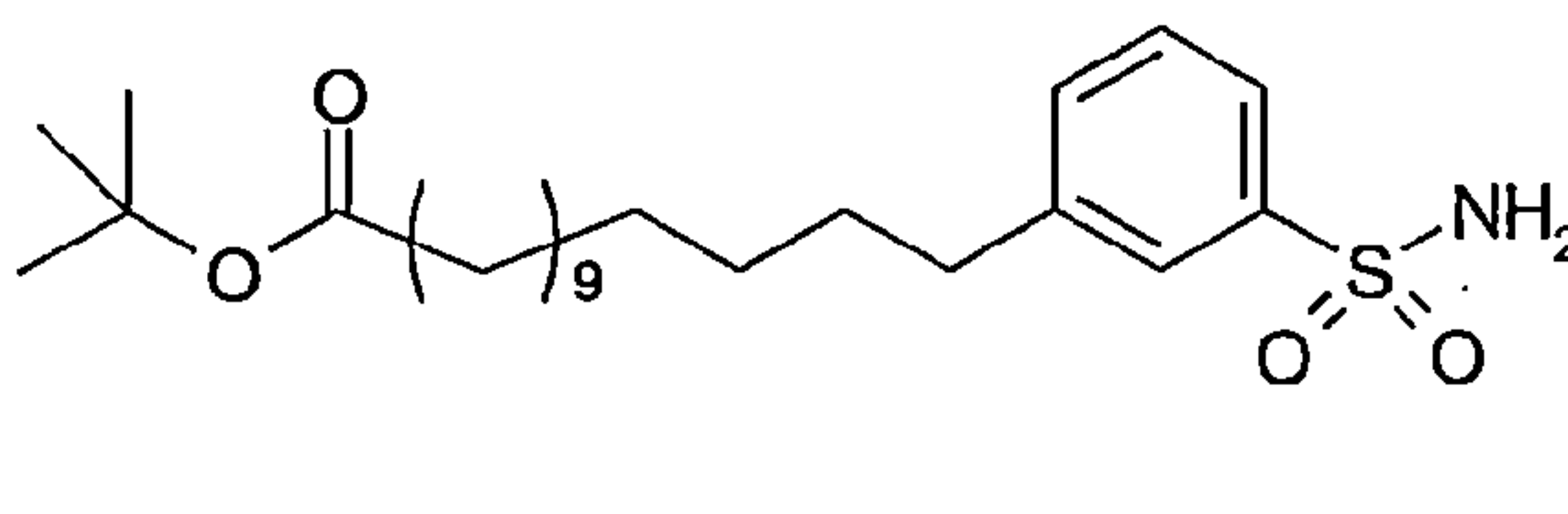
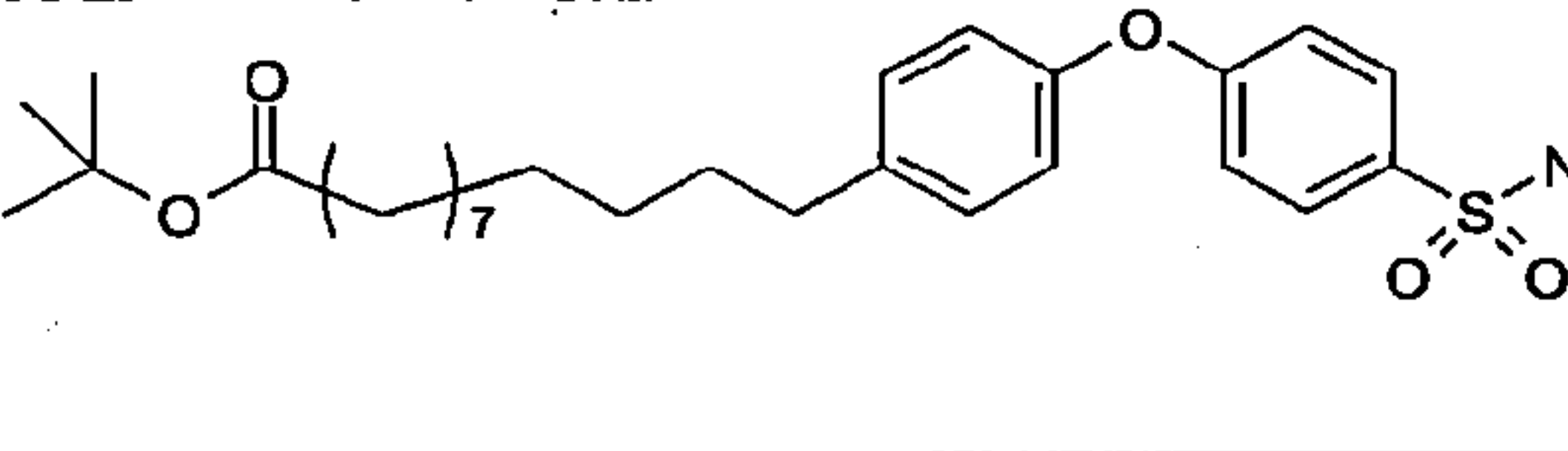
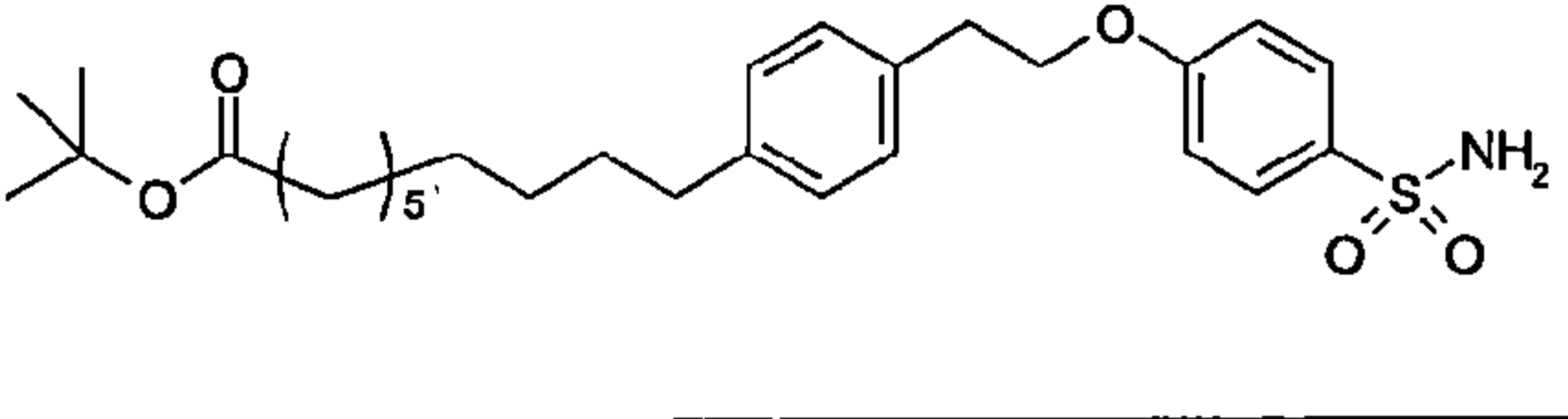
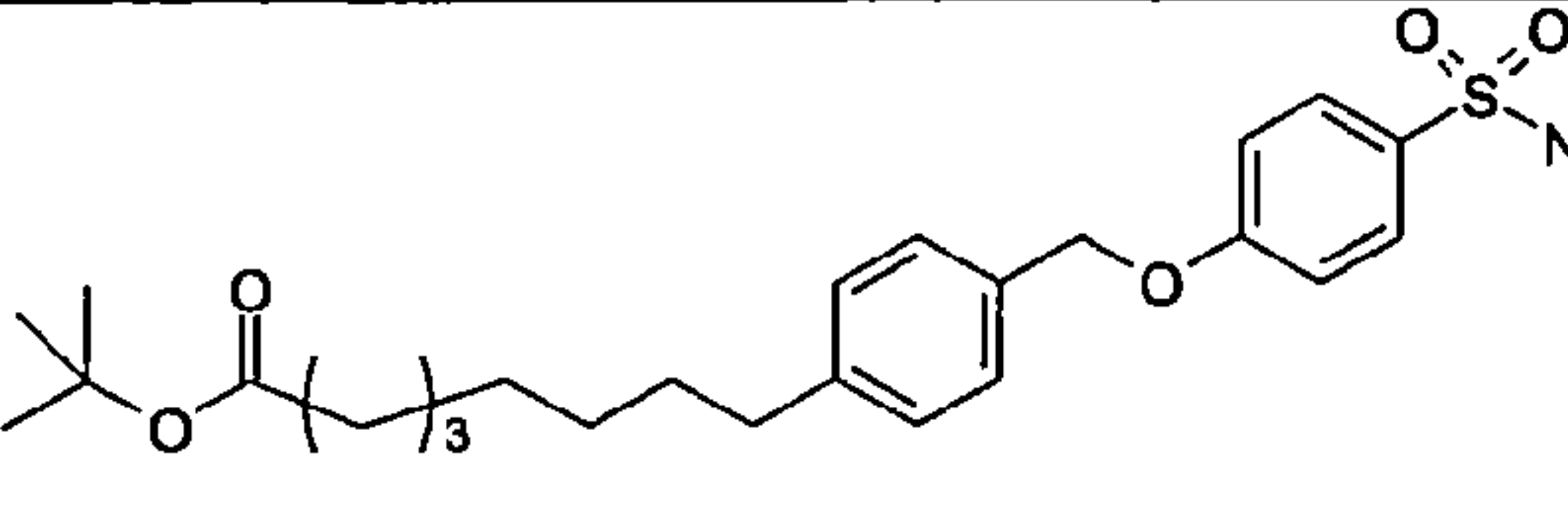
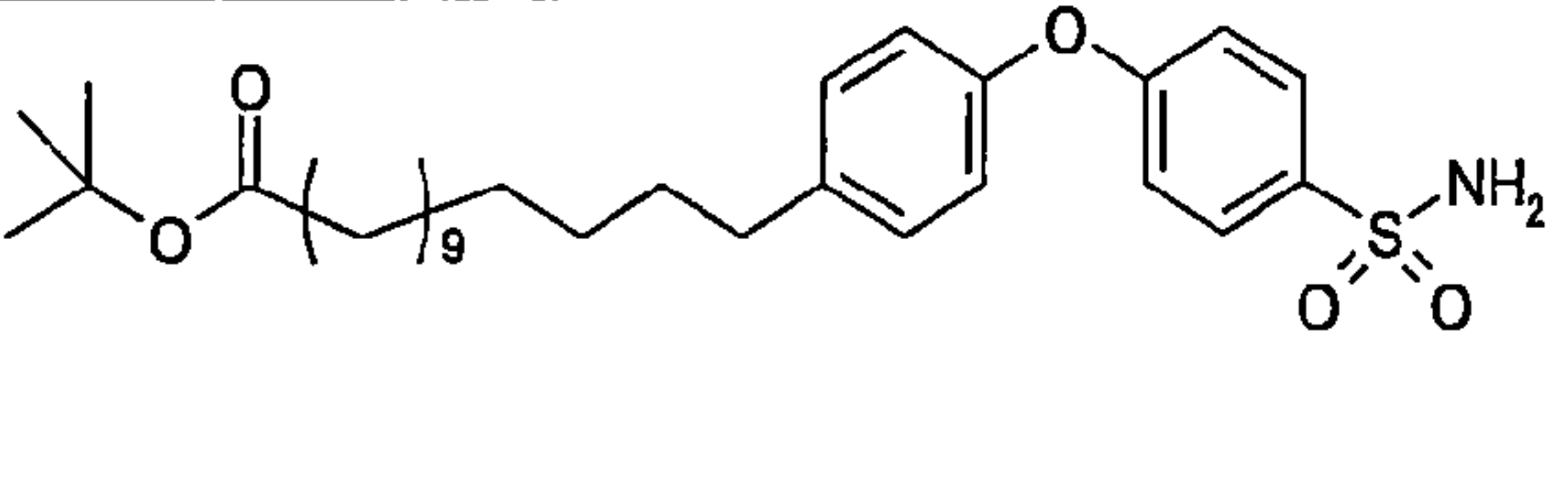
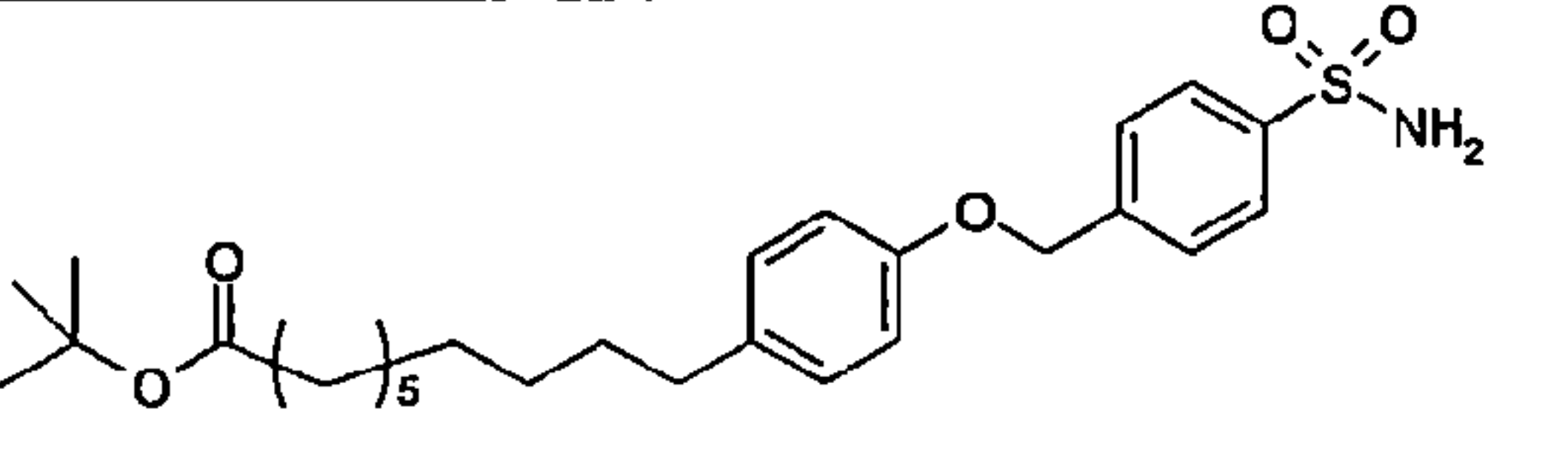
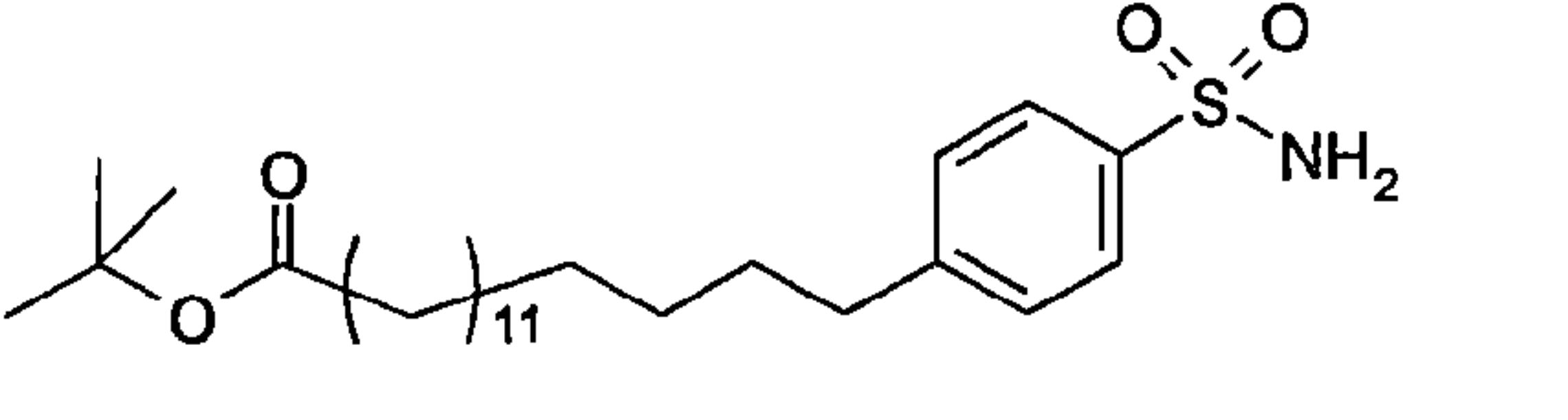
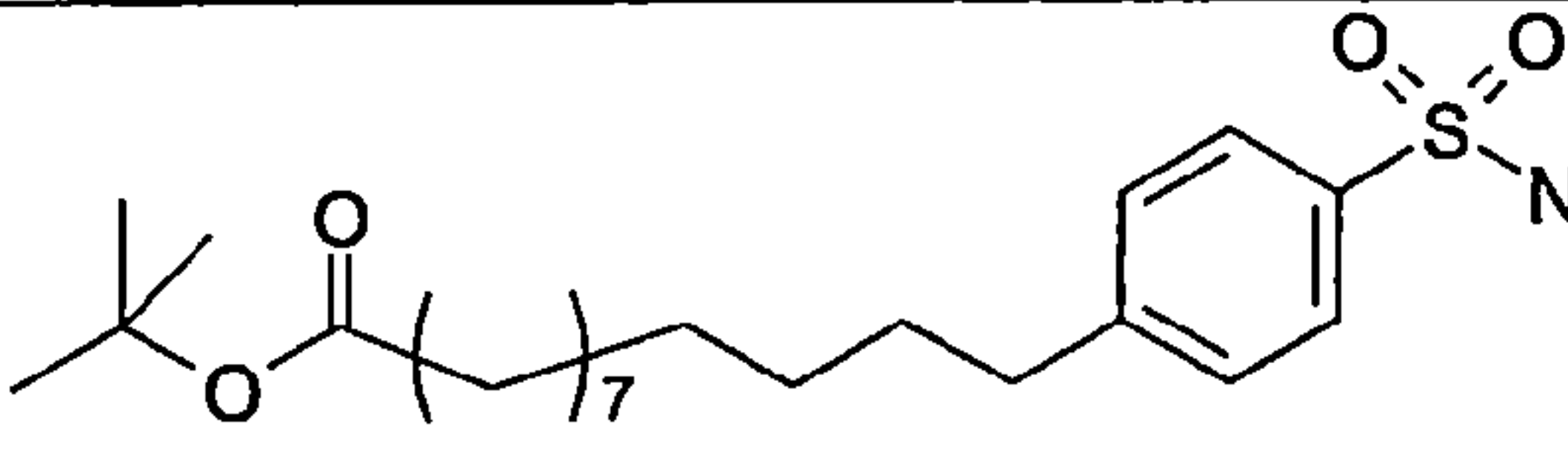
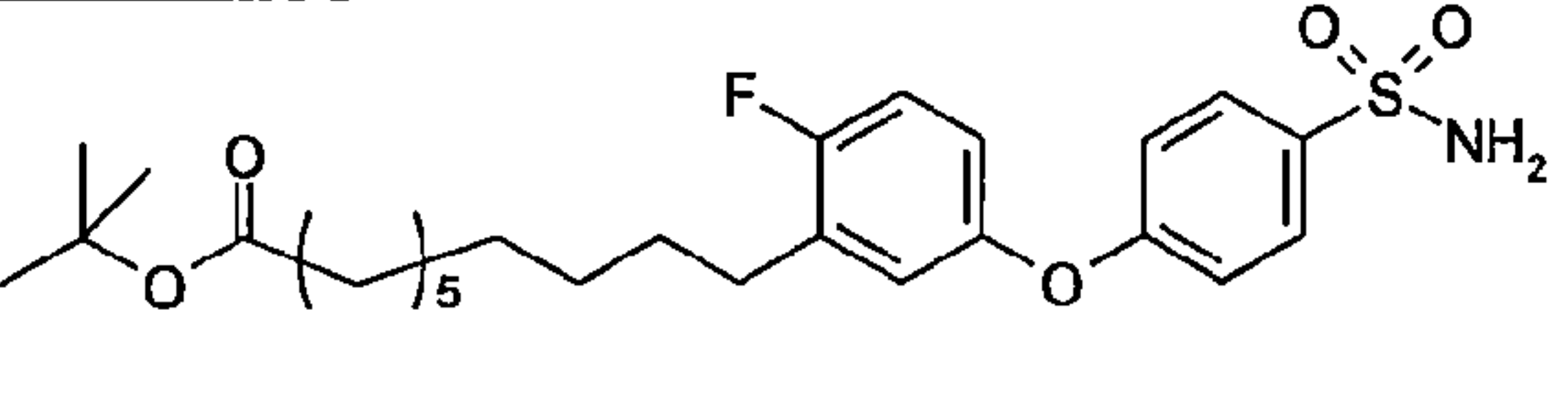
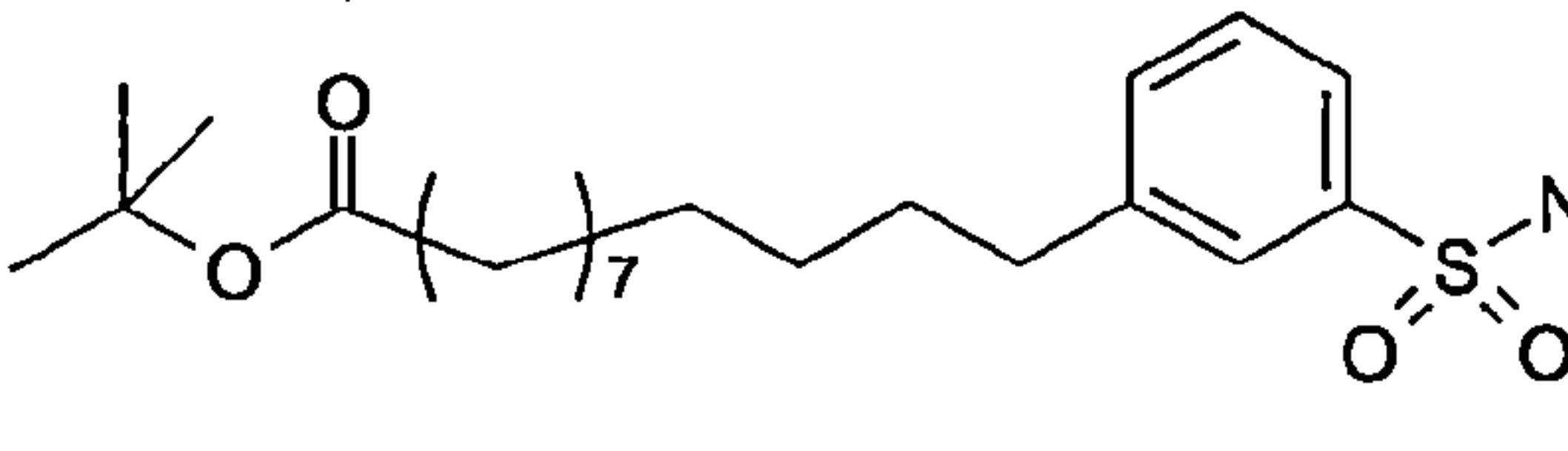
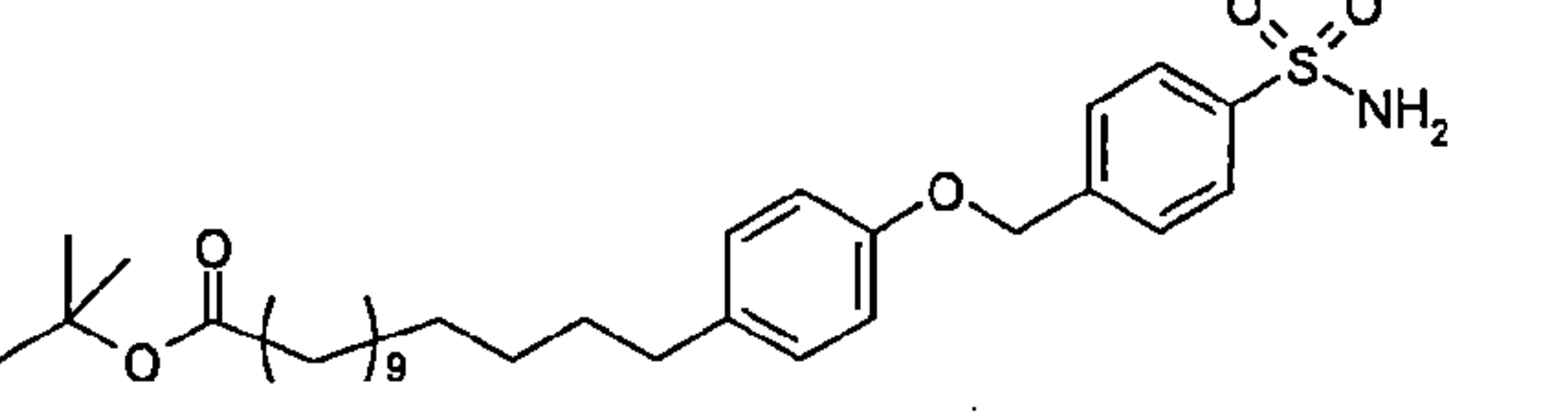
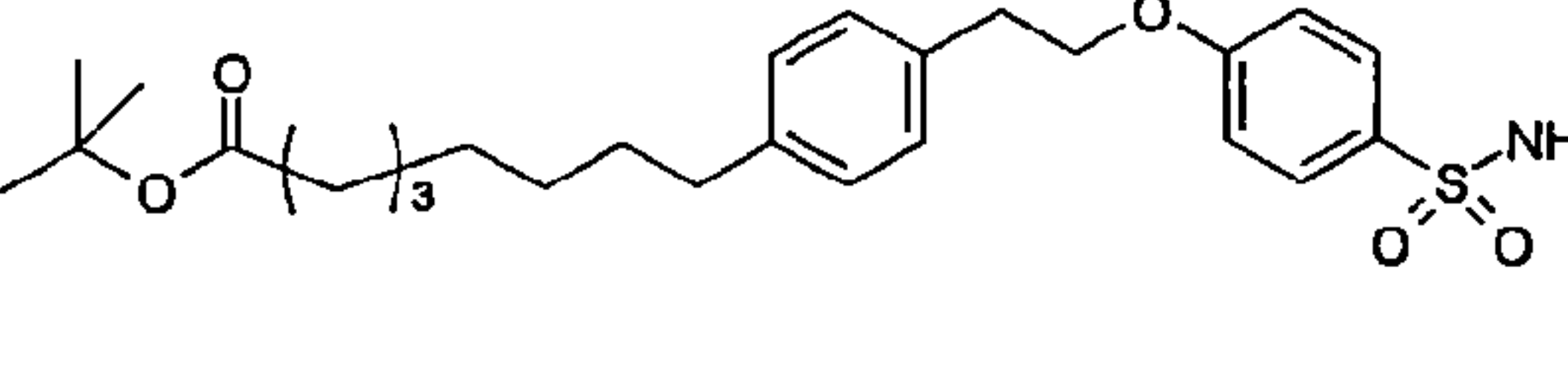
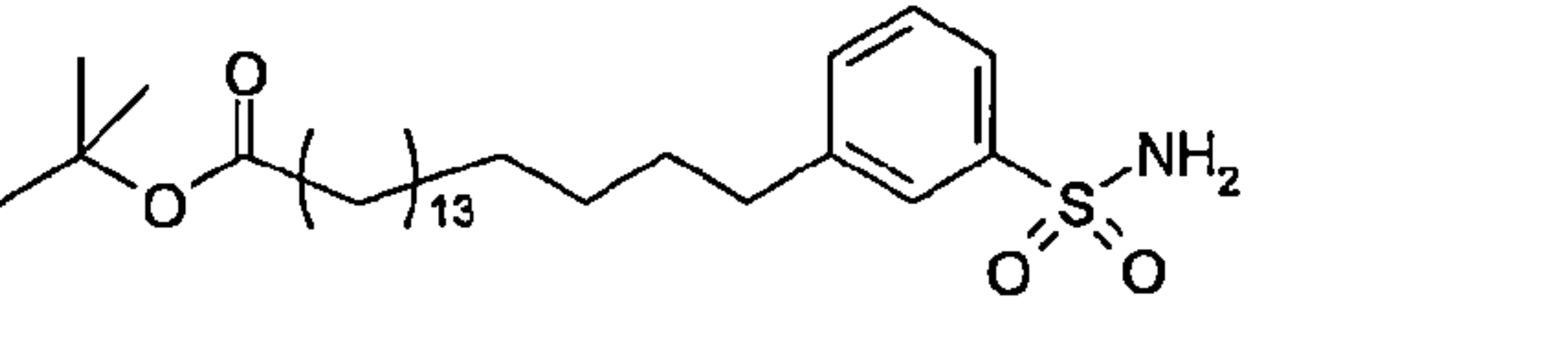


【0361】 將PtO₂ (0.23 g，1.01 mmol)添加到14-(4-胺磺醯基苯基)十四-13-炔酸第三丁酯(2.2 g，5.05 mmol)在THF (30 ml)中的混合物。將燒瓶抽真空並回填H₂。然後將混合物在室溫下攪拌過夜。過濾，在真空下濃縮，得到呈灰色固體狀的14-(4-胺磺醯基苯基)十四酸酯(2 g，4.55 mmol，產率：90%)。

【0362】 LC-質譜法：移動相：A = 10 mM TFA/H₂O，B = MeCN；梯度：在1.5分鐘內B = 5 % - 95 %；流速：1.8 ml/min；管柱：Xbridge-C₁₈，50 × 4.6mm，3.5 um。LC純度：93% (214 nm)；質量：在2.44分鐘時發現峰462 (M+H)⁺。

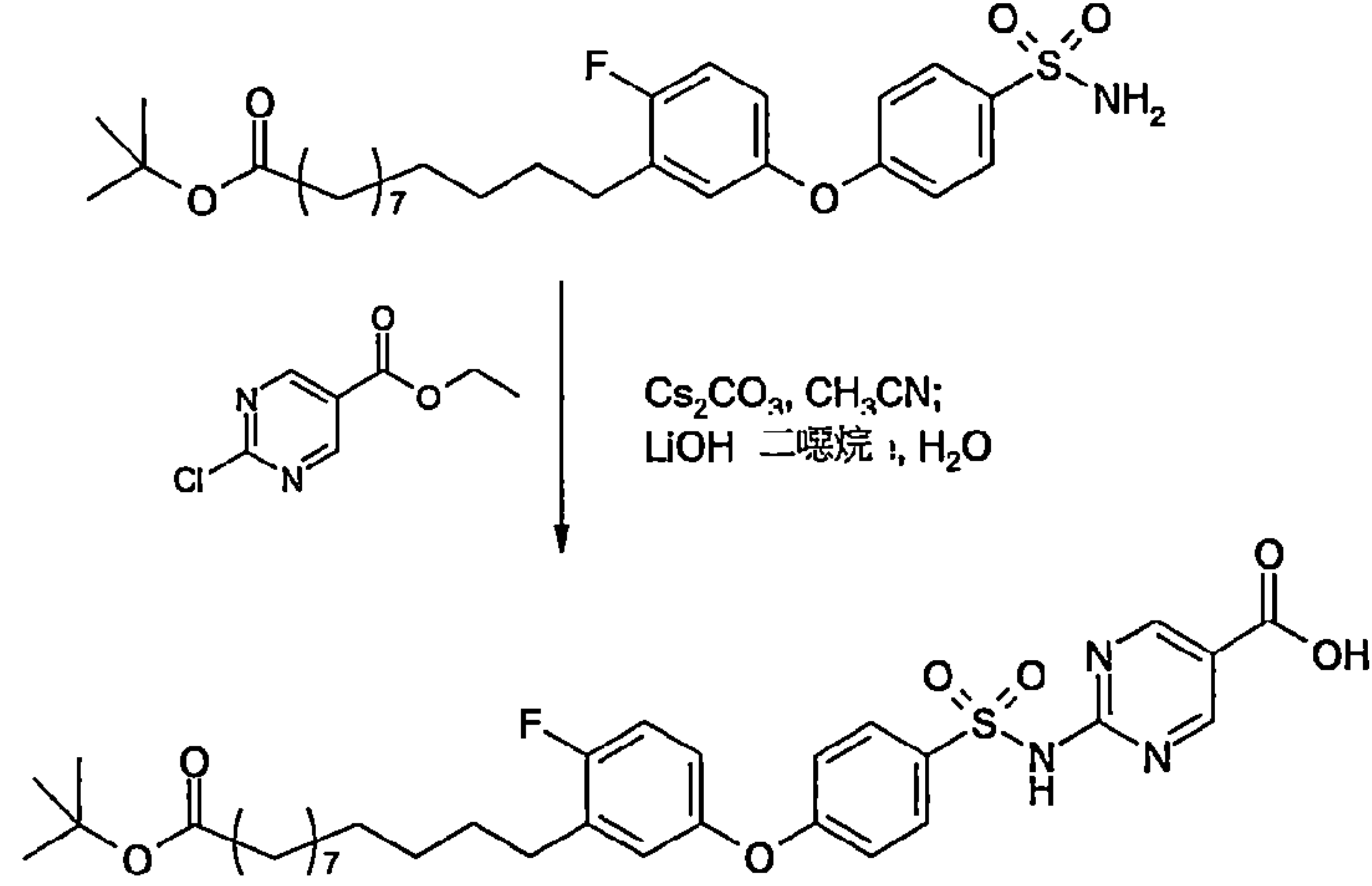
【0363】 ¹HNMR (400 MHz, DMSO) δ 7.72 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.26 (s, 2H), 2.63 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.16 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.57 (s, 2H), 1.51 - 1.43 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.25 (d, J = 14.5 Hz, 18H)。

【0364】 對應合成以下化合物：

	
18-(4-胺磺醯基苯基)十八酸第三丁酯	14-(3-胺磺醯基苯基)十四酸第三丁酯
	
12-[4-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十二酸第三丁酯	10-[4-[2-[4-(胺磺醯基苯氧基)乙基]苯基]癸酸第三丁酯
	
8-[4-(4-胺磺醯基苯氧基)甲基]苯基]辛酸第三丁酯	14-[4-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十四酸第三丁酯
	
10-[4-[(4-胺磺醯基苯基)甲氧基]苯基]癸酸第三丁酯	16-(4-胺磺醯基苯基)十六酸第三丁酯
	
12-(4-胺磺醯基苯基)十二酸第三丁酯	10-[2-氟-5-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]癸酸第三丁酯
	
12-(3-胺磺醯基苯基)十二酸第三丁酯	14-[4-(4-胺磺醯基苯基)甲氧基]苯基]十四酸第三丁酯
	
8-[4-[2-[4-(胺磺醯基苯氧基)乙基]苯基]辛酸第三	18-(3-胺磺醯基苯基)十八酸第三丁酯

丁酯	
12-[2-氟-5-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十二酸第三丁酯	8-[2-氟-5-(4-胺磺醯基-苯氧基)苯基]辛酸第三丁酯
14-[2-氟-5-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十四酸第三丁酯	10-(4-胺磺醯基苯基)癸酸第三丁酯
16-[2-氟-5-(4-胺磺醯基-苯氧基)苯基]十六酸第三丁酯	

2.8.4 合成2-[[4-[3-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸



【0365】 12-[2-氟-5-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十二酸第三丁酯(300 mg ,575 μmol) , 2-氯嘧啶-5-甲酸乙酯(112 mg , 603 μmol)和Cs₂CO₃(656 mg , 2.01 mmol)於MeCN (6 ml)中的混合物加熱至60℃並攪拌歷時3h(TLC控制)。反應混合物無需進一步純化即可用於下一個皂化步驟。

