

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/17, C07K 14/62, A61K 38/28	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64598 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03490 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Mai 1999 (21.05.99) (30) Prioritätsdaten: 198 25 447.4 6. Juni 1998 (06.06.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ERTL, Johann [DE/DE]; Ginsterweg 10, D-65817 Bremthal (DE). HABERMANN, Paul [DE/DE]; Rossertstrasse 35, D-65817 Eppstein (DE). GEISEN, Karl [DE/DE]; Jahnstrasse 43, D-60318 Frank- furt (DE). SEIPKE, Gerhard [DE/DE]; Wiesenstrasse 44, D-65719 Hofheim (DE). WOLLMER, Axel [DE/DE]; Hans Böckler Allee 31, D-52074 Aachen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts. COV 3498	

(54) Title: NOVEL INSULIN ANALOGS WITH ENHANCED ZINC BINDING

(54) Bezeichnung: NEUE INSULINANALOGA MIT ERHÖHTER ZINKBINDUNG

(57) Abstract

The invention relates to insulin analogs exhibiting enhanced zinc binding capacity and to stable zinc complexes thereof having a retarded activity in comparison with human insulin. The invention further relates to a method for the production of said insulin analogs and to their use, particularly in pharmaceutical preparations for therapy of type I and type II diabetes mellitus.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Insulinanaloga, welche ein erhöhtes Zinkbindungsvermögen aufweisen, sowie stabile Zinkkomplexe derselben, die im Vergleich zu Humaninsulin ein verzögertes Wirkprofil aufweisen, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung insbesondere in pharmazeutischen Zubereitungen zur Therapie des Diabetes mellitus vom Typ I wie auch Typ II.

Beschreibung

Neue Insulinaloga mit erhöhter Zinkbindung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Insulinaloga, welche ein erhöhtes Zinkbindungsvermögen aufweisen, sowie stabile Zinkkomplexe derselben, die im Vergleich zu Humaninsulin ein verzögertes Wirkprofil aufweisen, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung insbesondere in pharmazeutischen Zubereitungen zur Therapie des Diabetes mellitus vom Typ I wie auch Typ II.
- 10 Weltweit leiden etwa 120 Mio. Menschen an Diabetes mellitus. Darunter sind etwa 12 Mio. Typ I-Diabetiker, für die die Substitution der fehlenden endokrinen Insulinsekretion die einzige derzeit mögliche Therapie darstellt. Die Betroffenen sind lebenslang, in der Regel mehrmals täglich, auf Insulininjektionen angewiesen. Im
- 15 Gegensatz zum Typ I-Diabetes besteht beim Typ II-Diabetes nicht grundsätzlich ein Mangel an Insulin, jedoch wird in einer Vielzahl von Fällen, vor allem im fortgeschrittenem Stadium, die Behandlung mit Insulin, gegebenenfalls in Kombination mit einem oralen Antidiabetikum, als günstigste Therapieform angesehen.
- 20 Beim Gesunden ist die Insulinfreisetzung durch den Pankreas strikt an die Konzentration der Blutglucose gekoppelt. Erhöhte Blutglucosespiegel, wie sie nach Mahlzeiten auftreten, werden durch eine entsprechende Steigerung der Insulinsekretion rasch kompensiert. Im nüchternen Zustand sinkt der
- 25 Plasmainsulinspiegel auf einen basalen Wert ab, der ausreicht, eine kontinuierliche Versorgung insulinempfindlicher Organe und Gewebe mit Glucose zu gewährleisten und die hepatische Glucoseproduktion in der Nacht niedrig zu halten. Der Ersatz der körpereigenen Insulinsekretion durch exogene, meist subcutane Applikation von Insulin erreicht in der Regel die oben beschriebene Qualität der physiologischen
- 30 Regulation der Blutglucose nicht annähernd. Häufig kommt es zu Entgleisungen der Blutglucose nach oben oder unten, die in ihren schwersten Formen lebensbedrohlich sein können. Daneben stellen jedoch auch über Jahre erhöhte Blutglucosespiegel ohne anfängliche Symptome ein erhebliches Gesundheitsrisiko dar. Die

großangelegte DCCT-Studie in den USA (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N. Engl. J. Med. 329, 977-986) wies eindeutig nach, daß chronisch erhöhte Blutglucosespiegel wesentlich für die Entwicklung diabetischer Spätschäden verantwortlich sind. Diabetische Spätschäden sind mikro-

- 5 und makrovaskuläre Schädigungen, die sich u. U. als Retino-, Nephro-, oder Neuropathie manifestieren und zu Erblindung, Nierenversagen sowie dem Verlust von Extremitäten führen und darüber hinaus mit einem erhöhten Risiko für Herz/Kreislaufferkrankungen einhergehen. Daraus ist abzuleiten, daß eine verbesserte Therapie des Diabetes in erster Linie darauf abzielen muß, die
- 10 Blutglucose möglichst eng im physiologischen Bereich zu halten. Nach dem Konzept der intensivierten Insulintherapie soll dies durch mehrmals tägliche Injektionen von schnell und langsam wirkenden Insulinzubereitungen erreicht werden. Rasch wirkende Formulierungen werden zu den Mahlzeiten gegeben, um den postprandialen Anstieg der Blutglucose auszugleichen. Langsam wirkende
- 15 Basalinsuline sollen die Grundversorgung mit Insulin insbesondere während der Nacht sicherstellen, ohne zu einer Hypoglykämie zu führen.

Die derzeit verfügbaren Basalinsuline erfüllen diese Anforderung nur unzulänglich. Speziell die häufig verwendeten NPH-Insuline weisen ein zu stark ausgeprägtes

20 Wirkungsmaximum auf und haben eine zu kurze Gesamtwirkung. Dies birgt bei abendlicher Applikation die Gefahr einer nächtlichen Hypoglykämie und einer morgendlichen Hyperglykämie.

- Aus der EP 0 821 006 sind Insulinanaloga mit erhöhtem Zinkbindungsvermögen
- 25 bekannt, die in Verbindung mit Zink ein gegenüber Humaninsulin verzögertes Wirkprofil aufweisen. Diese Analoga unterscheiden sich von Humaninsulin im wesentlichen durch Variation der Aminosäure in Position A21 der A-Kette und durch Addition eines Histidinrestes oder eines Peptides mit 2 bis 35 Aminosäureresten, welches 1 bis 5 Histidinreste enthält, an Position B30 der B-Kette.