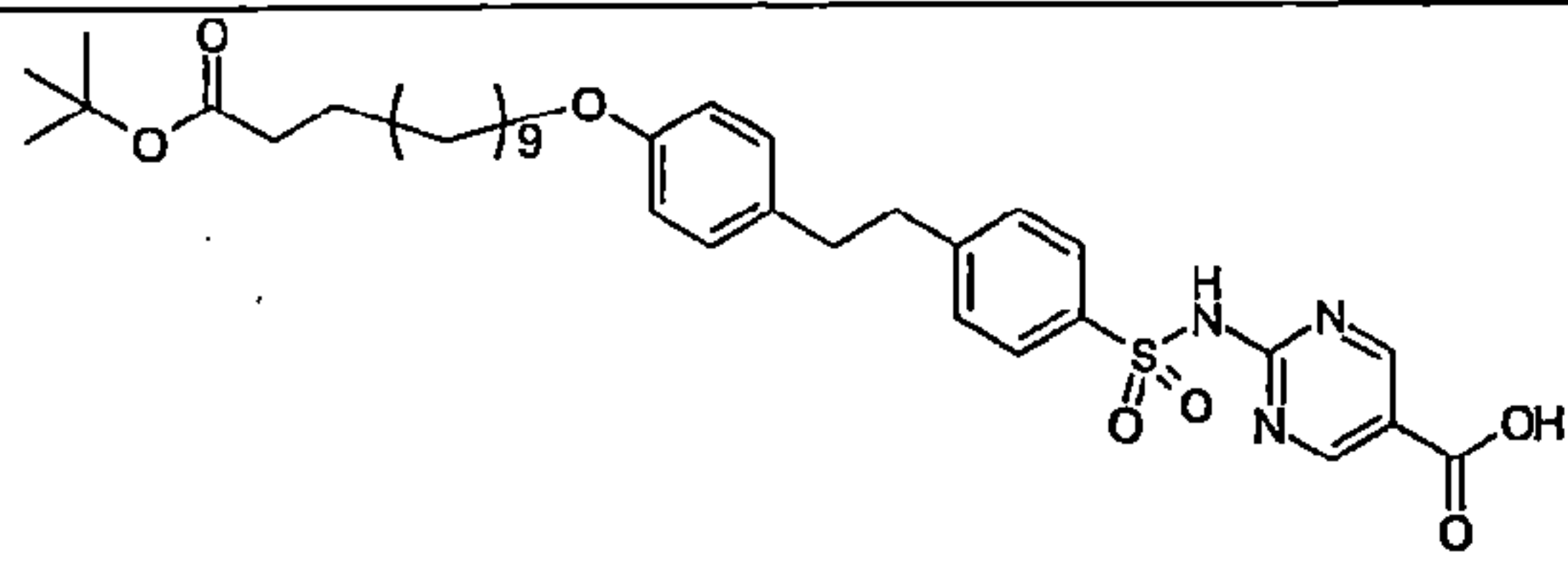
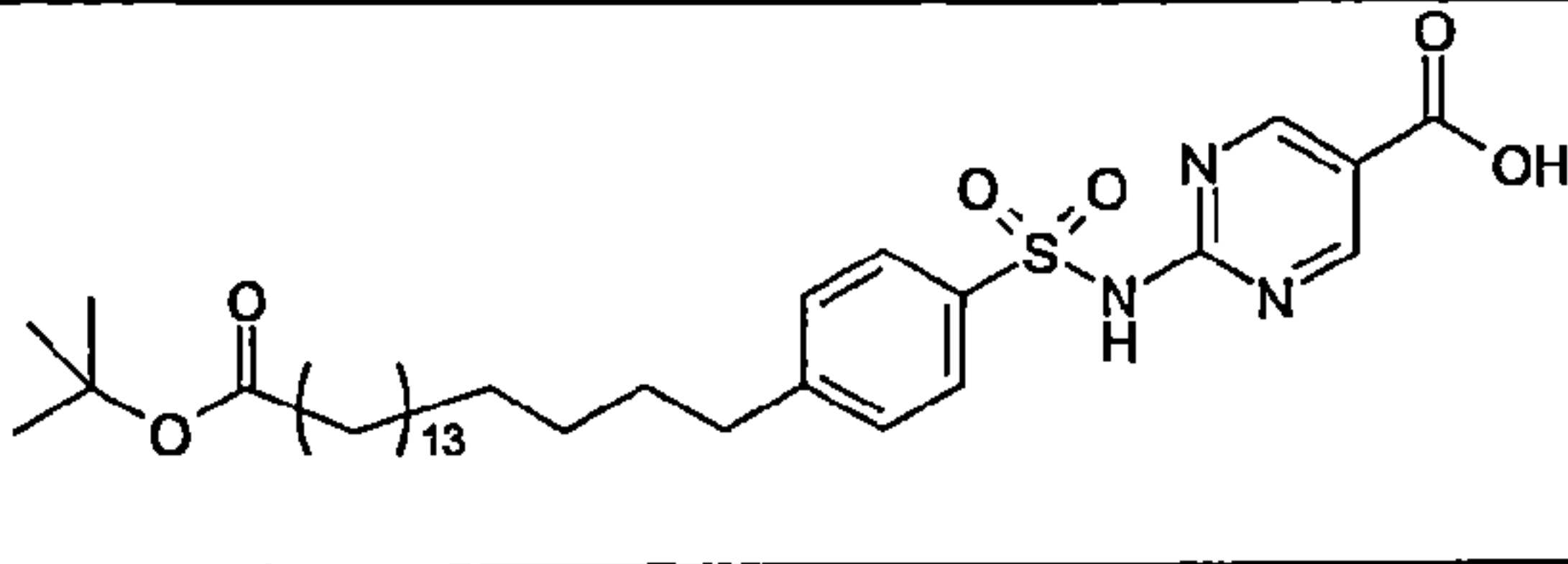
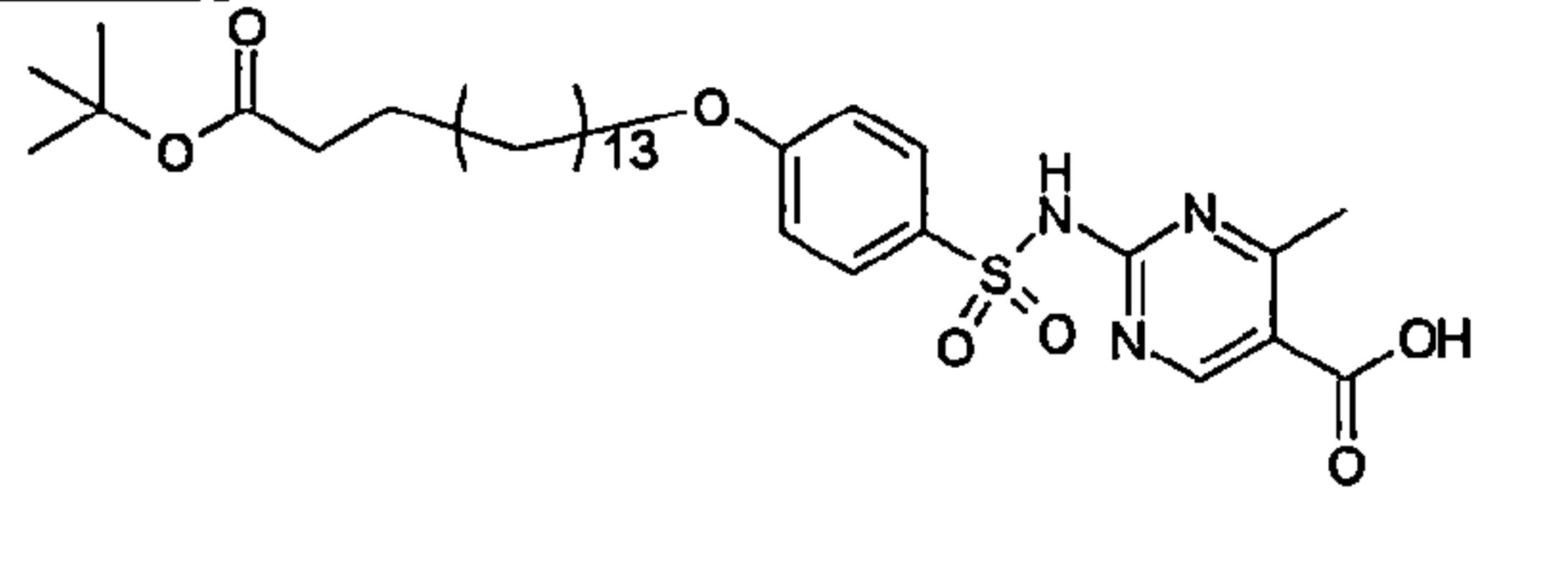
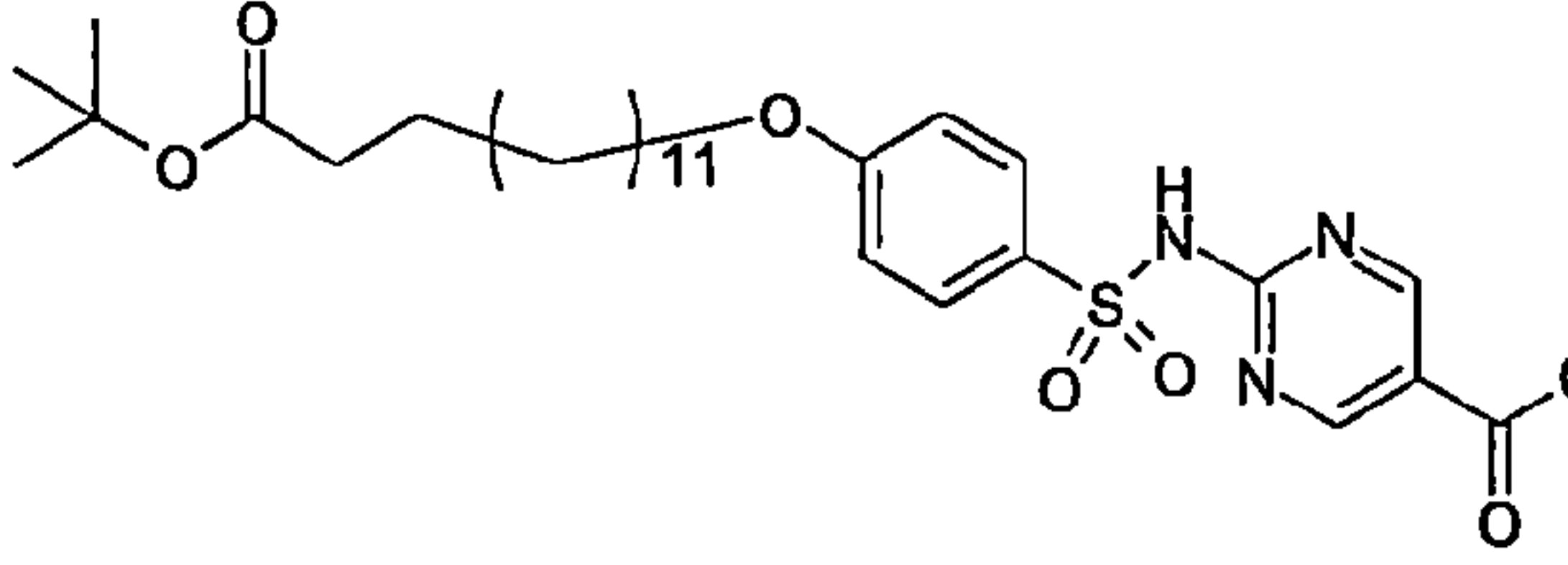
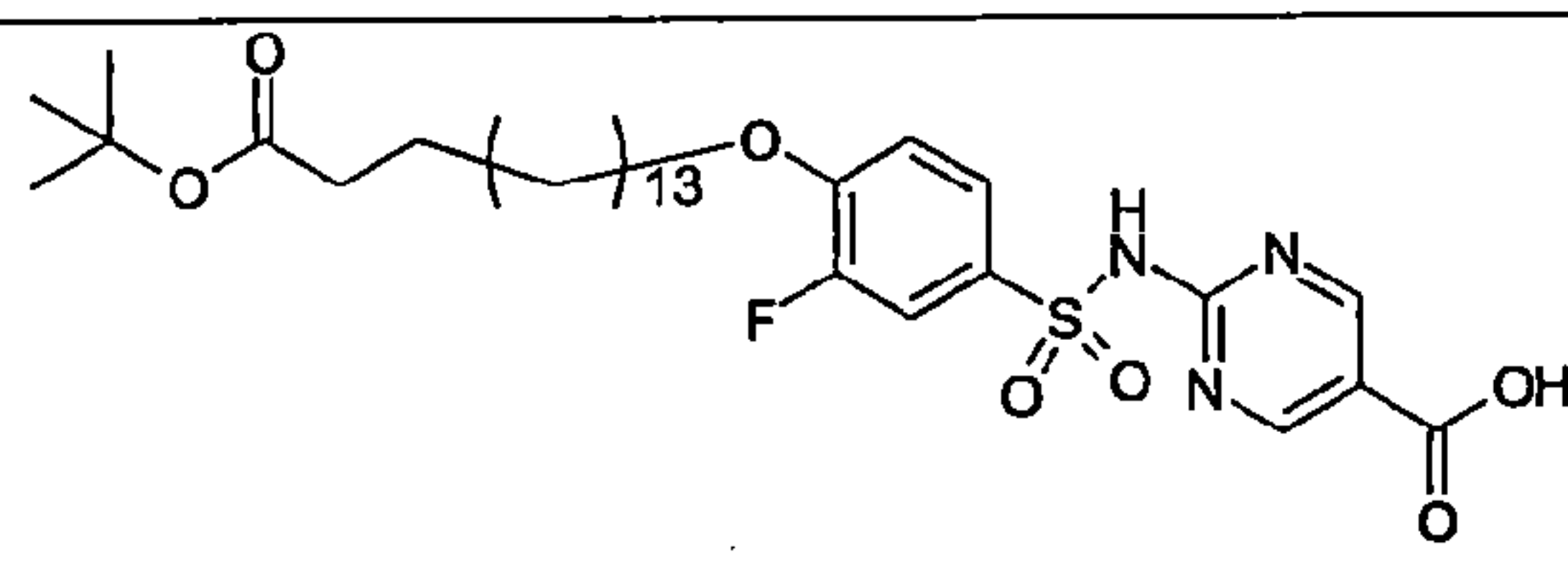
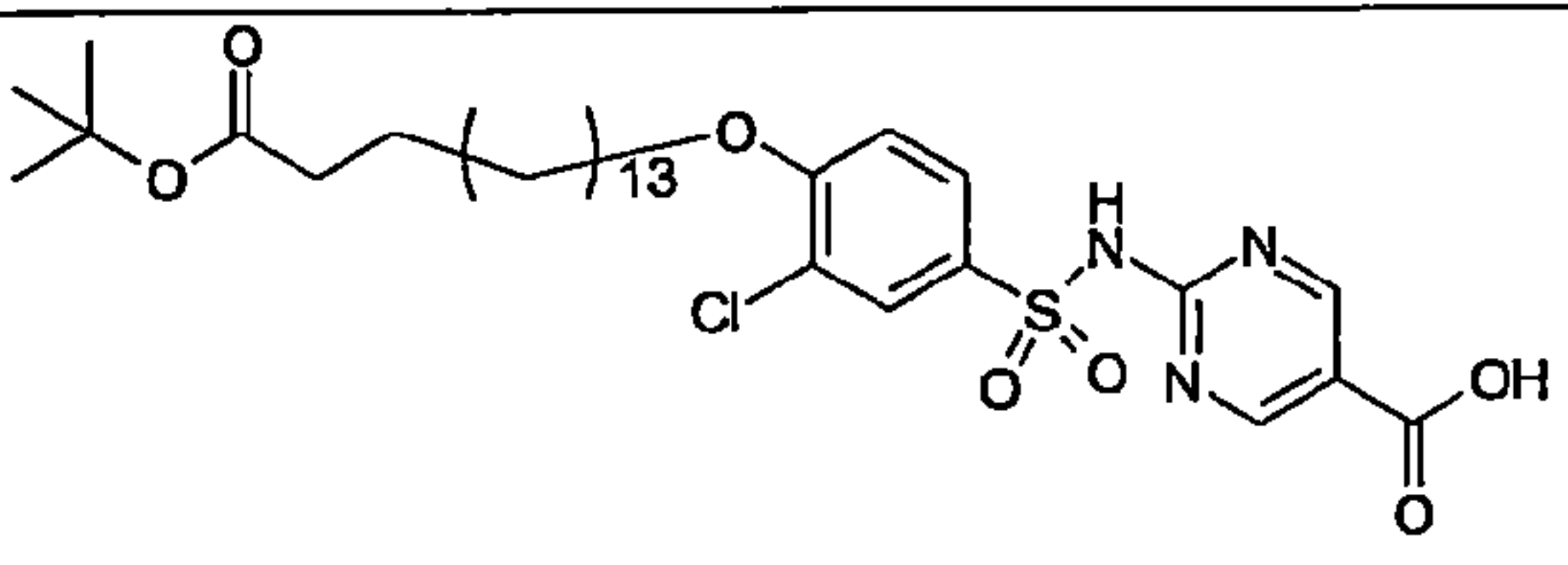
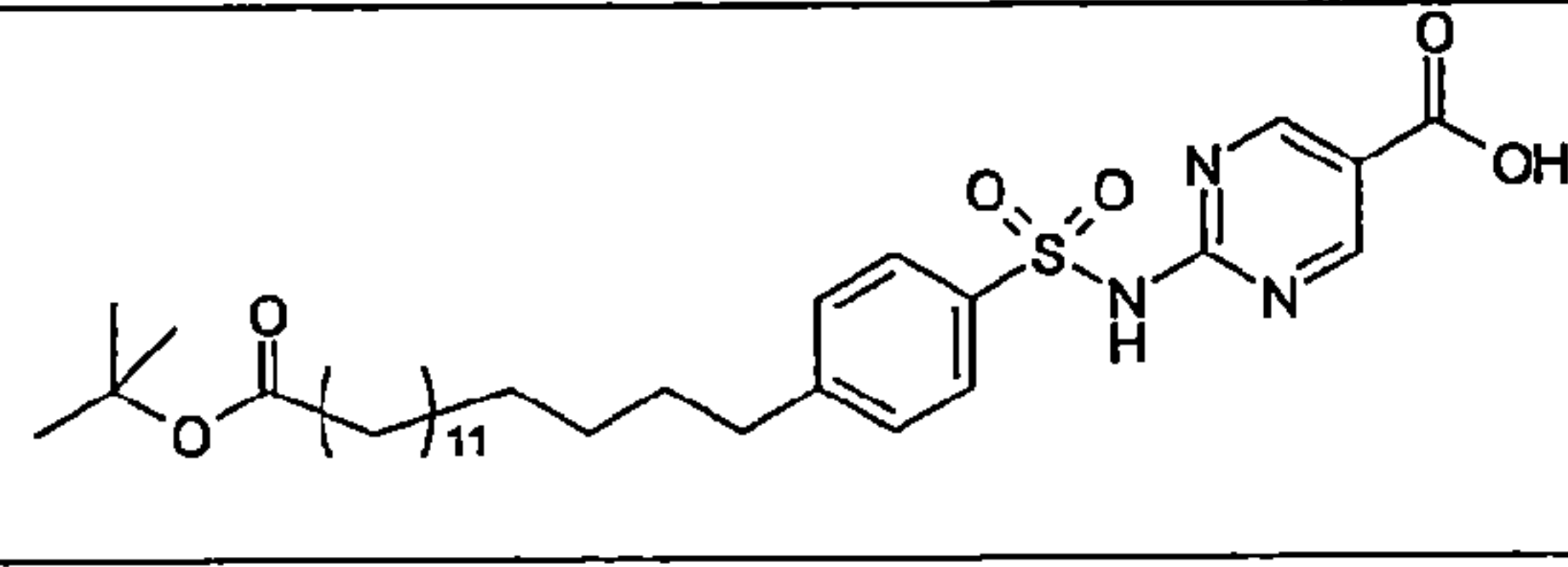
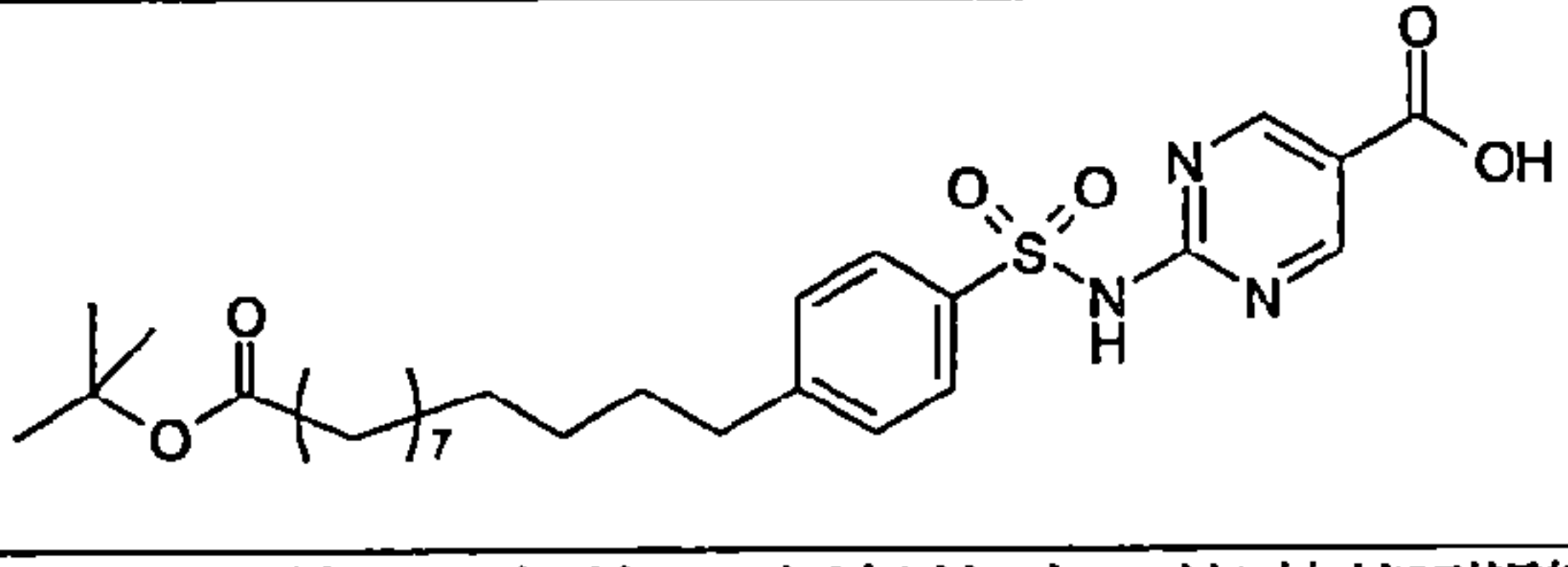
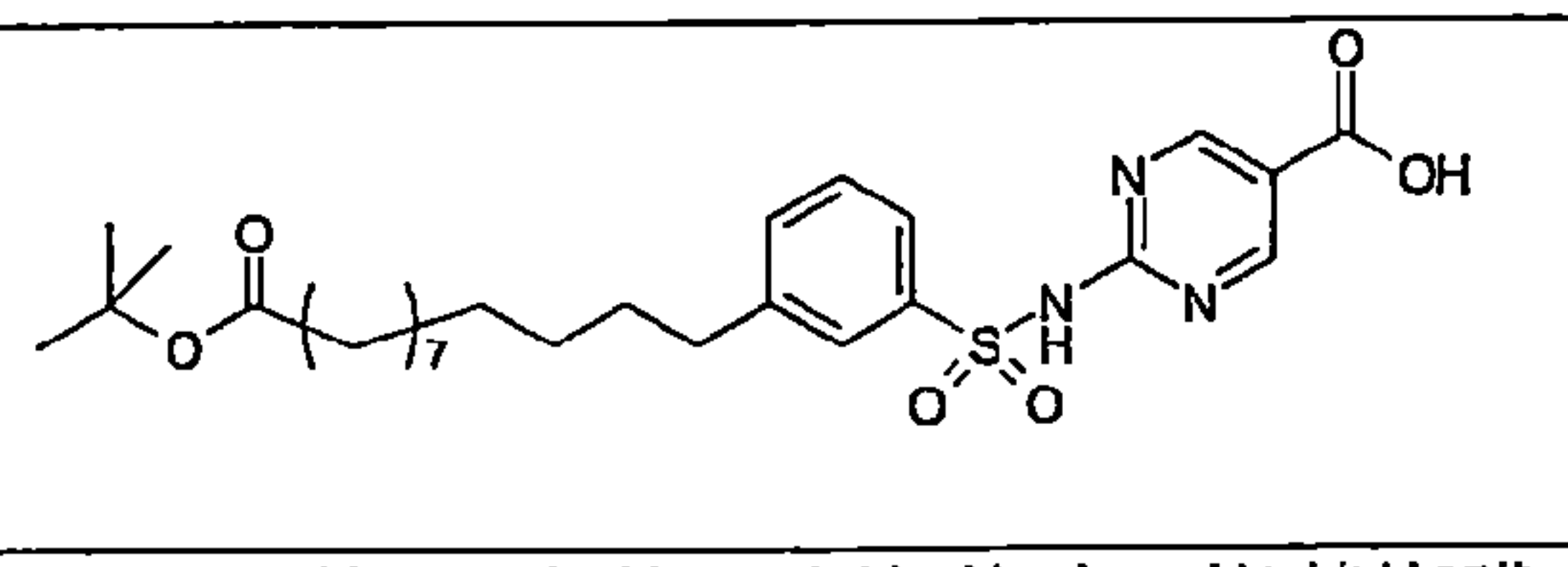
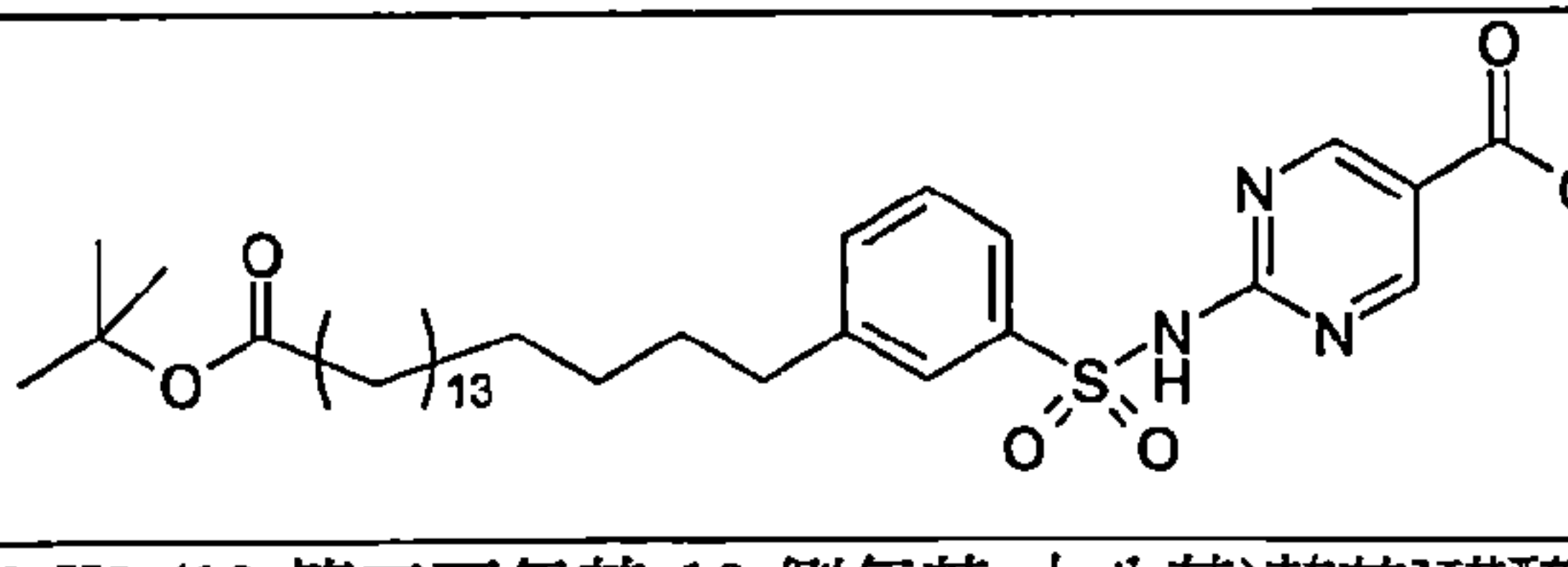
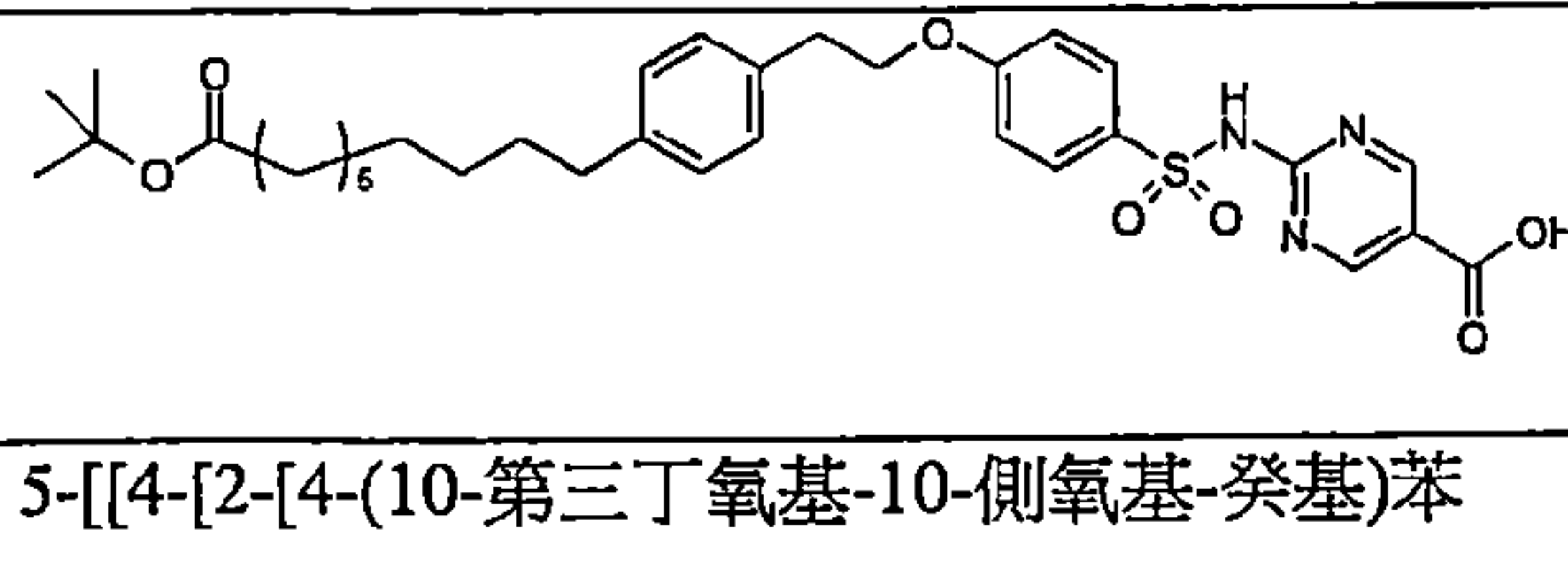
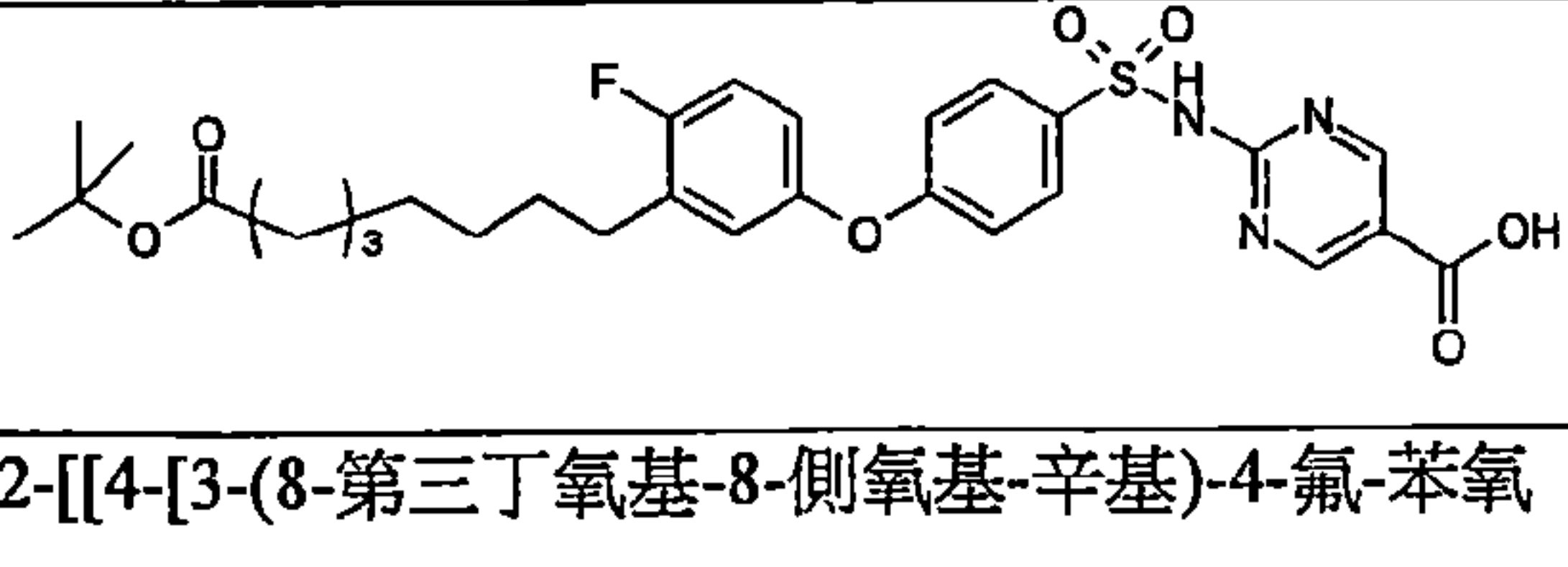
【0366】 將該懸浮液用二噁烷(6 ml)稀釋，並加入LiOH (37 mg，1.56 mmol) 於水(6 ml)中的溶液。將混合物在室溫下攪拌歷時16h，並加入額外的LiOH (37 mg，1.56 mmol)。總體上，將混合物在室溫下攪拌歷時36h。將懸浮液傾倒在檸檬酸水溶液(10%，50 ml)上。過濾懸浮液，且用水洗滌濾餅並在真空下乾燥。獲得呈白色固體狀的標題化合物2-[[4-[3-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸(350 mg，quan.)。

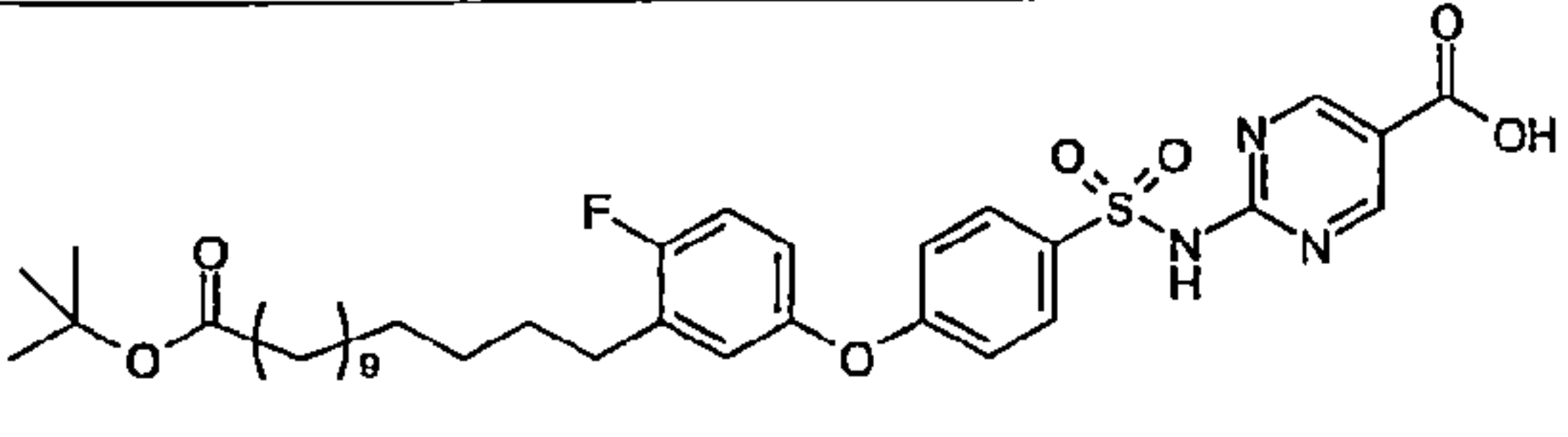
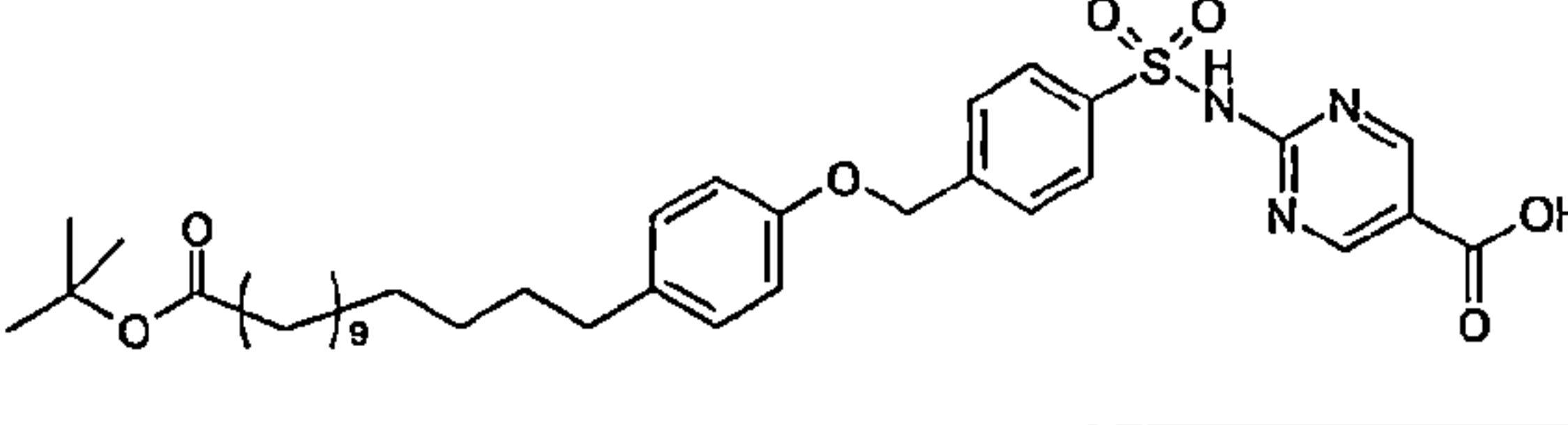
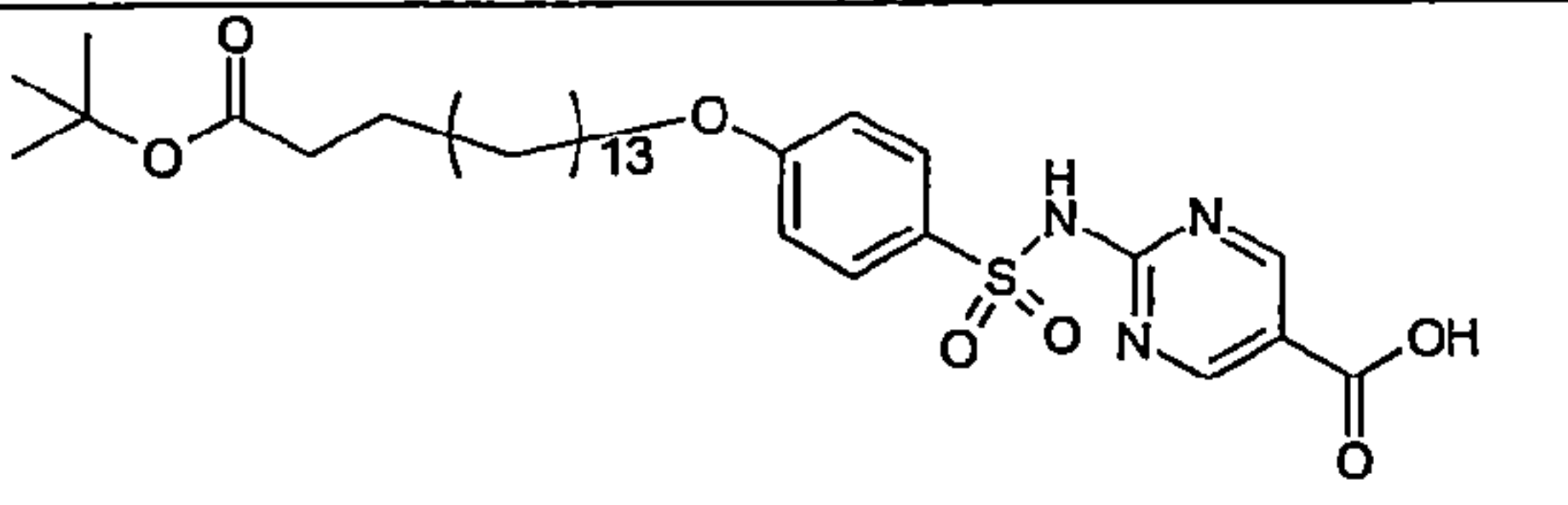
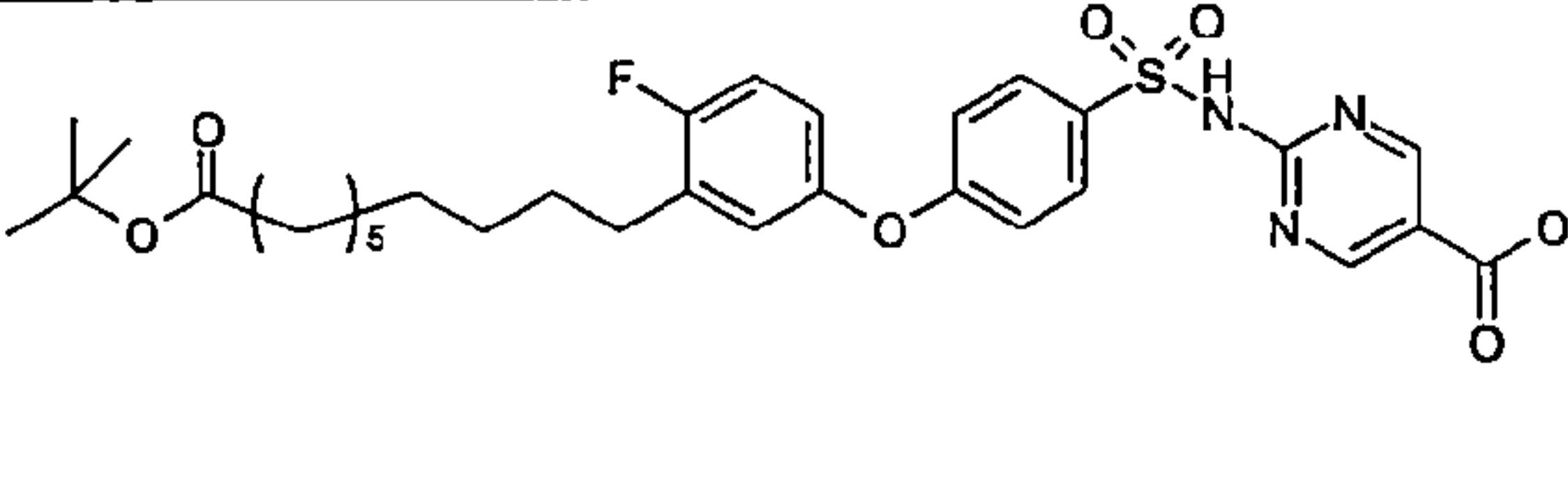
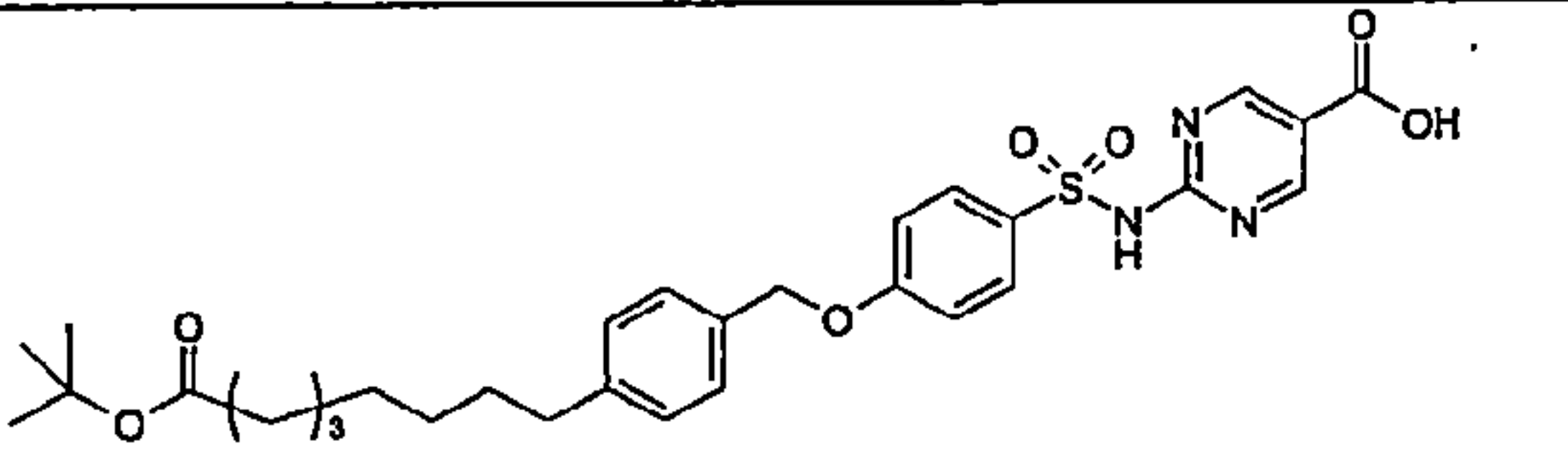
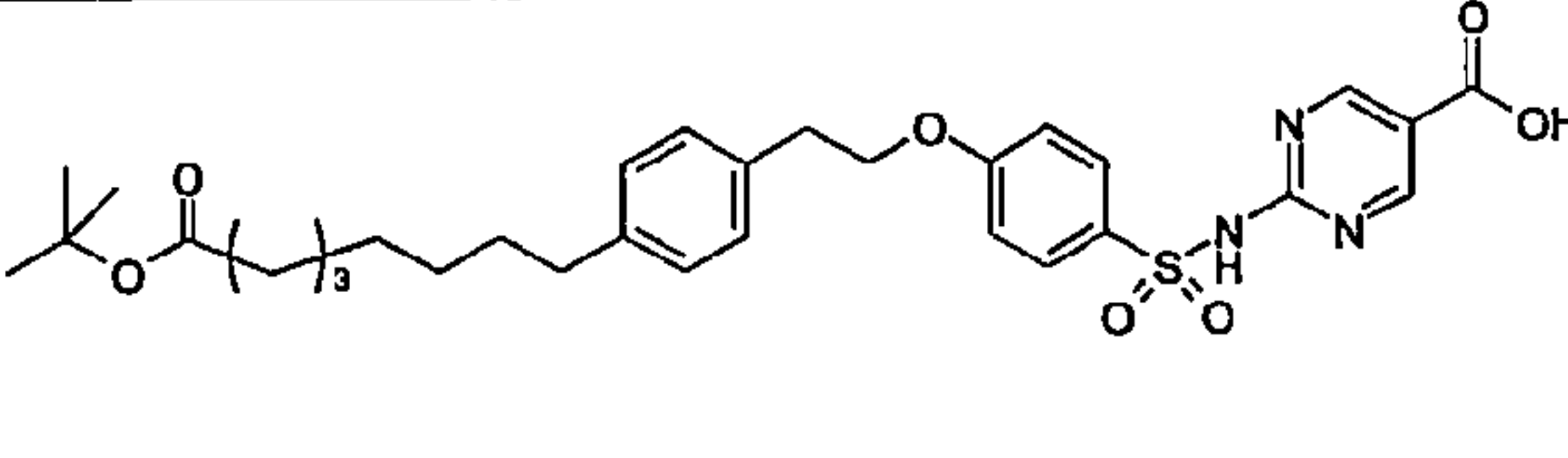
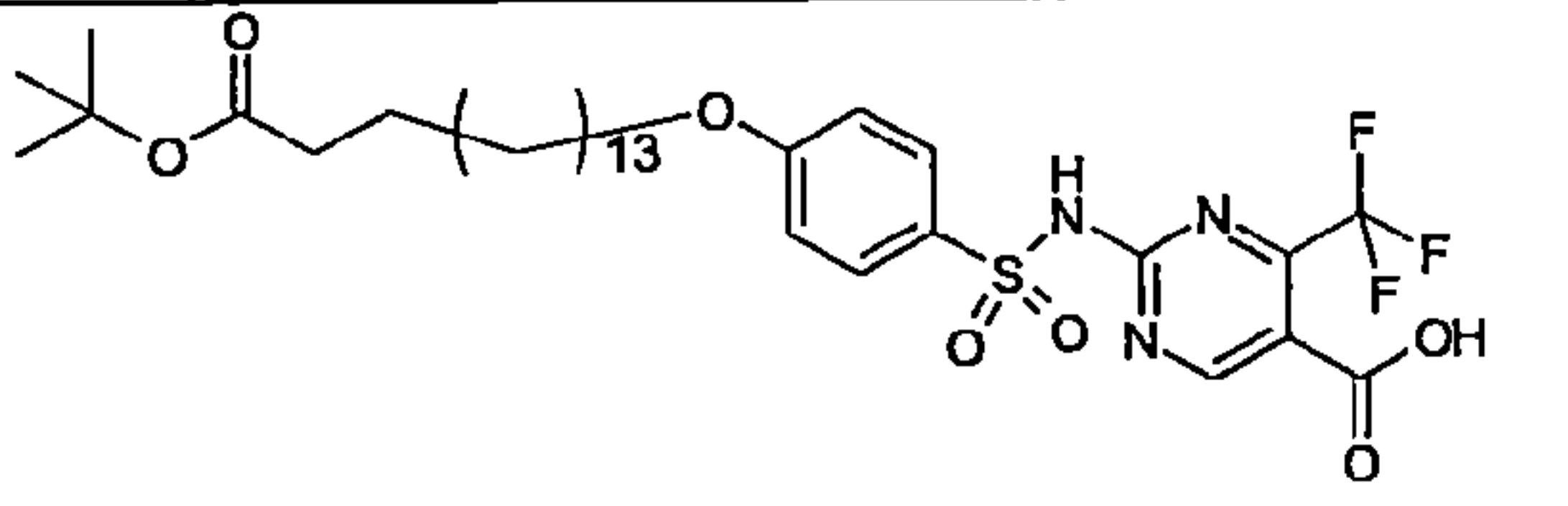
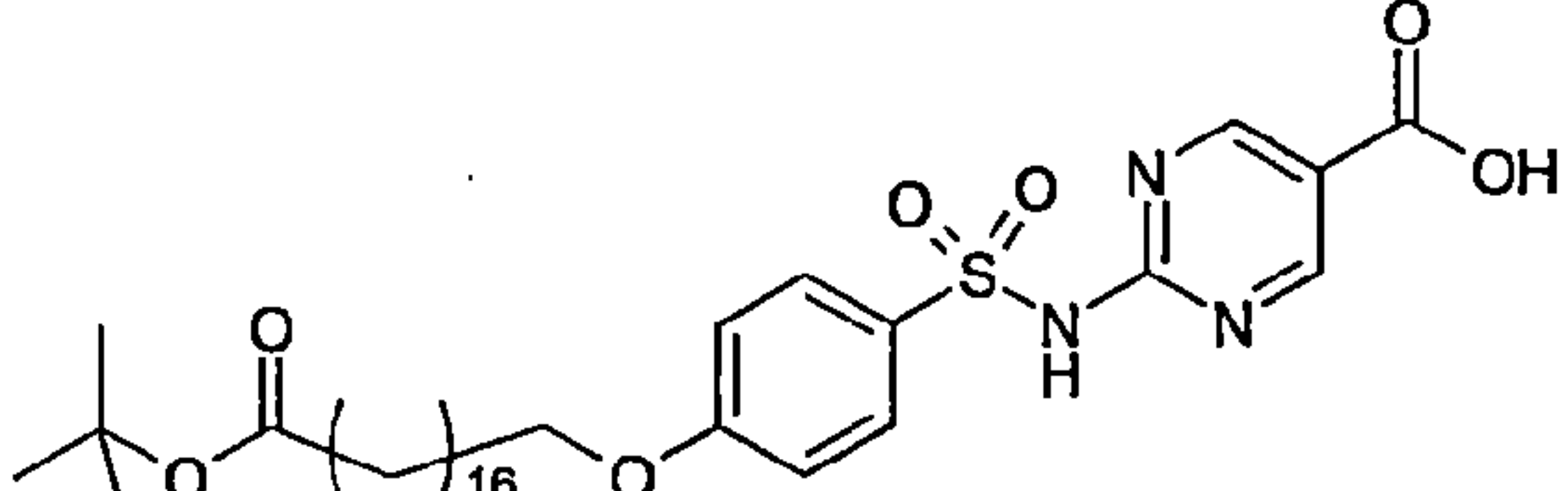
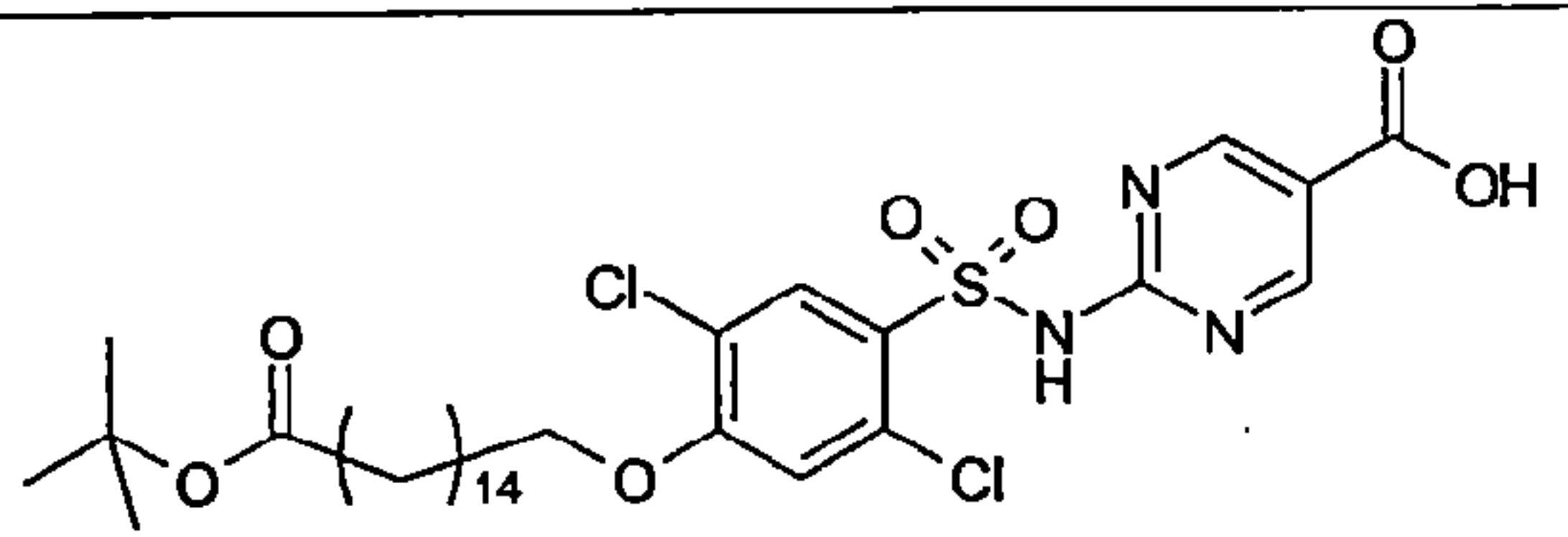
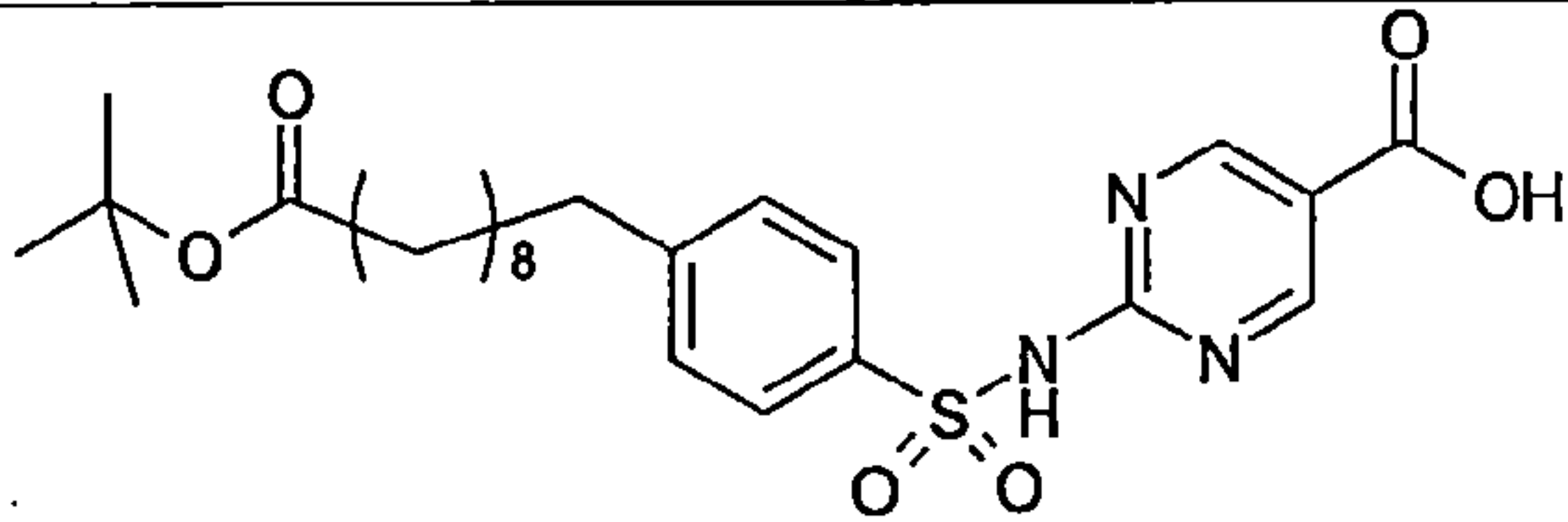
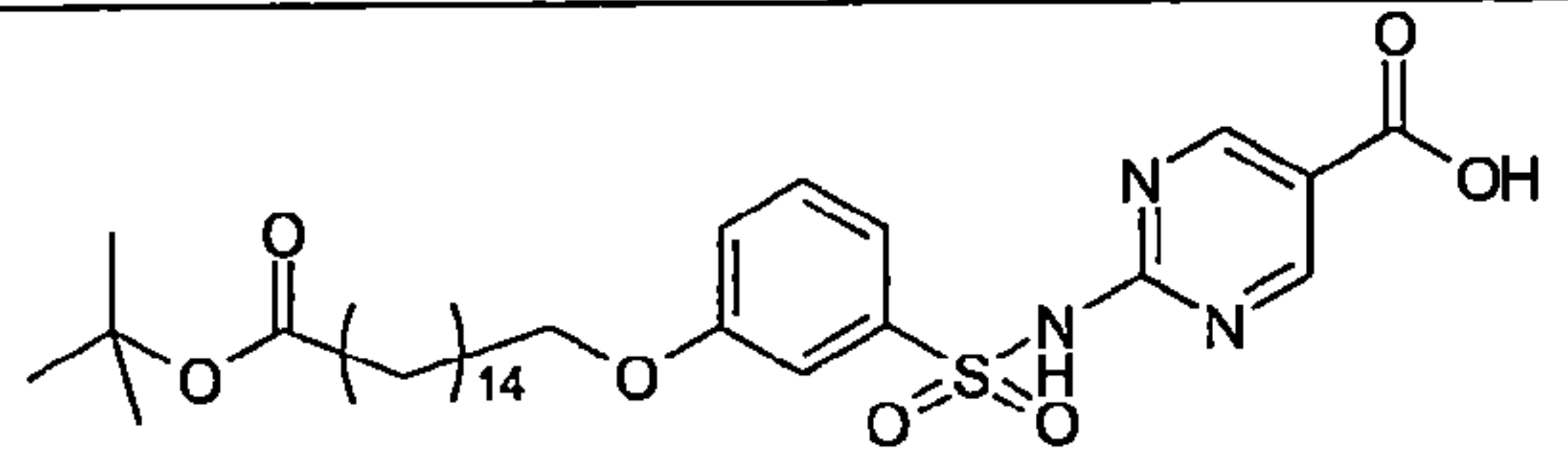
【0367】 ¹H NMR (400.23 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 12.2 (bs, 2 H), 8.89 (s, 2 H), 7.99 (d, J=8.93 Hz, 2 H), 7.21 (t, J=9.17 Hz, 1 H), 7.05 (m, 4 H), 2.58 (br t, J= 7.46 Hz, 2 H), 2.15 (t, J= 7.27 Hz, 2 H), 1.53 (m, 2 H), 1.47 (m, 2 H), 1.38 (s, 9 H), 1.26-1.22 (m, 14 H)。

【0368】 如果所需產物傾倒至檸檬酸水溶液上時沒有沉澱，則將水層用乙酸乙酯萃取，將合併的有機層用Na₂SO₄乾燥，過濾並且在真空中濃縮。將粗產物進行管柱層析，使用MeOH/CH₂Cl₂作為溶析液。

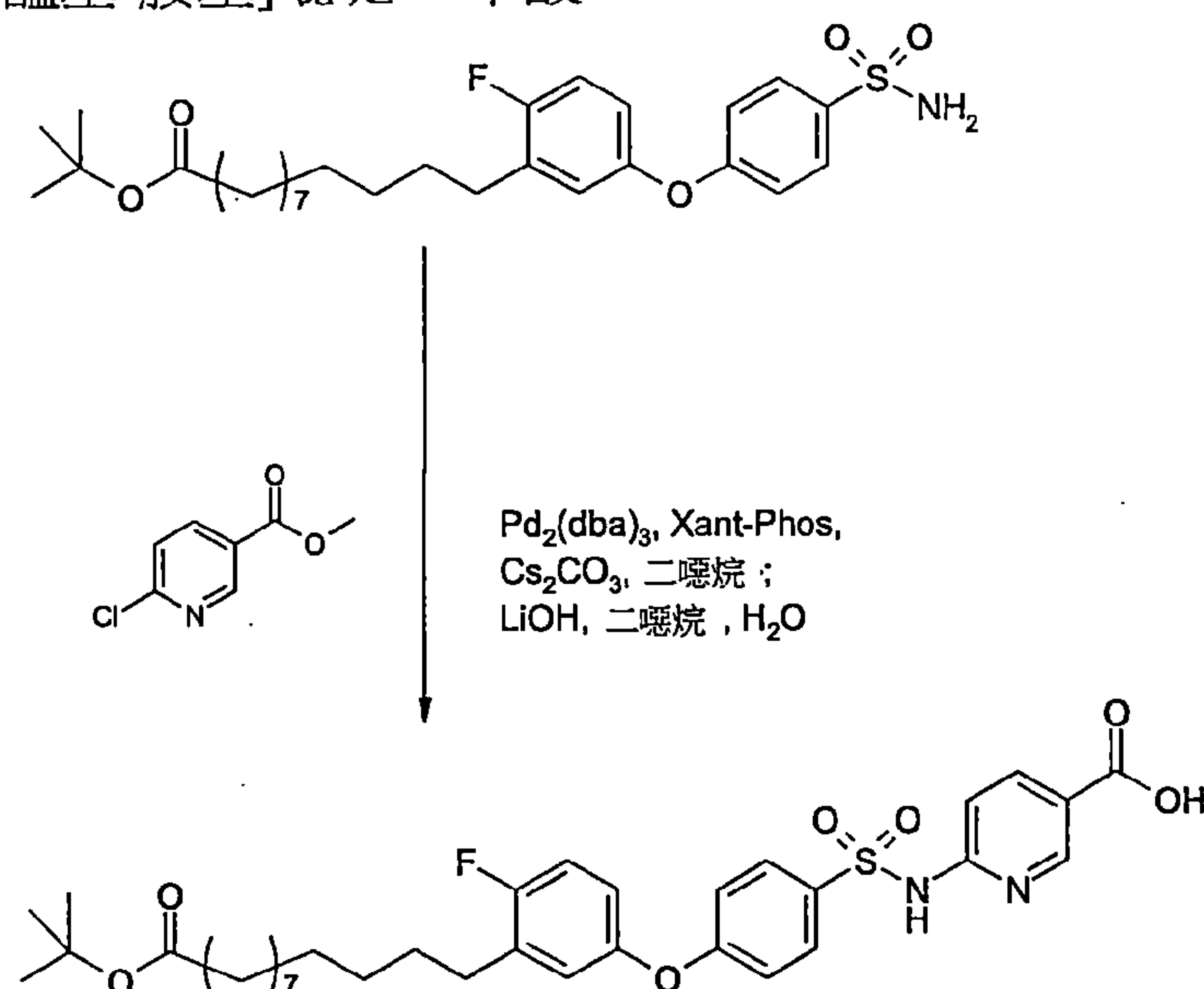
【0369】 對應合成以下化合物：

5-[[4-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	5-[[4-[[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯氧基]甲氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸
5-[[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	5-[[4-[[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸

5-[[4-[3-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	5-[[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸
	
5-[[4-[2-[4-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二烷氧基)苯基]乙基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	5-[[4-(18-第三丁氧基-18-側氧基-十八基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸
	
2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]-4-甲基-嘧啶-5-甲酸	5-[[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸
	
2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)-3-氟-苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸	2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)-3-氯-苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸	2-[[4-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
2-[[3-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸	2-[[3-(18-第三丁氧基-18-側氧基-十八基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
5-[[4-[2-[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯基]乙氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	2-[[4-[3-(8-第三丁氧基-8-側氧基-辛基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸

	
5-[[4-[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	2-[[4-[[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]甲基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
5-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	2-[[4-[3-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
5-[[4-[[4-(8-第三丁氧基-8-側氧基-辛基)苯基]甲氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸	2-[[4-[2-[4-(8-第三丁氧基-8-側氧基-辛基)苯基]乙氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]-4-(三氟甲基)嘧啶-5-甲酸	2-[[4-(18-第三丁氧基-18-側氧基-十八烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)-2,5-二氯-苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸	2-[[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸
	
2-[[3-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-甲酸	

2.8.5 合成6-[[4-[3-(12-第三-丁氧基-12-側氧基-十二基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基-胺基]吡啶-3-甲酸



【0370】 12-[2-氟-5-(4-胺磺醯基苯氧基)苯基]十二酸第三丁酯(300 mg, 575 μmol)、6-氯菸酸甲酯(102 mg, 603 μmol)、 Cs_2CO_3 (468 mg, 1.44 mmol)，叁(二亞苺基丙酮)二鈣(26 mg, 29 μmol)和4,5-雙(二苺基-磷基)-9,9-二甲基二苺并哌喃(「xantphos」, 17 mg, 29 μmol)在二噁烷(6 ml)中的混合物在氬氣氣氛中加熱到80°C歷時3小時(TLC控制)。反應混合物無需進一步純化即可用於下一個皂化步驟。

【0371】 將該懸浮液用二噁烷(6 ml)稀釋，並加入 LiOH (37 mg, 1.56 mmol)於水(6 ml)中的溶液。將混合物在室溫下攪拌歷時16h，並加入額外的 LiOH (37 mg, 1.56 mmol)。總體上，將混合物在室溫下攪拌歷時36h。將懸浮液傾倒至檸檬酸水溶液(10%，50 ml)上。過濾懸浮液，且用水洗滌濾餅並真空乾燥。得到呈白色固體狀的標題化合物6-[[4-[3-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基-胺基]吡啶-3-甲酸(350 mg, quan.)。

【0372】 ^1H NMR (400.23 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 12.5 (br s, 1H), 8.54 (br s, 1H), 8.11 (dd, $J=8.93, 2.20$ Hz, 1 H), 7.91 (br d, $J=8.68$ Hz, 2 H), 7.80 (m, 1 H), 7.19 (m,

2 H), 7.04 (m, 4 H), 2.58 (br t, J= 7.46 Hz, 2 H), 2.15 (t, J=7.27 Hz, 2 H), 1.48 (m, 4 H), 1.38 (s, 9 H), 1.26-1.22 (m, 14 H)。

【0373】 如果所需產物傾倒至檸檬酸水溶液上時沒有沉澱，則將水層用乙酸乙酯萃取，將合併的有機層用Na₂SO₄乾燥，過濾並且在真空中濃縮。將粗產物進行管柱層析，使用MeOH/CH₂Cl₂作為溶析液。

【0374】 對應合成以下化合物：

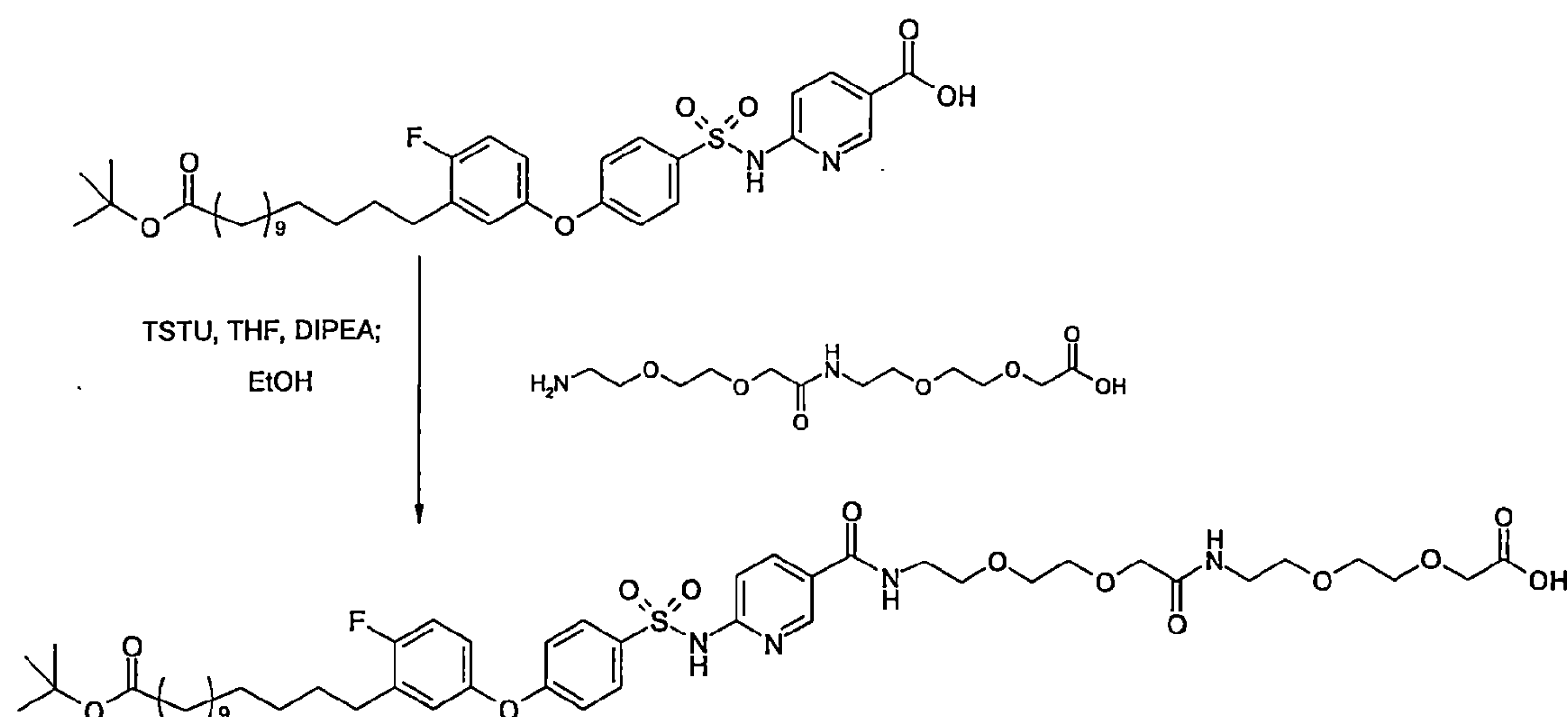
6-[[4-[4-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二烷氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯氧基]甲基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-[2-[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯基]乙氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-[3-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(18-第三丁氧基-18-側氧基-十八基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸

6-[[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四烷氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)-2,3-二氯-苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)-3-氟-苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-[[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]甲基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-[2-[4-(8-第三丁氧基-8-側氧基-辛基)苯基]乙氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[3-(18-第三丁氧基-18-側氧基-十八基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)-3-氯-苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(18-第三丁氧基-18-側氧基-十八烷氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸

6-[[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-[2-[4-(8-第三丁氧基-8-側氧基-辛基)苯基]乙氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[4-(20-第三丁氧基-20-側氧基-二十烷氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	6-[[3-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸
6-[[4-[2-[4-(12-第三丁氧基-12-側氧基-十二烷氧基)苯基]乙基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸	

2.9 依據方案1合成具有式I之化合物的實例

2.9.1 合成2-[2-[2-[[2-[2-[2-[6-[[4-[3-[14-第三丁氧基-14-側氧-十四基]-4-]氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸



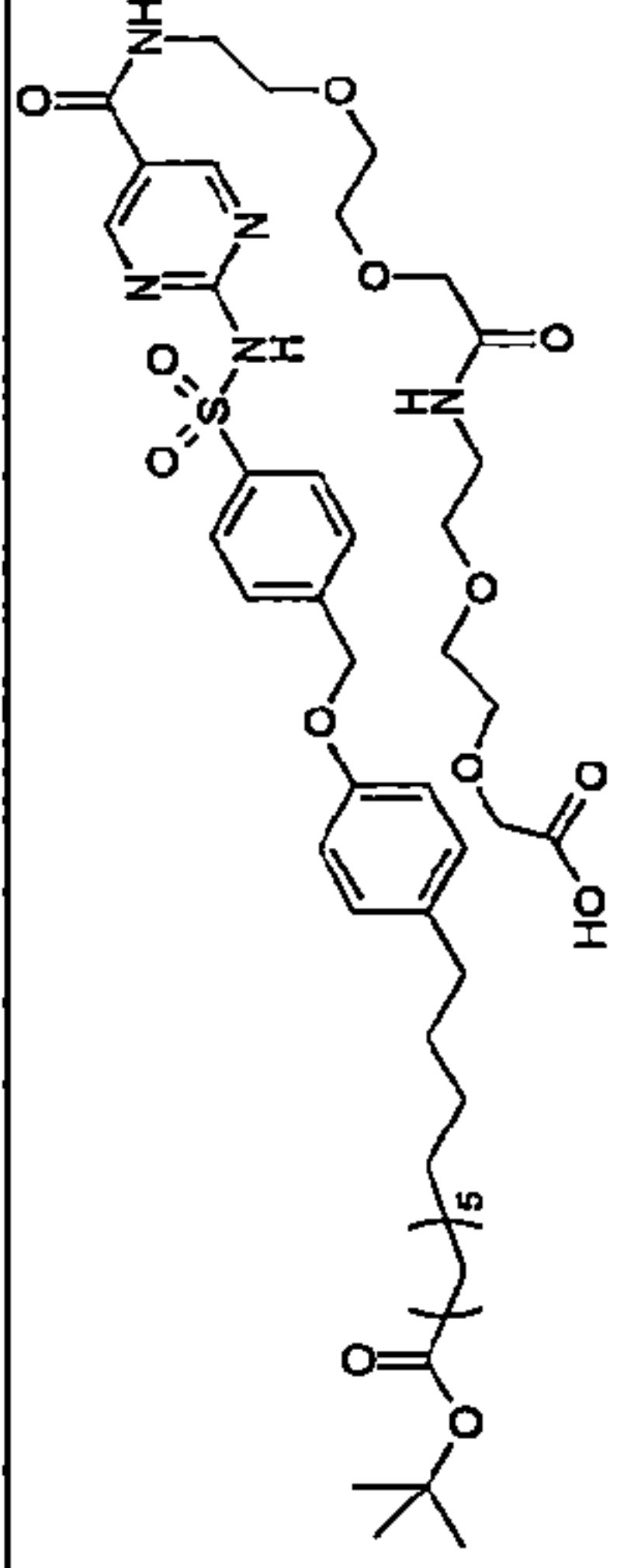
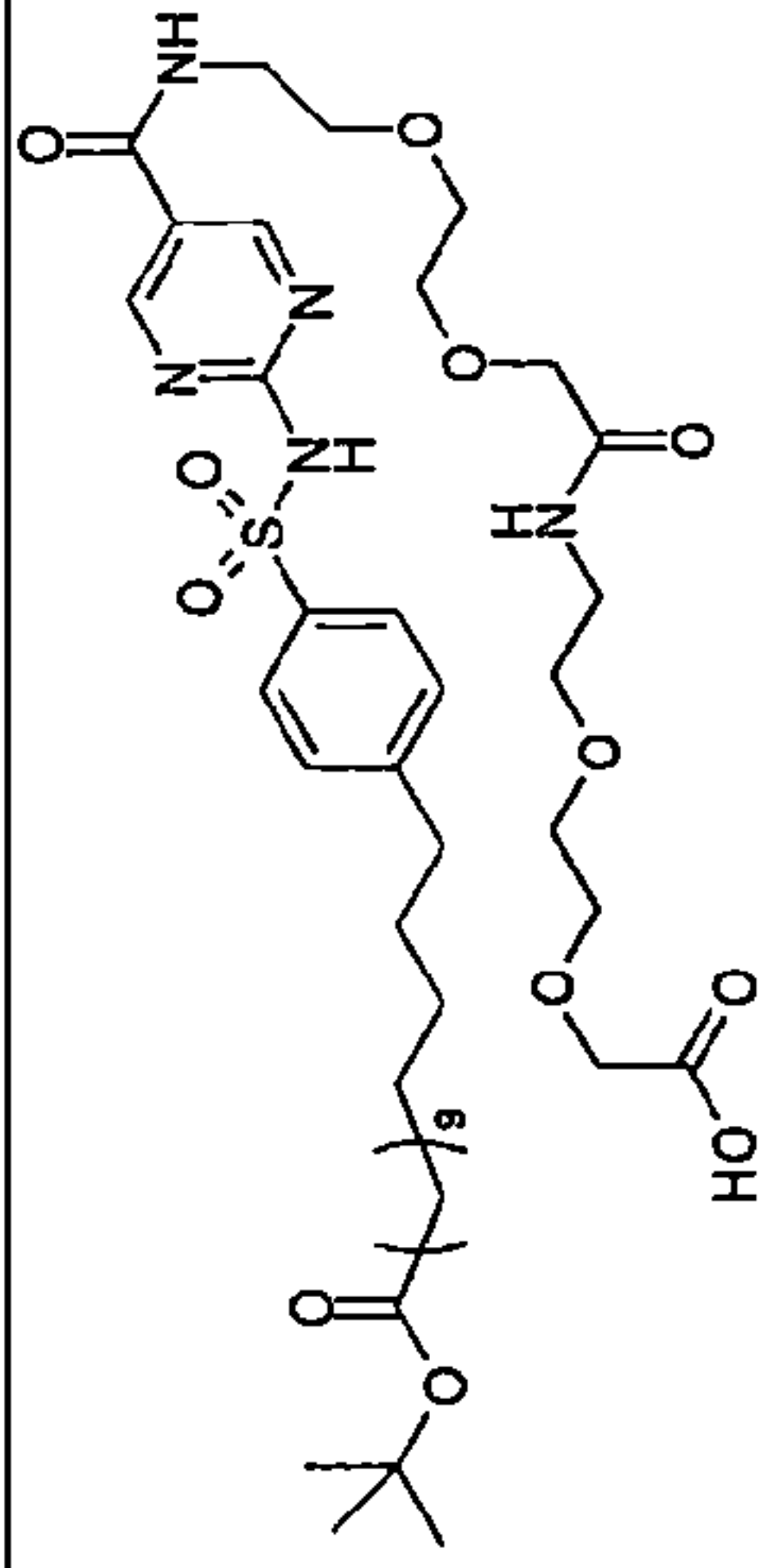
【0375】 6-[[4-[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-甲酸(169 mg, 251 μ mol), TSTU (80 mg, 264 mmol)和DIPEA (132 μ l, 97 mg, 1.25 mmol)在6 ml THF中的混合物在室溫下攪拌歷時16小時。16小時後，在減壓下移除溶劑並添加[2-(2-{2-[2-(2-胺基-乙氧基)-乙氧基]-乙醯基胺基}-乙氧基)-乙氧基]-乙酸(85 mg, 277 μ mol)在6 ml純EtOH中的溶液，且將混合物在室溫下攪拌歷時16h。在減壓下移除揮發性成分，將所得殘餘物溶解於CH₂Cl₂，並用10% KHSO₄水溶液洗滌。有機層用水和鹽水洗滌，經無水Na₂SO₄乾燥，過濾並在減壓下濃縮。粗產物藉由RP HPLC純化，得到2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[6-[4-[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)-4-氟-苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-羧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸(106 mg, 44%)。

【0376】 ¹H NMR (400.23 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 12.29 (br s, 1 H), 8.52 (m, 2 H), 8.09 (dd, J=8.93, 2.32 Hz, 1 H), 7.89 (d, J=8.80 Hz, 2 H), 7.61 (br t, J=5.69 Hz, 1 H), 7.18 (m, 2 H), 7.03 (m, 4 H), 4.01 (s, 2 H), 3.86 (s, 2 H), 3.20 - 3.68 (m, 16 H), 2.58 (br t, J=7.52 Hz, 2 H), 2.15 (t, J=7.27 Hz, 2 H), 1.49 (m, 4 H), 1.38 (s, 9 H), 1.25 (m, 18 H)。

【0377】 對應合成以下化合物：

[illegible]

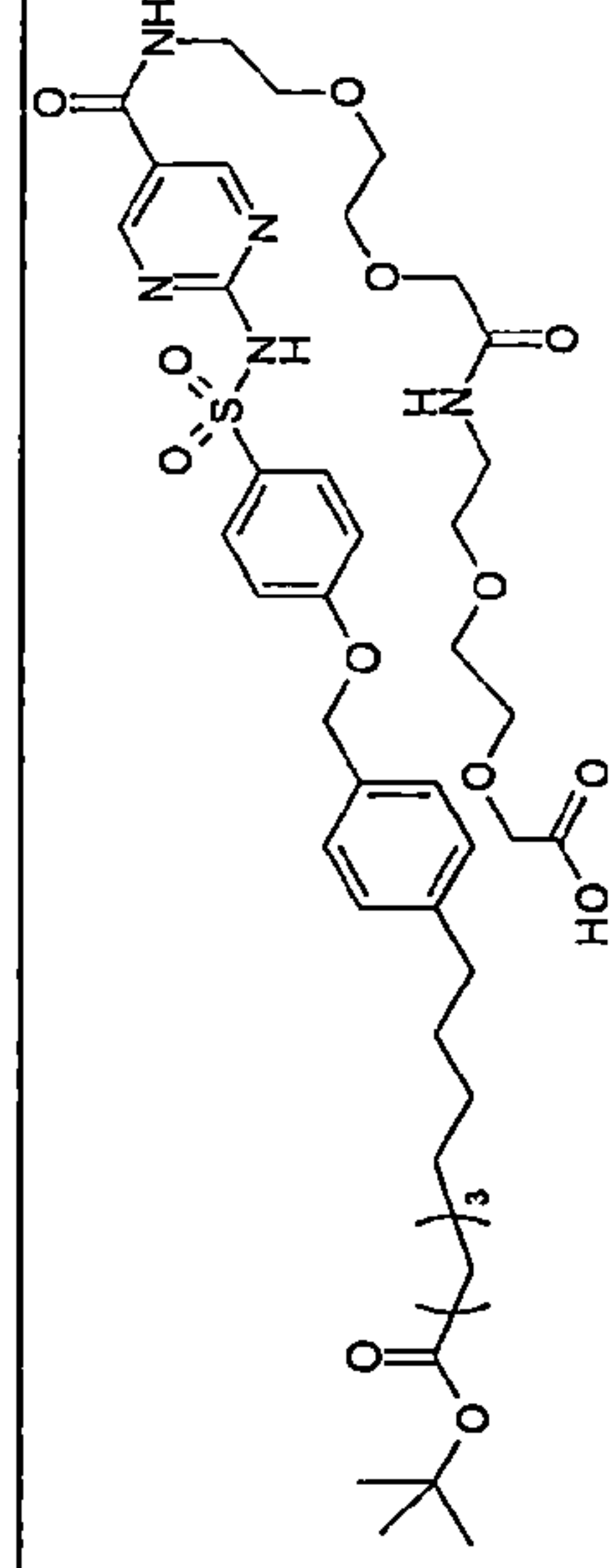
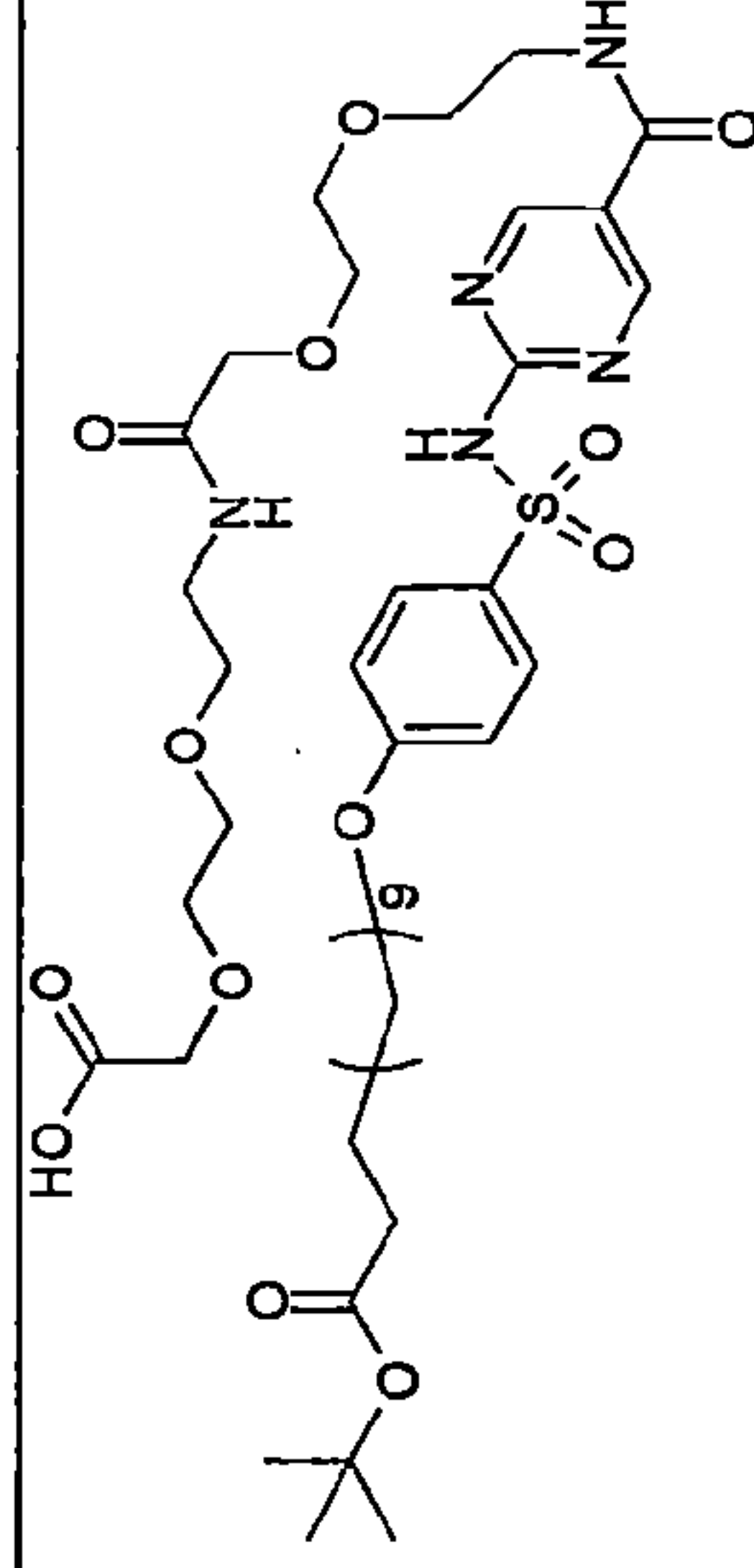
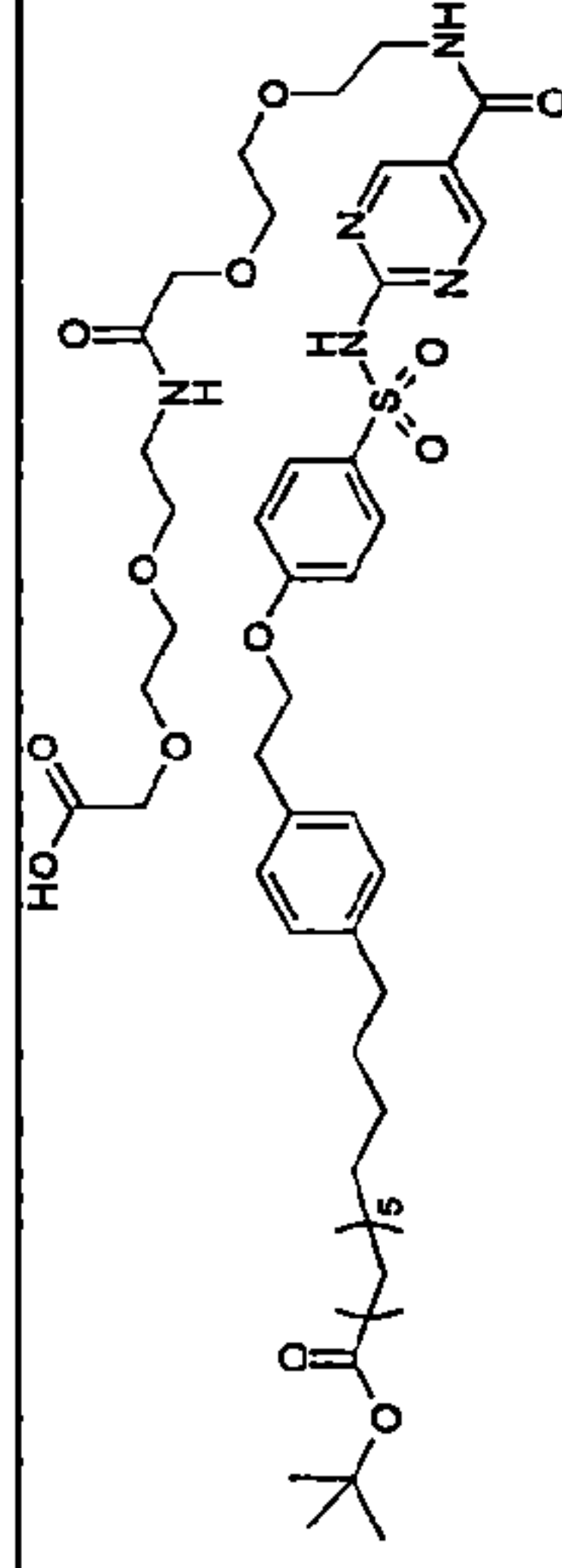
[illegible]



2-[2-[2-[2-[2-[5-[4-[3-(14-第三丁氧基-14-側
氧基-十四基)-4-氟-苯氧基]苯基]]磺鹽基]胺基]噻
啉-2-羧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]胺基]乙
氧基]乙氧基]乙酸

2-[2-2-[2-2-[2-2-[5-[4-(14-第三丁氧基-14側氧基

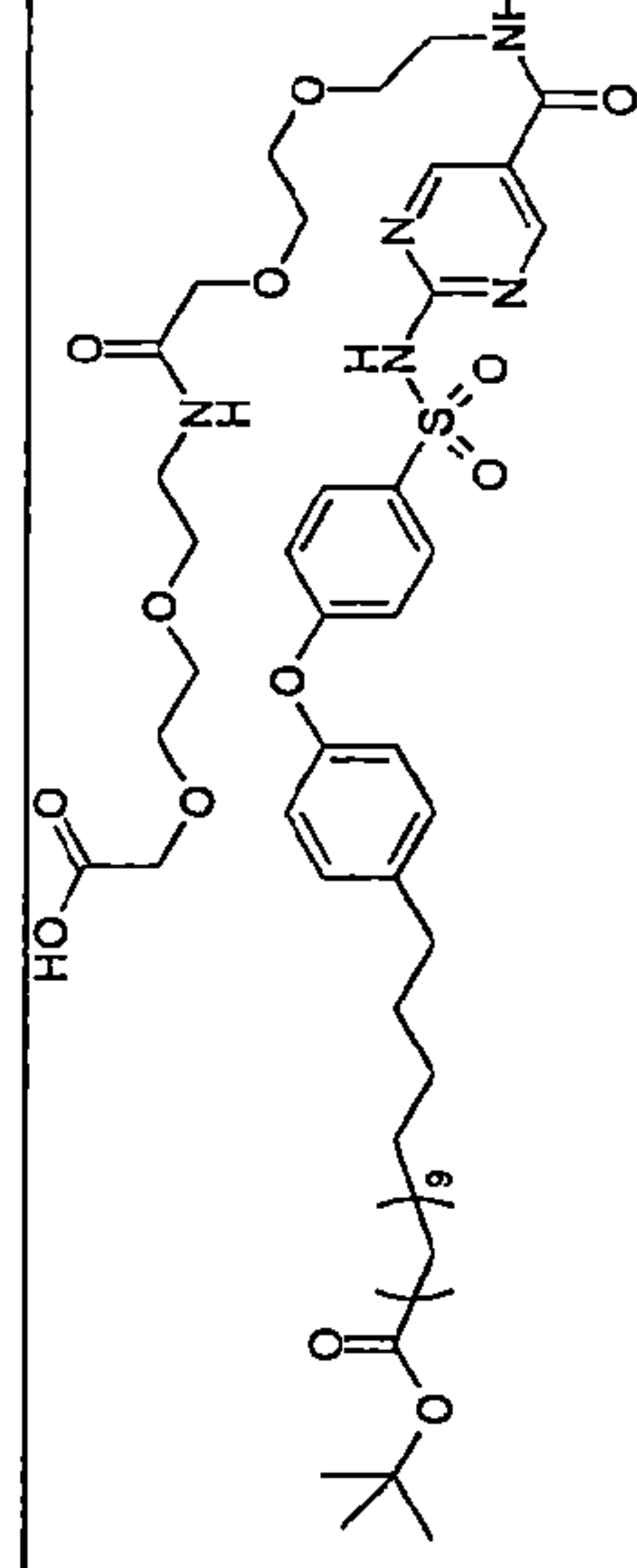
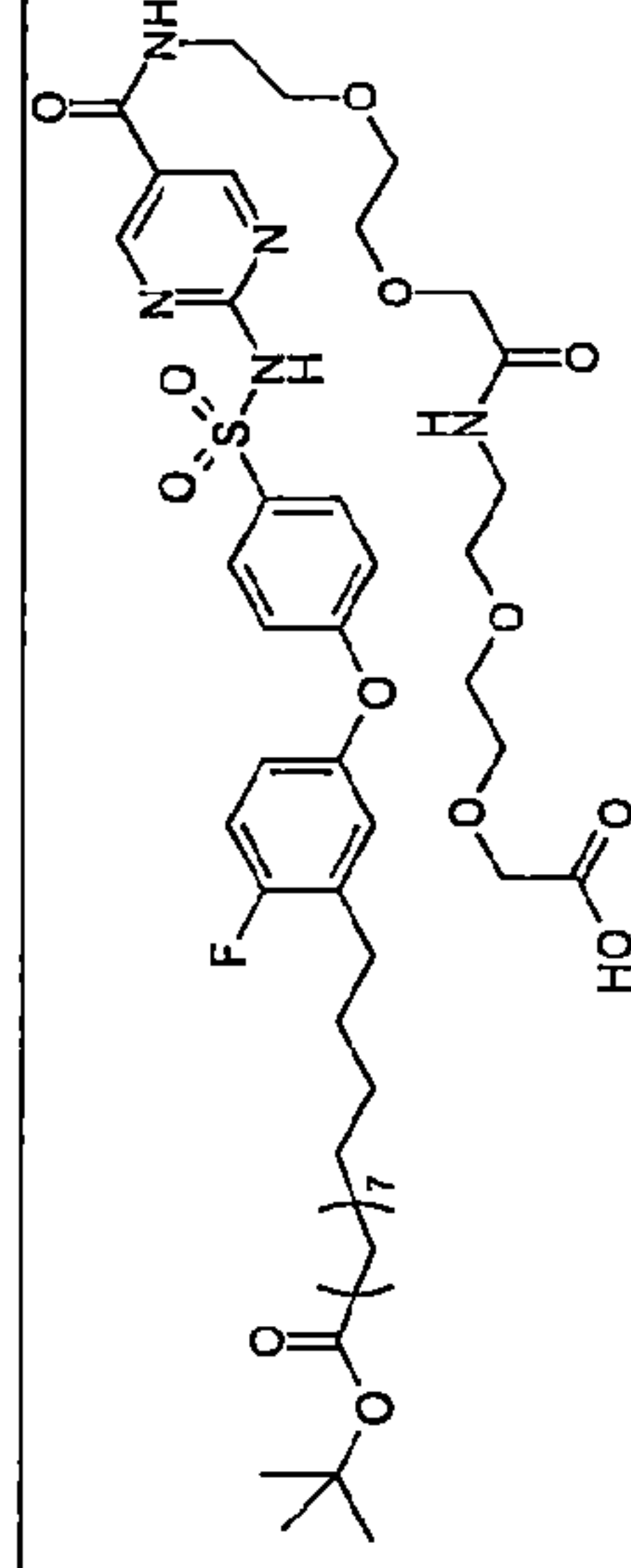
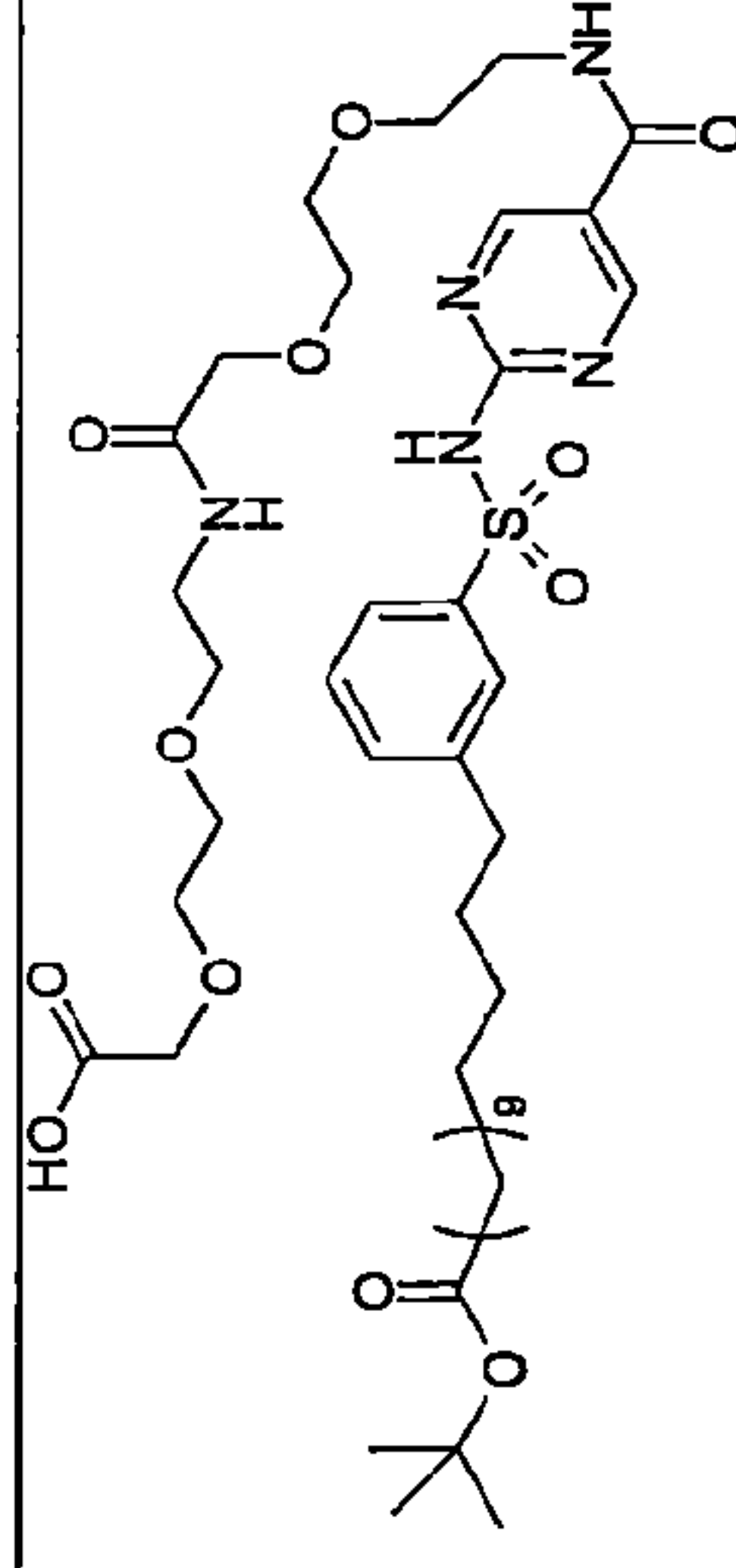
2-[2-2-[2-2-[2-[5-[4-[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯氧基]甲基]苯基]磺酰基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸



2-[2-[2-[2-[2-[4-[2-[5-[[4-[2-[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯基]乙氧基]苯基]]磷鹽基胺基]噻啶-2-羧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

2-[2-[2-[2-[2-[5-[[4-(12-第三丁氧基-12-側氧基
--十二烷氧基)苯基]磺酰基胺基]嘧啶-2-羧基]胺基]
乙氧基]乙氧基]乙氧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

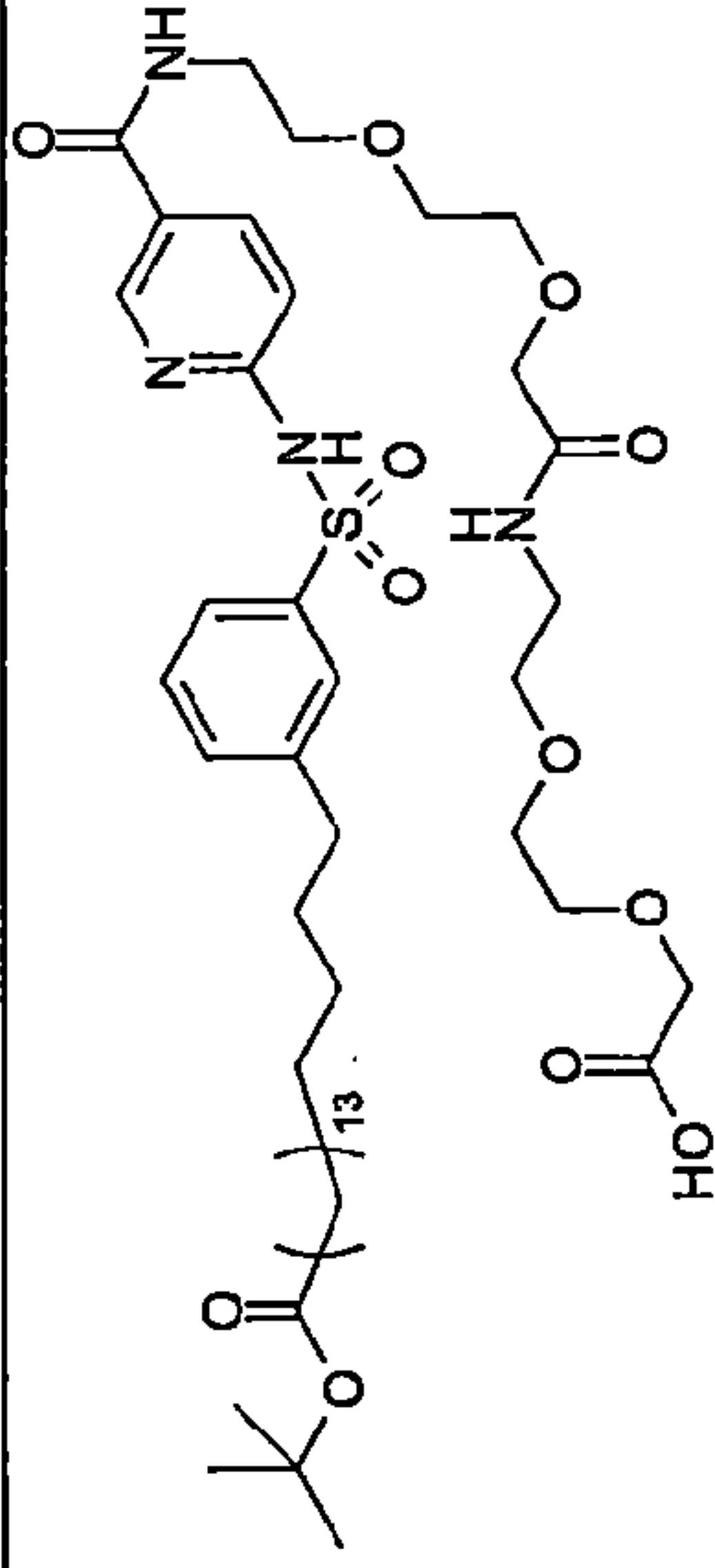
2-[2-2-[2-2-[2-[5-[4-[4-(8-第三丁氧基-8-側氧基-辛



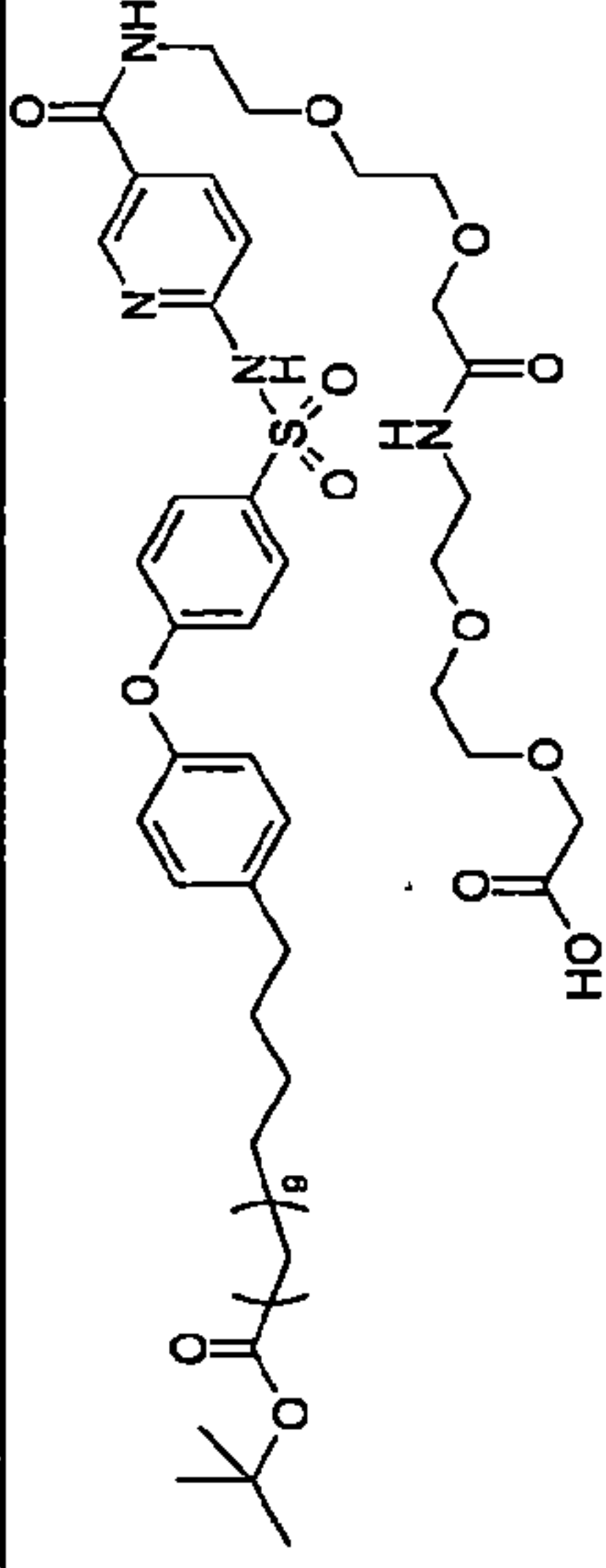
[illegible]

CC(C)(C)OC(=O)C(CCCCc1ccc(cc1)S(=O)(=O)Nc2ncnc2NC(=O)OCCOCCOC(=O)NCCOC(=O)O)C(=O)O

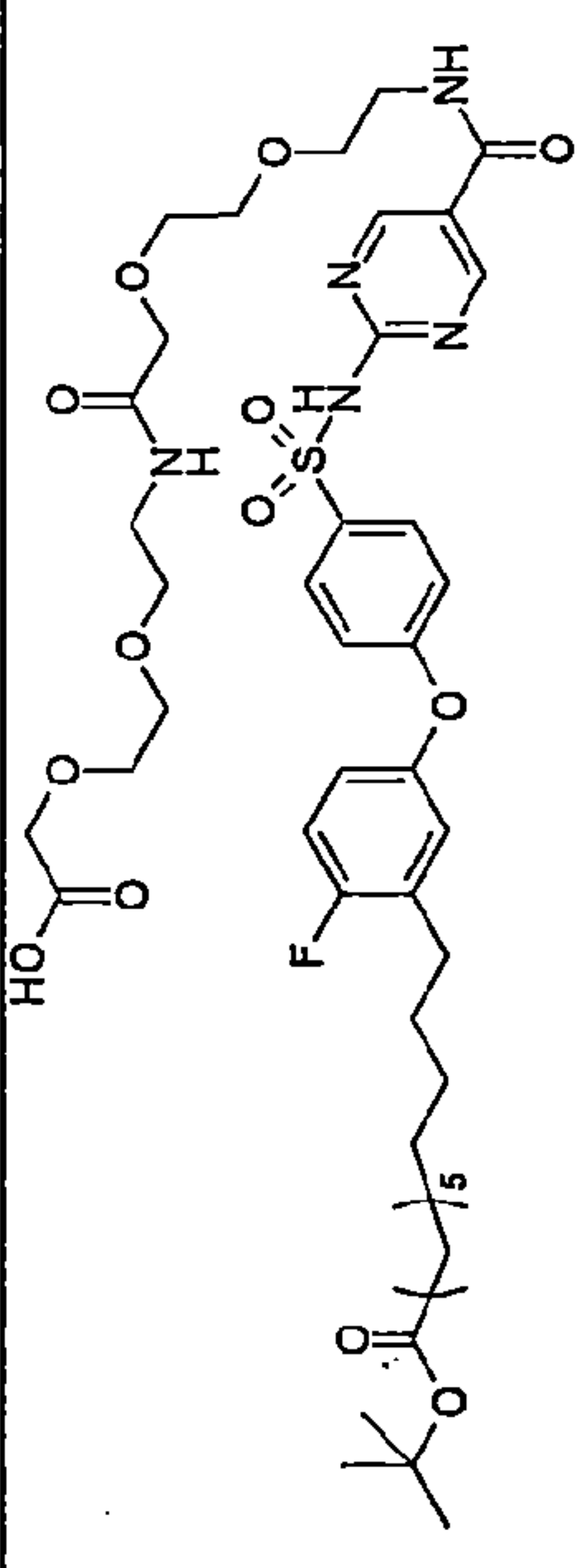
2-2-[2-[2-[2-[2-[4-(16-第三丁氧基-16-側氧
基-十六基)苯基]磺酰基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]
乙氧基]乙氧基]乙氧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙
酸



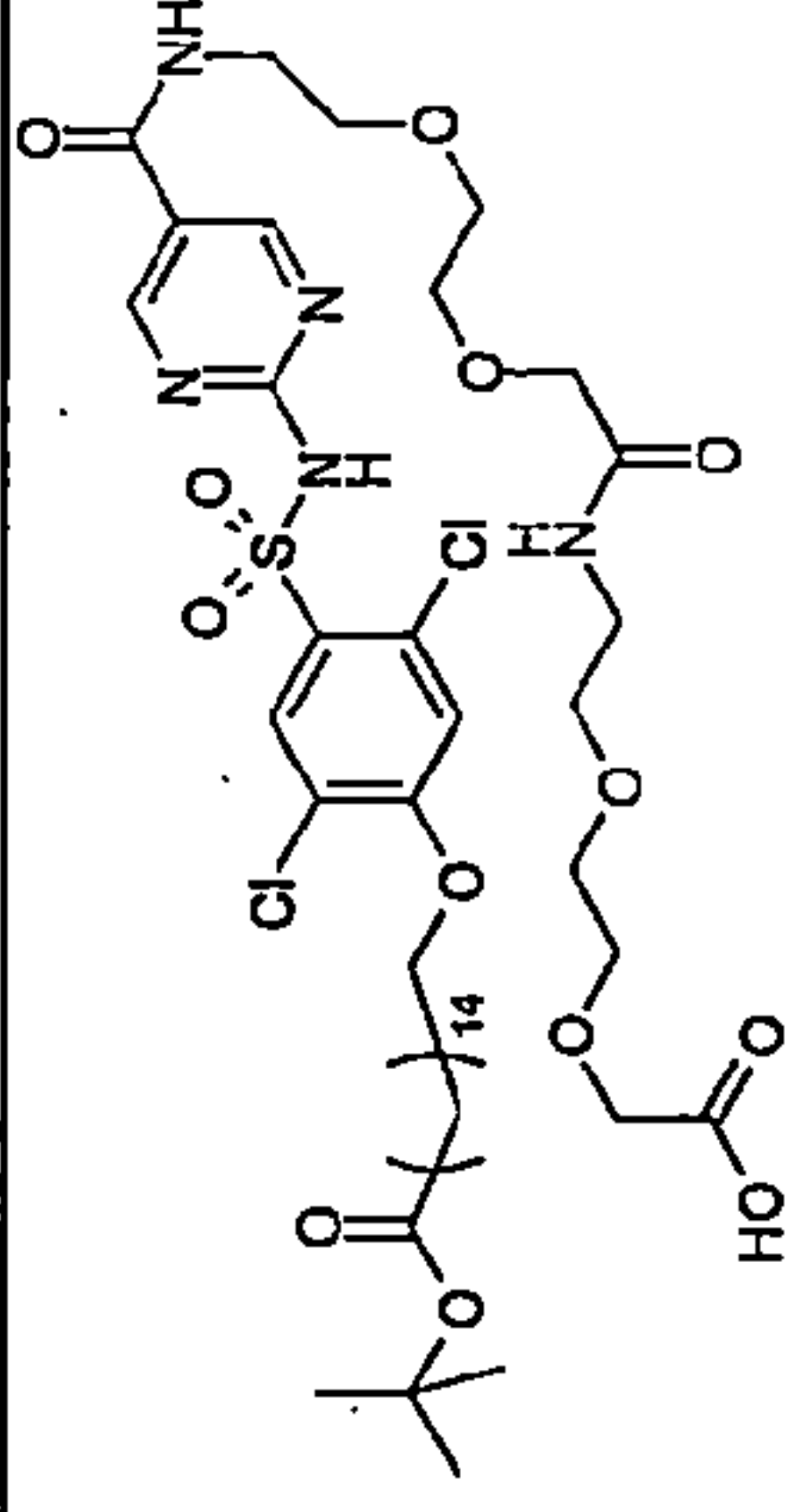
2-[2-[2-[2-[2-[6-[3-(18-第三丁氧基-18-側氧基-十八基)苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-羧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸



2-2-[2-[2-[2-[6-[4-(4-(14-第三丁氧基-14-側氧
基-十四基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-羰基]
胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]胺基]乙氧基]乙氧基]
乙酸



2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[3-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)-4-氟-苯氧基]苯基][磺鹽基胺基]噻啉-5-羧基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酸

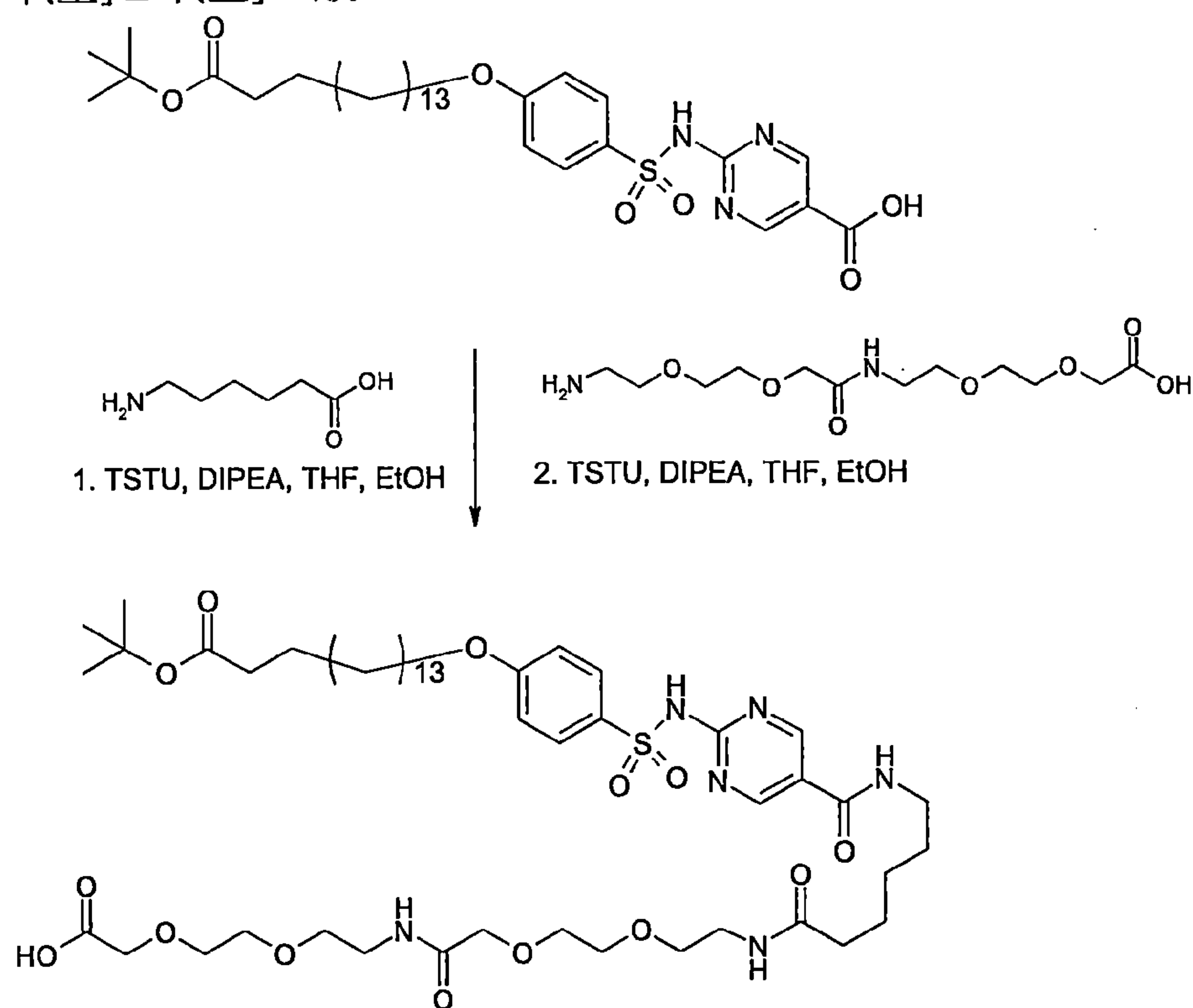


2-[2-2-[2-2-[2-2-[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六
烷氧基)-2,5-二氯-苯基]磺鹽基胺基]]嘧啶-5-羰基]胺基]
乙氧基]乙氧基]乙鹽基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

	2-[2-[2-[2-[2-[4-(8-(3-(tert-butoxy)propyl)oxyphenyl]amino]sulfonyl]phenyl]amino]pyrimidin-5-yl]ethoxy]ethyl acetate
	2-[2-[2-[2-[2-[4-(12-(3-(tert-butoxy)propyl)oxyphenyl]amino]sulfonyl]phenyl]amino]pyrimidin-5-yl]ethoxy]ethyl acetate
	2-[2-[2-[2-[2-[4-(18-(3-(tert-butoxy)propyl)oxyphenyl]amino]sulfonyl]phenyl]amino]pyrimidin-5-yl]ethoxy]ethyl acetate
	2-[2-[2-[2-[2-[4-(12-(3-(tert-butoxy)propyl)oxyphenyl]amino]sulfonyl]phenyl]amino]pyrimidin-5-yl]ethoxy]ethyl acetate
	2-[2-[2-[2-[2-[4-(18-(3-(tert-butoxy)propyl)oxyphenyl]amino]sulfonyl]phenyl]amino]pyrimidin-5-yl]ethoxy]ethyl acetate

	2-[2-[2-[2-[2-[4-(10-第三丁氧基-10-側氧基-癸基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酸
	2-[2-[2-[2-[2-[3-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酸

2.9.2 合成2-[2-[2-[[2-[2-[2-[6-[[5-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]己醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

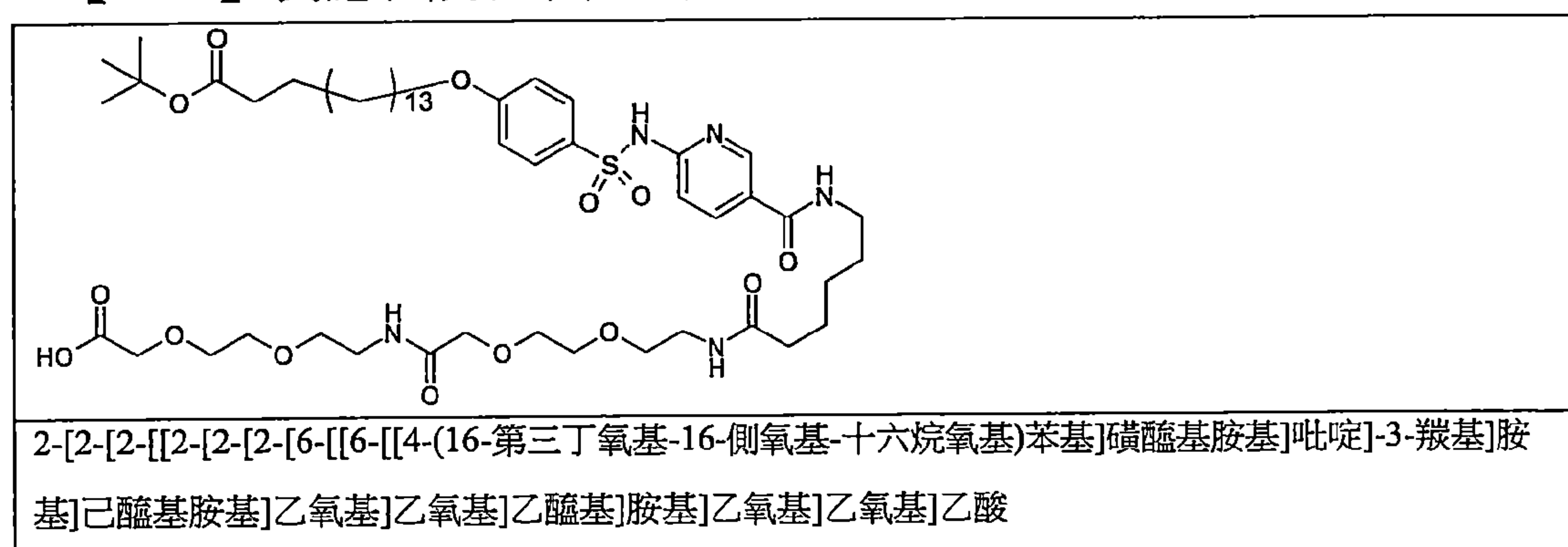


【0378】 5-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸(500 mg, 825 μmol), TSTU(310 mg, 1.0 mmol)和DIPEA (360 μl, 266 mg, 2.06 mmol)在6 ml THF中的混合物在室溫下攪拌歷時16小時。16小時後，在減壓下移除溶劑，並添加6-胺基己酸(130 mg, 990 μmol)和DIPEA (360 μl, 266 mg, 2.06 mmol)於6 ml純EtOH中的溶液，且將混合物在室溫下攪拌下歷時16h。在減壓下移除揮發性成分，將所得殘餘物溶於CH₂Cl₂中，並用10% KHSO₄水溶液洗滌。有機層用水和鹽水洗滌，經無水Na₂SO₄乾燥，過濾並在減壓下濃縮。900 mg所得的粗製6-[[5-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]己酸無需進一步純化即用於下個步驟。

【0379】 6-[[5-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]己酸(900 mg粗產物，純度65%，814 μmol)，TSTU (306 mg，1.02 mmol)和DIPEA (355 μl ，262 mg，2.03 mmol)在6 ml THF中的混合物在室溫下攪拌歷時16小時。16小時後，在減壓下移除溶劑，並添加2-[2-[2-[[2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸(301 mg，976 μmol)和DIPEA (355 μl ，262 mg，2.03 mmol)於純EtOH中的溶液，且將混合物在室溫下攪拌歷時16h。在減壓下移除揮發性成分，將所得殘餘物溶解於 CH_2Cl_2 中，並用10% KHSO_4 水溶液洗滌。有機層用水和鹽水洗滌，經無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾並在減壓下濃縮。粗產物藉由RP HPLC純化，得到2-[2-[2-[[2-[2-[2-[6-[[5-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]己醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸(78 mg，10%)。

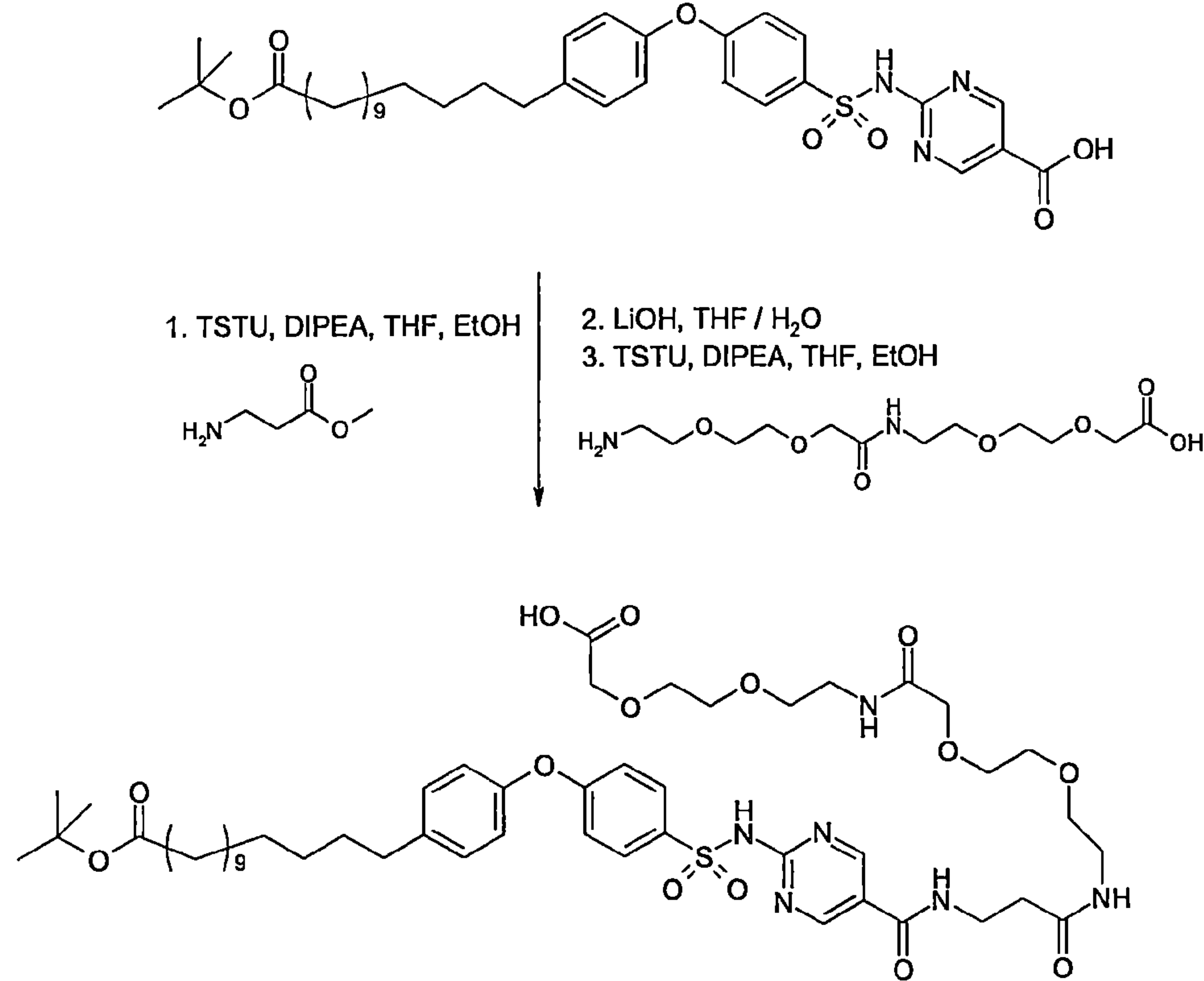
【0380】 ^1H NMR (400.23 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 12.29 (br s, 1 H), 8.82 (s, 2 H), 8.47 (br s, 1 H), 7.90 (d, $J=8.93$ Hz, 2 H), 7.79 (t, $J=5.50$ Hz, 1 H), 7.63 (t, $J=5.75$ Hz, 1 H), 7.07 (d, $J=8.93$ Hz, 2 H), 4.01 (m, 4 H), 3.87 (s, 2 H), 3.20 - 3.68 (m, 18 H), 2.15 (t, $J=7.27$ Hz, 2 H), 2.05 (t, $J=7.34$ Hz, 2 H), 1.70 (m, 2 H), 1.48 (m, 6 H), 1.38 (s, 9 H), 1.25 (m, 24 H)。

【0381】 對應合成以下化合物：

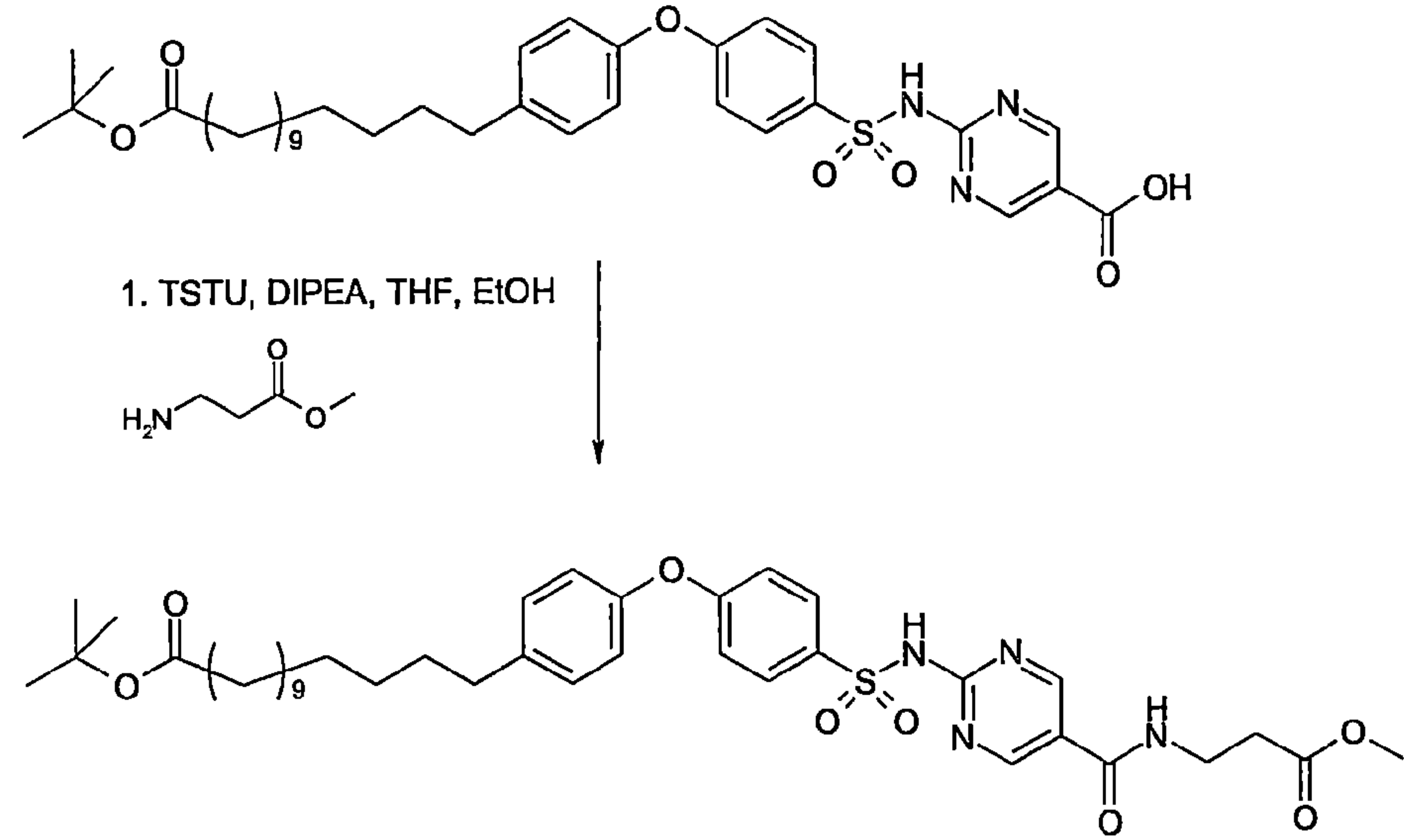


2.10 併入物質(2)

2.10.1 合成2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-[[5-[[4-[4-[14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基]苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]丙醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸



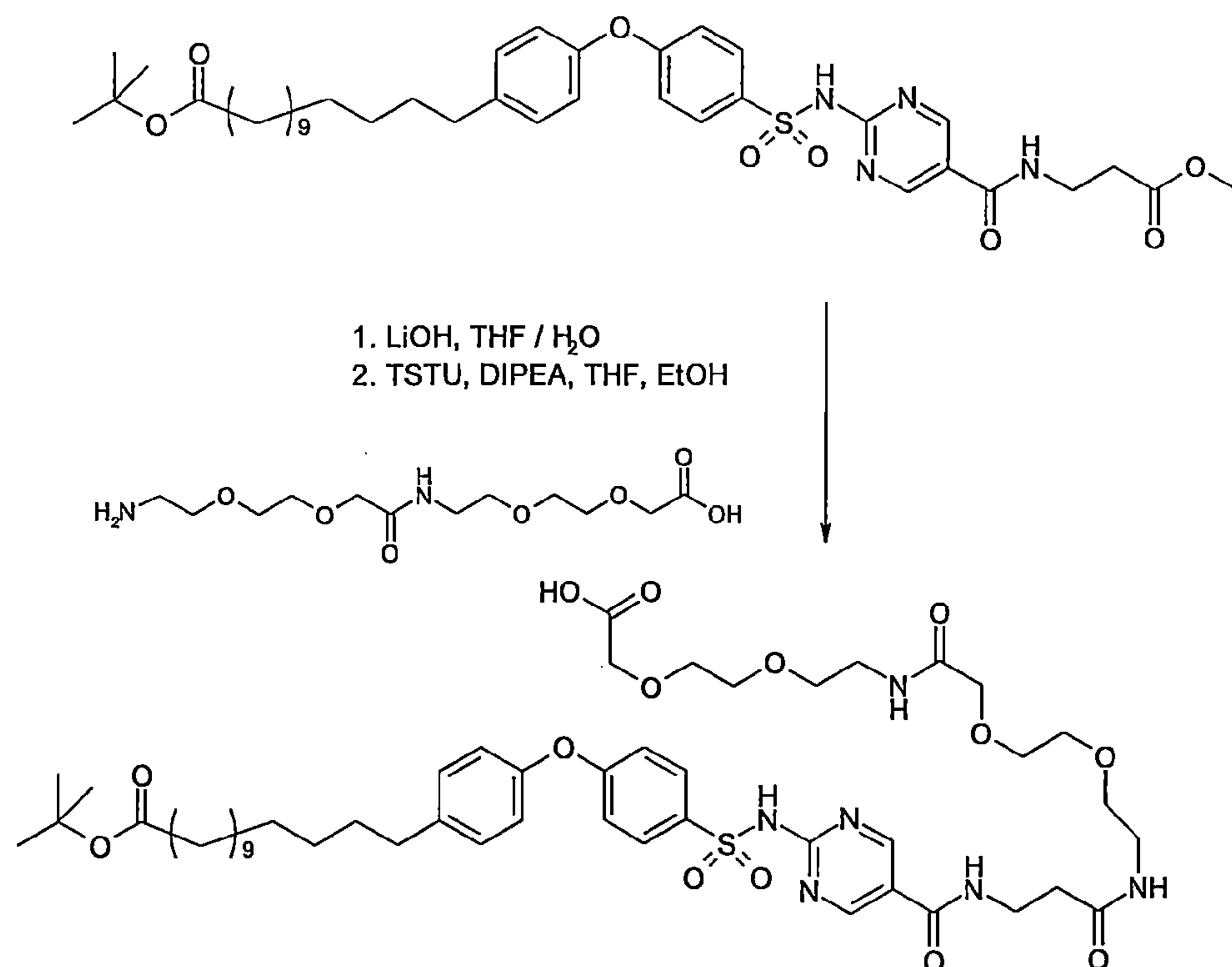
2.10.2 合成14-[4-[4-[[5-[(3-甲氧基-3-側氧基-丙基)胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]苯氧基]苯基]十四酸第三丁酯



【0382】 將5-[[4-[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-甲酸(1.0 g, 764 μmol), TSTU (241 mg, 803 μmol)和DIPEA (494 mg, 3.82 mmol)在10 ml THF中的混合物在室溫下攪拌歷時16小時。加入額外的TSTU (80 mg, 267 μmol), 並在RT下繼續攪拌歷時2h。加入3-胺基丙酸甲酯鹽酸鹽(117 mg, 841 μmol), 並在室溫下繼續攪拌歷時16h。在減壓下移除揮發性成分, 將所得殘餘物溶解於 CH_2Cl_2 中, 並用10% KHSO_4 水溶液洗滌。有機層用水和鹽水洗滌, 經無水 Na_2SO_4 乾燥, 過濾並在減壓下濃縮。粗產物藉由RP製備型HPLC純化, 得到14-[4-[4-[[[5-[(3-甲氧基-3-側氧基-丙基)胺基甲醯基]嘧啶丁-2-基]胺磺醯基]苯氧基]苯基]十四酸酯(235 mg, 42%)。

【0383】 ^1H NMR (400.23 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.11 (br s, 1 H), 8.84 (s, 2 H), 8.66 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H), 7.98 (d, $J=8.93$ Hz, 2 H), 7.26 (d, $J=8.44$ Hz, 2 H), 7.04 (m, 4 H), 3.60 (s, 3 H), 3.46 (m, 2H), 2.57 (m, 4 H), 2.15 (t, $J=7.27$ Hz, 2 H), 1.56 (m, 2 H), 1.46 (m, 2 H), 1.38 (s, 9 H), 1.29 (m, 18 H)。

2.10.3 合成2-[2-[2-[[2-[2-[2-[3-[[5-[4-[4-[14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基]苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]丙醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸



【0384】 將14-[4-[4-[[5-[(3-甲氧基-3-側氧基-丙基)胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]苯氧基]苯基]十四酸酯(235 mg, 318 μmol)、LiOH (38 mg, 1.59 mmol), THF (5 ml)和H₂O (5 ml)的混合物在室溫下攪拌歷時2h。用HCl (2.0 M)將反應混合物酸化至大約pH=1.0, 並用CH₂Cl₂萃取。有機層用鹽水洗滌, 用Na₂SO₄乾燥, 過濾並濃縮, 得到呈白色固體狀的3-[[5-[[4-[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]丙酸(207 mg, 產率89%), 其無需進一步純化即可用於下一個反應。

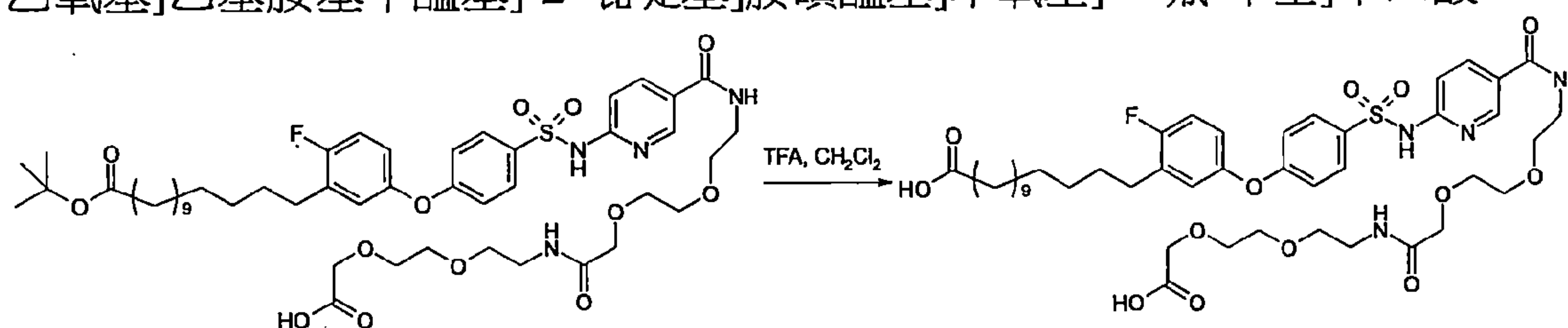
【0385】 將3-[[5-[[4-[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]丙酸(207 mg, 285 μmol), TSTU (90 mg, 300 μmol)和DIPEA (150 μl , 110 mg, 850 μmol 爾)在6 ml THF中的混合物在室溫下攪拌歷時1小時。1小時後, 在減壓下移除溶劑, 並添加2-[2-[2-[[2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸(97 mg, 314 μmol)和DIPEA (150 μl , 110 mg, 850 μmol)於6 ml純EtOH中的溶液, 且將混合物在室溫下攪拌歷時16h。在減壓下移除揮發性成分, 將所得殘餘物溶解於CH₂Cl₂中, 並用10% KHSO₄水溶

液洗滌。有機層用水和鹽水洗滌，經無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾並在減壓下濃縮。粗產物藉由RP HPLC純化，得到2-[2-[2-[[2-[2-[2-[3-[[5-[[4-[4-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)苯氧基]苯基]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]丙醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸(163 mg, 56%)。

【0386】 ^1H NMR (400.23 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.11 (br s, 2 H), 8.84 (s, 2 H), 8.61 (t, $J=5.62$ Hz, 1 H), 7.97 (m, 3 H), 7.62 (t, $J=5.56$ Hz, 1 H), 7.26 (d, $J=8.44$ Hz, 2 H), 7.04 (m, 4 H), 4.01 (s, 2 H), 3.86 (s, 2 H), 3.20 - 3.60 (m, 18 H), 2.58 (m, 2 H), 2.34 (t, $J=7.03$ Hz, 2 H), 2.15 (t, $J=7.27$ Hz, 2 H), 1.56 (m, 2 H), 1.46 (m, 2 H), 1.38 (s, 9 H), 1.29 (m, 18 H)。

2.11 去保護

合成14-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]-2-吡啶基]胺磺醯基]苯氧基]-2-氟-苯基]十四酸