30

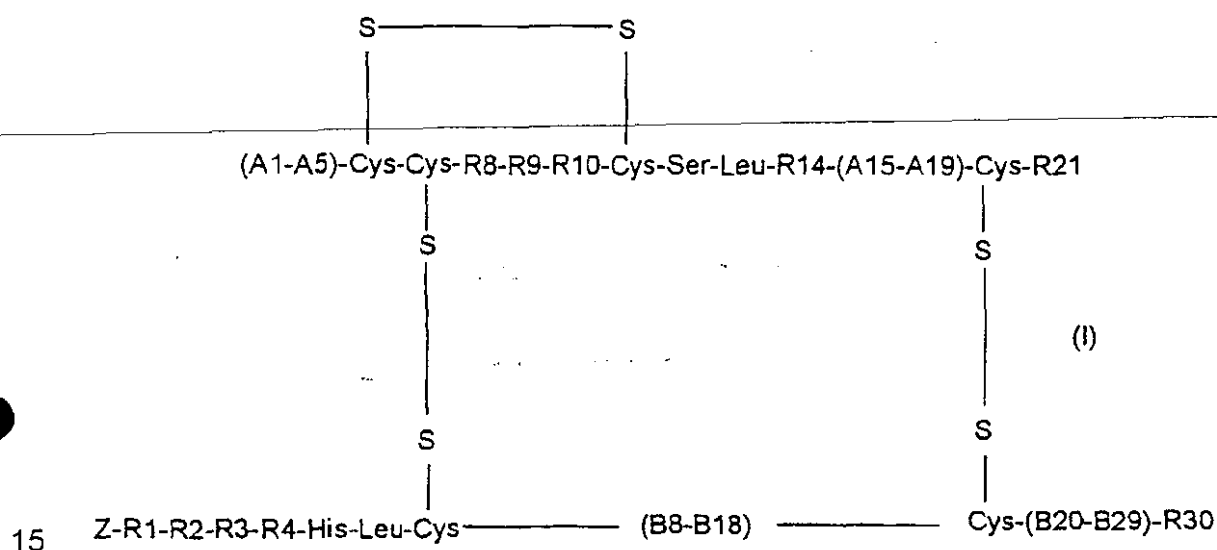
Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, weitere Insulinanaloga (Analoga von humanem oder tierischem Insulin) bereitzustellen, die ein erhöhtes Zinkbindungsvermögen aufweisen, einen stabilen Komplex, enthaltend ein Hexamer

des Insulinanalogons und Zink, bilden und in geeigneter Zubereitung bei subcutaner Injektion infolge des im Vergleich zu Humaninsulin verzögerten Wirkprofils eine verbesserte Therapie des Diabetes mellitus vom Typ I wie auch Typ II ermöglichen.

- 5 Insulinanaloge leiten sich von natürlich vorkommenden Insulinen, nämlich Humaninsulin (s. SEQ ID NO: 1: A-Kette von Humaninsulin und SEQ ID NO: 2: B-Kette von Humaninsulin) oder tierischen Insulinen, durch Substitution oder Fehlen wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes und/oder Addition wenigstens eines Aminosäurerestes an A- und/oder B-Kette des natürlich
- 10 vorkommenden Insulins ab.

Die Aufgabe wird gelöst durch

1. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I



worin bedeuten

- (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 1) oder tierischem Insulin,
- 20 (A15-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 1) oder tierischem Insulin,
- (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 2) oder tierischem Insulin,

(B20-B29) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 2) oder tierischem Insulin,

R8 Thr oder Ala,

R9 Ser oder Gly,

5 R10 Ile oder Val,

R14 Tyr, His, Asp oder Glu,

R21 Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln,

R1 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder ein Wasserstoffatom,

10 R2 Val, Ala oder Gly,

R3 Asn, His, Glu oder Asp,

R4 Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu,

R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH,

Z ein Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch

15 kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His),

mit der Maßgabe, daß für den Fall, daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R1 oder R3

His, Glu oder Asp bedeuten, wobei R3 His bedeutet, wenn R1 einen neutralen oder

negativ geladenen Aminosäurerest darstellt, oder mit der Maßgabe, daß für den Fall,

daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R14 His, Asp oder Glu bedeutet, und ferner mit

20 der Maßgabe, daß sich das Insulinanalogon oder das physiologisch verträgliche Salz

desselben der Formel I nicht allein durch Variation der Aminosäurereste in den

Positionen R3 oder R3 in Verbindung mit R21 oder R3 in Verbindung mit R4 in

Formel I von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2) unterscheidet.

25 Vorzugsweise ist das Insulinanalogon oder das physiologisch verträgliche Salz desselben dadurch gekennzeichnet, daß

2. R8 Thr, R9 Ser und R10 Ile bedeuten,

30 3. R1 Phe, His, Asn, Asp oder Gly bedeutet,

4. R30 Thr, Ala oder Ser bedeutet oder

5. dadurch gekennzeichnet, daß R21 Asn und R1 Phe bedeuten.

6. Eine bevorzugte Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung ist ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I,

5 welches dadurch gekennzeichnet ist, daß R2 Val, R3 Asn und R4 Gln bedeuten.

Ferner bevorzugt ist ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß R14

10 7. Tyr,

8. His,

9. Asp oder

15

10. Glu bedeutet.

Ferner bevorzugt ist ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, welches sich dadurch auszeichnet, daß R30

20

11. Thr,

12. Ala,

25 13. Ser oder

14. -OH

bedeutet.

30

Besonders bevorzugt ist ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß Z

15. His,

16. His-Ala- oder

5 17. His-Ala-Ala-

bedeutet.

Beispiele für Insulinanaloga gemäß der vorliegenden Erfindung sind

10

18. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
15 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys

aufweist (SEQ ID NO: 3), beispielsweise das His(B0), des (B30)-Humaninsulin,

20

19. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
25 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO: 4), beispielsweise das His(B0)-Humaninsulin,

20. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

30

His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO: 5), beispielsweise das His (B-1), Ala (B0)-Humaninsulin oder

21. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

- 10 aufweist (SEQ ID NO: 6), beispielsweise das His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-Humaninsulin.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des Insulinanalogons oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben gemäß der vorliegenden Erfindung, umfassend die Konstruktion eines replizierbaren Expressionsvehikels, welches eine DNA-Sequenz enthält, die für einen Vorläufer des Insulinanalogons mit der allgemeinen Aminosäuresequenz II kodiert

- 20 Met- X^2_m -(Arg)_p-Z-R1-R2-R3-R4-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B29)-R30- X^1_n -Arg-(A1-A5)-Cys-Cys-R8-R9-R10-Cys-Ser-Leu-R14-(A15-A19)-Cys-R21

II,

worin

- X^1_n eine Peptidkette mit n Aminosäurresten ist, wobei n eine ganze Zahl von 0 bis 34 bedeutet,
- 25 X^2_m eine Peptidkette mit m Aminosäurresten ist, wobei m eine ganze Zahl von 0 bis 20 bedeutet,
- p 0, 1 oder 2,
- R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest bedeutet oder abwesend ist und
- 30 Z abwesend ist oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His) bedeutet

und die übrigen Variablen die vorstehend unter Nr. 1 genannten Bedeutungen haben, wobei auch die vorstehend genannten Maßgaben gelten, Expression in einer Wirtszelle und Freisetzung des Insulinanalogons aus dessen Vorläufer mit chemischen und/oder enzymatischen Methoden.