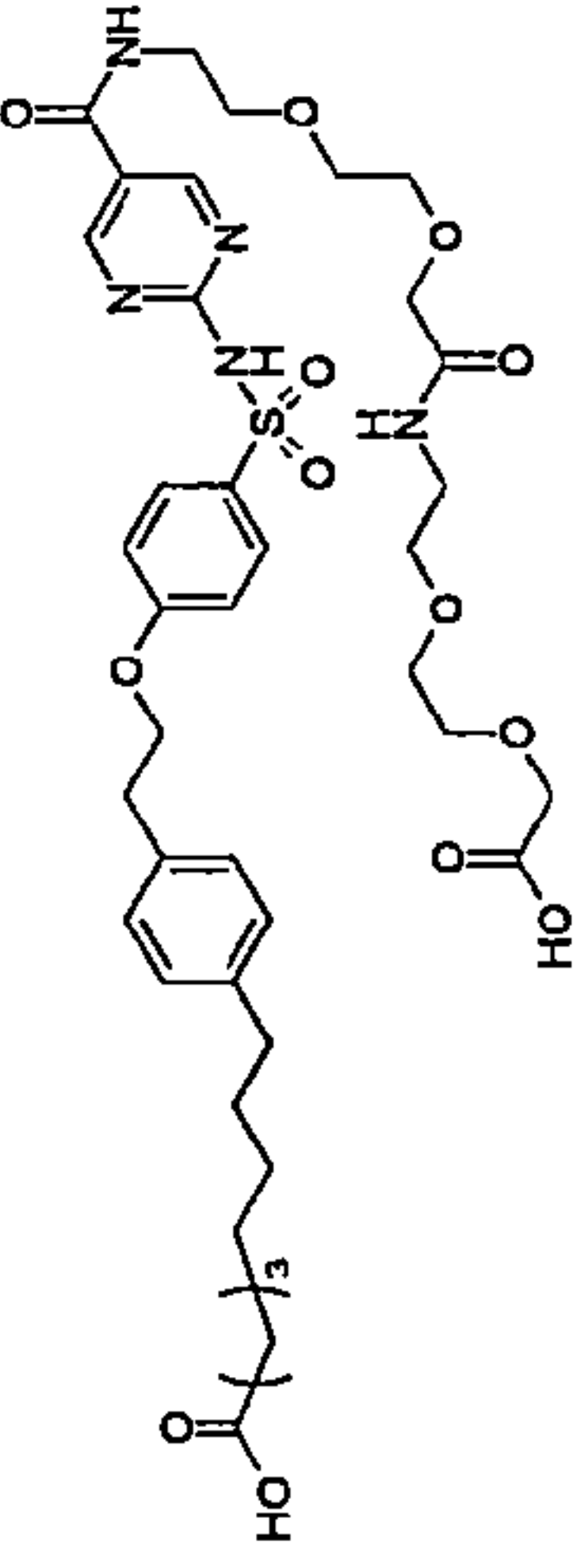
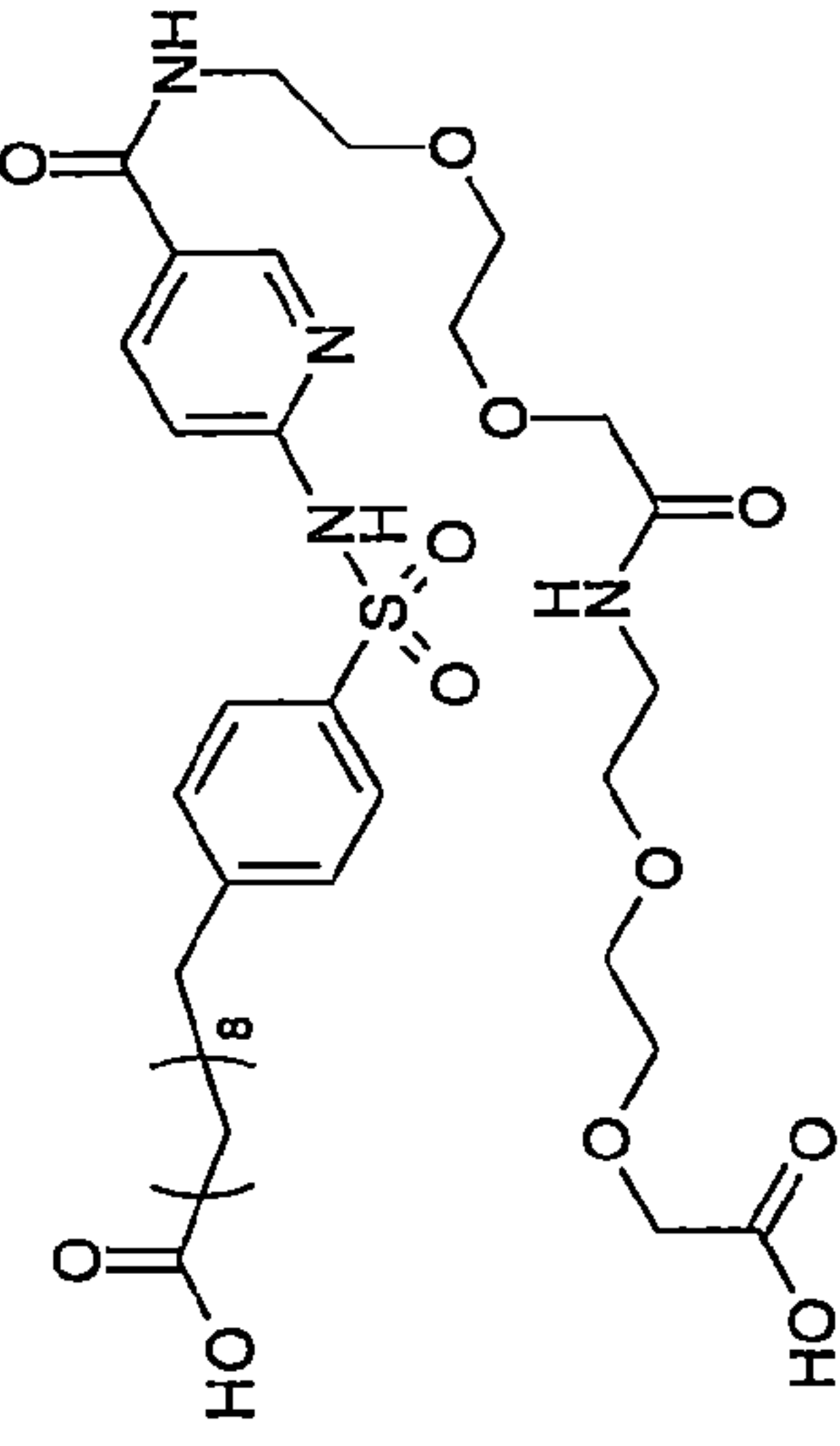
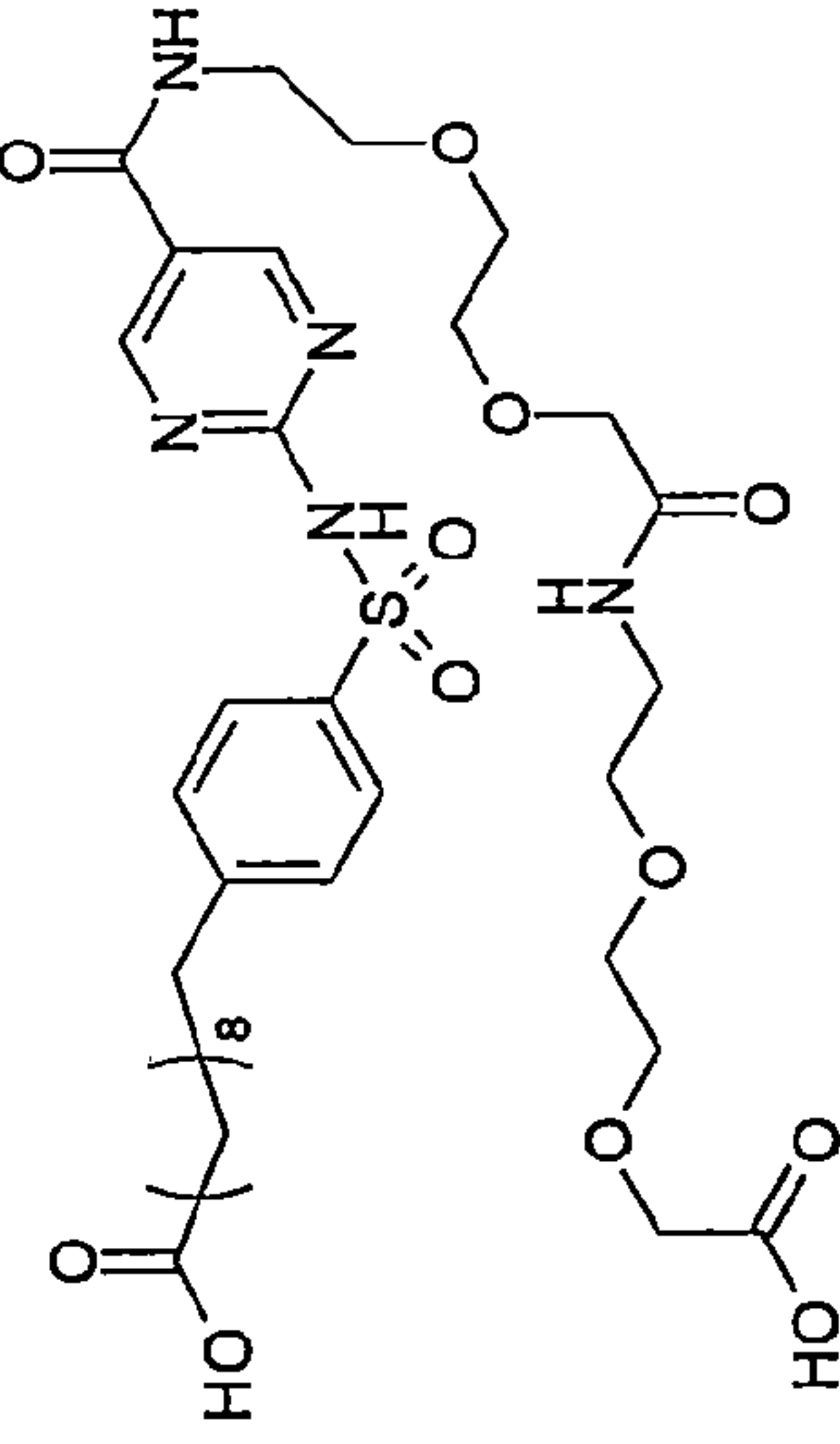
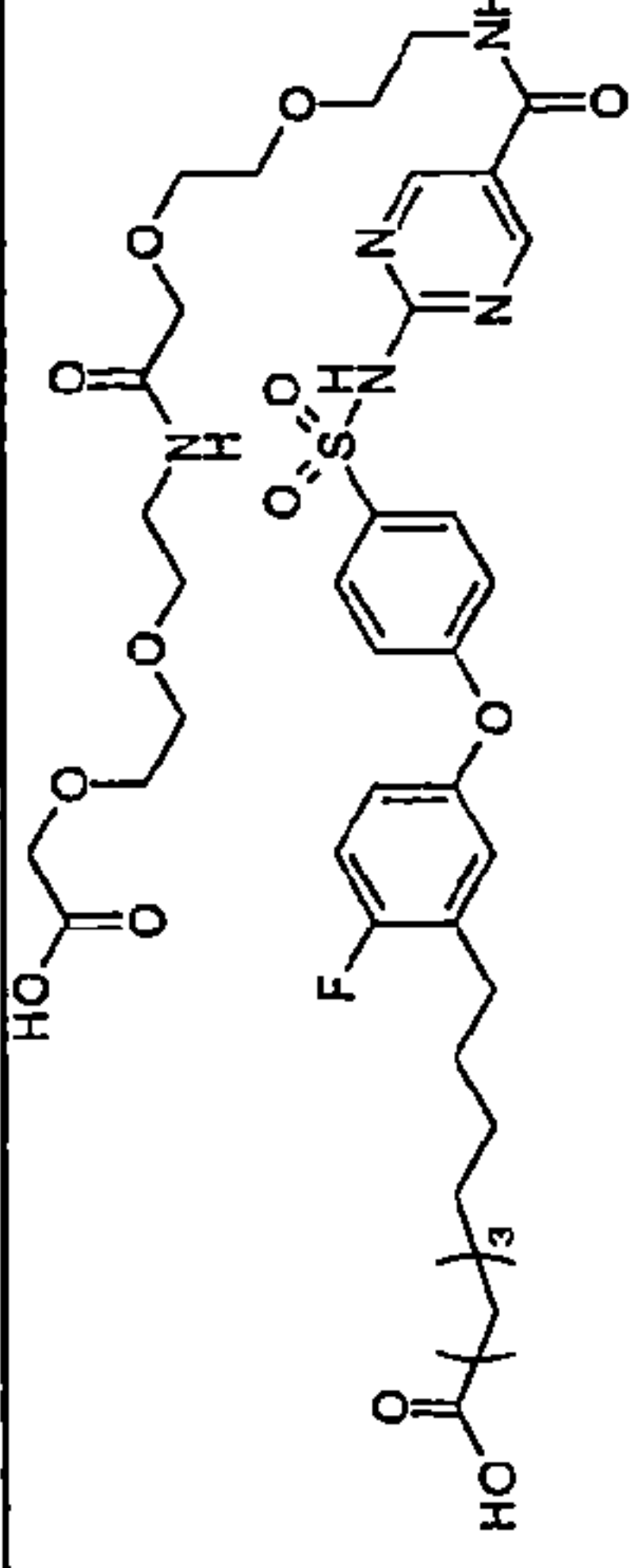
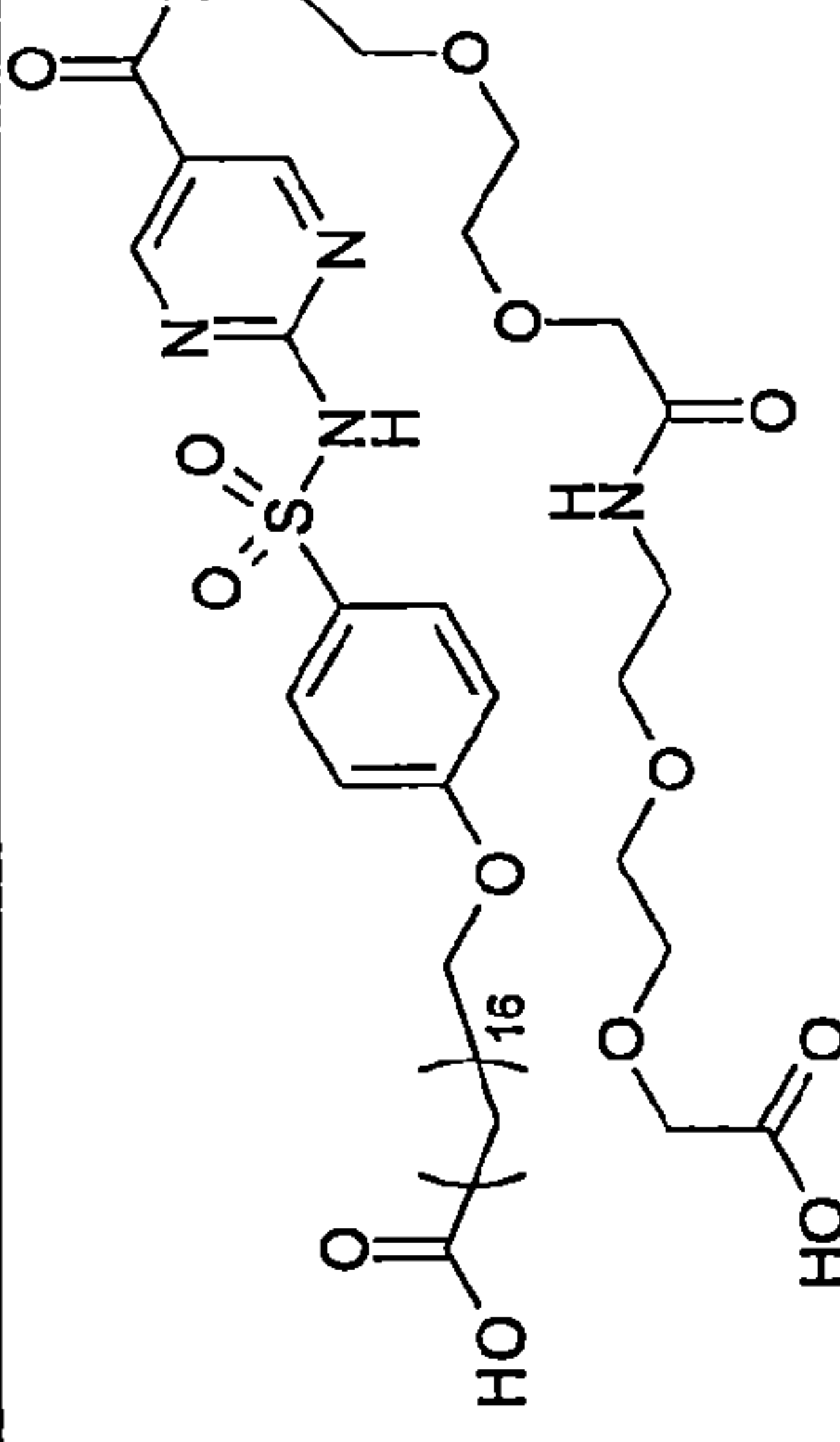
【0387】 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)-4-氟-苯氧基]]苯基]磺醯基胺基]吡啶-3-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸(20 mg, 21 μmol)溶解在DCM (3.0 ml)中，並在室溫下添加TFA (0.5 ml)。在室溫下繼續攪拌歷時16小時。在減壓下移除揮發性成分，並將所得殘餘物溶解於DCM中，並再蒸發兩次。粗產物藉由RP製備型HPLC純化。得到呈無色固體狀的標題化合物14-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]-2-吡啶基]胺磺醯基]苯氧基]-2-氟-苯基]十四酸(19 mg, 21 μmol , quan.)。

【0388】 ^1H NMR (400.23 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.19 (br s, 1 H), 8.51 (m, 2 H), 8.09 (dd, $J=8.93, 2.32$ Hz, 1 H), 7.89 (d, $J=8.93$ Hz, 2 H), 7.61 (br t, $J=5.56$ Hz, 1 H), 7.20 (t, $J=8.93$ Hz, 1 H), 7.15 (d, $J=8.19$ Hz, 1 H), 7.03 (m, 4 H), 4.01 (s, 2 H), 3.86 (s, 2 H), 3.20 - 3.68 (m, 16 H), 2.58 (br t, $J=7.52$ Hz, 2 H), 2.17 (t, $J=7.34$ Hz, 2 H), 1.49 (m, 4 H), 1.25 (m, 18 H)。

【0389】 對應合成以下化合物：

[illegible]

[illegible]

	8-[4-[2-[4-[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲酯基]吡啶-2-基]胺磺酯基]苯氧基]乙基]苯基]辛酸
	10-[4-[2-[4-[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲酯基]-2-吡啶基]胺磺酯基]苯基]癸酸
	10-[4-[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲酯基]胺磺酯基]苯基]癸酸
	8-[5-[4-[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲酯基]吡啶-2-基]胺磺酯基]苯氧基]-2-氟-苯基]辛酸
	18-[4-[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲酯基]胺磺酯基]苯氧基]十八酸
	18-[4-[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲酯基]胺磺酯基]苯基]十八酸

3. 胰島素及接合物合成

3.1 人類胰島素

【0390】 人類胰島素A鏈及B鏈的胺基酸序列為：

A鏈：GIVEQCCTSI~~C~~SLYQLENYCN (SEQ ID NO: 102)

B鏈：FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF~~Y~~TPKT (SEQ ID NO:103)

【0391】 一個鏈內二硫橋接存在於Cys(A6)和Cys(A11)之間，兩個鏈內二硫橋接存在於Cys(A7)和Cys(B7)以及Cys(A20)和Cys(B19)之間。

3.2 胰島素類似物41

【0392】 胰島素類似物41是以人類胰島素為基礎，其在位置A14、B16、B25中帶有突變，且移除位置B30處的胺基酸：

Glu(A14)：在人類胰島素A鏈的位置14處的胺基酸(Y，酪胺酸，Tyr)被取代為麩胺酸(E，Glu)，

His(B16)：在人類胰島素B鏈的位置16處的胺基酸(Y，酪胺酸，Tyr)被取代為組胺酸(H，His)，

His(B25)：在人類胰島素B鏈的位置25處的胺基酸(F，苯丙胺酸，Phe)被取代為組胺酸(H，His)，

Des(B30)：在人類胰島素B鏈的位置30處的胺基酸缺失。

【0393】 關於A鏈和B鏈，胰島素類似物41的完整胺基酸序列為：

A鏈：GIVEQCCTSI~~C~~SLEQLENYCN (SEQ ID NO: 104)

B鏈：FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK- (SEQ ID NO: 105)

【0394】 該一個鏈內二硫橋接以及該兩個鏈內二硫橋街與人類胰島素一致。

3.3 帶有人類胰島素的接合物/合成[16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]苯氧基]十六酸]Lys(B29)-胰島素

從依據3.1的人類胰島素，以及從實例2.9的2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸來合成接合物：

合成16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺基磺醯基]苯氧基]十六酸酯：

【0395】 向296 mg 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸於9 ml DMF中的溶液，添加92.7 μ l三乙胺，106 mg TSTU和微量DMAP。將該溶液攪拌歷時1小時。加入100 ml二氯甲烷，且所得溶液用50 ml鹽水洗滌3次。分離有機層，用硫酸鈉乾燥，過濾並真空濃縮。將粗產物溶解於11 ml二氯甲烷和5.5 ml三氟乙酸中，並在5°C下儲存過夜。

【0396】 將溶液濃縮。接著，將粗產物溶解於30 ml二氯甲烷中三次並蒸發。將固體材料懸浮於5 ml甲基第三丁醚，傾析醚。在真空中乾燥殘餘物且無須進一步純化即可使用。

【0397】 將480 mg胰島素溶液懸浮在25 ml水中，然後加入0.45 ml三乙胺。對澄清溶液，先加入25 ml MeCN，然後加入0.9 ml (45.89 mM在DMF中)的16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺基磺醯基]苯氧基]十六酸酯。將該溶液在室溫下攪拌歷時3小時。在氯化鈉磷酸鹽緩衝液中用UPLC H-classs於214 nm下分析反應。Waters BEH300 10 cm。胰島素滯留時間：3.85分鐘。胰島素接合物滯留時間6.46分鐘。該產物藉由HPLC純化，使用ÄKTA avant 25. Kinetex 5 μ m C18 100 250×21.2 mm。

管柱體積(CV) 88 ml。

管柱體積(CV) 88 ml。

溶劑A：0.5%乙酸於水中

溶劑B：0.5%乙酸於水/MeCN 2：8中

梯度：95% A 5% B至40% A 60%，於14 CV中

【0398】在氯化鈉磷酸鹽緩衝液中用UPLC H-classs於214 nm下分析反應。Waters BEH300 10 cm。胰島素接合物滯留時間：6.419分鐘。將溶液凍乾並提供所需產物。93 mg 34%產率。質譜，6629.6 g/mol。

3.4 帶有胰島素類似物41的接合物

【0399】使用實例2.9的黏合劑分子，製備依據3.2之胰島素類似物41的接合物(關於結構，亦參見表1)：

黏合劑5：16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]苯氧基]十六酸；

第三丁酯：

2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

黏合劑8：14-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]苯氧基]-2-氟-苯基]十四酸；第三丁酯：

2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[3-(14-第三丁氧基-14-側氧基-十四基)-4-氟-苯氧基]苯基]]磺醯基胺基]嘧啶-2-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

黏合劑50：16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]-2-氯-苯氧基]十六酸；第三丁酯：

2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)-3-氯-苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

黏合劑54：16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]苯基]十六酸；和第三丁酯：

2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸

3.4.1 合成Glu(A14)His(B16)His(B25)[16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(羧甲基氧基)乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯基]苯氧基]十六酸]Lys(B29)Des(B30)-胰島素

【0400】在離胺酸B29的ε-胺基基團和2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-(16-第三丁氧基-16-側氧基-十六烷氧基)苯基]磺醯基胺基]嘧啶-5-羰基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙醯基]胺基]乙氧基]乙氧基]乙酸呈其第三丁酯形式之黏合劑的經活化乙酸殘基之間如下形成一個醯胺鍵：將400 mg胰島素類似物41(依據實例3.2的Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素)的溶液懸浮在20 ml水中，然後加入0.4 ml三乙胺。向該澄清溶液加入20ml DMF，然後加入5 ml (17.04 mM在DMF中)16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]乙氧基]乙基胺基甲醯基]嘧啶-2-基]胺磺醯

基]苯氧基]十六酸酯。將該溶液在室溫下攪拌歷時2小時。在氯化鈉磷酸鹽緩衝液中用Waters UPLC H-class在214nm下分析反應。

Waters BEH300 10 cm。

胰島素滯留時間：2.643分鐘

胰島素接合物滯留時間6.224分鐘。

藉由HPLC使用ÄKTA avant 25純化產物。

Kinetex 5 μ m C18 100 A 250 $\times$ 21.2 mm管柱體積(CV)88 ml。

溶劑A：0.5%乙酸於水中

溶劑B：0.5%乙酸於水/MeCN 4：6中

梯度：80% A 20% B至20% A 80% B，於10 CV中

【0401】凍乾產物後，將粉末溶解於2 ml三氟乙酸中。一小時後，溶液用稀碳酸氫鈉中和。將產物藉由HPLC純化，使用ÄKTA avant 25. Kinetex 5 μ m C18 100 A 250 $\times$ 21.2 mm。柱體積(CV) 88毫升。

溶劑A：0.5%乙酸於水中

溶劑B：0.5%乙酸於水/MeCN 4：6中

梯度：70% A 30% B至30% A 70% B，於8 CV中

【0402】在氯化鈉磷酸鹽緩衝液中用waters UPLC H-classs於214 nm下分析反應。

Waters BEH300 10 cm。

胰島素接合物滯留時間：5.121分鐘。

將溶液凍乾並提供所需產物。

63 mg 14%產率。

質譜：6453.9 g/mol。

【0403】對應製備黏合劑8、50及54與胰島素類似物41的接合物。

4. 分析數據

4.1 液相層析質譜(LCMS)分析

質譜法	方法說明	質譜類型
a	Waters SQD 單四極，質量 00-1400 的掃描時間為 0.13s	UPLC esi
b	Waters SQD 單四極，質量 100-1400 的掃描時間為 0.5s	UPLC esi

液相層析法	方法說明
A	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm MV Kit; H2O+0.05% TFA:MeCN+0.035% TFA 98:2(0min)至 98:2(0.2min)至 2:98(3.8min)至 2:98(4.3min)至 98:2(4.5min), 1 ml/min 55°C
B	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm; H2O+0.05% TFA:MeCN+0.035% TFA 95:5(0min)至 5:95(2min)至 5:95(2.6min)至 95:5(2.7min)至 95:5(3min), 0.9 ml/min 55°C
C	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm; H2O+0.05% TFA:MeCN+0.035% TFA 98:2(0min)至 98:2(0.2min)至 2:98(3.8min)至 2:98(4.3min)至 98:2(4.5min), 1 ml/min 55°C

4.2段中的表1顯示經分離黏合劑的LCMS分析結果。

4.2 分析白蛋白結合

儀器： 配備Waters Acquity光電二極體陣列檢測器的Waters Alliance 2795 / Waters PDA 2996或Waters H-Class UPLC

軟體： Waters Empower 3

管柱： CHIRALPAK® HSA 50 x 4 mm；5μm粒徑

Chiraltech訂購編號：HSA: 34712

溶析液A： pH = 7.4的磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)

Gibco PBS pH7.4(10x)磷酸鹽緩衝食鹽水500 ml；訂購編號：70011-036
(500 ml)

溶析液B：異丙醇

Fisher訂購編號：A461-1 (1L)

梯度

時間[分鐘]	%A	%B
0	98	2
2	98	2
17	60	40
22	60	40
22.2	98	2
30	98	2
31	95	5

管柱溫度：25℃

流速： 1.0 ml/min

偵測： $\lambda = 220\text{ nm}$

注射體積：20 μL

樣品濃度： • 關於胰島素樣品，1 mg/ml胰島素溶液於PBS中
• 5 μL 的10 mM DMSO儲備溶液(DMSO蒸發後再溶於200 μL 異丙醇/
水1：1 v/v中，用於分離的黏合劑樣品)(250 μM ，在800Da分子量
下為0.2mg/ml)

t0標記 硝酸鈉(NaNO_3)於水中的溶液，0.05 mg/ml是由1 mg/ml儲備水溶液
(Fluka訂購編號：74246-100ML)稀釋而來

回報值 樣品淨滯留時間：RetTime樣品-RetTime t0標記

【0404】 針對以下來進行親和力層析：i)在配備有Waters光電二極體陣列檢測器2996的Waters Alliance Separation Module 2695或配備有Waters Acquity光電二極體陣列檢測器的Waters H-Class UPLC上，依據實例3.3和3.4的胰島素接合物；以及ii)在配備有Waters光電二極體陣列檢測器2996的Waters Alliance Separation Module2795或配備有Waters Acquity光電二極體陣列檢測器的Waters H-Class UPLC上，依據實例2.11的經分離黏合劑。

【0405】 所有測量均使用Waters Empower 3作為數據處理軟體。

【0406】 具有固定型人類血清白蛋白的管柱(50 x 4mm；5μm粒徑)的管柱是購自於Chiralpak並用於分離。

【0407】 磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)是購自Gibco並用作為溶析液A，異丙醇是購自Fisher並用作溶析液B。

【0408】 下面顯示流速為1.0 ml/min的施用梯度：

時間[分]	%溶析液 A	%溶析液 B
0	98	2
2	98	2
17	60	40
22	60	40
22.2	98	2
30	98	2
31	95	5

【0409】 在LC運行期間，帶有固定型血清白蛋白的管柱保持於25℃下，在220 nm下進行UV偵測而注射體積為20 μL。

【0410】 樣品的淨滯留時間報導為
淨滯留時間=RetTime樣品-RetTime t0標記

【0411】 表1顯示經分離黏合劑的白蛋白結合結果，連同4.1段的LCMS數據一起。

【0412】 表1中使用的縮寫定義如下：

NRT： 帶有固定型人類血清白蛋白的管柱上的淨滯留時間

LCMS：液相層析質譜

MSM：質譜法

OIM： 觀察到的離子質量

OIT： 觀察到的離子類型

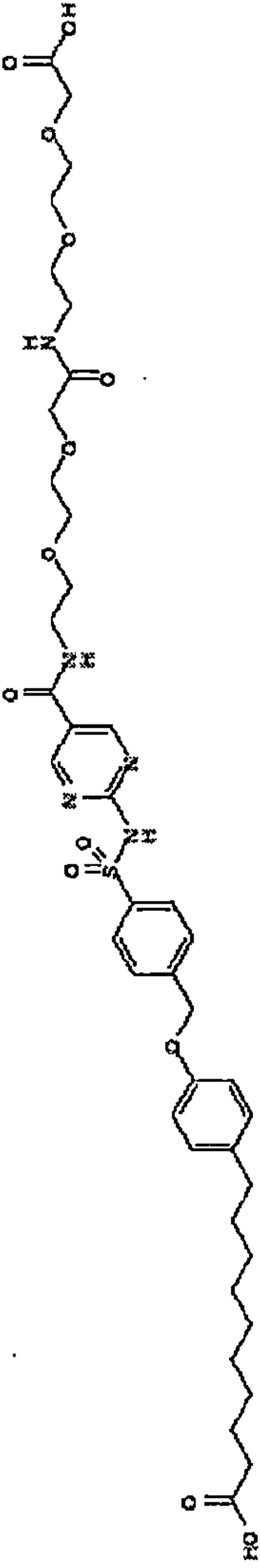
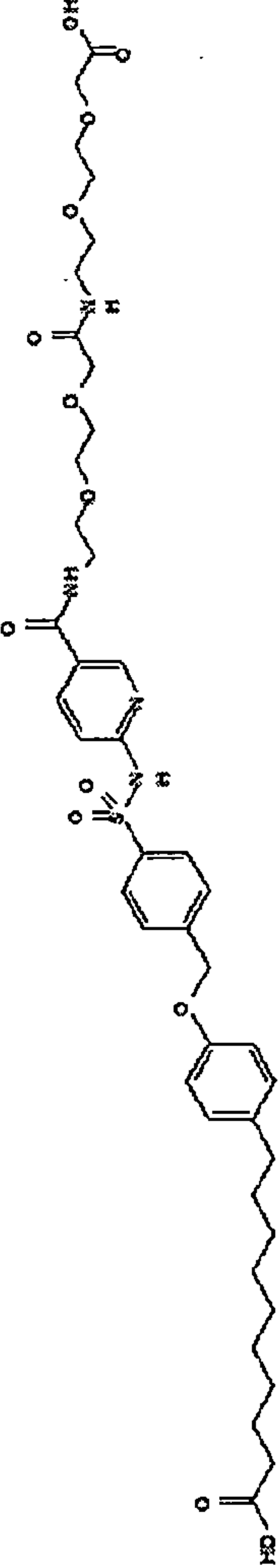
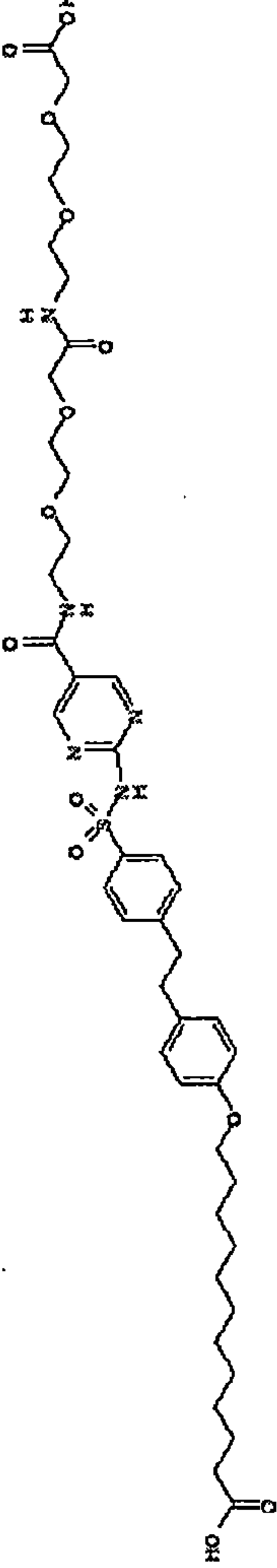
IM： 電離法

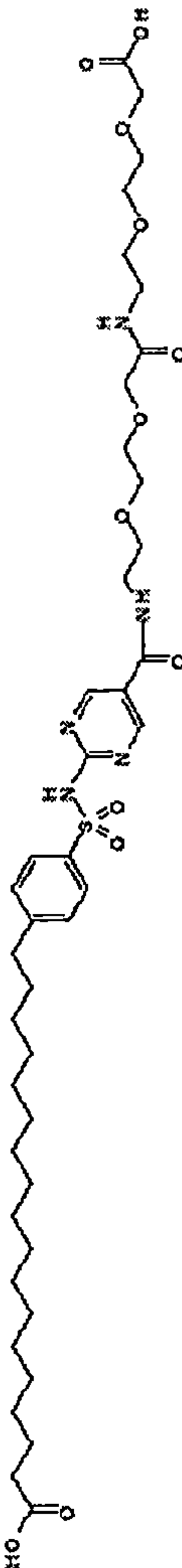
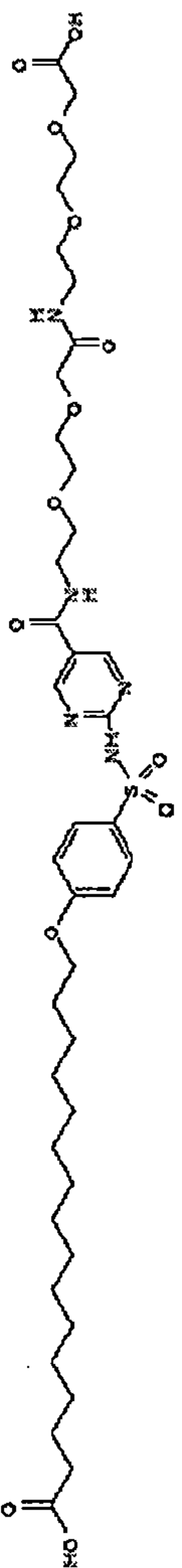
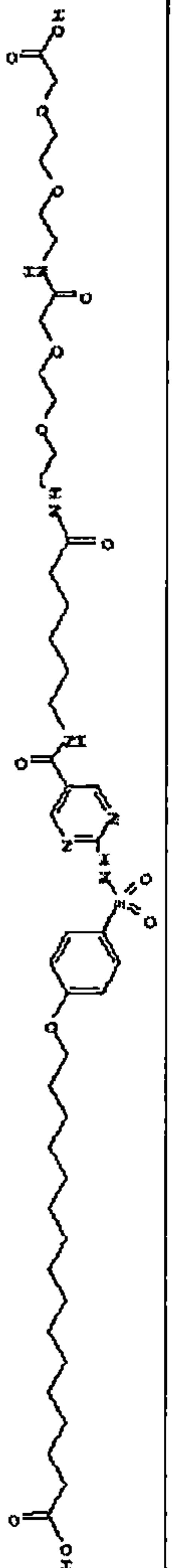
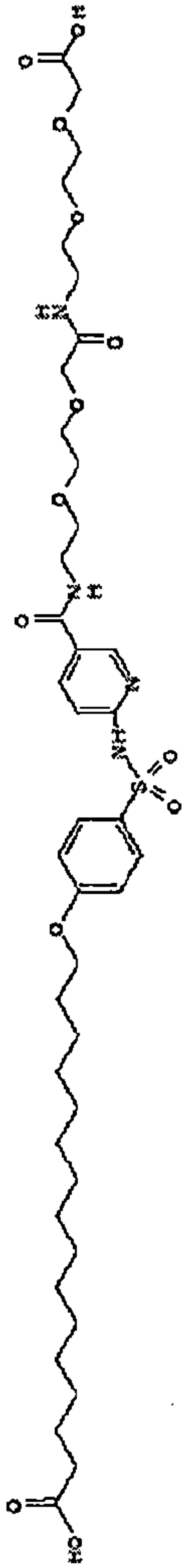
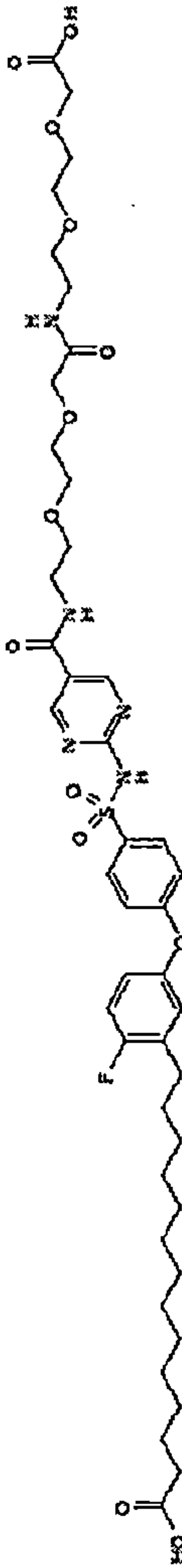
LCRT：液相色譜滯留時間

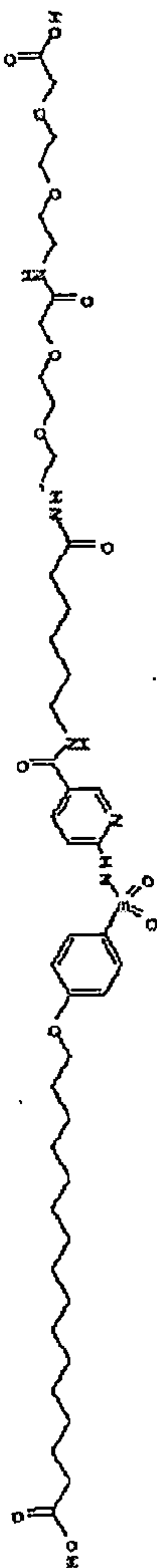
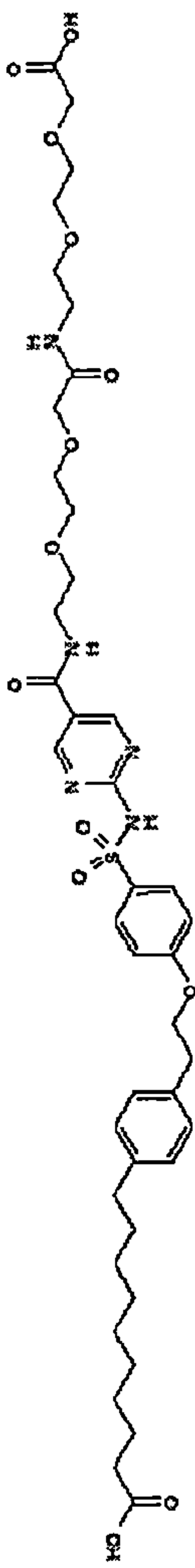
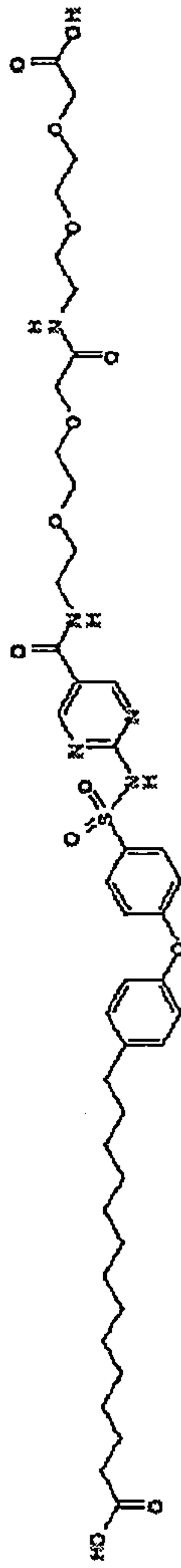
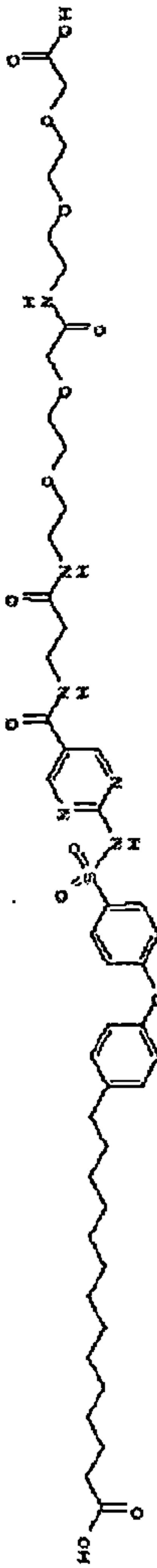
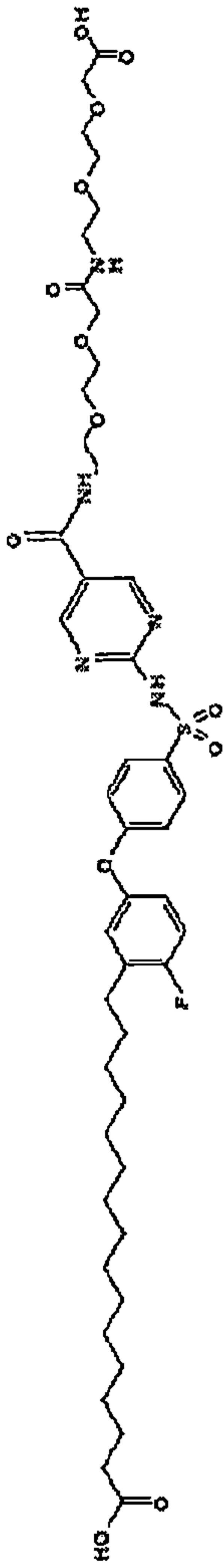
LCM：液相層析法

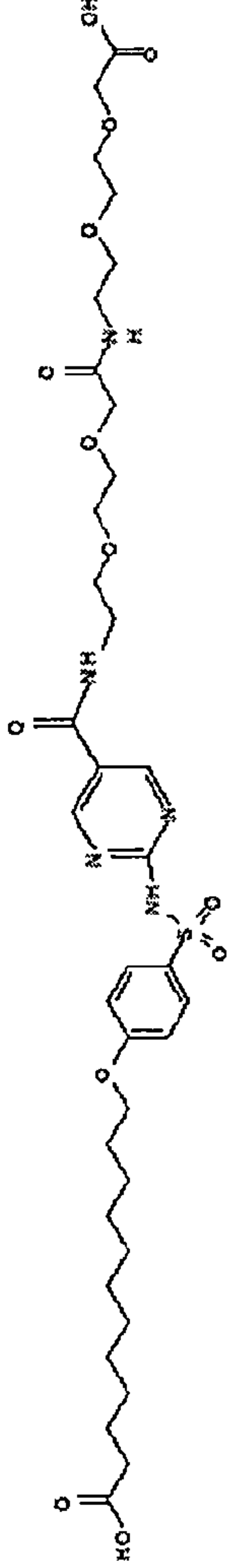
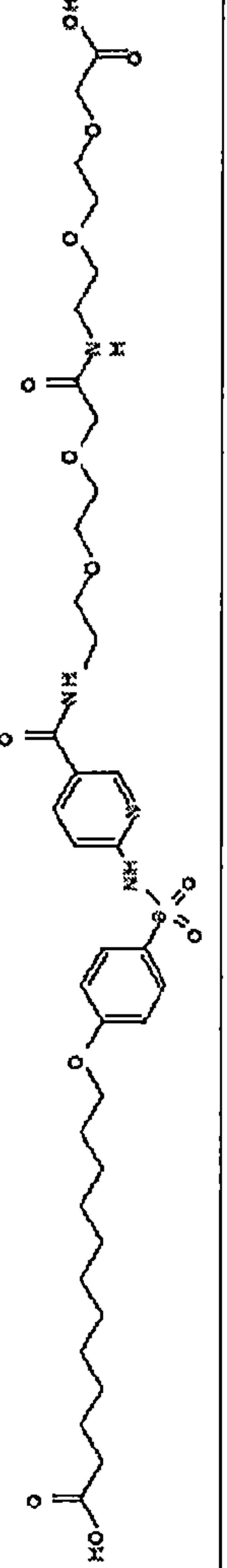
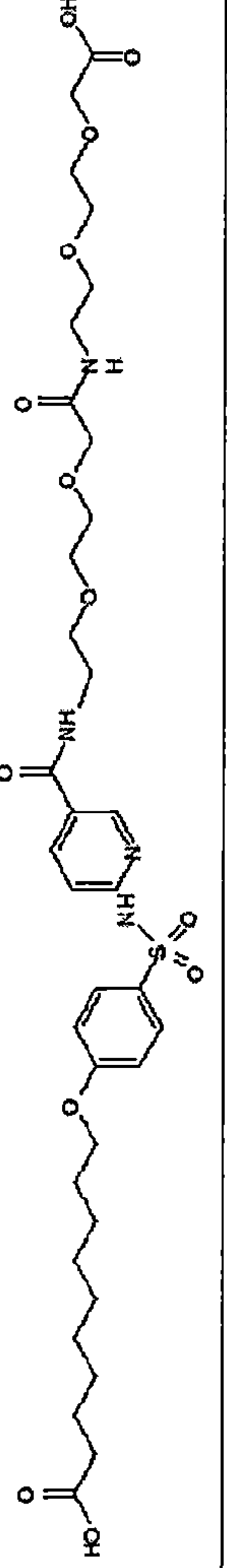
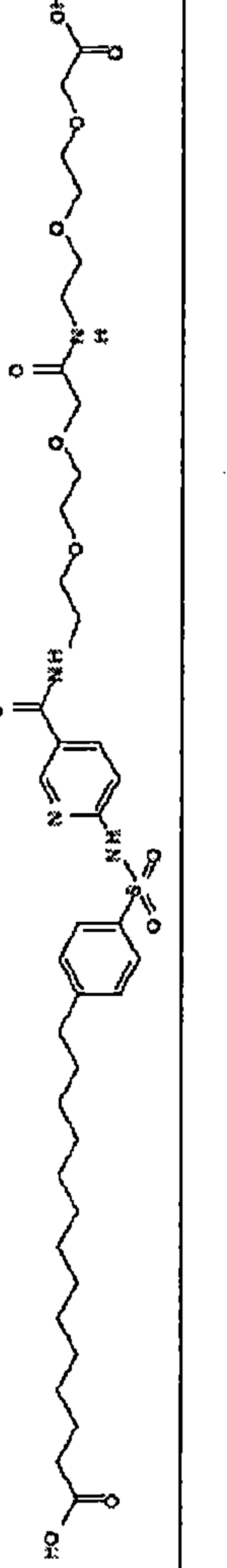
表1

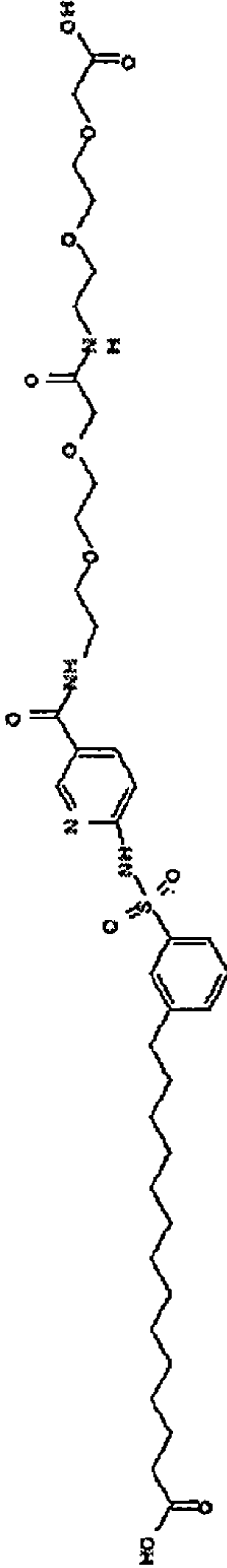
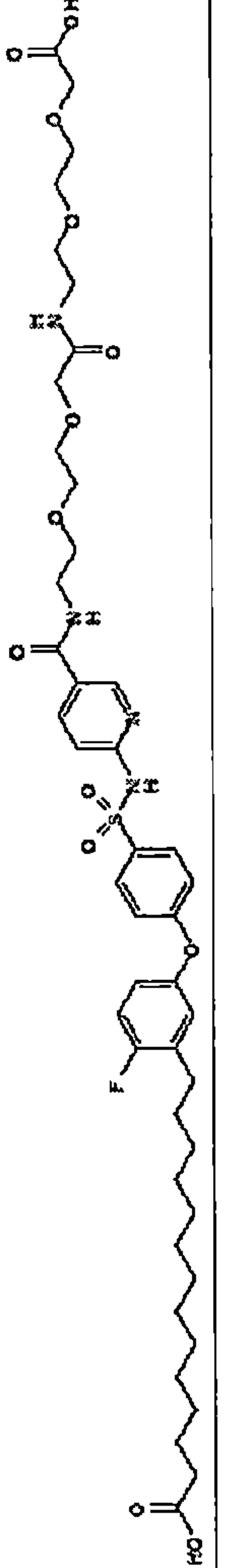
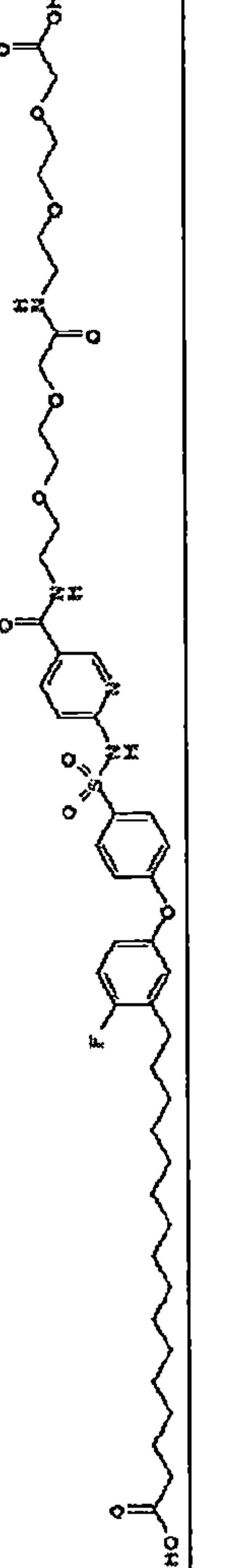
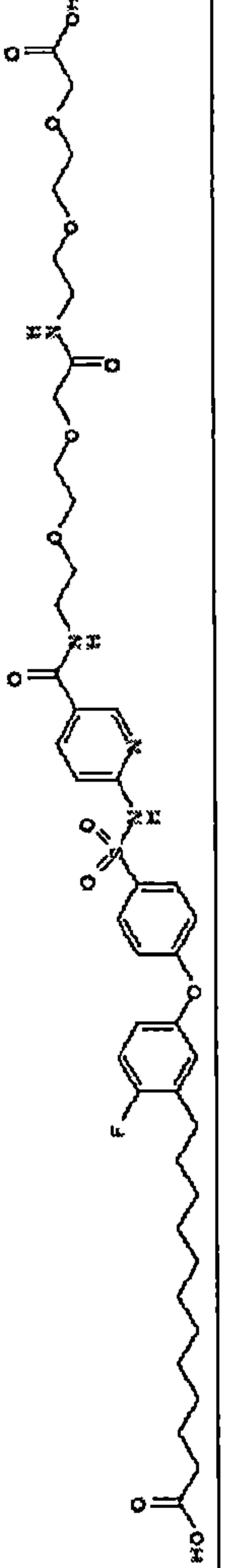
來自帶有固定型血清白蛋白之管柱的結果以及LCMS數據

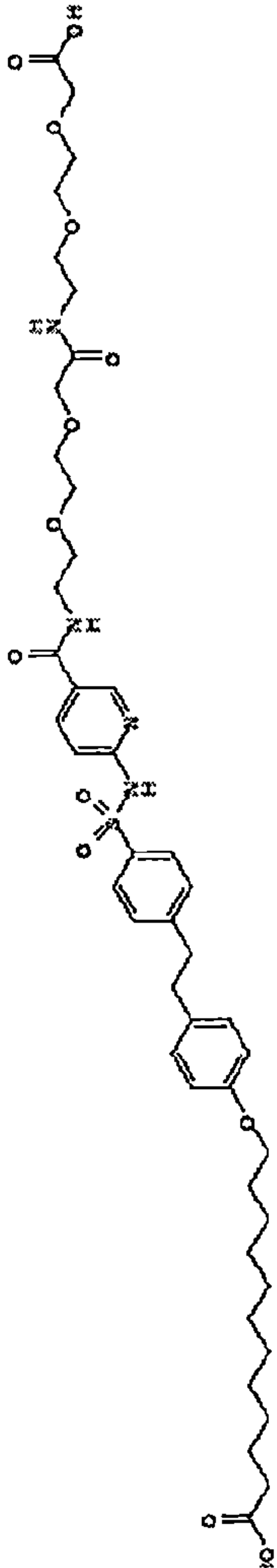
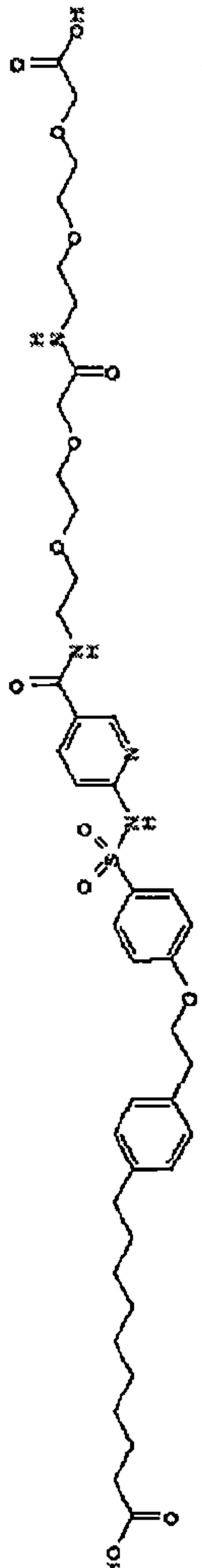
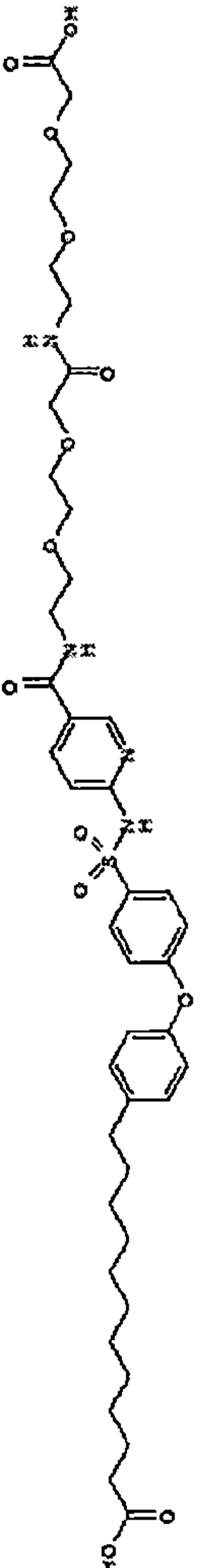
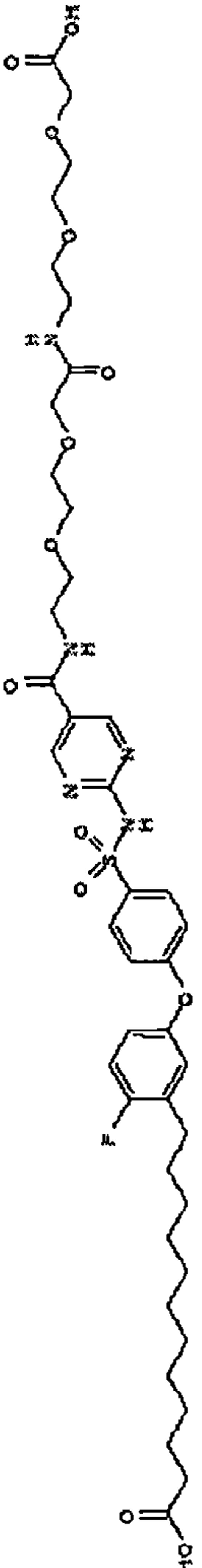
			LCMS					
編號	結構	NRT [min]	MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
1		16.76	b	846.37	[M+H] ⁺	ES ⁺	1.78	B
2		17.88	b	845.37	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.28	C
3		17.51	b	888.35	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.52	C

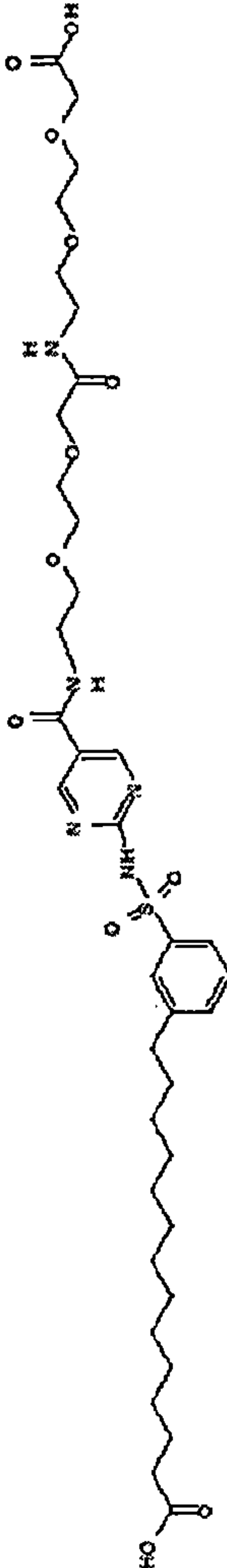
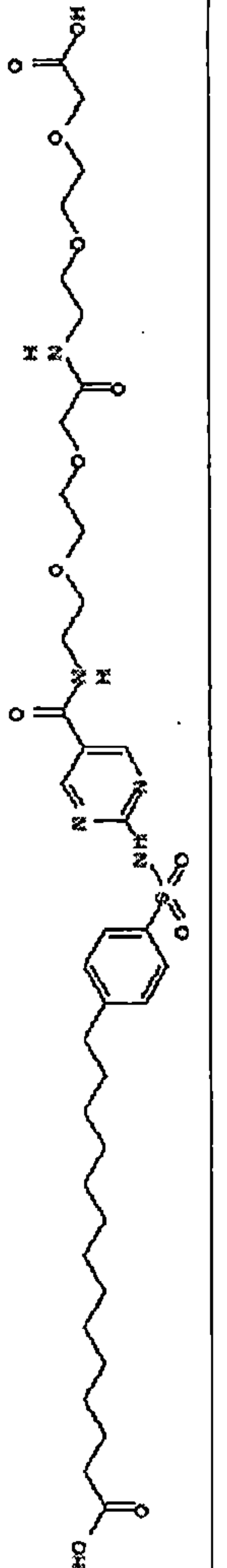
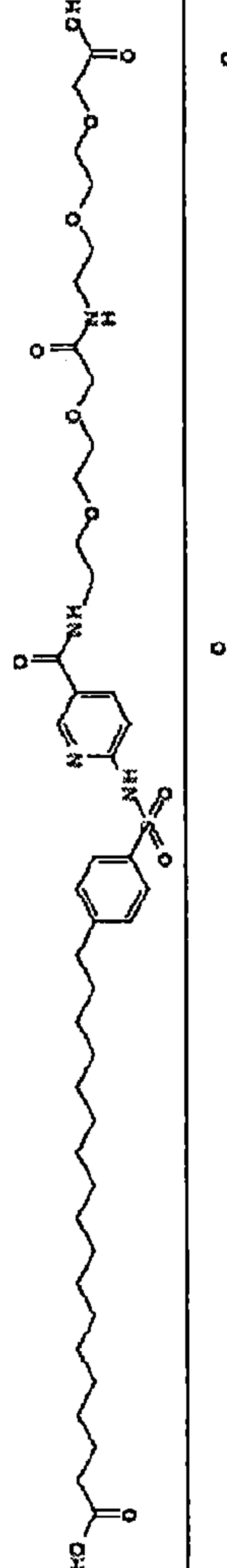
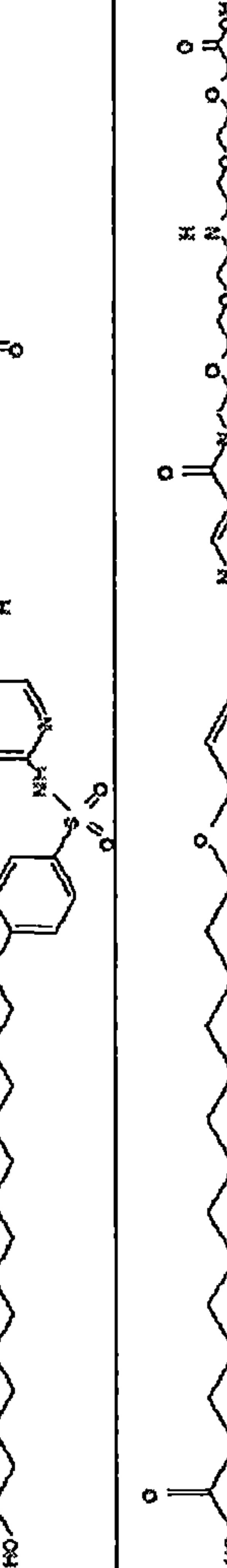
	編號	結構	NRT [min]	LCMS					
				MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
4			15.75	b	852.7	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.88	A
5			14.32	b	840.35	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.59	C
6			14.31	b	953.46	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.58	C
7			14.65	b	839.4	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.58	C
8			15.29	a	906.52	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.77	C

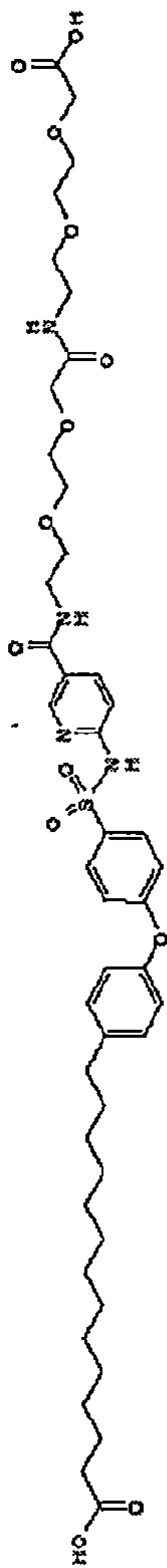
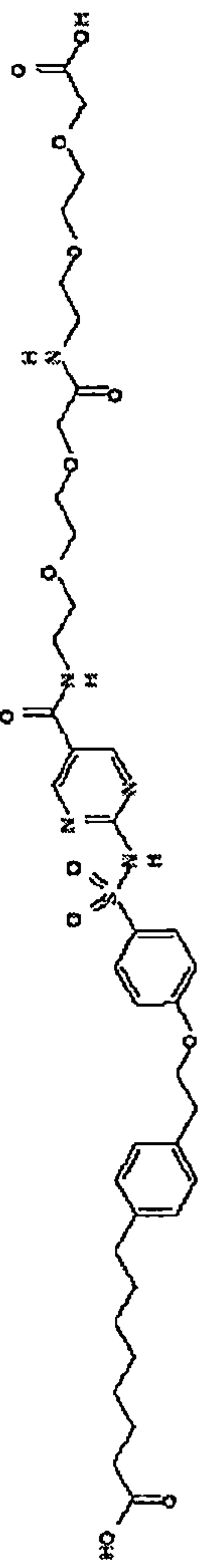
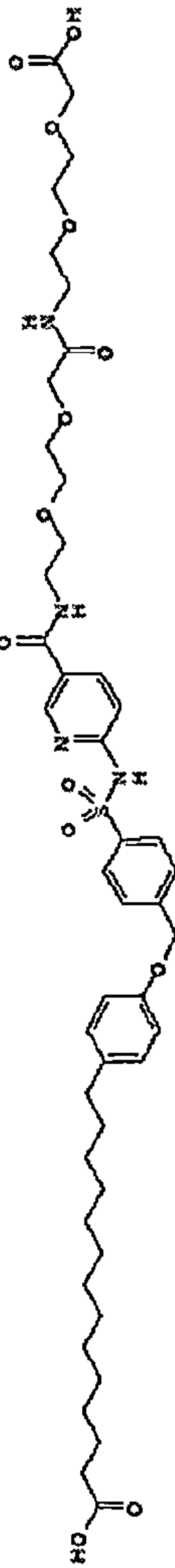
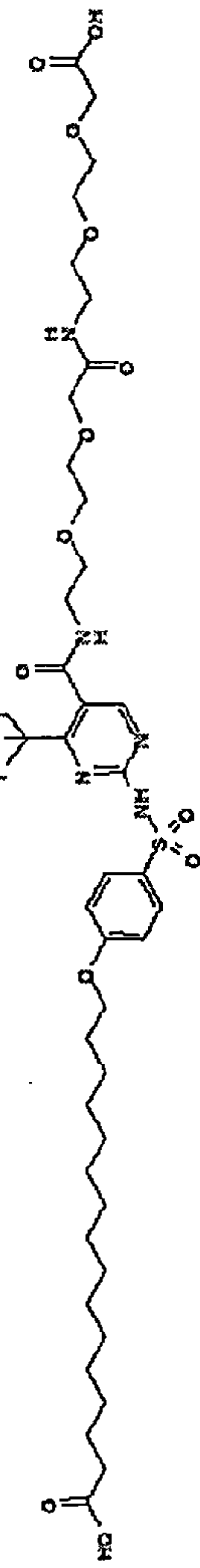
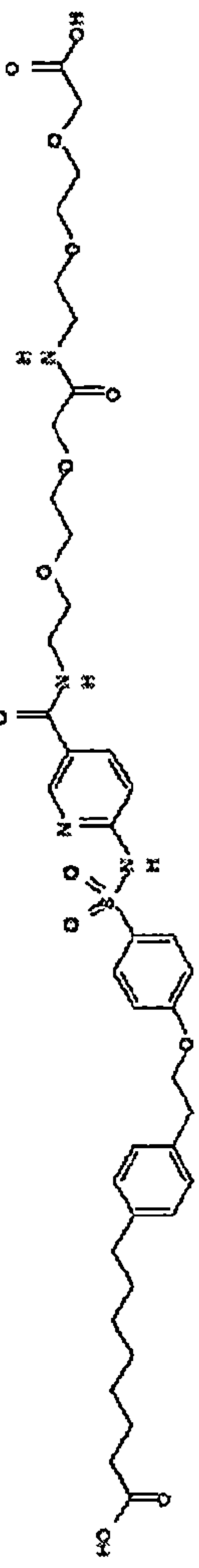
		LCMS						
		MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM	
編號	結構	NRT [min]	b	952.4	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.57	C
9		14.01	b	860.32	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.38	C
10		15.65	b	888.7	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.78	A
11		14.52	b	957.7	[M-H] ⁻	ES ⁻	2.73	A
12		14.95	b	934.78	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.99	A
13		15.29	b					

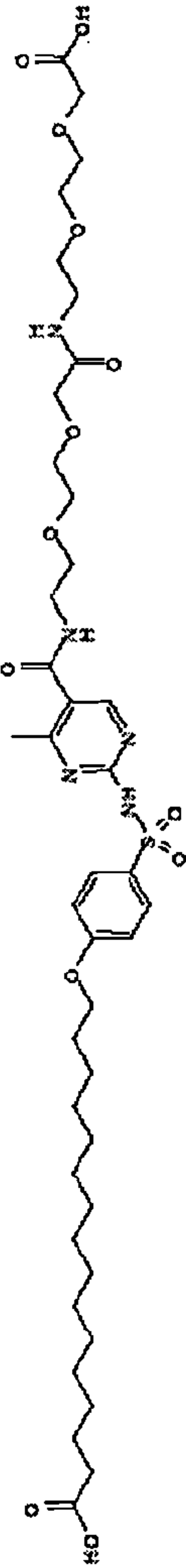
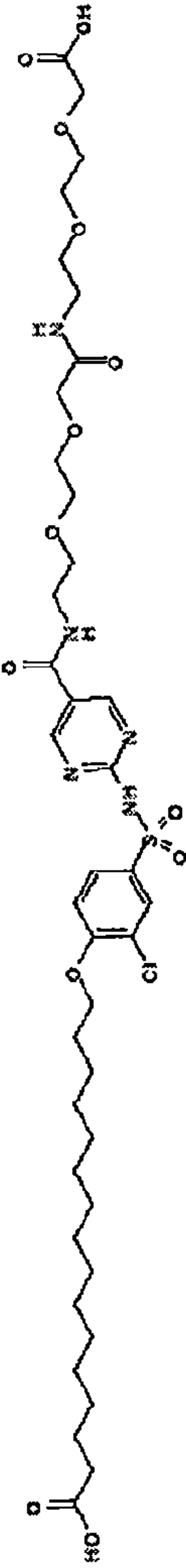
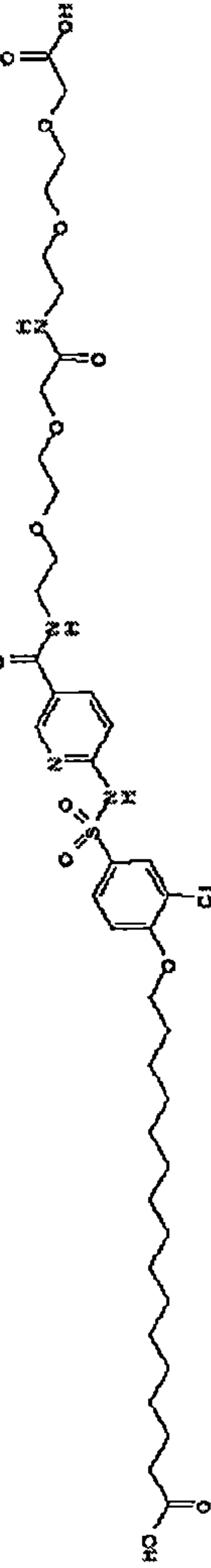
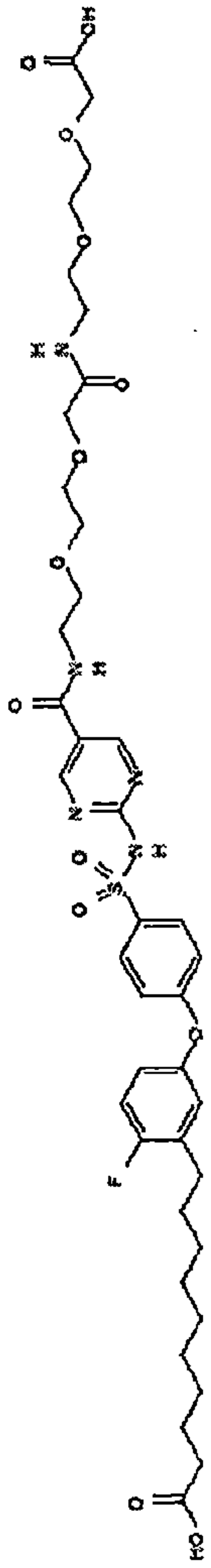
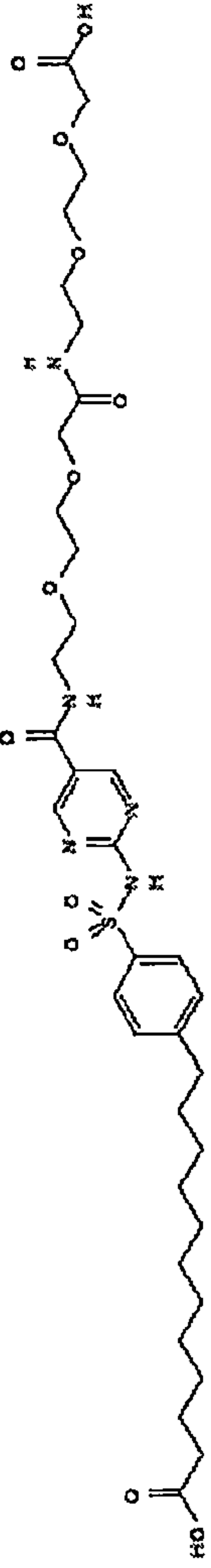
		結構	NRT [min]	LCMS					
				MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
16			11.88	a	784.28	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.14	C
18			12.37	a	783.34	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.13	C
19			10.82	a	755.28	[M+H] ⁺	ES ⁺	1.87	C
20			14.8	a	795.37	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.4	C

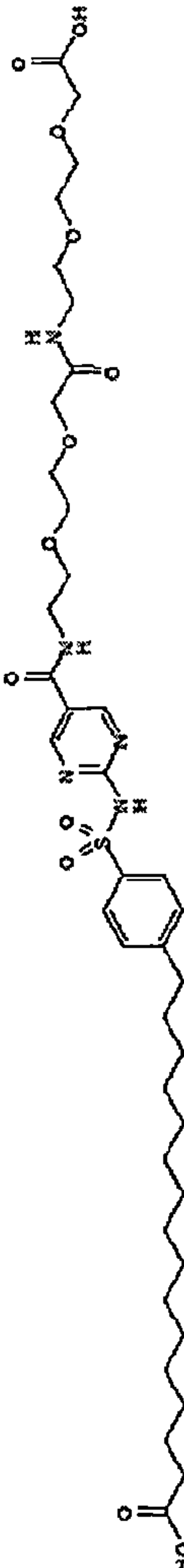
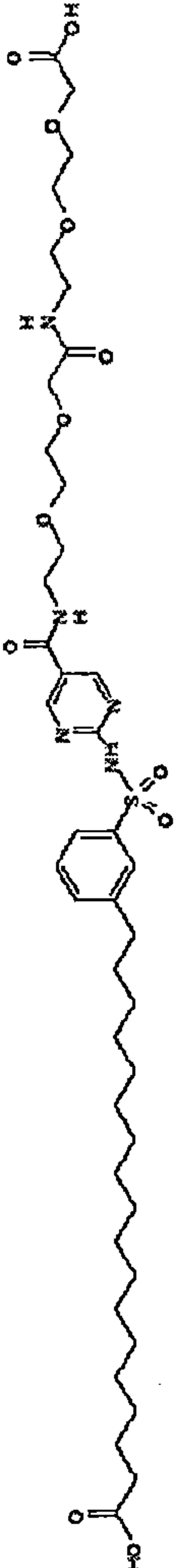
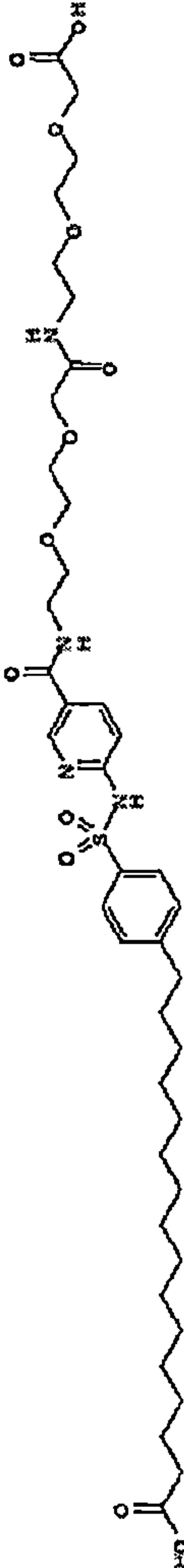
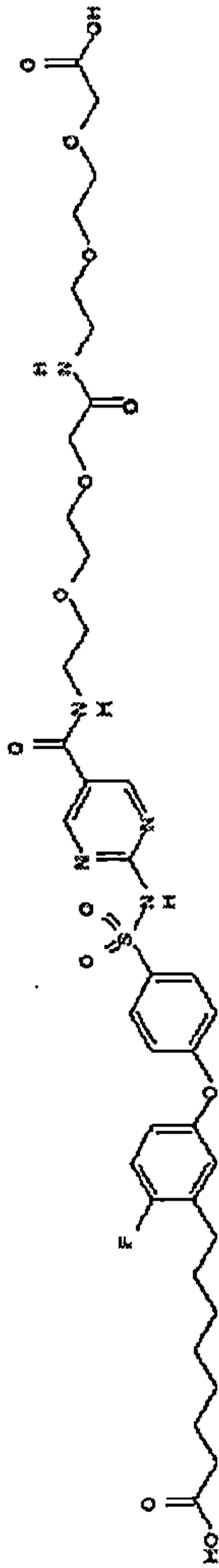
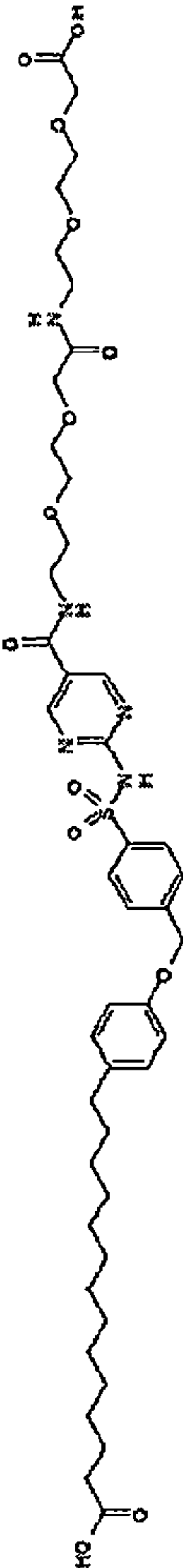
			LCMS					
編號	結構	NRT [min]	MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
21		16.26	a	795.37	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.38	C
22		15.55	a	905.47	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.77	C
23		15.61	a	933.54	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.99	C
24		15.76	a	877.44	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.55	C

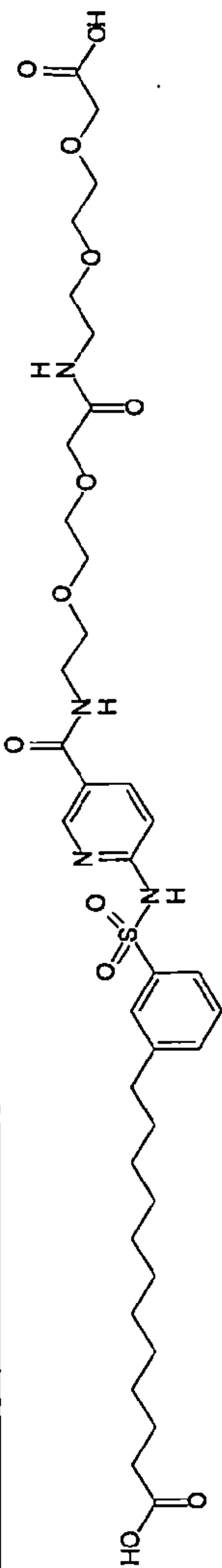
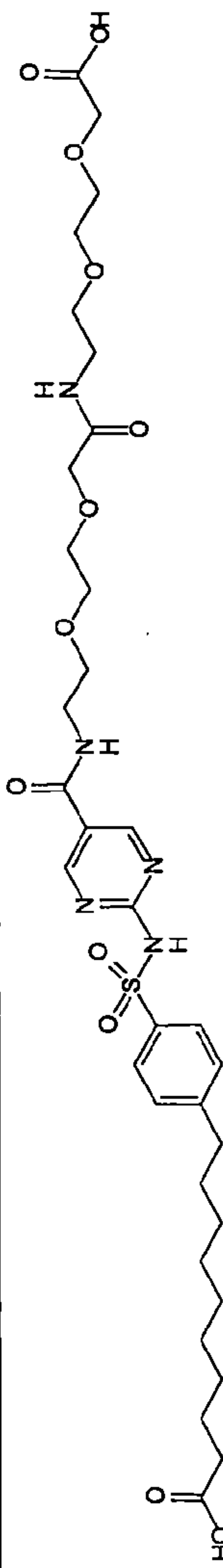
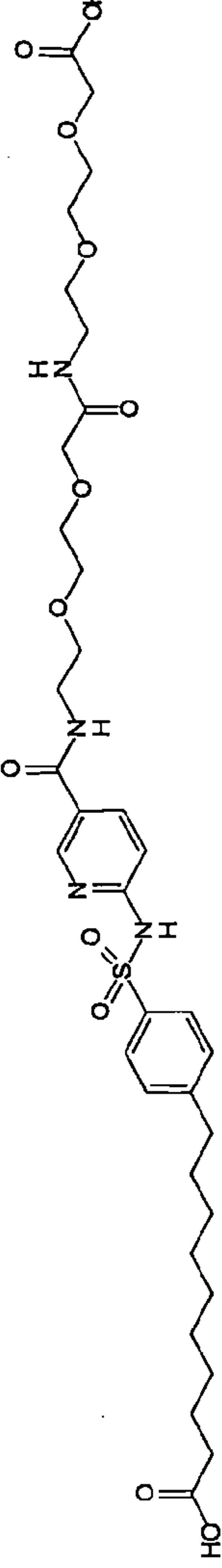
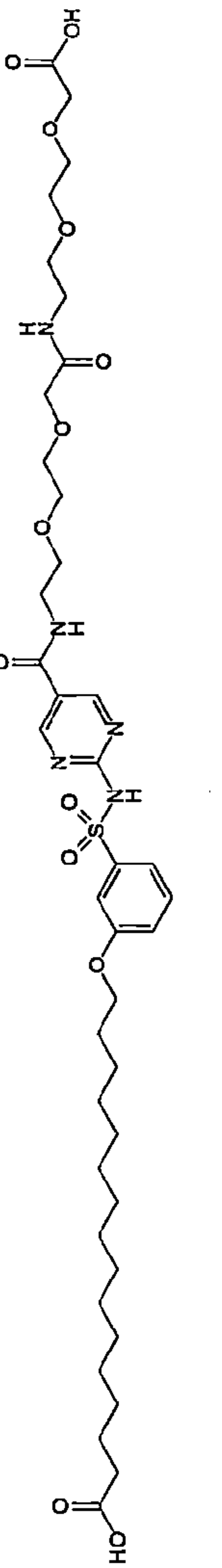
		LCMS							
編號	結構	NRT [min]	MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM	
25		17.48	a	887.49	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.54	C	
26		14.98	a	859.44	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.41	C	
27		15.01	a	859.45	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.55	C	
28		15.39	a	878.4	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.57	C	

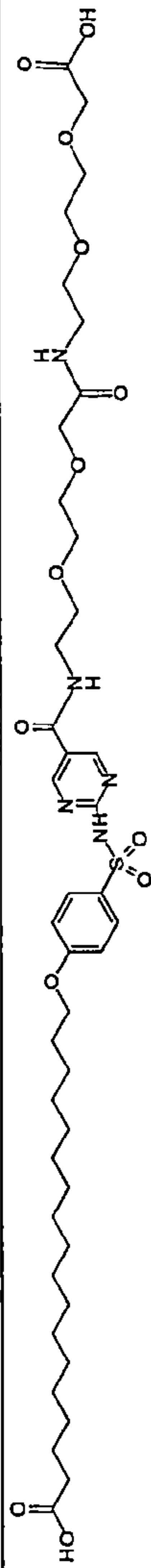
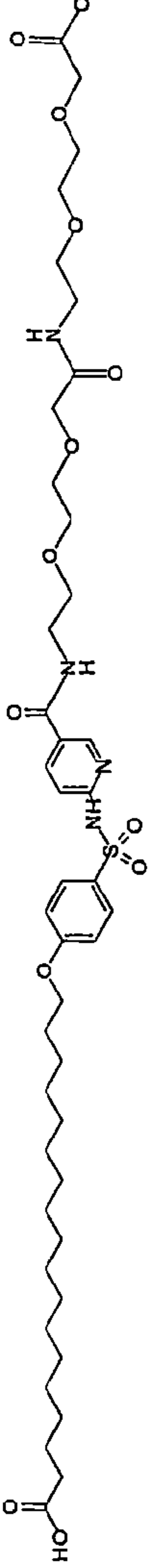
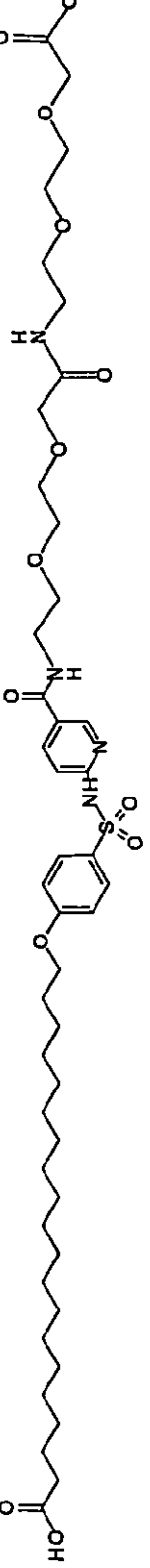
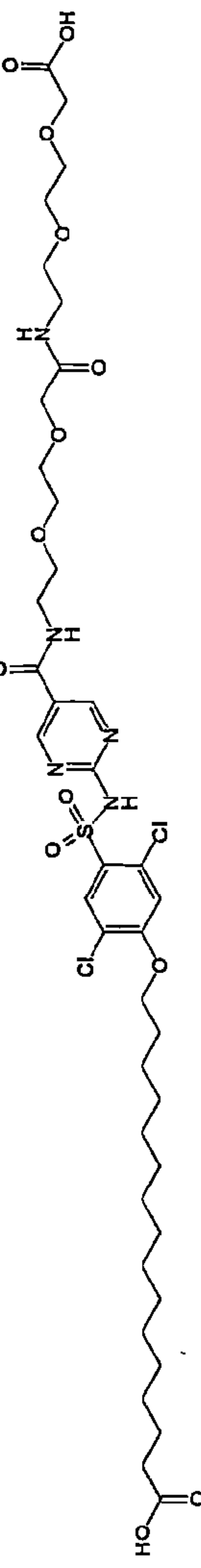
		LCMS						
編號	結構	NRT [min]	MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
29		15.66	a	796.4	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.39	C
30		14.36	a	796.44	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.41	C
31		15.77	a	851.51	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.88	C
32		13.9	a	811.29	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.36	C
33		13.57	a	812.23	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.37	C

		LCMS						
		NRT [min]	MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
編號	結構							
42		14.35	a	887.65	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.76	C
43		11.36	a	832.6	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.18	C
44		15.04	a	901.72	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.76	C
45		13.8	a	908.66	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.77	C
46		14.48	a	831.6	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.16	C

編號	結構	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OT	IM	LCRT[min]	LCM
47		13.73	a	854.7	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.63	C
50		13.74	a	874.6	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.7	C
51		13.59	a	871.6	[M-H] ⁻	ES ⁻	2.68	C
52		14.56	a	850.54	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.33	C
53		12.29	a	768.5	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.16	C

		LCMS							
編號	結構	NRT [min]	MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM	
54		15.19	a	824.61	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.64	C	
55		15.01	a	852.58	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.84	C	
59		15.47	a	821.62	[M-H] ⁻	ES ⁻	2.62	C	
63		13.42	a	822.52	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.11	C	
64		14.78	a	902.65	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.78	C	

		LCMS							
		LCRT[min]	IM	OIT	OIM	MSM	NRT [min]		
編號	結構	2.13	ES+	[M+H] ⁺	767.61	a	12.21		65
		1.92	ES+	[M+H] ⁺	740.57	a	9.87		66
		1.91	ES+	[M+H] ⁺	739.57	a	10.99		67
		2.60	ES+	[M+H] ⁺	840.57	a	14.74		68

		LCMS						
		NRT [min]	MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
編號	結構							
69		14.24	a	868.82	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.84	C
70		14.26	a	867.83	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.83	C
71		14.42	a	895.81	[M+H] ⁺	ES ⁺	3.06	C
72		13.96	a	908.79	[M+H] ⁺	ES ⁺	2.77	C