5

Vorzugsweise ist die Wirtszelle ein Bakterium, besonders bevorzugt Bakterium *E. coli*.

Vorzugsweise ist die Wirtszelle eine Hefe, besonders bevorzugt *Saccharomyces cerevisiae*.

10

Bei der Expression in *E. coli* bilden die genannten Fusionsproteine (SEQ ID NO: 7 bis 9) in der Regel unlösliche Einschußkörperchen (inclusion bodies), die nach Zellaufschluß durch Zentrifugation isoliert werden können und unter Verwendung chaotroper Zusätze (z. B. 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidiniumchlorid) wieder gelöst werden. Das gelöste Fusionsprotein kann einer Sulfitolysen unterzogen werden, bei der SH-Reste in S-Sulfonate überführt werden (z. B. R.C. Marshall und A.S. Iglin in 'Practical Protein Chemistry – A Handbook', Herausgeber A. Darbre (1986), Seiten 49-53). Dadurch verbessert sich die Löslichkeit des Fusionsproteins und erleichtert die Reinigung beispielsweise mittels Anionenaustauscher- oder Gelpermeationschromatographie.

15

20

Die Überführung des derivatisierten Fusionsproteins in Präproinsulin mit nativer räumlicher Struktur und korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken (Faltung) erfolgt in verdünnter wäßriger Lösung durch Zusatz einer begrenzten Menge eines SH-Reagens wie Merkaptoethanol, Cystein oder Glutathion und anschließender Luftoxidation. Alternativ kann das gelöste, nicht derivatisierte Fusionsprotein unter ähnlichen Bedingungen auch direkt gefaltet werden (EP-A-0 600 372; EP-A-0 668 292).

25

Präproinsulin wird anschließend durch limitierte proteolytische Spaltung in biologisch aktives Insulin überführt. Hierfür kann Trypsin verwendet werden, welches die in Formel II mit $\text{Met-X}_m^2-(\text{Arg})_p$ bezeichneten Präsequenz entfernt und an der mit X_n^1 -Arg bezeichneten Peptidkette spaltet und damit B- und A-Kette trennt. In der Regel beginnt die Sequenz X^1 mit Arg, Arg_2 oder sie ist nicht vorhanden ($n=0$), so daß nach

30

der Spaltung ein Insulinderivat vorliegt, das mit Arg oder Arg₂ am C-Terminus der B-Kette verlängert ist. Diese Aminosäuren können mit Carboxypeptidase B entfernt werden. Die tryptische Spaltung kann durch Erhöhung der Trypsinkonzentration oder Verlängerung der Reaktionsdauer auch so geführt werden, daß zusätzlich an

- 5 Lysin(B29) gespalten wird. In diesem Fall entsteht ein des(B30)-Insulinderivat. Das bei der Spaltung entstandene Insulinanalogon kann durch chromatographische Standardverfahren (z. B. Ionenaustauscher- und Reversed-Phase-Chromatographie) gereinigt und zuletzt durch Fällung, Kristallisation oder einfache Gefriertrocknung isoliert werden.

10

Der Vorläufer des Insulinanalogons hat vorzugsweise die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

- 15 His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys

- 20 Asn

(SEQ ID NO: 7), beispielsweise die Sequenz des His (B0)-Präproinsulins, oder die Sequenz

- 25 Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg

- 30 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
Asn

(SEQ ID NO: 8), beispielsweise die Sequenz des His(B-1), Ala(B0)-Präproinsulins, oder die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

- 5 His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys
10 Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(SEQ ID NO: 9), beispielsweise die Sequenz des His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-Präproinsulins.

- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend genannten Vorläufer der Insulinanaloga gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere die Präproinsuline, die DNA-Sequenzen, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß der vorliegenden Erfindung kodieren, die Expressionsvehikel, welche eine DNA-Sequenz enthalten, die für einen erfindungsgemäßen Vorläufer des
20 Insulinanalogons gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, sowie eine Wirtszelle, die mit einem solchen Expressionsvehikel transformiert ist.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Insulinanalogon und/oder mindestens ein physiologisch
25 verträgliches Salz gemäß der vorliegenden Erfindung.

- Vorzugsweise zeichnet sich die pharmazeutische Zubereitung dadurch aus, daß sie das erfindungsgemäße Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.
30

Die pharmazeutische Zubereitung enthält wahlweise ferner einen Depohtilfsstoff, vorzugsweise Protaminsulfat, wobei das Insulinanalogon und/oder das physiologisch

verträgliche Salz desselben vorzugsweise mit dem Protaminsulfat in einem Cokristallisat vorliegt.

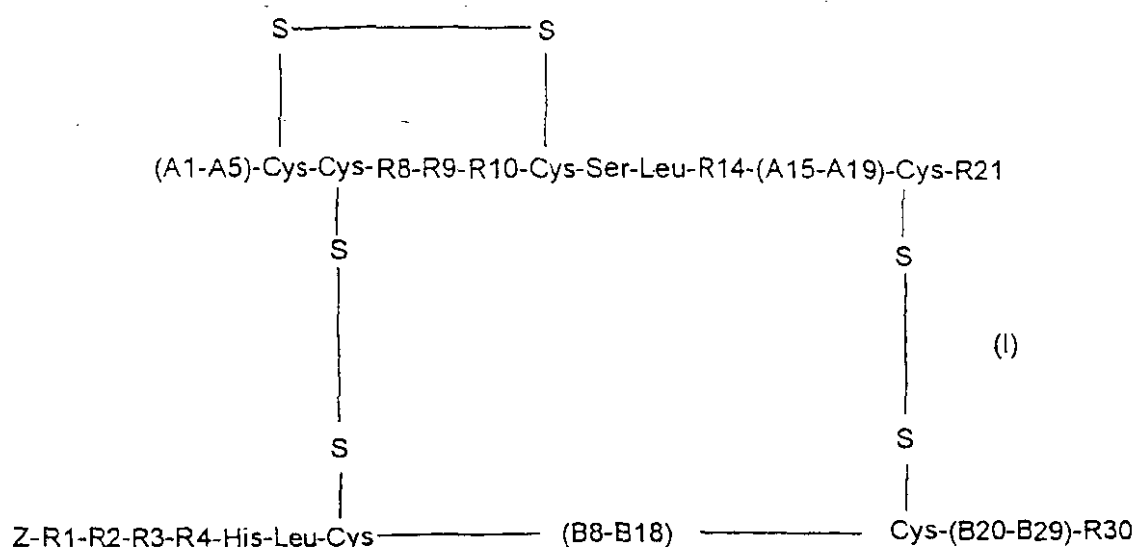
- Die pharmazeutische Zubereitung gemäß der vorliegenden Erfindung kann
- 5 wahlweise zusätzlich unmodifiziertes Humaninsulin und/oder ein weiteres Insulinanalogon enthalten, vorzugsweise Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-Humaninsulin.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, welche die pharmazeutische Zubereitung gemäß der vorliegenden Erfindung in
- 10 gelöster Form enthält, vorzugsweise gekennzeichnet durch einen Gehalt von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml, besonders bevorzugt durch einen Gehalt von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung des Insulinanalogons
- 15 und/oder dessen physiologisch verträglichen Salzes gemäß der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit verzögertem Wirkungseintritt aufweist.
-

- Die eingangs gestellte Aufgabe wird ferner gelöst durch einen Insulin-Zink-Komplex,
- 20 enthaltend ein Insulinhexamer und 4 bis 10 Zinkionen pro Insulinhexamer, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinhexamer aus sechs Molekülen eines Insulinanalogons der Formel I besteht,

12



worin bedeuten

- (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von
 5 Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (A15-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von
 Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von
 Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- 10 (B20-B29) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von
 Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- R8 Thr oder Ala,
- R9 Ser oder Gly,
- R10 Ile oder Val,
- 15 R14 Tyr, His, Asp oder Glu,
- R21 Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln,
- R1 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder
 ein Wasserstoffatom,
- R2 Val, Ala oder Gly,
- 20 R3 Asn, His, Glu oder Asp,
- R4 Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu,
- R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH,
- Z ein Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch

kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His).

Vorzugsweise enthält der Insulin-Zink-Komplex 5 bis 8 Zinkionen pro Insulinhexamer.

5

Vorzugsweise enthält der Insulin-Zink-Komplex ein Insulinhexamer, das aus sechs Molekülen des vorstehend beschriebenen Insulinanalogons der Formel I gemäß der vorliegenden Erfindung besteht.

- 10 Der Insulin-Zink-Komplex gemäß der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise auch dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

Phe Val His Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly

- 15 Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 10) aufweist, beispielsweise das His(B3)-Humaninsulin, oder dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

- 20 Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 11) aufweist, beispielsweise das Asp(B3)-Humaninsulin.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens einen erfindungsgemäßen Insulin-Zink-Komplex sowie eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine saure Lösung mindestens eines Insulinanalogons und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben mit einer entsprechenden Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-
- 30 Zink-Komplexes gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht, wobei das Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz vorzugsweise das vorstehend beschriebene Insulinanalogon der Formel I gemäß der vorliegenden

Erfindung oder ein Insulinanalogon der Formel I, dessen B-Kette die Sequenz mit der Nummer SEQ ID NO's.: 3, 4, 5, 10 oder 11 aufweist.

Die pharmazeutische Zubereitung ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß
5 sie den Insulin-Zink-Komplex in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, enthaltend die pharmazeutische Zubereitung in gelöster Form und ist vorzugsweise
10 gekennzeichnet durch einen Gehalt von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml, besonders bevorzugt durch einen Gehalt von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung des Insulin-Zink-Komplexes zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit
15 verzögertem Wirkungseintritt aufweist.

Die Insulinanaloga gemäß der vorliegenden Erfindung sind biologisch aktiv und zeigen nach subcutaner Applikation als schwach saure, klare Lösung mit 80 µg Zn⁺⁺/ml (Zink/ml) am Hund eine stark verzögerte Wirkung. Bei dem Insulinanalogon, welches am N-Terminus der B-Kette mit Histidin verlängert ist, das His(B0), des
20 (B30)-Humaninsulin (s. SEQ ID NO.: 3), hängt das Wirkprofil beispielsweise sehr stark von der Menge an zugesetzten Zinkionen ab. Eine zinkfreie Zubereitung besitzt keinerlei Depoteffekt (Gesamtwirkung 6 - 8 h, Beispiel 8) und unterscheidet sich in der Pharmakodynamik kaum von Humaninsulin, während man nach Zusatz von
25 Zinkionen (80 µg/ml) eine starke Wirkungsverzögerung findet (Gesamtwirkung etwa 16 h, Beispiel 8). Der beobachtete Depoteffekt, ist also wesentlich ausgeprägter als der von NPH-Insulin. Darüber hinaus besitzt dieses Analogon den Vorteil, daß die Pharmakodynamik durch Vorgabe des Zinkgehaltes in einer Breite steuerbar ist, wie es mit Humaninsulin nicht möglich ist. Formulierungen mit raschem Wirkungseintritt
30 lassen sich ebenso wie solche mit mäßig oder stark verzögerter Wirkung mit einer Wirksubstanz allein durch die Variation des Zinkgehaltes herstellen. Damit kann das Wirkprofil individuell den Bedürfnissen des Patienten angepaßt werden, entweder unter Verwendung einer Zubereitung mit entsprechend voreingestelltem Zinkgehalt

oder durch Mischung von Zubereitungen mit hohem und niedrigem Zinkgehalt durch den Arzt oder den Patienten selbst.

- 5 Die hier beschriebenen Analoga sind ferner dadurch charakterisiert, daß sie im Vergleich zu Humaninsulin eine erhöhte Affinität zu Zinkionen aufweisen.

- 10 Humaninsulin bildet in wäßriger neutraler Lösung Hexamere, welche jeweils zwei Zinkionen über die His(B10)-Seitenketten komplexieren. Diese Zinkionen lassen sich durch Dialyse gegen wäßrige Puffer im Neutralen nicht entfernen. Unter den gleichen Bedingungen binden die hier beschriebenen Analoga mehr als 4 Zinkionen. Im Falle des erfindungsgemäßen His(B0)-Des(B30)- und His(B3)-Insulin sind dies etwa 7 Zinkionen/Hexamer, bei Asp(B3)-Insulin wurden 4,2 Zinkionen/Hexamer gemessen (Beispiel 9).

- 15 Es ist bekannt, daß in neutralen Lösungen Zink zur Bildung höhermolekularer Assoziate und zur Ausfällung des Insulins führt. Nach der Injektion einer schwach sauren zinkhaltigen Zubereitung, die Insulin klar gelöst enthält, kommt es daher im subcutanen Gewebe durch Neutralisation zur Bildung von Insulin-Zinkkomplexen und in der Folge zur Präzipitation des Insulins. Aus diesem Depot geht Insulin wieder
20 in Lösung und gelangt dann verzögert in den Blutstrom und an den Wirkort. Diese Wirkungsverzögerung ist bei Humaninsulin nur schwach, bei den hier beschriebenen Analoga aufgrund der erhöhten Affinität zu Zink jedoch stark ausgebildet. Die erhöhte Zinkbindung stellt daher die Grundlage für die oben beschriebenen zinkabhängige Wirkungsverlängerung dar.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft daher nicht nur die beschriebenen Insulinanaloga sondern auch auf die zugehörigen Insulin-Zink-Komplexe. Diese Komplexe unterscheiden sich von den entsprechenden Humaninsulin-Zink-Komplexen dadurch, daß sie einen höheren Anteil an fest gebundenem Zink aufweisen. Es ist daher naheliegend, daß neben Zink auch andere Übergangsmetallionen wie zum
30 Beispiel Cobalt oder Kupfer zur Bildung entsprechender Komplexe eingesetzt werden können.