5 胰島素受體結合親和力

【0413】 如在Hartmann et al. (Effect of the long-acting insulin analogues glargine and degludec on cardiomyocyte cell signaling and function. Cardiovasc Diabetol. 2016;15:96)中所述，測定表2中所列之胰島素、胰島素類似物41以及對應接合物的胰島素受體結合親和力。如先前所述(Sommerfeld *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9540)進行胰島素受體嵌入質膜(M-IR)的分離以及競爭結合實驗。簡言之，收集過度表現IR的CHO細胞，然後將其再懸浮於冰冷的2.25 STM緩衝液(2.25 M蔗糖，5 mM Tris-HCl pH 7.4，5 mM MgCl₂，完全蛋白酶抑制劑)中，然後使用Dounce均質機透過超音波處理使其破裂。用0.8 STM緩衝液(0.8 M蔗糖，5 mM Tris-HCl pH 7.4，5 mM MgCl₂，完全蛋白酶抑制劑)覆蓋均質物，並在100,000g下超速離心90分鐘。收集界面處的質膜並用磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)洗滌兩次。將最終丸粒再懸浮於稀釋緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.4，5 mM MgCl₂，完全蛋白酶抑制劑)中，並再次用Dounce均質機予以均質。在96孔微量盤的結合緩衝液(50 mM Tris-HCl，150 mM NaCl，0.1% BSA，完全蛋白酶抑制劑，調整至pH 7.8)中進行競爭結合實驗。在各孔中，2 µg經分離的膜與0.25 mg小麥胚芽凝集素聚乙烯甲苯聚乙烯亞胺閃爍親近測定法(SPA)珠粒一起培育。在室溫(23°C)下，添加固定濃度的經[125I]標記的人類Ins (100 pM)與不同濃度的個別未標記的Ins (0.001–1000 nM)歷時12 h。在微量盤閃爍計數器(Wallac Microbeta, Freiburg, Germany)中於平衡狀態下測量放射性。

【0414】 表2中所示類似物相對於人類胰島素的胰島素受體結合親和力包含以下範圍：A (≥40%)；B (<20%)。接合物人類胰島素+黏合劑5號屬於A類，而所有其他接合物和胰島素類似物41則歸在B類。

表2

相對於人類胰島素的胰島素受體B結合親和力

黏合劑編號	骨架	活體外胰島素受體 B 活化
5	人類胰島素	A
5	胰島素類似物 41	B
8	胰島素類似物 41	B
50	胰島素類似物 41	B
54	胰島素類似物 41	B
---	胰島素類似物 41	B

6. 活體內測試-評估藥動學效用

【0415】 血糖正常的健康哥廷根小型豬(年齡8-11個月，體重約12-18公斤)被用來評估極長效胰島素類似物在動物體內的藥效學和藥動學效用。將豬飼養在標準的動物房舍條件下，每天餵食一次，可隨意獲得自來水。在禁食過夜後，將豬隻單次皮下注射含有安慰劑配方，胰島素或胰島素類似物或對應接合物的溶液。測試純人類胰島素和純胰島素類似物41以及黏合劑5號與人類胰島素的接合物，還有黏合劑5、50和54與胰島素類似物41的接合物。

【0416】 經由預先植入的中央靜脈導管進行採血，以便測定來自K-EDTA血漿的血糖，藥動學和額外生物標記。血液採樣在投與測試物(基線)之前開始，每天重複1-4次直到研究結束。在研究期間，在最後一個血液採樣日後餵食動物。對所有動物進行常規處理，並在治療當天記錄臨床徵象至少兩次，且在研究的其餘期間每天記錄一次。仔細監測動物的任何低血糖臨床徵象，包括行為、毛皮，尿液和糞便排泄，體孔狀況和任何疾病徵象。在嚴重低血糖的情況下，允許研究者提供食物或靜脈內輸注(iv)葡萄糖，以防無法進食。在最後一次血液採樣之後，將動物轉回至非GLP動物飼養設施。

【0417】 為了確定藥動學參數，使用以下實驗條件。

6.1 材料及化學品

【0418】 MeCN (hyperSolv chromanorm)、二甲亞砜(uvasol)、2-丙醇，甲醇(hyperSolv chromanorm)、水(hyperSolv chromanorm)、甲酸(98-100%)購自Merck (Darmstadt, Germany)。分析物與合宜的內部參考品是得自Sanofi。空白血漿(K2-EDTA作為抗凝劑)是得Seralab (West Sussex, UK)。

6.2 測試化合物以及內部標準品的儲備溶液與工作溶液

【0419】 在MeCN/水/甲酸(50：50：1，v/v/v)中以1 mg/ml的濃度製備測試化合物及其內部標準品的儲備溶液。在相同的溶劑中分別以100 µg/ml和1250 ng/ml的濃度製備測試化合物和對應內部標準品的工作溶液。

6.3 血漿樣品製備

【0420】 將25 µl的血漿部分加入10 µl內部標準品工作溶液(1250 ng/ml)到1.5 ml微量離心管中。密封並混合後，添加75 µl的MeCN/甲醇(80：20，v/v)並將樣品渦旋5秒且在約5°C和3000g下渦旋10分鐘。然後，將75 µl的上清液轉移到含有75 µl水的自動進樣器小瓶中。將小瓶密封，混合並進行分析。

6.4 LC-MS/MS分析

【0421】 完整胰島素的LC-MS/MS分析是在偶合至ABSciex QqQ API 4000質譜儀(Darmstadt, Germany)的Agilent 1290 Series HPLC (Waldbronn, Germany)上進行。在40°C下操作配備有Aeris PEPTIDE XB-C18分析管柱(100 x 2.1 mm，粒徑3.6 µm，Phenomenex)的LC。流動相A由水/甲酸/DMSO (100：0.1：1，v/v/v)組成，而流動相B由MeCN/甲酸/DMSO (100：0.1：1，v/v/v)組成。藉由將初始條件維持在2% B歷時0.5分鐘開始HPLC程式，然後在7.5分鐘內施加2% B至90% B的梯度並再次平衡管柱2分鐘。流速為600 µl/min且將40 µl的體積注入系統中。質譜儀在5500 V的離子噴霧電壓下以正模式運行，並且優化去簇電位以有效分離5倍質子化的分子。質譜儀以正模式運行，並優化了MS化合物特定參數以實現最佳靈敏度。氮用作為碰撞氣體。

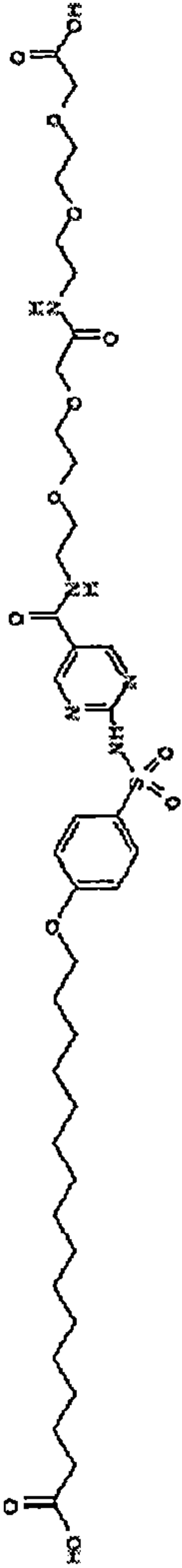
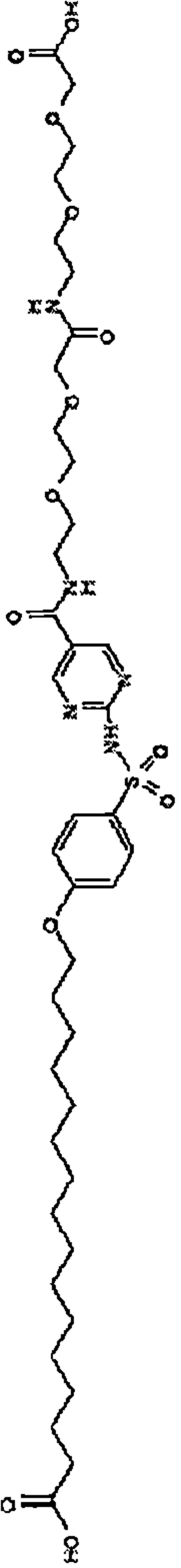
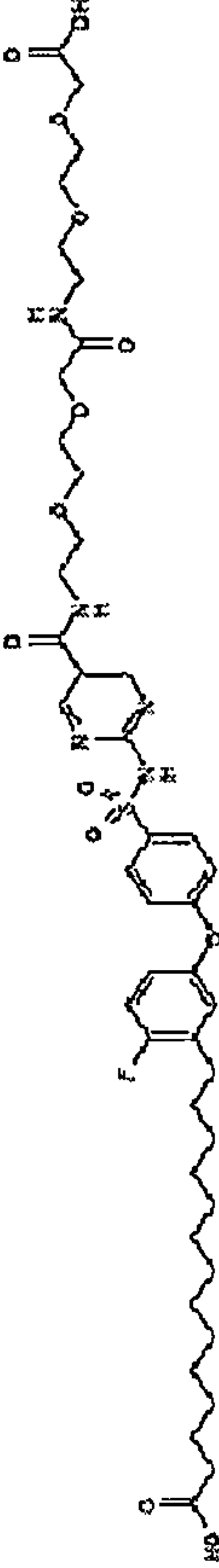
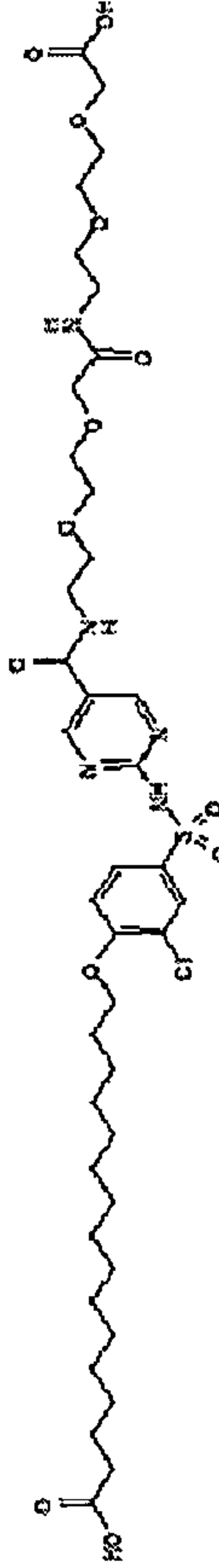
【0422】 藥動學(PK)參數半衰期($t_{1/2}$)和平均停留時間(MRT)顯示於表3中。

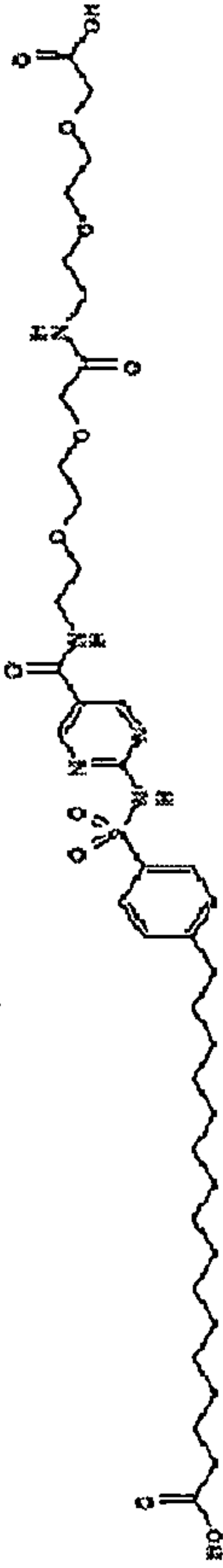
【0423】 關於人類胰島素，在慢性糖尿病猶卡坦小型豬(Yucatan minipig)中獲得文獻MRT值(Senshang Lin, Li-Lan H. Chen and Yie W. Chien, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1998, 286, 959-966)。依據教科書 Clinical Pharmacokinetics Concepts and applications by Tozer and Rowland, 3rd edition (Publisher Lippincott Williams & Wilkins), 1995- Section II-6)，所列 $t_{1/2}$ 已使用公式 $t_{1/2} * 1.44$ 被計算為近似值。

【0424】 可以看出，本發明之胰島素衍生物(在此是人類胰島素或胰島素類似物41)與黏合劑的接合對於所得接合物的PK (藥動學)性質具有顯著衝擊，在所有情況下均導致 $t_{1/2}$ 和MRT增加。

表3

純胰島素相對於接合物的藥動學結果

黏合劑 編號	黏合劑的結構	骨架	PK t _{1/2}	MRT
---	無黏合劑	人類胰島素	~2h**	2.8 h*
5		人類胰島素	30 h	47.2 h
5		胰島素類似物 41	37h	57.7 h
8		胰島素類似物 41	38h	63.3 h
50		胰島素類似物 41	52h	83 h

黏合劑 編號	黏合劑的結構	骨架	PK t _{1/2}	MRT
54		胰島素類似物 41	33h	56.5 h

* 來自：Senshang Lin, Li-Lan H. Chen and Yie W. Chien, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1998,

286, 959-966。

** 依據Clinical Pharmacokinetics Concepts and applications by Tozer and Rowland, 3rd edition (Publisher Lippincott Williams & Wilkins), 1995- Section II-6)從 $t_{1/2} = MRT / 1.44$ 計算。

【0425】 數種胰島素和接合物的藥效學效用顯示於圖1和2中，即描述在s.c. 投藥後對血糖的影響。數據證明，相較於胰島素類似物41和人類胰島素在測試劑量下觀察到的作用持續時間低於24 hr，經測試的所有胰島素-黏合劑接合物的作用持續時間均分別有顯著延長(>48 h)。就具有低胰島素受體結合親和力的測試胰島素接合物來說，所選定的活體內劑量要比對應的親本胰島素更高，未在更高的劑量下進行測試以避免低血糖效用。

實例7：生產人類胰島素及胰島素類似物

【0426】 人類胰島素以及胰島素類似物是以重組方式生產的。編碼前胰島素原的多核苷酸是自Genart[®]訂購。針對在酵母中表現來優化所設計的多核苷酸。透過經典限制性選殖將它們插入表現載體中，從而能夠在乳酸克魯維酵母(*Klyveromyces lactis* K)中進行功能性表現並分泌。作為分泌前導序列，該基因在C端融合至編碼釀酒酵母之 α 交配因子信號的DNA序列。重組基因表現受到乳糖誘導型乳酸克魯維酵母啟動子所控制。

【0427】 人類胰島素和胰島素類似物被製造為前胰島素原。使用經遺傳融合的N端序列前體來增進表現和分泌產量，並穩定培養液中的肽。各種各樣的序列可用於此目的，並針對效率而進行了測試。胰島素原本身由與C肽融合的B鏈和隨後的C端A鏈組成。作為C肽，描述了多種胺基酸組合。已顯示，具有1-10個胺基酸的短肽可以充分用作C序列。對於胰島素的後續加工，重要的是特異性蛋白酶的識別位點，該位點側接C肽以使其切除。

【0428】 藉由化學方式使得乳酸克魯維酵母細胞變成勝任的。隨後，用編碼對應前胰島素原的表現質體來轉形細胞。插入質體後，將細胞接種在含有遺傳黴素的選擇性瓊脂盤上。分離生長的菌落並測試重組基因表現。細胞在補充有遺傳黴素的酵母蛋白胰葡萄糖培養基中生長到足夠高的細胞密度。在初始生長期之後，將具有遺傳黴素的經鹽緩衝酵母萃取物培養基(補充有乳糖)添加至培

養物中，以誘導重組基因的表現。培養物生長數天，並藉由離心收取上清液。

【0429】藉由過濾程序開始純化功能性胰島素或胰島素類似物。用離子交換樹脂進行初步層析捕獲程序。利用高度特異性蛋白酶將前胰島素原裂解為胰島素。透過兩個額外層析步驟的級聯，完成了宿主細胞蛋白質，序列前體和產物相關產物的消耗。在疏水交互作用層析之後，施用另一種離子交換程序來實現這個目標。藉由逆相層析進行最終優化。過濾，沉澱和冷凍乾燥被用來完成胰島素分子的生產過程。

【0430】與經活化羧酸衍生物的偶合反應後，過濾帶有接合胰島素分子的溶液。藉由逆相層析進行最終純化。過濾，沉澱和冷凍乾燥被用來完成目標分子的合成。

【0431】產生了例如在位置B16，B25及/或A14處帶有突變的各種胰島素類似物。表4提供所產生的胰島素的概述。

表4：所產生的人類胰島素的類似物

類似物	骨架	A14	B16	B25	胺基酸序列 A 鏈	SEQ ID NO (A 鏈)	胺基酸序列 B 鏈	SEQ ID NO (B-鏈)
WT	人類胰島素 (野生型)	Tyr	Tyr	Phe	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	1	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF YTPKT	2
2	Glu(A14)Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	Phe	GIVEQCCTSI ^{CS} LEQLEN YCN	3	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF YTPK	4
3	Leu(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	Leu	Phe	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	5	FVNQHLCGSHLVEALLVCGERGFFY TPK	6
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	Trp	Phe	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCG	7	FVNQHLCGSHLVEALWLVCGERGFF YTPK	8
5	His(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	His	Phe	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	9	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFF YTPK	10
6	Val(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	Val	Phe	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	11	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFF YTPK	12
7	Ala(B25)-胰島素	Tyr	Tyr	Ala	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	13	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFA YTPKT	14
8	Ala(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Ala	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	15	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFA YTPK	16
9	Glu(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Glu	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	17	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFE YTPK	18
10	His(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	His	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	19	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFH YTPK	20
11	Leu(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Leu	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	21	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFL YTPK	22
12	Val(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Val	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN YCN	23	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFV YTPK	24
13	His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	His	His	GIVEQCCTSI ^{CS} LYQLEN	25	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFH	26

28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	His	His	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	55	FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFH YTPK	56
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Ile	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	57	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIY TPK	58
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Ile	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	59	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYT PK	60
31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Trp	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	61	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFWY TPK	62
32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Val	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	63	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVY TPK	64
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Val	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	65	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVY TPK	66
34	Glu(A14)Leu(B16)Ala(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Leu	Ala	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	67	FVNQHLCGSHLVEALLVCGERGFA YTPK	68
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Ile	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	69	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIY TPK	70
36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Trp	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	71	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFW YTPK	72
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Trp	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	73	FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFW YTPK	74
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Val	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	75	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFV YTPK	76
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Val	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	77	FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFV YTPK	78
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Val	GIVEQCCTSIQSLEQLEN	79	FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFV YTPK	80

實例8：胰島素受體結合親和力分析/胰島素受體自磷酸化分析

【0432】 藉由結合分析和受體自磷酸化分析來測定各種產生的胰島素類似物的胰島素結合和信號轉導。

A) 胰島素受體結合親和力分析

【0433】 如Hartmann *et al.* (Effect of the long-acting insulin analogs glargine and degludec on cardiomyocyte cell signaling and function. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:96)中所述，針對表4中所列之類似物測試胰島素受體結合親和力。如先前所述(Sommerfeld *et al.*, *PLoS One.* 2010; 5(3): e9540)進行胰島素受體嵌入質膜(M-IR)的分離和競爭結合實驗。簡言之，收集過度表現IR的CHO細胞，然後將其再懸浮於冰冷的2.25 STM緩衝液(2.25 M蔗糖，5 mM Tris-HCl pH 7.4，5 mM MgCl₂，完全蛋白酶抑制劑)中，然後使用Dounce均質機透過超音波處理使其破裂。用0.8 STM緩衝液(0.8 M蔗糖，5 mM Tris-HCl pH 7.4，5 mM MgCl₂，完全蛋白酶抑制劑)覆蓋均質物，並在100,000g下超速離心90分鐘。收集界面處的質膜並用磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)洗滌兩次。將最終九粒再懸浮於稀釋緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.4，5 mM MgCl₂，完全蛋白酶抑制劑)中，並再次用Dounce均質機予以均質。在96孔微量盤的結合緩衝液(50 mM Tris-HCl，150 mM NaCl，0.1% BSA，完全蛋白酶抑制劑，調整至pH 7.8)中進行競爭結合實驗。在各孔中，2 µg經分離的膜與0.25 mg小麥胚芽凝集素聚乙烯甲苯聚乙烯亞胺閃爍親近測定法(SPA)珠粒一起培育。在室溫(23°C)下，添加固定濃度的經[125I]標記的人類胰島素(100 pM)與不同濃度的個別未標記的胰島素(0.001–1000 nM)歷時12 h。在微量盤閃爍計數器(Wallac Microbeta, Freiburg, Germany)中於平衡狀態下測量放射性。

【0434】 相對於人類胰島素，針對測試類似物的胰島素受體結合親和力分析結果顯示於表5中。

B) 胰島素受體自磷酸化分析(作為信號轉導的量度)

【0435】 為了測定結合至胰島素受體B之胰島素類似物的信號轉導，在活體外測量自磷酸化。

【0436】 如先前所述(Sommerfeld *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9540)，使用In-Cell Western技術將表現人類胰島素受體同功型B (IR-B)的CHO細胞用於IR自磷酸化分析。關於分析IGF1R自磷酸化，在小鼠胚胎纖維母細胞3T3 Tet off細胞株(BD Bioscience, Heidelberg, Germany)中過度表現受體，該細胞株已用IGF1R四環素可調節表現質體穩定轉染。為了測定受體酪胺酸磷酸化水平，將細胞植入到96孔板中並生長44小時。用無血清培養基Ham's F12培養基(Life Technologies, Darmstadt, Germany)使細胞血清飢餓2小時。隨後在37°C下用濃度遞增的人類胰島素或胰島素類似物處理細胞歷時20分鐘。培育後，丟棄培養基，並將細胞固定在3.75%新鮮製備的聚甲醛中歷時20分鐘。用PBS中的0.1% Triton X-100使細胞通透歷時20分鐘。用Odyssey阻斷緩衝液(LICOR, Bad Homburg, Germany)在室溫下進行阻斷歷時1小時。在室溫下培育抗pTyr 4G10 (Millipore, Schwarbach, Germany)歷時2小時。一級抗體培育後，將細胞用PBS + 0.1%Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)洗滌。培育抗小鼠IgG-800-CW二級抗體((LICOR, Bad Homburg, Germany)歷時1小時。藉由使用TO-PRO3染料(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)量化DNA來將結果正規化。數據以相對單位(RU)的形式獲得。

【0437】 相對於人類胰島素，針對測試類似物的胰島素受體自磷酸化分析結果顯示於表5中。

表5：測試之人類胰島素類似物的相對胰島素受體結合親和力及自磷酸化活性(關於序列，請參見表4)

類 似 物	骨架	A14	B16	B25	胰島素受體 結合親和力 *	自 磷 酸 化 活性*

WT	人類胰島素 (野生型)	Tyr	Tyr	Phe	1	1
2	Glu(A14)Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	Phe	1.05	0.87
3	Leu(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	Leu	Phe	0.24	0.34
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	Trp	Phe	0.57	0.4
5	His(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	His	Phe	nd	nd
6	Val(B16)Des(B30)-胰島素	Tyr	Val	Phe	nd	0.32
7	Ala(B25)-胰島素	Tyr	Tyr	Ala	0.05	0.2
8	Ala(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Ala	nd	0.17
9	Glu(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Glu	nd	nd
10	His(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	His	0.37	0.31
11	Leu(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Leu	0.01	0.06
12	Val(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Val	0.01	0.06
13	His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	His	His	0.11	0.1
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Trp	His	0.4	0.35
15	Gly(A21)Trp(B16)Trp(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Trp	Trp	0.43	0.38
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)-胰島素	Glu	His	Phe	0.36	0.29
17	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)- 胰 島 素	Glu	Trp	Phe	0.63	0.38
18	Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Phe	0.23	0.18
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Phe	nd	0.32
20	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Phe	0.4	0.28
21	Glu(A14)His(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	His	nd	nd
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	Ile	0.01	0.04
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25)Des(B30)- 胰 島 素	Glu	Tyr	Trp	0.56	0.37
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	Val	0.01	0.04
25	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	Val	0.02	0.03
26	Glu(A14)Glu(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Glu	His	0.01	0.07
27	Glu(A14)His(B16)Ala(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	His	Ala		0.11
28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	His	His	0.12	0.11
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Ile		0.01
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Ile	0**	0.01
31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Trp	0.12	0.13

32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Val	0	0.04
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Ile	Val	0.01	0.02
34	Glu(A14)Leu(B16)Ala(B25)Des(B30)- 胰 島 素	Glu	Leu	Ala	0.01	0.04
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Ile	0	0.01
36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Trp	0.17	0.23
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Trp	0.21	0.19
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Val	0	0.03
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Val	0	0.02
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	Glu	Val	Val	0.01	0.01

* 相對於人類胰島素，nd：未測定

** 數值為0表示結合親和力低於偵測極限。

C) 結論

【0438】 如從表5可推知，測試在位置B16及/或B25處的各種疏水性取代(色胺酸、丙胺酸、纈胺酸，白胺酸和異白胺酸)。儘管程度有所不同，但在這些位置處帶有疏水性取代的所有測試胰島素類似物均顯示胰島素受體結合活性降低。與色胺酸取代相比(參見類似物4、15和23)，用脂族胺基酸(諸如丙胺酸、纈胺酸，白胺酸和異白胺酸)取代對胰島素受體結合活性具有更強的影響。觀察到纈胺酸，白胺酸和異白胺酸的影響最為強烈，其全都是支鏈胺基酸。用異白胺酸，纈胺酸和白胺酸取代可導致胰島素受體結合活性顯著降低。有趣的是，在位置B25處帶有這些取代的胰島素類似物(諸如在位置B25處的纈胺酸，白胺酸或異白胺酸取代，類似物11、12、22、24、25、29、30、32、33、35、38、39、40)顯示出信號轉導比依據其IR-B結合親和力所預期增加至高6倍。具體而言，相對於人類胰島素，Leu(B25)Des(B30)-胰島素和Val(B25)Des(B30)-胰島素(分別為

類似物11和12)顯示出與胰島素受體B結合僅有1%而自磷酸化為6%。類似地，在位置B16處的單一白胺酸取代(類似物3)也顯示出在信號轉導有類似的增強，儘管程度略低。透過比較，除了類似物26以外，帶有組胺酸B25取代的類似物(類似物10、13、14、21、28)也顯示出受體結合降低，但是伴隨著自磷酸化降低。

【0439】 在某些情況下(類似物30、32、35、38、39)，胰島素受體結合為0%，同時自磷酸化分析中仍顯示有活性。所有這些類似物在位置B16和B25處共同具有纈胺酸及/或異白胺酸取代的組合，這表明該組合是胰島素受體結合進一步下降的主因。與自磷酸化值相比，在位置B25處沒有取代但在位置B16處有交換的胰島素顯示結合親和力略高(類似物3、4、16、17、18、19、20)。

【0440】 在位置B25中的丙胺酸顯示出與纈胺酸、白胺酸或異白胺酸取代(類似物11、12、22)有類似的作用，儘管程度較低。帶有纈胺酸、白胺酸或異白胺酸取代之類似物的受體結合親和力和自磷酸化活性比帶有丙胺酸取代之類似物還低。

實例9：在不同重組蛋白酶及模擬胃液中測定活體外穩定性

【0441】 針對蛋白水解穩定性(α -胰凝乳蛋白酶、組織蛋白酶D、胰島素降解酶(IDE)和模擬胃液)測試所產生的胰島素類似物。

A) 分析條件

蛋白酶	在分析中的最終蛋白酶濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	所使用的緩衝系統
胰蛋白酶	2	0.1 M 碳酸氫銨，pH 8.3
α -胰凝乳蛋白酶	0.5	0.1 M 碳酸氫銨，pH 8.3
羧肽酶 A	0.1	以胰蛋白酶在 TCNB-緩衝液中預活化(60分鐘)，分析 Tris-Puffer 7.5
羧肽酶 B	0.1	以胰蛋白酶在 TCNB-緩衝液中預活化(30分鐘)前，分析 Tris-緩衝液 7.5
組織蛋白酶 D	2	乙酸鹽緩衝液，pH 4.5
IDE	2	Tris-緩衝液 pH 7.5

B) 製備模擬胃液

【0442】 兩公克氯化鈉和3.2 g的經純化胃蛋白酶(來自豬胃黏膜，每mg蛋白質有800至2500單位的活性)溶解於7.0 ml鹽酸中。用水將體積調整至1000 ml。混合所得溶液，並用0.2 N氫氧化鈉或0.2 N鹽酸將pH調整為 1.2 ± 0.1 。

C) 一般性分析程序

【0443】 使用適當的時間點(對於SIF和SGF為15、30、60、120和240分鐘；對於蛋白酶為15、30、60和120分鐘)進行穩定性測定。在37°C下培育，並參考T0時間點來計算剩餘的親本化合物%。

【0444】 關於親本化合物的測定，在用乙醇(1當量v/v)沉澱蛋白質以及一個離心步驟之後，使用適當的生物分析LC-MS/MS或LC-HRMS方法。

D) 製備樣品

【0445】 將化合物以40 μ M的最終濃度溶解於稀鹽酸中。分析中的化合物濃度為2 μ M。將工作溶液1:20稀釋到蛋白酶緩衝液中，然後在攪拌下於37°C下培育樣品。在適當的時間點，並取等分試樣，用乙醇(1當量v/v)淬滅反應，然後離心。分析上清液。

E) 結論

【0446】 尤其研究B鏈中位置16和25處的親脂性胺基酸取代(諸如纈胺酸和異白胺酸)。在所測試的類似物(2、7、11、12、14、16、19、22、23、24和38)中，相對於人類胰島素，對蛋白酶胰蛋白酶，羧肽酶A和羧肽酶B僅觀察到穩定性有微小差異(數據未顯示)。大體上，所有帶有A14和B25取代的類似物(類似物22、24、38)對 α -胰凝乳蛋白酶，組織蛋白酶D和胰島素降解酶(IDE)顯示出蛋白水解穩定性有改善。例如，在 α -胰凝乳蛋白酶的情況下，人類胰島素在2小時內完全降解，而類似物22幾乎完全具有抗性。類似地，所有測試的B25經取代類似物均顯示出對組織蛋白酶D的穩定性有所增進，儘管與其他B25變異體相比，類

似物38 (B16/B25變異體)顯示出更優異的穩定性。

【0447】 在IDE的情況下觀察到一個值得注意的例外，其中與B25變異體相比，帶有A14/B16取代的類似物19顯示出表現有所增進。然而，數據表明，在A14處的取代(在此測試取代為麩胺酸)對於穩定性增加尤為重要。還顯示出其他取代有益於增加穩定性：諸如在位置B16和B25處的取代。例如，在位置B25中帶有胺基酸交換的類似物7導致不穩定性增加。

表6：將不同的胰島素類似物與四種不同蛋白酶培育30或120分鐘後，剩餘的胰島素類似物百分比(關於測試的類似物的序列，參見表4)

類似物	骨架	A14	B16	B25	胃液 (30 分鐘) [%]	α-胰凝乳蛋白 酶 (120 分鐘) [%]	組織蛋白 酶 D (30 分鐘) [%]	胰島素降解 酶，IDE (30 分鐘) [%]
WT	胰島素	Tyr	Tyr	Phe	0	5	0	38
2	Glu(A14)Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	Phe	0	35	0	81
7	Ala(B25)-胰島素	Tyr	Tyr	Ala	30	58	52	2
11	Leu(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Leu	nd	nd	nd	12
12	Val(B25)Des(B30)-胰島素	Tyr	Tyr	Val	44	31	43	11
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25) Des(B30)-胰島素	Tyr	Trp	His	nd	nd	nd	41
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30) -胰島素	Glu	His	Phe	nd	nd	nd	88
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30) -胰島素	Glu	Val	Phe	0	30	0	98
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)- 胰島素	Glu	Tyr	Ile	52	99	20	77
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25) Des(B30)-胰島素	Glu	Tyr	Trp	nd	nd	nd	80
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30) -胰島素	Glu	Tyr	Val	52	40	59	86
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)	Glu	Val	Val	36	34	62	86

	Des(B30)-胰島素							
--	--------------	--	--	--	--	--	--	--

nd：未測定

實例10：生產更多接合物-活體內測試-評估藥動學效用

【0448】 製備胰島素接合物1至4 (如實例3.4.1中所述)並進行測試。製備接合物5作為對照，這已描述於WO2018109162A1中。

【0449】 下表中總結所製備的胰島素接合物(表7)。此外，胰島素接合物1至4顯示在圖5至8中。

表7：關於接合物1至5的總結

胰島素接合物	胰島素骨架*	側鏈	白蛋白黏合劑
接合物 1 (參見圖 5)	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素 (表 4 中的類似物 24)	表 1 中的黏 合劑 No. 5	
接合物 2 (參見圖 6)	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素 (表 4 中的類似物 24)	表 1 中的黏 合劑 No. 8	
接合物 3 (參見圖 7)	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)- 胰島素 (表 4 中的類似物 39)	表 1 中的黏 合劑 No. 5	
接合物 4 (參見圖 8)	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素 (表 4 中的類似物 22)	表 1 中的黏 合劑 No. 5	
接合物 5 (如 WO2018109162A1 中所述)	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素 表 4 中的類似物 28	二十烷二 醯基 -γGlu-OEG ₂	二十烷二醯基-γGlu-OEG ₂

*關於序列，參見實例7中的表4。

【0450】 血糖正常的健康哥廷根小型豬(使用年齡介於0.5-6歲的豬隻，體重範圍取決於年齡在約12-40公斤間)被用來評估極長效胰島素接合物在活體內的藥效學和藥動學效用。將豬飼養在標準的動物房舍條件下，每天餵食一次，可隨意獲得自來水。在禁食過夜後，將豬隻單次皮下注射含有安慰劑配方，或對應胰島素接合物的溶液。測試胰島素接合物1-4以及胰島素接合物5 (描述於WO2018109162A1中)。

【0451】 經由預先植入的中央靜脈導管進行血液收集，以便測定來自K-EDTA血漿的血糖，藥動學和額外生物標記。血液採樣在投與測試物(基線)之前開始，每天重複1-4次直到研究結束。在研究期間，在最後一個血液採樣日後餵食動物。對所有動物進行常規處理，並在治療當天記錄臨床徵象至少兩次，且在研究的其餘期間每天記錄一次。仔細監測動物的任何低血糖臨床徵象，包括行為、毛皮，尿液和糞便排泄，體孔狀況和任何疾病徵象。在嚴重低血糖的情況下，允許研究者提供食物或靜脈內輸注(iv)葡萄糖溶液，以防無法進食。在最後一次血液採樣之後，將動物轉回至動物飼養設施。

A) 對禁食血糖的影響

【0452】 結果亦顯示於圖3中。

表8：對血糖的影響

胰島素接 合物	胰島素骨架	側鏈	劑量 [nM/kg]	FPG 葡萄 糖降 低持 續時 間> 15% vs 安 慰劑 [h]	最大葡 萄糖降 低[%]
接合物 1	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素(表 4 中的類	黏合劑 No. 5	30	>128	45

	似物 24)				
接合物 2	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素 (表 4 中的類似物 24)	黏合劑 No. 8	30	>104	39
接合物 3	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素(表 4 中的類似物 39)	黏合劑 No. 5	30	>152	30
接合物 4	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素(表 4 中的類似物 22)	黏合劑 No. 5	30	>104	27
接合物 5	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素，表 4 中的類似物 28	二十碳二醯基 -Glu-OEG2	18	>128	62

B) 對藥動學參數的量度

【0453】 結果亦顯示於圖4中。

表9：對血糖的影響

接合物	序列	側鏈	劑量 [nM/kg]	PK t _{max} [h]	PK t _{1/2} [h]
接合物 1	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素	黏合劑 No. 5	30	8	45
接合物 2	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-胰島素	黏合劑 No. 8	30	20	38.9
接合物 3	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-胰島素	黏合劑 No. 5	30	8	42.8
接合物 4	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-胰島素	黏合劑 No. 5	30	14.7	45.2
接合物 5	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-胰島素	二十烷二醯基 -Glu-OEG2	18	32	39

C) 結論

【0454】 單次投與劑量為30 nM/kg的胰島素接合物4 (Ile(B25))展示出低至中度的降葡萄糖效用，其平坦曲線至多為152小時。含有突變Val(B16)和Val(B25)的胰島素接合物3顯示至多152小時的平坦曲線，具有中度至中等的降葡萄糖效用。此外，含有突變Val(B25)的兩種胰島素接合物1和2均有穩定降低葡萄糖的效用，在劑量為30 nM/kg時不會引起低血糖症。相反，發現到與胰島素接合物1至4相比，在僅僅18 nM/kg的劑量下，胰島素接合物5 (描述於WO2018109162A1中)顯示出更強的降葡萄糖效用，且具有較不平坦的時間作用曲線。化合物可能具

有較高的低血糖症風險。

【0455】 藥動學參數證明，胰島素接合物1至4在8-20小時的範圍內顯示出更早的 $T_{\max}$ ，且平台在 $C_{\max}$ 達至多50小時。因為它們顯示一個末端長 $t_{1/2}$ 在39至45小時的範圍內，由於對於低血糖症事件的潛在風險降低，平坦PK (藥動學)曲線實現了對於一週給藥一次的期望。

【0456】 引用文獻

- Senshang Lin, Li-Lan H. Chen and Yie W. Chien, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1998, 286, 959-966.
- Clinical Pharmacokinetics Concepts and applications by Tozer and Rowland, 3rd edition (Publisher Lippincott Williams & Wilkins), 1995-Section II-6).
- Hartmann *et al.*, Effect of the long-acting insulin analogues glargine and degludec on cardiomyocyte cell signaling and function, Cardiovasc Diabetol. 2016;15:96.
- Sommerfeld *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9540.
- Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002).

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

無

序列表

<110> 法商賽諾菲公司(Sanofi)
<120> 胰島素接合物
<130> DE2018/057
<150> EP 18 306 657.0
<151> 2018-12-11
<150> EP 18 306 658.8
<151> 2018-12-11
<150> 18 306 659.6
<151> 2018-12-11
<160> 105
<170> BiSSAP 1.3.6
<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 鏈A

<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

<220>
<223> 鏈B

<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> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈A

<400> 3
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 4
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

<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 5
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> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 6
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Leu
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

108544-序列表

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 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

<210> 8
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 8
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Trp
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 9
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 9
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 10
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

108544-序列表

<400> 10
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 11
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> 12
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 12
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 13
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> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈B

<400> 14
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 Ala Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

<210> 15
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 15
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> 16
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 16
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 Ala Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 17
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 17
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

108544-序列表

<210> 18
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 18
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 Glu Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 19
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> 20
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 20
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 His Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

108544-序列表

<400> 21
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> 22
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 22
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 Leu Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 23
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> 24
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 24
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 Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈A

<400> 25
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> 26
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 26
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
 20 25

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 27
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

<210> 28
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 28
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Trp
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
 20 25

108544-序列表

<210> 29
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 29
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

<210> 30
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 30
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Trp
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Trp Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 31
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 31
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 32
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

108544-序列表

<400> 32
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 33
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 33
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
20

<210> 34
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 34
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Trp
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 35
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 35
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 36
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈B

<400> 36
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 37
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 38
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 38
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 39
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 39
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

108544-序列表

<210> 40
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 40
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 41
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 41
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 42
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 42
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 His Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 43
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

108544-序列表

<400> 43
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 44
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 44
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 Ile Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 45
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 45
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
20

<210> 46
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 46
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 Trp Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 47
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈A

<400> 47
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

<210> 48
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 48
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 Val Tyr Thr Pro Lys
 20 25

<210> 49
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 49
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
 20

<210> 50
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 50
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
 20 25

108544-序列表

<210> 51
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 51
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 52
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 52
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 53
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 53
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 54
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

108544-序列表

<400> 54
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 55
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 55
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 56
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 56
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 57
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 57
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 58
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈B

<400> 58
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ile Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 59
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 59
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 60
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 60
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ile Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 61
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 61
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
20

108544-序列表

<210> 62
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 62
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Trp Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 63
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 63
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 64
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 64
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 65
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

108544-序列表

<400> 65
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
20

<210> 66
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 66
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 67
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 67
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 68
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 68
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Leu
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 69
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<210> 73
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 73
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
20

<210> 74
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 74
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Trp Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 75
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 75
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 76
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

108544-序列表

<400> 76
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 77
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 77
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 78
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 78
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 79
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈A

<400> 79
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Gly
20

<210> 80
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈B

<400> 80
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 81
<211> 21
<212> PRT
<213> Bos

<220>
<223> 鏈A

<400> 81
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 82
<211> 30
<212> PRT
<213> Bos

<220>
<223> 鏈B

<400> 82
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 Ala
20 25 30

<210> 83
<211> 21
<212> PRT
<213> Sus

<220>
<223> 鏈A

<400> 83
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

108544-序列表

<210> 84
<211> 30
<212> PRT
<213> Sus

<220>
<223> 鏈B

<400> 84
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 Ala
20 25 30

<210> 85
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 85
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 Leu Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 86
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 86
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 Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 87
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

108544-序列表

<400> 87
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 Ile Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 88
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 88
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 Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 89
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 89
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 90
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 90
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ile Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 91
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

108544-序列表

<220>
<223> 鏈B

<400> 91
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ile Tyr Thr Pro Lys
 20 25

<210> 92
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 92
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
 20 25

<210> 93
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 93
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
 20 25

<210> 94
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 94
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ile Tyr Thr Pro Lys
 20 25

108544-序列表

<210> 95
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 95
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 96
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 96
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 97
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鏈B

<400> 97
Phe Val Glu Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Val
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Val Tyr Thr Pro Lys
20 25

<210> 98
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利西拉來

108544-序列表

<400> 98
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 99
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 艾塞那肽

<400> 99
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 100
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塞馬魯肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2
<223> Aib

<400> 100
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 101
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 杜拉魯肽

<400> 101

108544-序列表

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 102
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類胰島素，A鏈

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> 103
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 人類胰島素，B鏈

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> 104
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胰島素類似物1，A鏈

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

<210> 105
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

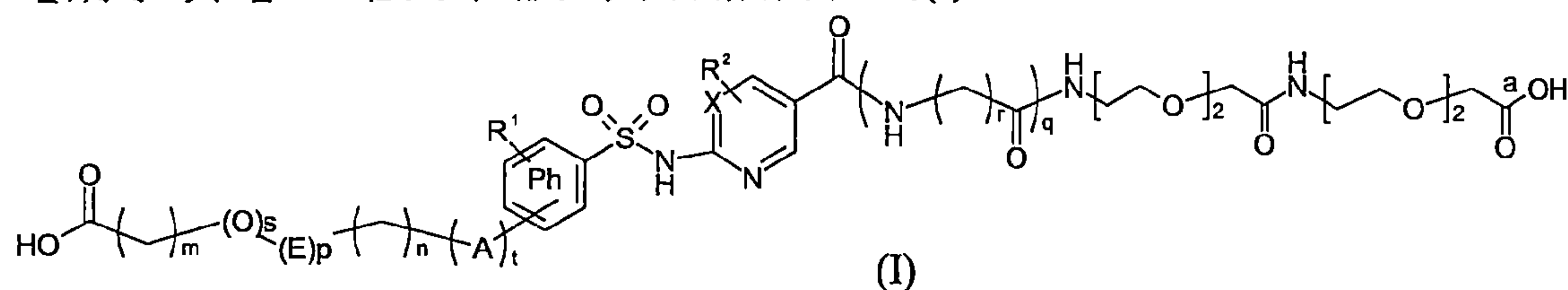
108544-序列表

<220>
<223> 胰島素類似物1，B鏈

<400> 105
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
 20 25

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種包含胰島素類似物和式(I)的磺醯胺的接合物，



其中：

A 選自由氧原子、-CH₂CH₂-基團，-OCH₂-基團和-CH₂O-基團組成之群；

E 表示-C₆H₃R-基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或-CH-基團；

m 為範圍5至17的整數；

n 為零或範圍1至3的整數；

p 為零或1；

q 為零或1；

r 為範圍1至6的整數；

s 為零或1；

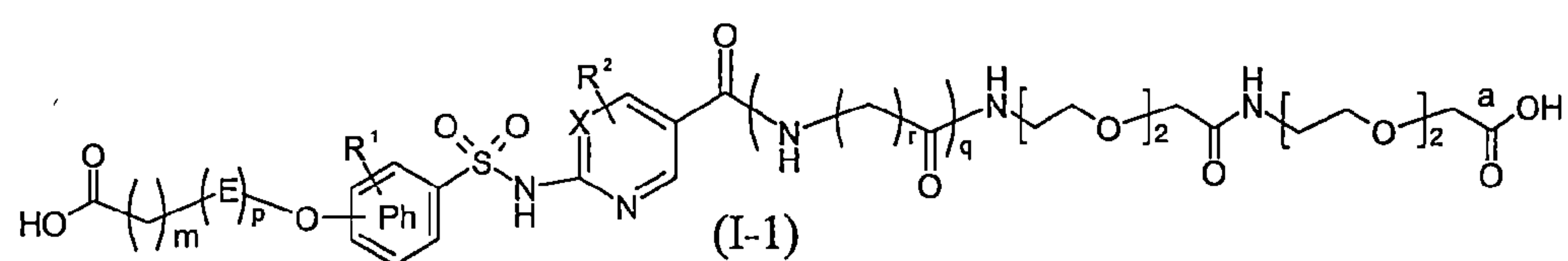
t 為零或1；

R¹ 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

R² 表示選自氫原子、鹵素原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群的至少一個殘基；

其中式(I)的磺醯胺共價結合至胰島素類似物，在於式(I)的磺醯胺的末端羧基「a」共價結合至胰島素類似物的胺基基團。

【請求項2】 如請求項1之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1)



其中：

E 表示 $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ 基團，其中R為氫原子或鹵素原子，其中鹵素原子選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群；