Beispiel 1: Konstruktion des Plasmides pINT345d kodierend für die Variante His(B3)-Präproinsulin.

Das US Patent mit der Patentnummer 5358857 beschreibt das Plasmid pINT90d.

- 5 DNA dieses Plasmides dient als Ausgangsmaterial zur Konstruktion des Plasmides pINT345d, welches gegenüber pINT90d durch zwei neue Eigenschaften charakterisiert ist. Es kodiert zum einen für ein Präproinsulinanalogon, das in Position 3 der B-Kette die Aminosäure Histidin statt Asparagin enthält und trägt zum anderen unmittelbar vor Beginn der für diese Präproinsulinvariante kodierenden
- 10 Sequenz eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BssH2, so daß die für die N-terminalen 10 Aminosäuren des Präproinsulinanalogons kodierende Sequenz leicht manipulierbar wird, wenn man die Dra3-Spaltstelle im Verlauf der Präproinsulinsequenz berücksichtigt.

- Zur Konstruktion des Plasmides pINT345d wird DNA des Plasmides pINT90d in
- 15 einem Doppelverdauansatz in Position 284bp durch das Restriktionsenzym NcoI und in Position 351 bp durch das Restriktionsenzym Dra3 gespalten, so daß zwei Fragmente entstehen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Spaltgemisches wird das große Restplasmid-DNA-Fragment isoliert.

- Dieses DNA-Fragment wird dann mit dem synthetischen DNA-Fragment der Form
- 20

$\frac{1}{2}$ NcoI
 5' - C ATG GCA ACA ACA TCA ACA GGA AAT TCG GCG CGC TTT GTG CAC CAG CAC CTG
 3' - CGT TGT TGT AGT TGT CCT TTA AGC CGC GCG AAA CAC GTG GTC GTG GAC

5 B7 B8 B9 $\frac{1}{2}$ Dra3
 TGC GGC TCC CAC CTA - 3'
 ACG CCG AGG GTG -5'

in einer T4-DNA-Ligasereaktion umgesetzt. Kompetente E.coli K12-Zellen werden
 10 mit dem Ligationsgemisch transformiert und der Transformationsansatz auf NA-
 Platten, die 20mg/l Ampicillin enthalten, ausplattiert. Die Platten werden über Nacht
 bei 37° C inkubiert. Von entstandenen Kolonien wird Plasmid-DNA isoliert mit dem
 Restriktionsenzym BssH2 gespalten. Die gewünschte Plasmid-DNA wird dabei
 linearisiert und unterscheidet sich so von pINT90d-DNA, die keine BssH2-
 15 Schnittstelle enthält und entsprechend nicht gespalten wird.
 Die Plasmid-DNA eines Klonen, die sich richtig verhält, wird mit pINT345d
 bezeichnet.

~~Sie dient als Ausgangsmaterial für die die Konstruktion der im folgenden~~
 beschriebenen Präproinsulinvarianten.

20

Beispiel 2: Konstruktion des Plasmides pINT342d kodierend für die Variante His(B0)-
 Präproinsulin

DNA des Plasmides pINT345d wird mit den Enzymen BssH2 und Dra3
 25 doppelverdaut und das große Restplasmidfragment nach gelektrophoretischer
 Trennung isoliert. Dieses DNA-Fragment wird mit dem synthetischen DNA-
 Fragment der Form

30 His B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10
 5' - CG CGC CAC TTT GTT AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCC CAC CTA - 3'
 3' - G GTG AAA CAA TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGG GTG - 5'
 $\frac{1}{2}$ BssH2 Hpa1 $\frac{1}{2}$ Dra3

in einer T4-DNA-Ligasereaktion umgesetzt. Es entsteht das Plasmid pINT342d, das
 35 durch eine zusätzliche Hpa1-Schnittstelle gegenüber dem Ausgangsplasmid

charakterisiert ist. Das Plasmid kodiert für eine Präproinsulinvariante die in Position B0 ein Histidin aufweist.

Beispiel 3: Konstruktion des Plasmides pINT343d kodierend für die Variante

5 His(B-1), Ala(B0)-Präproinsulin

DNA des in Beispiel b beschriebenen Restplasmidfragmentes wird mit einem synthetischen DNA-Fragment der Form

10

	His	Ala	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11
5'-	CG	CGC	CAC	GCT	TTT	GTT	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC CAC CTA - 3'
3'-		G	GTG	CGA	AAA	CAA	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGG GTG - 5'
	½ BssH2			Hpa1				¼ Dra3					

15 in einer T4-DNA-Ligasereaktion umgesetzt. Es entsteht das Plasmid pINT343d, das wie auch pINT342d gegenüber dem Ausgangsvektor eine zusätzliche Hpa1-Schnittstelle enthält.

Beispiel 4: Konstruktion des Plasmides pINT344d kodierend für die Variante

20 His(B-2),Ala(B-1),Ala(B0)-Präproinsulin

DNA des in Beispiel b beschriebenen Restplasmidfragmentes wird mit einem synthetischen DNA-Fragment der Form

25

	His	Ala	Ala	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11
5'-	CG	CGC	CAC	GCT	GCT	TTT	GTT	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC CAC CTA - 3'
3'-		G	GTG	CGA	CGA	AAA	CAA	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGG GTG - 5'
	½ BssH2			Hpa1				¼ Dra3						

30

in einer T4-DNA-Ligasereaktion umgesetzt. Es entsteht das Plasmid pINT344d, das gegenüber dem Ausgangsvektor durch eine zusätzliche Hpa1-Schnittstelle charakterisiert ist.

Beispiel 5: Expression der konstruierten Insulinvarianten

Die Plasmide pINT 342d, 343d und 344d werden beispielhaft jeweils nach E.coli K12 W3110 transformiert. Rekombinante Bakterien, welche die Plasmide für die jeweilige Variante enthalten, werden dann gemäß Beispiel 4 des US Patentes mit der Patentnummer 5227293 fermentiert und so der gewünschte Rohstoff zur Erzeugung der jeweiligen Insulinvariante erzeugt.

Beispiel 6: Herstellung von His(B0),Des(B30)-Insulin

Gemäß Beispiel 5 wird die Präproinsulinvariante in E.coli exprimiert und in Form von Einschußkörperchen (*inclusion bodies*) nach Zellaufschluß durch Zentrifugation isoliert. Die Einschußkörperchen werden in Harnstoff (8 mol/l) gelöst, einer Sulfitolyse unterzogen und durch Anionenaustauscher (Q-Sepharose) und Gelpermeationschromatographie (Sephacryl S 200) gereinigt. Die bei der Chromatographie eingesetzten Puffer enthalten 4 M Harnstoff und 50 mM Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl) pH 8,5. Die fraktionierte Elution am Anionenaustauscher erfolgt durch Anlegen eines Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl. Die Konzentration des Harnstoffs wird anschließend durch Ultrafiltration und Verdünnen auf < 1 M reduziert und das Präproinsulin-S-Sulfonat durch Fällung bei pH 4 isoliert und zuletzt getrocknet.

Zur Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken, wie sie in natürlichem Proinsulin vorliegen, wird das Präproinsulin-S-Sulfonat bei einer Konzentration von 0,3 g/l in einem Puffer, der 20 mM Glycin enthält, bei pH 10,8 gelöst, mit Merkaptoethanol versetzt (etwa 25-50 mol/mol Präproinsulin) und über Nacht bei 4 °C gerührt. Der Ansatz wird anschließend mit Phosphorsäure auf pH 3,5 gestellt und zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Präproinsulin wird zur Überführung in Insulin nach Zugabe von Tris (25 mM) auf pH 8,2 gestellt und mit Trypsin (1,5 mg/g Präproinsulin) versetzt. Der Verlauf der proteolytischen Spaltung wird mittels Reversed Phase HPLC verfolgt. Nach etwa 6 Stunden enthält der Ansatz einen hohen Anteil an His(B0),Des(B30)-Insulin. Die Reaktion wird durch Ansäuern auf pH 3,5 beendet. Die Reinigung des Insulinanalogons erfolgt durch Ionenaustauscher-Chromatographie (S-Hyper-D, Sepracor) und Reversed Phase Chromatographie

(PLRP-S RP300, Polymer Laboratories). Die Ionenaustauscherchromatographie wird in einem Puffer durchgeführt, der 30 % 2-Propanol und 50 mM Milchsäure (pH 3,5) enthält. Die Elution des gebundenen Insulins erfolgt durch einen linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl. Die Reversed Phase Chromatographie erfolgt in 0,1 %

- 5 Trifluoressigsäure, der zur Elution steigende Mengen an Acetonitril zugemischt werden. Das Produkt wird durch Ausfällung bei pH 5,4 isoliert und lyophilisiert.

Beispiel 7: Formulierung von Insulinanaloga zur parenteralen Applikation

- Die Zubereitungen enthalten je ml 40 bzw. 100 IE Insulin (1 IE entspricht etwa 6,2
10 nmol), 20 mg 85 % Glycerin, 2,7 mg m-Kresol und gegebenenfalls Zink⁺⁺ (als Zinkchlorid) in wässriger, steriler Lösung bei pH 4.

Beispiel 8: Wirkprofil von His(B0),Des(B30)-Insulin am Hund

- 15 Jeweils 6 Hunde (Beagles) erhielten subcutane Applikationen einer Zubereitung mit 40 U/ml (Beispiel 7) und dem angegebenen Gehalt an Zink. Die Dosis betrug 0,3 IE/kg. Im weiteren Verlauf des Versuchs wurde nach den angegebenen Zeiten die Konzentration der Blutglucose gemessen. Die Werte wurden prozentual auf den jeweiligen Ausgangswert normiert und gemittelt.

20

Zeit (Stunden)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Zinkfrei	100	59	50	61	75	84	89	98	103	97	104	100
80 µg Zink ⁺⁺ /ml	100	97	83	75	65	56	51	58	68	72	78	82

Beispiel 9: Zinkbindung von Insulinanaloga

25

Eine Zubereitung von Insulin (0,3 mM Insulin, 0,13 M NaCl, 0,1 % Phenol, 100 µg/ml Zink⁺⁺ (als Zinkchlorid), 25 mM Tris/HCl, pH 7,4) wurde extensiv gegen zinkfreien

neutralen Puffer dialysiert (3h gegen 0,15 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei Raumtemperatur, 72 Stunden gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei 15 °C und nochmals 16 h gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei 15 °C). Danach wurden die Dialysate angesäuert und analysiert. Die Konzentration von Insulin wurde durch Reversed Phase-HPLC und die des Zink durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Die Zinkwerte wurden mit dem Zinkgehalt eines Kontrollansatzes, der kein Insulin enthielt, korrigiert.

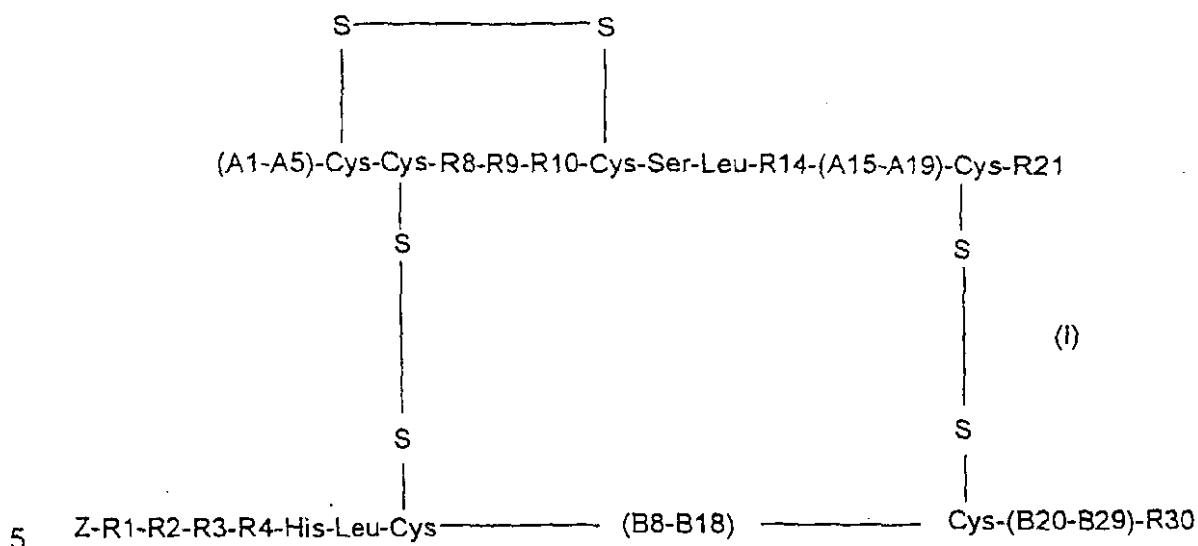
10

Zinkbindung

<i>Insulin</i>	<i>mol Zink/mol Hexamer</i>
Humaninsulin	2,5
His(B3)-Insulin	6,9
Asp(B3)-Insulin	4,2
His(B0),Des(B30)-Insulin	6,8

Patentansprüche

1. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I



worin bedeuten

- (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- 10 (A15-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (B20-B29) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von
- 15 Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- R8 Thr oder Ala,
- R9 Ser oder Gly,
- R10 Ile oder Val,
- R14 Tyr, His, Asp oder Glu,
- 20 R21 Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln,
- R1 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder ein Wasserstoffatom,
- R2 Val, Ala oder Gly,

R3 Asn, His, Glu oder Asp,

R4 Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu,

R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH,

Z ein Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch

5 kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His),

mit der Maßgabe, daß für den Fall, daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R1 oder R3

His, Glu oder Asp bedeuten, wobei R3 His bedeutet, wenn R1 einen neutralen oder

negativ geladenen Aminosäurerest darstellt, oder mit der Maßgabe, daß für den Fall,

daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R14 His, Asp oder Glu bedeutet, und ferner mit

10 der Maßgabe, daß sich das Insulinanalogon oder das physiologisch verträgliche Salz

desselben der Formel I nicht allein durch Variation der Aminosäurereste in den

Positionen R3 oder R3 in Verbindung mit R21 oder R3 in Verbindung mit R4 in

Formel I von Humaninsulin unterscheidet.