X 表示氮原子或 $-\text{CH}-$ 基團；

p 為零或1；

q 為零或1；

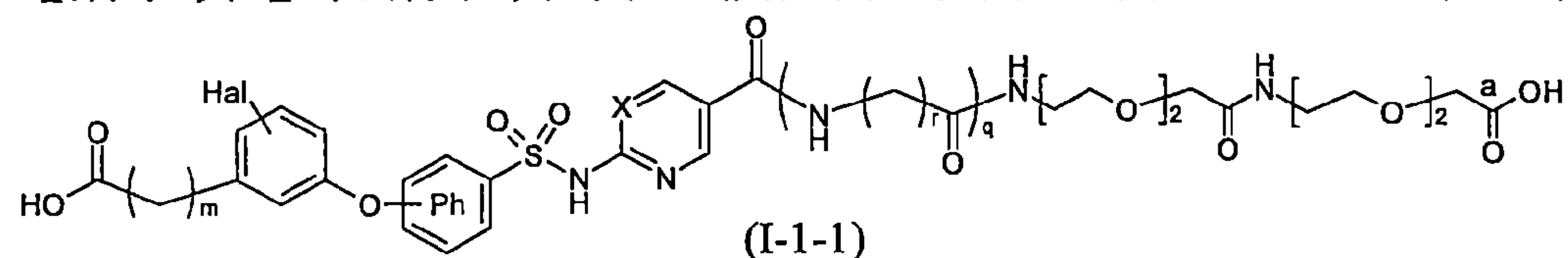
r 為範圍1至6的整數；

R^1 表示選自氫原子和鹵素原子之群的至少一個殘基；

R^2 表示選自氫原子，C1至C3烷基和鹵代C1至C3烷基之群中的至少一個殘基；

若p為零，則m為範圍5至15的整數；或若p為1，則m為範圍7至15的整數。

【請求項3】 如請求項1或2之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1-1)

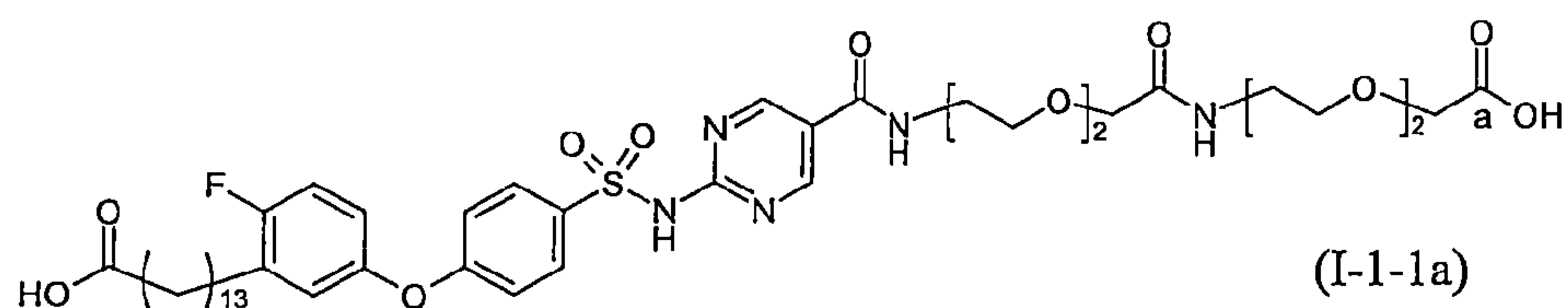


其中X為氮原子或 $-\text{CH}-$ 基團；m為範圍7至15的整數；r為範圍1至6的整數；q

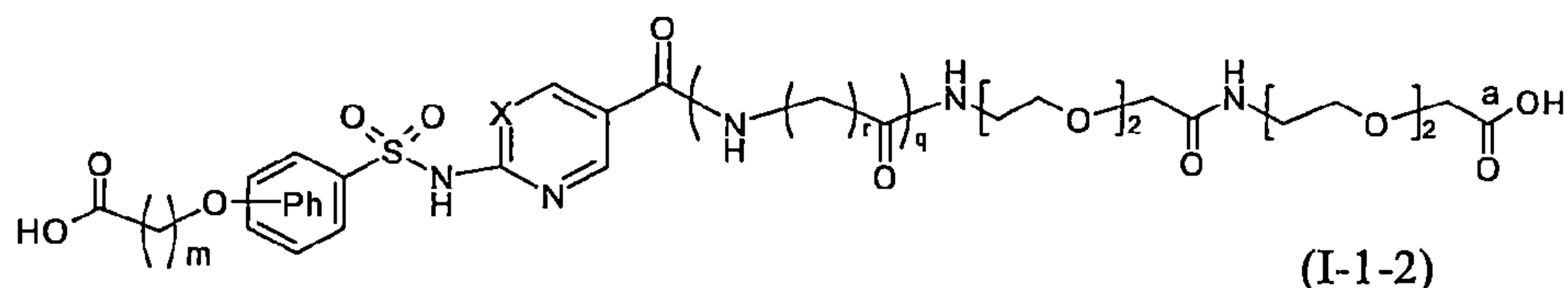
為零或1；Hal是選自由氟、氯，溴和碘原子組成之群的鹵素原子；且

$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}_6\text{H}_3\text{Hal}-\text{O}-$ 基團係位於苯環Ph上相對於 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 基團的間位或對位。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1-1a)



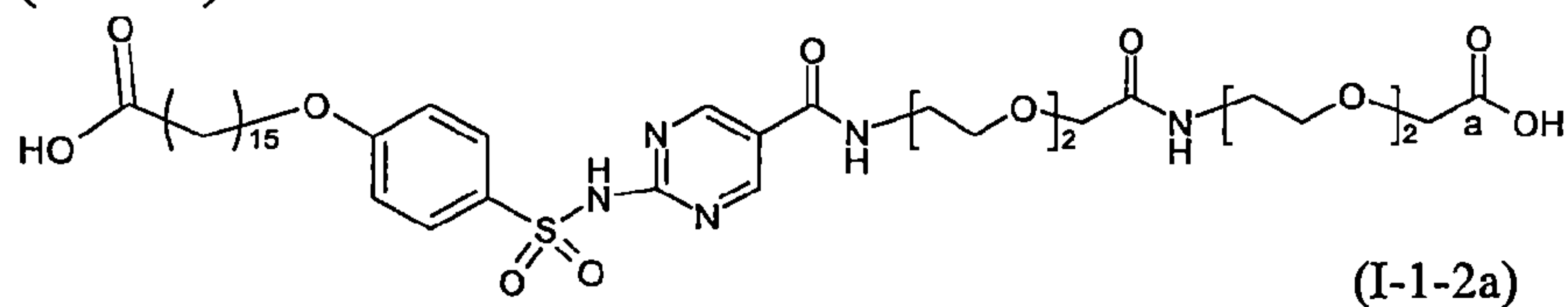
【請求項5】 如請求項1或2之接合物，其中該磺醯胺具有式(I-1-2)



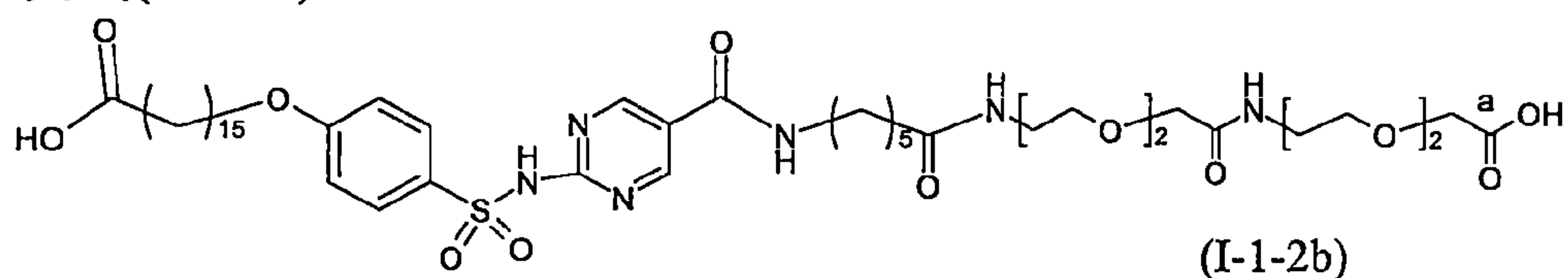
其中X為氮原子或-CH-基團；m為範圍5至15的整數；r為範圍1至6的整數；q為零或1；且HOOC-(CH₂)_m-O-基團係位於苯環Ph上相對於-S(O)₂-基團的間位或對位。

【請求項6】 如請求項1至2或5中任一項之接合物，其中該磺醯胺具有式

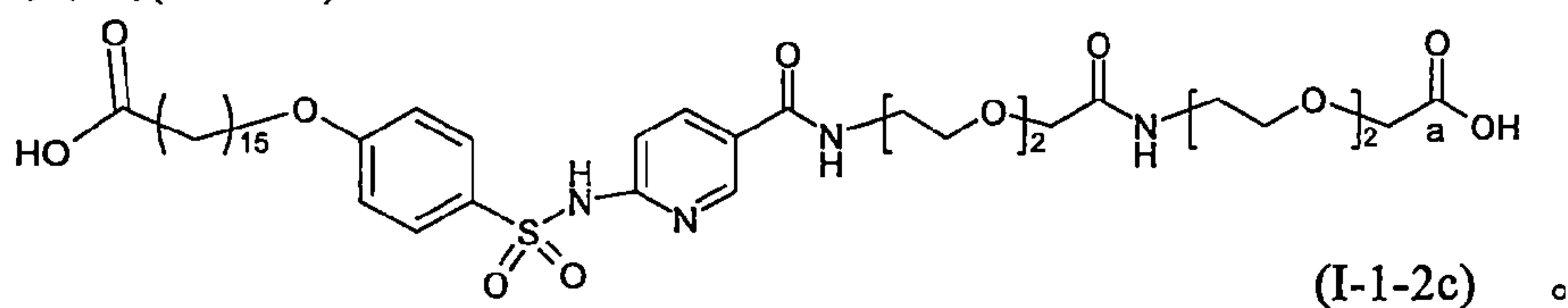
(I-1-2a)



或式(I-1-2b)



或式(I-1-2c)



【請求項7】 如請求項1至6中任一項之接合物，其中該胰島素類似物相對於親本胰島素包含至少一個突變，其中該胰島素類似物包含一個在位置B16處被疏水性胺基酸取代的突變，及/或一個在位置B25處被疏水性胺基酸取代的突變，且視情況，其中該胰島素類似物進一步包含一個在位置A14處被選自

由麩胺酸(Glu)、天冬胺酸(Asp)及組胺酸(His)組成之群的胺基酸取代的突變，及/或一個在位置B30處的突變。

【請求項8】 如請求項7之接合物，其中該親本胰島素是人類胰島素，豬胰島素或牛胰島素，及/或其中疏水性胺基酸是支鏈胺基酸，諸如選自由纈胺酸(Val)、異白胺酸(Ile)和白胺酸(Leu)組成之群的支鏈胺基酸。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項之接合物，其中該胰島素類似物選自

Leu(B16)-人類胰島素，

Val(B16)-人類胰島素，

Ile(B16)-人類胰島素，

Leu(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Val(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Ile(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Leu(B25)-人類胰島素，

Val(B25)-人類胰島素，

Ile(B25)-人類胰島素，

Leu(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-人類胰島素，

Glu(A14)Leu(B16)-人類胰島素，

Glu(A14)Ile(B16)-人類胰島素，

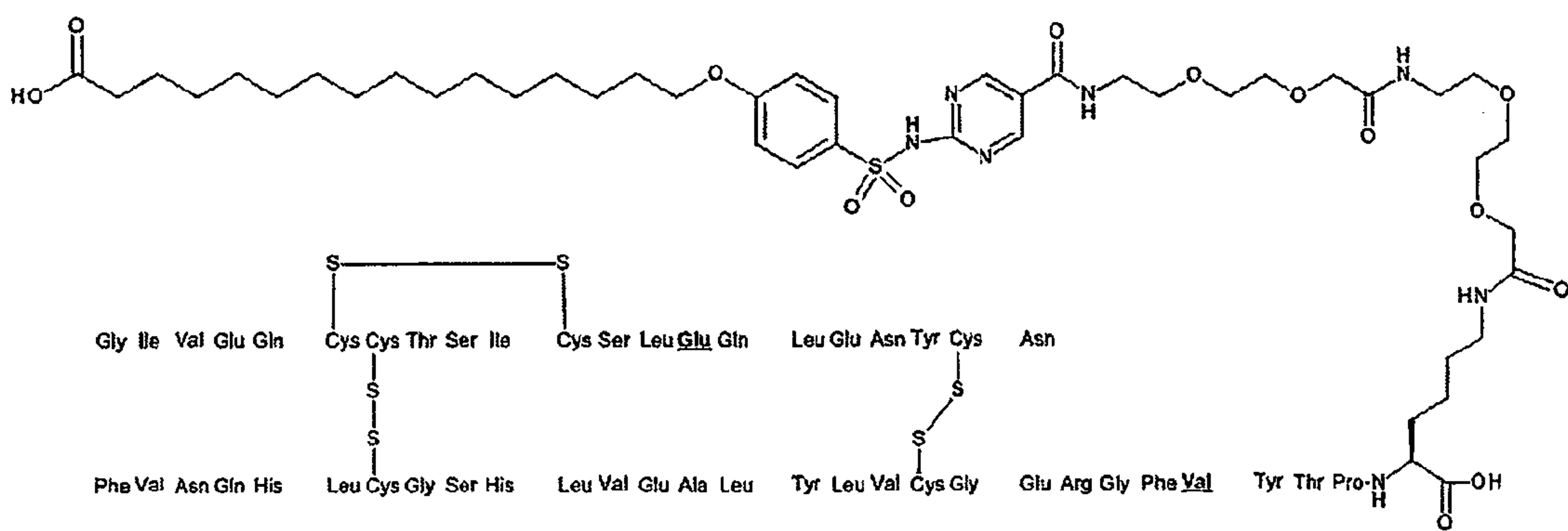
Glu(A14)Val(B16)-人類胰島素，

Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Leu(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素，
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素，及
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-人類胰島素。

- 【請求項10】 如請求項1至9中任一項之接合物，其中該胰島素類似物包含
- (d) 具有如 SEQ ID NO : 43 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，及具有如SEQ ID NO : 44中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK)的B鏈，
 - (e) 具有如 SEQ ID NO : 47 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，及具有如SEQ ID NO : 48中所示胺基酸序列(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK)的B鏈，或
 - (f) 具有如 SEQ ID NO : 77 中所示胺基酸序列 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN)的A鏈，及具有如SEQ ID NO : 78中所示胺基酸序列(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK)的B鏈。

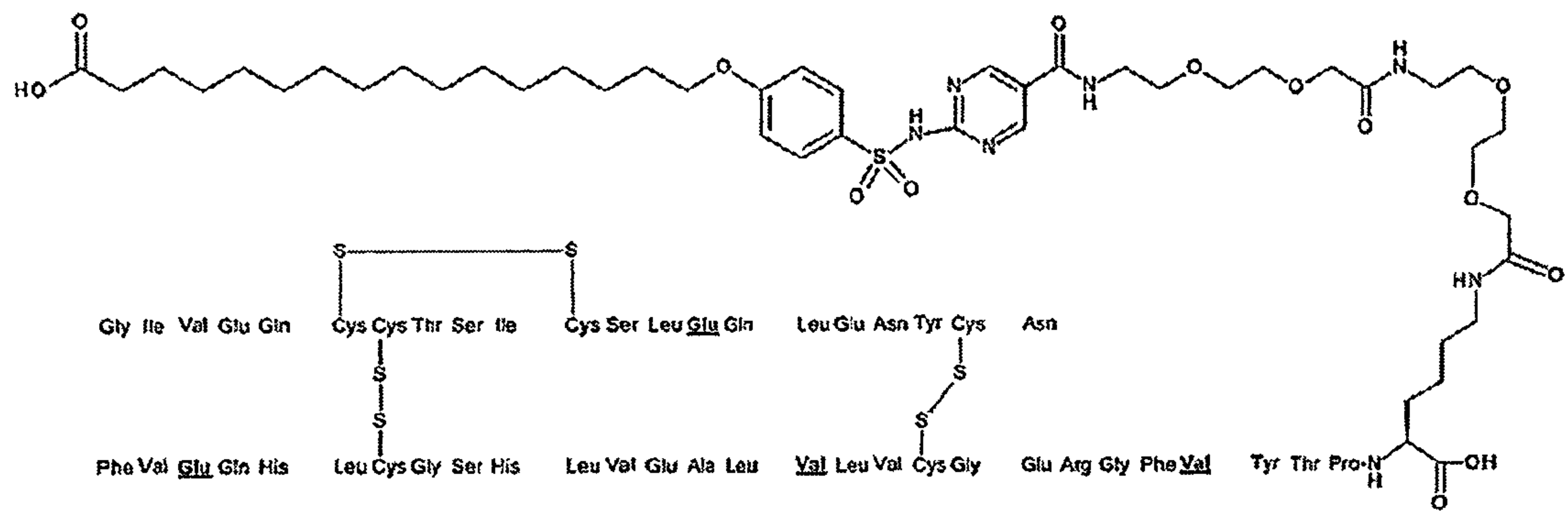
【請求項11】 如請求項1至10中任一項之接合物，其中式(I)的磺醯胺共價結合之胰島素類似物的胺基基團是存在於胰島素類似物中的離胺酸的ε胺基基團，或胰島素或胰島素類似物的B鏈的N端胺基基團，例如其中該胺基基團是存在於B鏈的位置B29處的離胺酸的ε胺基基團。

【請求項12】 如請求項1至11中任一項之接合物，其中該接合物為接合物1 (A鏈序列：SEQ ID NO: 47；B鏈序列：SEQ ID NO: 48)：



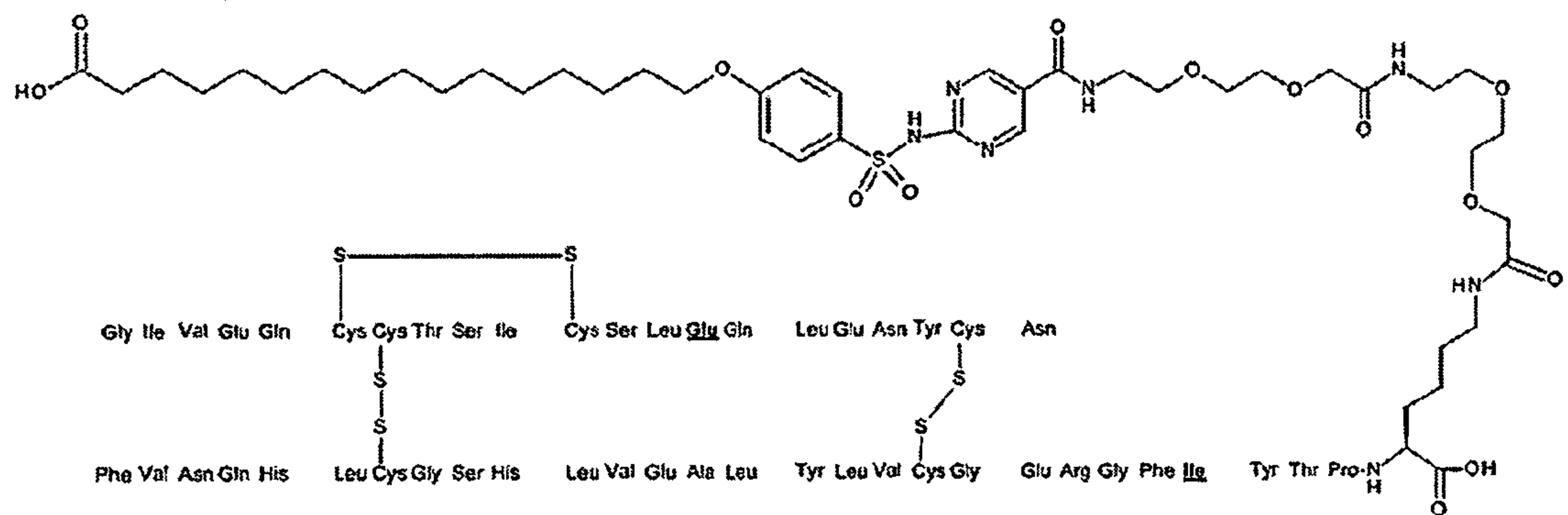
或

接合物3 (A鏈序列：SEQ ID NO: 77；B鏈序列：SEQ ID NO: 78)：



或

接合物4 (A鏈序列：SEQ ID NO: 43；B鏈序列：SEQ ID NO:44)：

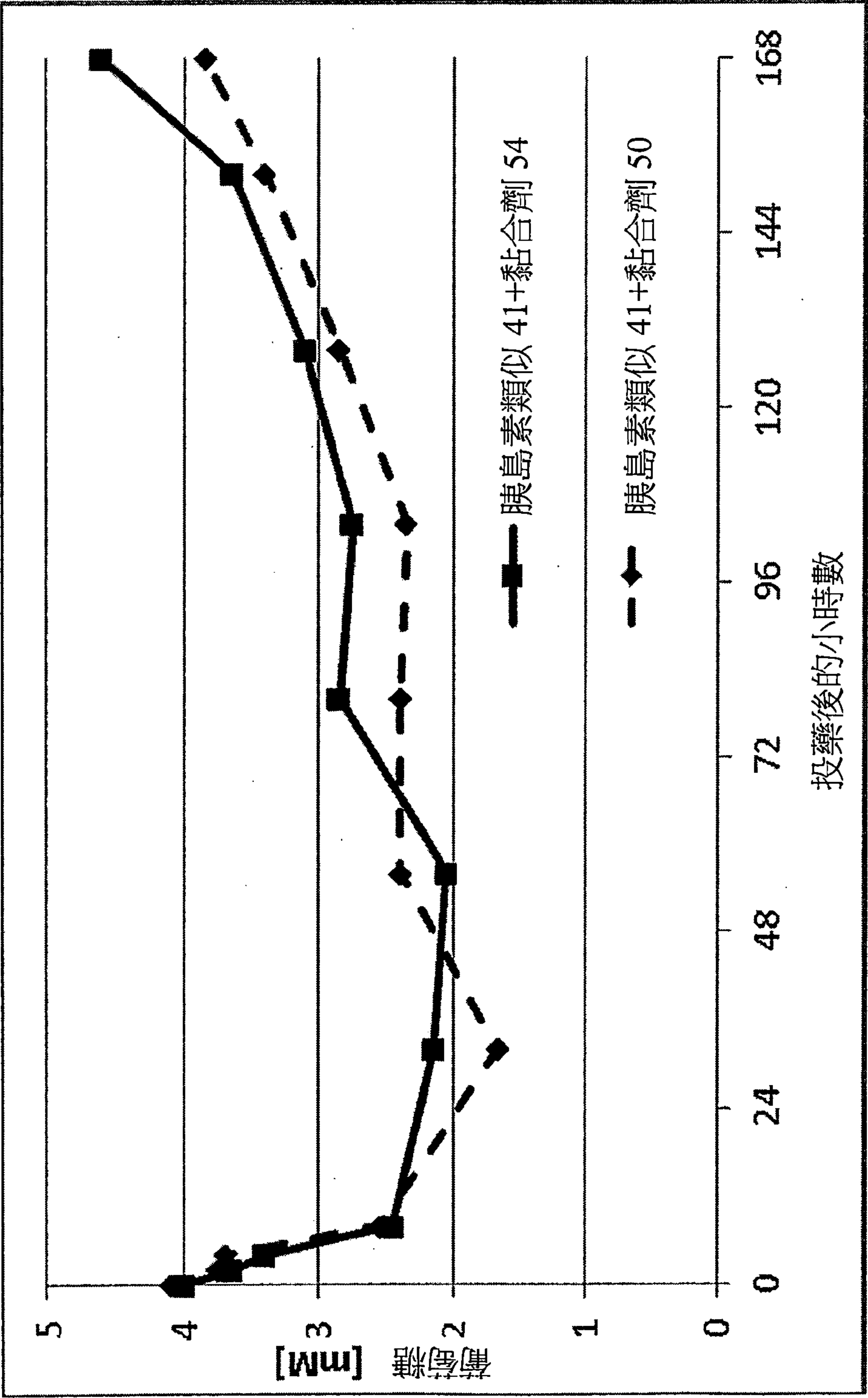


【請求項13】 一種醫藥組合物，其包含醫藥有效量之如請求項1至12中任一項之包含式(I)的磺醯胺以及胰島素類似物的接合物。

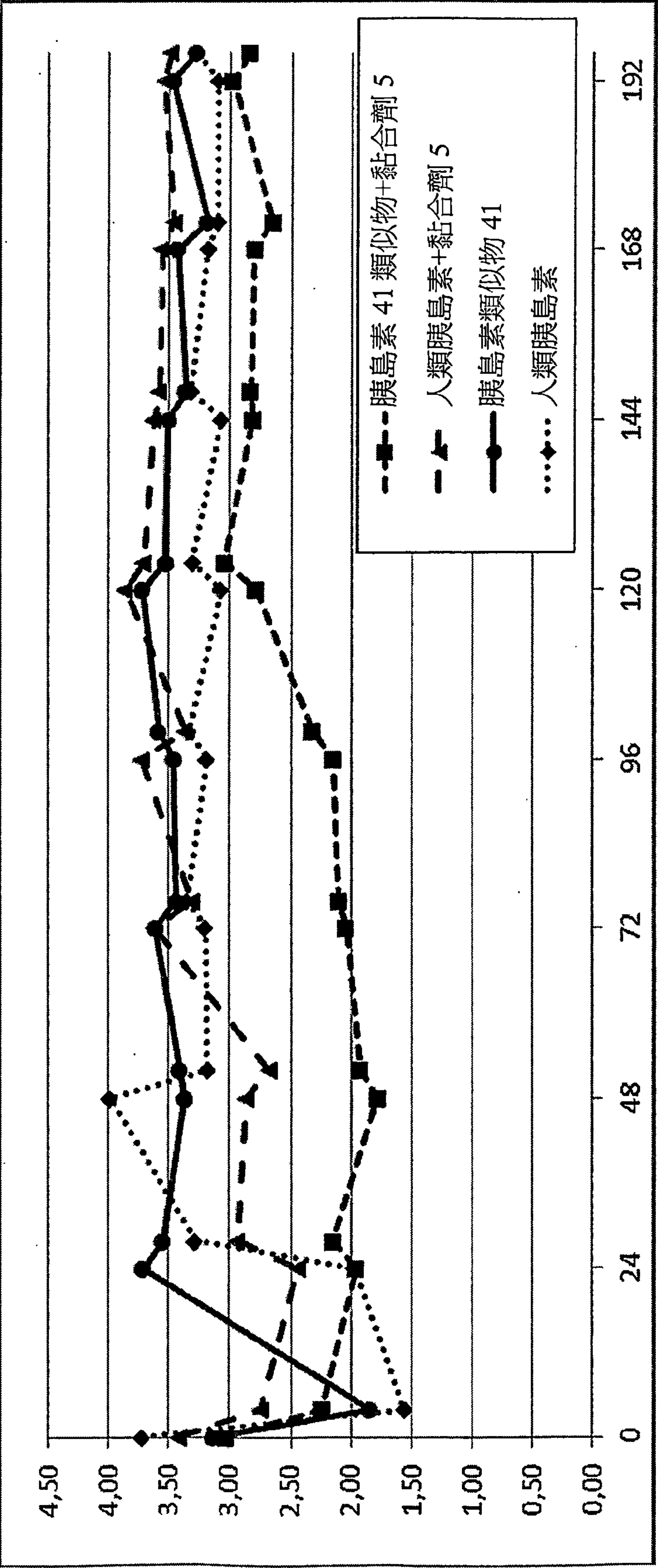
【請求項14】 如請求項1至12中任一項之包含式(I)的磺醯胺以及胰島素類似物的接合物，其用作藥劑。

【請求項15】 如請求項1至12中任一項之包含式(I)的磺醯胺以及胰島素類似物的接合物，其用作供治療選自由妊娠糖尿病、第1型糖尿病、第2型糖尿病及高血糖症組成之群的疾病，及/或降低血糖水平的藥劑。

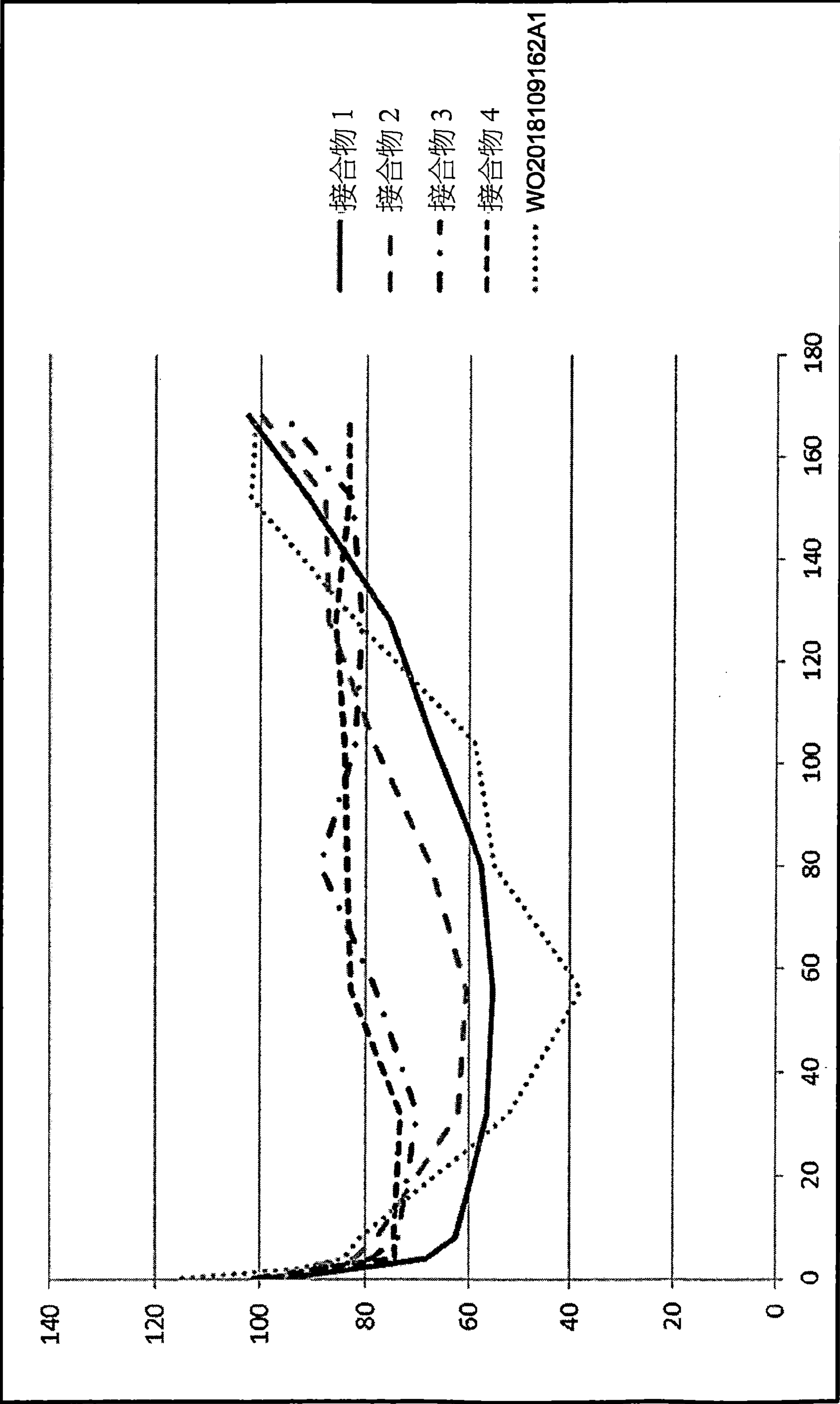
【發明圖式】



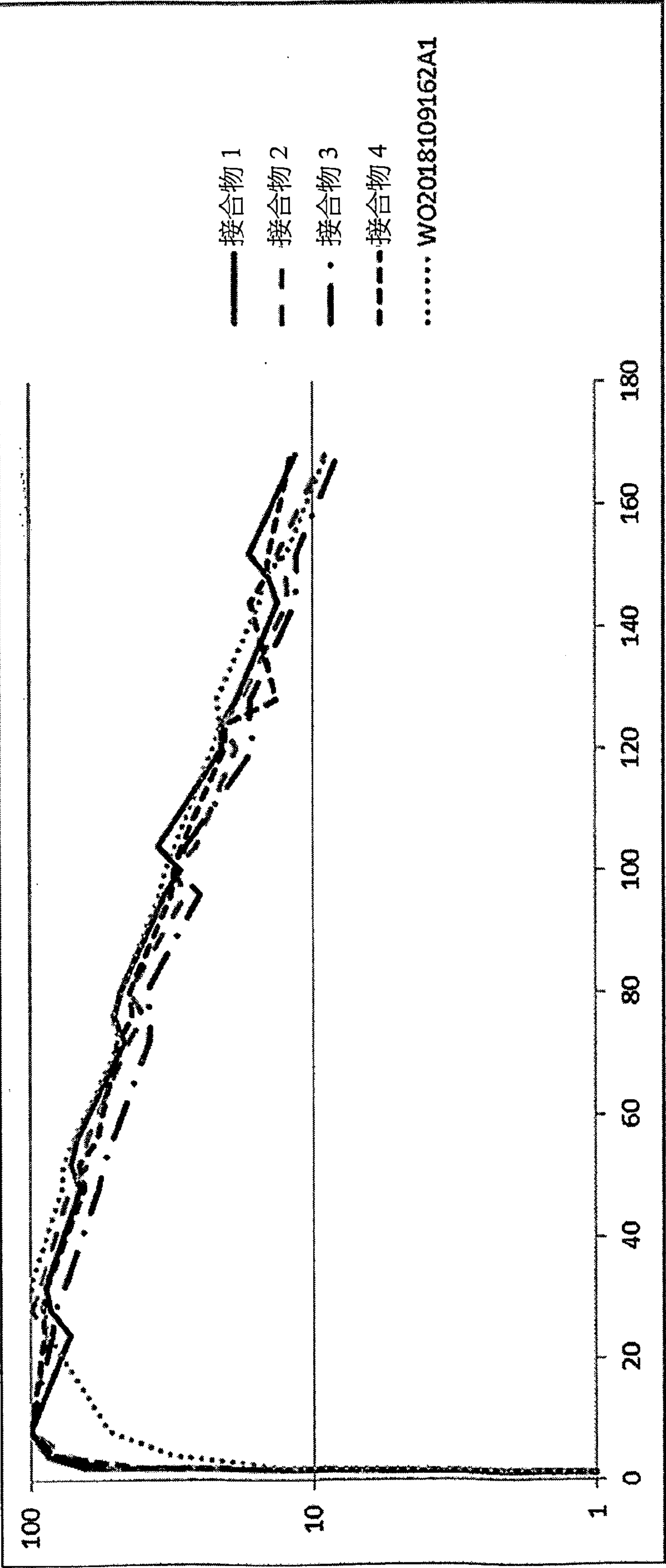
【圖1】



【圖2】

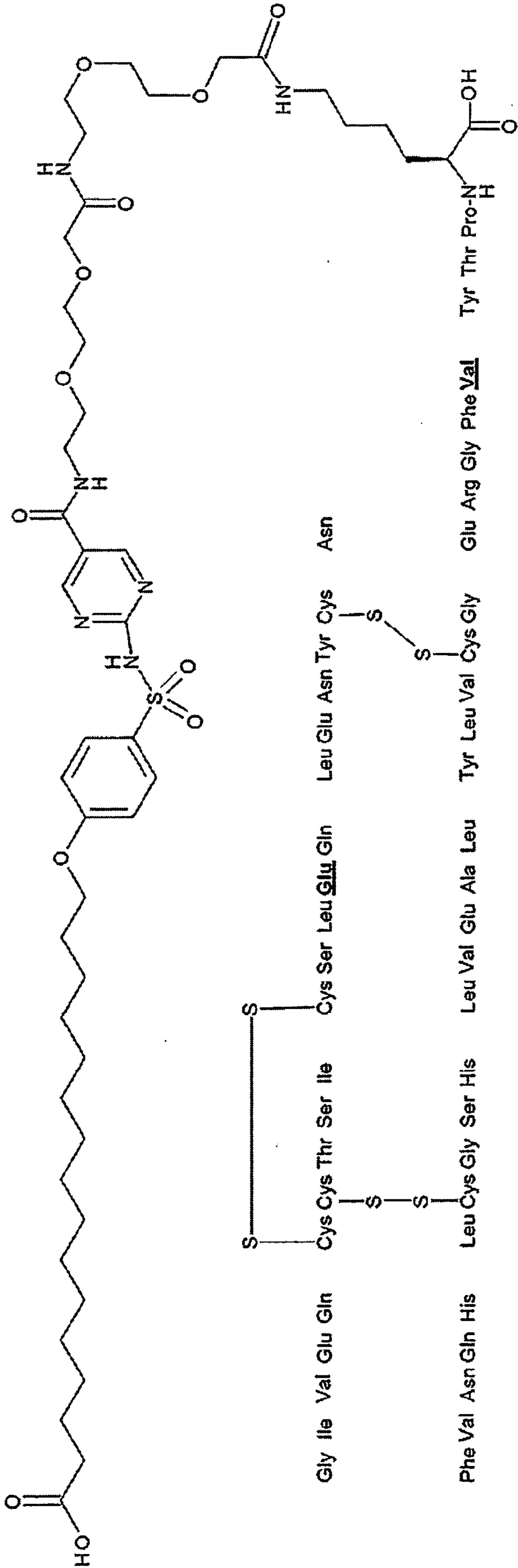


【圖3】



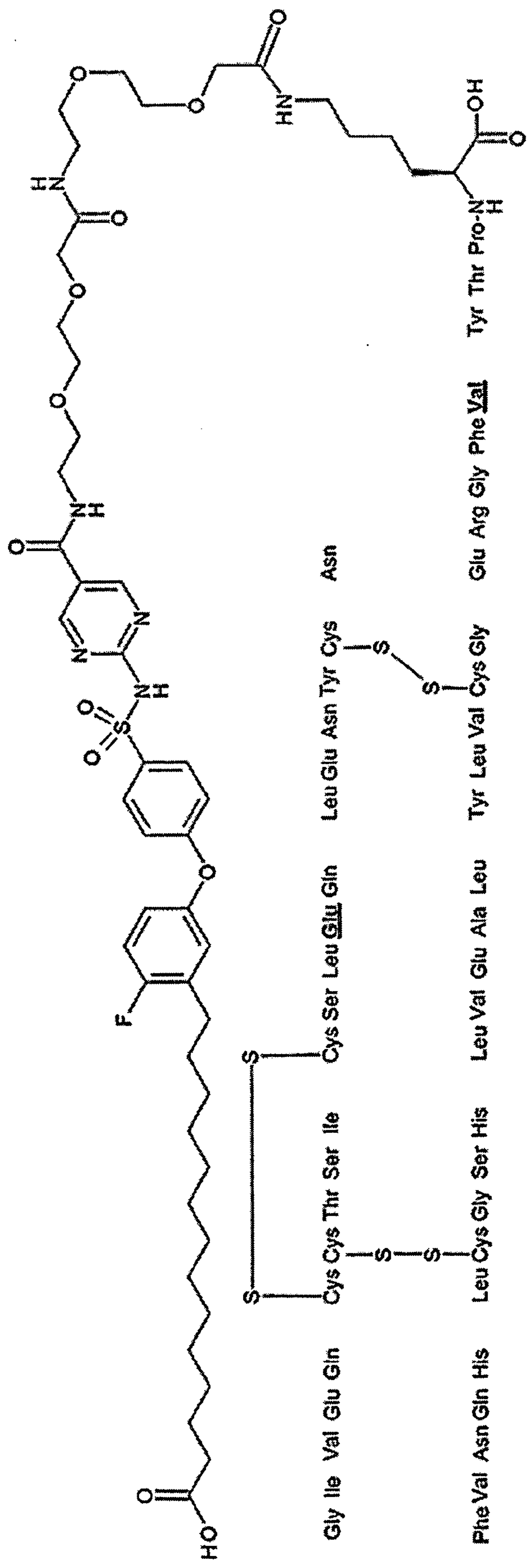
【圖4】

接合物 1



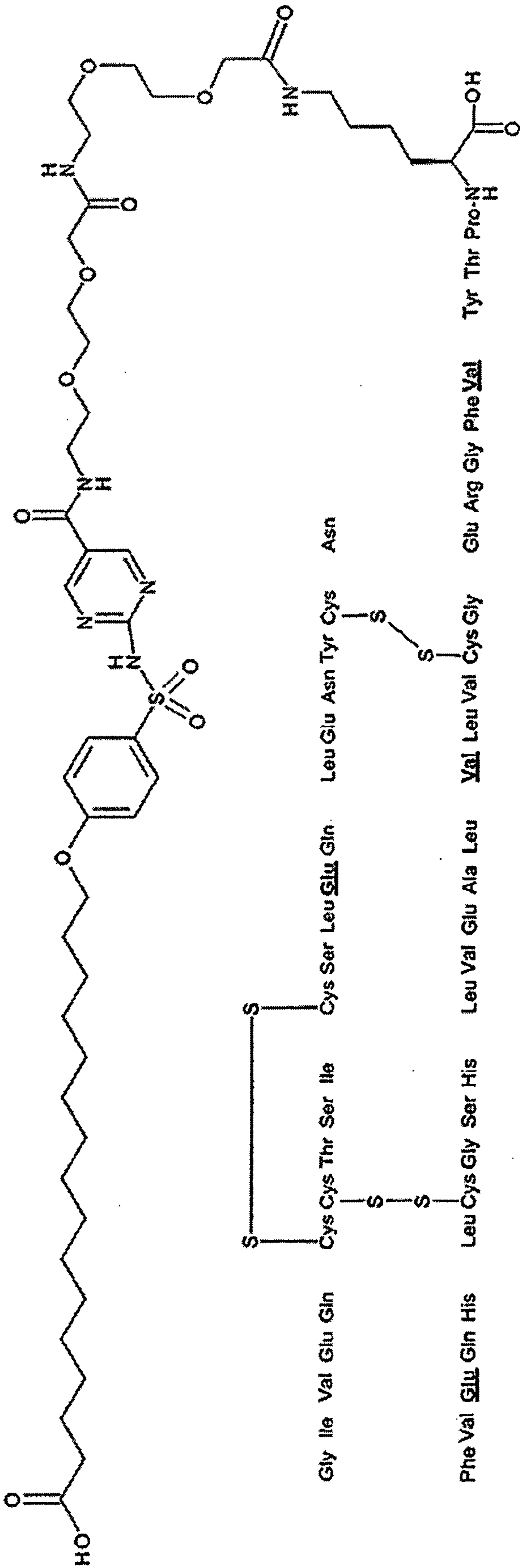
【圖5】

接合物 2

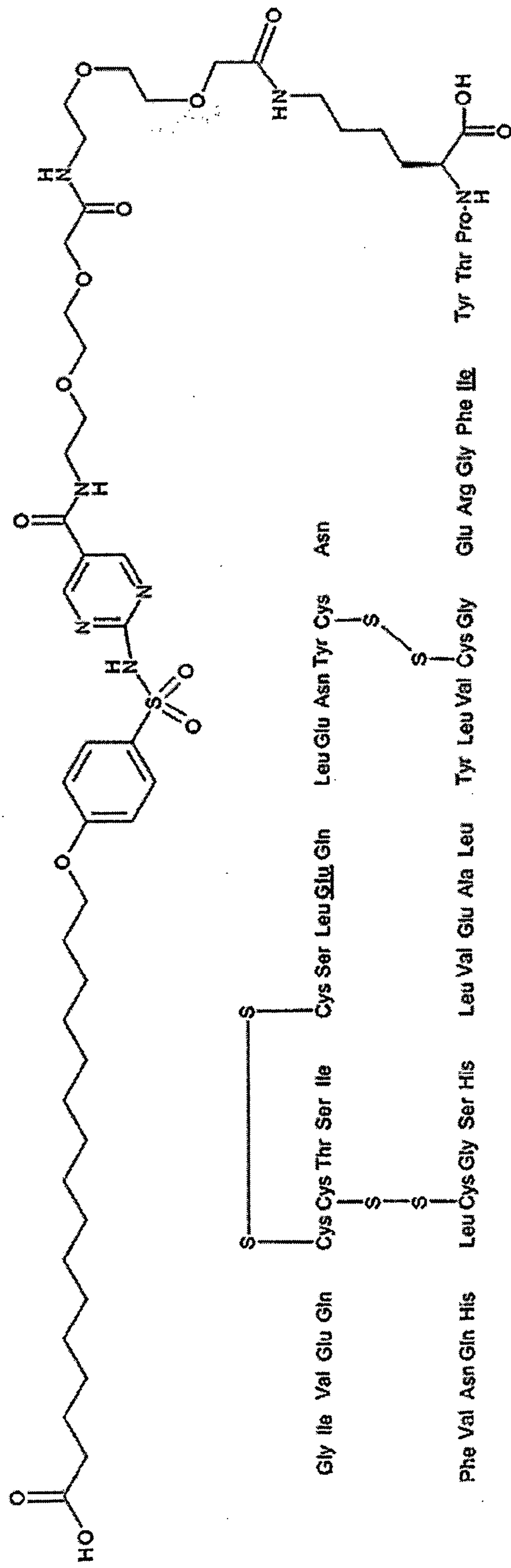


【圖6】

接合物 3



【圖7】



【∞】