15 2. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R8 Thr, R9 Ser und R10 Ile bedeuten.

3. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß R1 Phe, His, Asn, Asp oder Gly
20 bedeutet.

4. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Thr, Ala oder Ser bedeutet.
25

5. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß R21 Asn und R1 Phe bedeuten.

30 6. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß R2 Val, R3 Asn und R4 Gln bedeuten.

7. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 Tyr bedeutet.
- 5 8. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 His bedeutet.
9. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
10 einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 Asp bedeutet.
10. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
15 einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 Glu bedeutet.
11. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Thr bedeutet.
20
12. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Ala bedeutet.
- 25 13. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Ser bedeutet.
14. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
30 einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 -OH bedeutet.

15. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Z His bedeutet.

5 16. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Z His-Ala- bedeutet.

10 17. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Z His-Ala-Ala- bedeutet.

15 18. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys

aufweist (SEQ ID NO: 3).

20

19. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

25 His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO: 4).

30 20. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO: 5).

21. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
5 Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

- 10 aufweist (SEQ ID NO: 6).

22. Verfahren zur Herstellung eines Insulinanalogons oder eines physiologisch
verträglichen Salzes desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
21, umfassend die Konstruktion eines replizierbaren Expressionsvehikels, welches
15 eine DNA-Sequenz enthält, die für einen Vorläufer des Insulinanalogons mit der
allgemeinen Aminosäuresequenz II kodiert

Met- X^2_m -(Arg)_p-Z-R1-R2-R3-R4-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B29)-R30- X^1_n -Arg-
(A1-A5)-Cys-Cys-R8-Ser-R10-Cys-Ser-Leu-R14-(A15-A19)-Cys-R21

- 20 II,

worin

X^1_n eine Peptidkette mit n Aminosäureresten ist, wobei n eine ganze
Zahl von 0 bis 34 bedeutet,

- 25 X^2_m eine Peptidkette mit m Aminosäureresten ist, wobei m eine ganze
Zahl von 0 bis 20 bedeutet,

p 0, 1 oder 2,

R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest bedeutet
oder abwesend ist und

- 30 Z abwesend ist oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch
kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste
(His) bedeutet

und die übrigen Variablen die in Anspruch 1 genannten Bedeutungen haben, wobei
auch die in Anspruch 1 genannten Maßgaben gelten, Expression in einer Wirtszelle

und Freisetzung des Insulinanalogons aus dessen Vorläufer mit chemischen und/oder enzymatischen Methoden.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle ein
5 Bakterium ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium *E. coli* ist.

10 25. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle eine Hefe ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist.

15

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26 zur Herstellung eines Insulinanalogons gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer des Insulinanalogons die Sequenz

20 Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
25 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
Asn

aufweist (SEQ ID NO: 7).

30

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26 zur Herstellung eines Insulinanalogons gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer des Insulinanalogons die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
 His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 5 Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
 Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
 Asn

10 aufweist (SEQ ID NO: 8).

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26 zur Herstellung eines
 Insulinanalogons gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer
 des Insulinanalogons die Sequenz

15

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
 His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
 Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
 20 Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys
 Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

aufweist (SEQ ID NO: 9).

25

30. Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 22.

31. Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 27.

30 32. Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 28.

33. Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 29.

34. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 30 kodiert.
35. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß
5 Anspruch 31 kodiert.
36. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 32 kodiert.
- 10 37. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 33 kodiert.
38. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 34.
- 15 39. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 35.
-
40. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 36.
41. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 37.
20
42. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvehikel gemäß einem der Ansprüche 38 bis 41 transformiert ist.
- 25 43. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Insulinanalogon und/oder mindestens ein physiologisch verträgliches Salz desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21.
44. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben
30 in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.
45. Pharmazeutische Zubereitung nach Ansprüche 43 oder 44, dadurch gekennzeichnet, daß sie ferner einen Depothilfsstoff enthält.

46. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß der Depothilfsstoff Protaminsulfat ist, wobei das Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben mit dem Protaminsulfat in einem

5 Cokristallisat vorliegt.

47. Pharmazeutische Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 46, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen Gehalt an unmodifiziertem Humaninsulin.

10

48. Pharmazeutische Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 47, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen Gehalt an einem Insulinanalogon.

49. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinanalogon Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-Humaninsulin ist.

15

50. Injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, enthaltend die pharmazeutische Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 49 in gelöster Form.

20 51. Injizierbare Lösung nach Anspruch 50, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml.

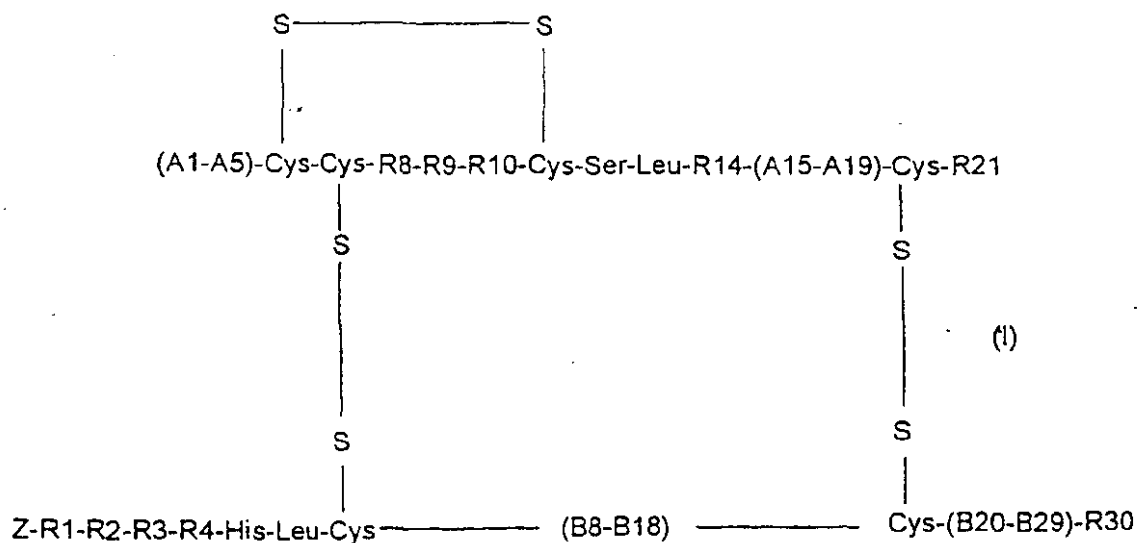
52. Injizierbare Lösung nach Anspruch 51, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.

25

53. Verwendung des Insulinanalogons und/oder dessen physiologisch verträglichen Salzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit verzögertem Wirkungseintritt aufweist.

30

54. Insulin-Zink-Komplex, enthaltend ein Insulinhexamer und 4 bis 10 Zinkionen pro Insulinhexamer, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinhexamer aus sechs Molekülen eines Insulinanalogons der Formel I besteht,



worin bedeuten

- | | | |
|----|-----------|---|
| 5 | (A1-A5) | die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin, |
| | (A15-A19) | die Aminosäurereste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin, |
| 10 | (B8-B18) | die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin, |
| | (B20-B29) | die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin, |
| | R8 | Thr oder Ala, |
| | R9 | Ser oder Gly, |
| 15 | R10 | Ile oder Val, |
| | R14 | Tyr, His, Asp oder Glu, |
| | R21 | Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln, |
| | R1 | ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder ein Wasserstoffatom, |
| 20 | R2 | Val, Ala oder Gly, |
| | R3 | Asn, His, Glu oder Asp, |
| | R4 | Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu, |
| | R30 | ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH, |

Z ein Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His).

55. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54, enthaltend 5 bis 8 Zinkionen pro Insulinhexamer.

5

56. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54 oder 55, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinhexamer aus sechs Molekülen des Insulinanalogons der Formel I gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21 besteht.

10 57. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54 oder 55, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

Phe Val His Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

15

(SEQ ID NO: 10) aufweist.

58. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54 oder 55, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

20

Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 11) aufweist.

25

59. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens einen Insulin-Zink-Komplex gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 54 bis 58.

60. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine saure Lösung mindestens
30 eines Insulinanalogons gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 54 bis 58 und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben mit einer entsprechenden Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-Zink-Komplexes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 54 bis 58 ermöglicht.

61. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 60, enthaltend eine saure
Lösung des Insulinanalogons und/oder des physiologisch verträglichen Salzes
desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21 mit einer
5 entsprechende Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-Zink-
Komplexes gemäß Anspruch 56 ermöglicht.

62. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 60, enthaltend eine saure
Lösung mindestens eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 57 oder 58
10 und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben mit einer
entsprechenden Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-Zink-
Komplexes gemäß einem der Ansprüche 57 oder 58 ermöglicht.

63. Pharmazeutische Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 59
15 bis 62, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Insulin-Zink-Komplex in gelöster,
amorpher und/oder kristalliner Form enthält.

64. Injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, enthaltend die pharmazeutische
Zubereitung gemäß Anspruch 63 in gelöster Form:

20

65. Injizierbare Lösung nach Anspruch 64, gekennzeichnet durch einen Gehalt
von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml.

66. Injizierbare Lösung nach Anspruch 65, gekennzeichnet durch einen Gehalt
25 von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.

67. Verwendung des Insulin-Zink-Komplex gemäß einem oder mehreren der
Ansprüche 54 bis 58 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche
eine Insulinaktivität mit verzögertem Wirkungseintritt aufweist.

30

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- 5 (i) ANMELDER:
(A) NAME: Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH
(B) STRASSE: -
(C) ORT: Frankfurt
10 (D) BUNDESLAND: -
(E) LAND: Germany
(F) POSTLEITZAHL: 65926
(G) TELEPHON: 069-305-5307
(H) TELEFAX: 069-357175
15 (I) TELEX: -
- (ii) ANMELDETITEL: Neue Insulinderivate zur Behandlung von
Diabetes mellitus
- 20 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11
- (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
35 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (ix) MERKMALE:
40 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LÄGE: 1..21
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:
45 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
50 20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LÄGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LÄGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

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

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein

(B) LAGE: 1..31

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

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

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

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 32 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein

(B) LAGE: 1..32

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

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

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

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LÄGE: 1..33

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

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

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 98 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LÄGE: 1..98

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Phe Val Asn Gln
1 5 10 15
His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
20 25 30
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp
35 40 45
Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser
50 55 60
Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val
65 70 75 80
Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
85 90 95
Cys Asn

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 99 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..99

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

```

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Ala Phe Val Asn
1          5          10          15
Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
          20          25          30

Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu
          35          40          45

Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly
          50          55          60

Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
65          70          75          80

Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn
          85          90          95

Tyr Cys Asn

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 100 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..100

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Ala Ala Phe Val
 1 5 10 15
 Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
 20 25 30
 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala
 35 40 45
 Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
 50 55 60
 Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 65 70 75 80
 Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu
 85 90 95
 Asn Tyr Cys Asn
 100

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein

(B) LAGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Phe Val His 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

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein

(B) LAGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

Phe Val Asp 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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/17 C07K14/62 A61K38/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 821 006 A (HOECHST AG) 28 January 1998 (1998-01-28) cited in the application the whole document	1-67
A	WO 95 07931 A (HALSTROM JOHN BROBERG ; JONASSEN IB (DK); MARKUSSEN JAN (DK); HAVEL) 23 March 1995 (1995-03-23) abstract; claims examples	1-67
A	EP 0 668 292 A (HOECHST AG) 23 August 1995 (1995-08-23) cited in the application examples	22-42, 49
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2000

Date of mailing of the international search report

31/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03490

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO 95 00550 A (NOVONORDISK AS ;BALSCHMIDT PER (DK)) 5 January 1995 (1995-01-05) the whole document ---	46-53
A	EP 0 214 826 A (NOVO INDUSTRI AS) 18 March 1987 (1987-03-18) the whole document -----	1-67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03490

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0821006	A	28-01-1998	AU 3017197 A	05-02-1998
			BR 9704117 A	29-12-1998
			CA 2207078 A	26-01-1998
			CN 1172811 A	11-02-1998
			CZ 9702370 A	18-02-1998
			HU 9701299 A	30-11-1998
			JP 10072496 A	17-03-1998
			NO 973438 A	27-01-1998
			NZ 328421 A	23-12-1998
			PL 321343 A	02-02-1998
WO 9507931	A	23-03-1995	AU 4846197 A	19-02-1998
			AU 682061 B	18-09-1997
			AU 7652094 A	03-04-1995
			BG 61611 B	30-01-1998
			BG 100420 A	31-12-1996
			BR 9407508 A	07-01-1997
			CA 2171424 A	23-03-1995
			CN 1133598 A	16-10-1996
			CZ 9600789 A	16-10-1996
			EP 0792290 A	03-09-1997
			FI 961220 A	14-05-1996
			HU 75991 A	28-05-1997
			JP 9502867 T	25-03-1997
			NO 961070 A	15-05-1996
			NZ 273285 A	24-10-1997
			PL 313444 A	08-07-1996
			RO 112873 A	30-01-1998
			SK 32496 A	06-11-1996
			US 5750497 A	12-05-1998
			ZA 9407187 A	17-03-1995
EP 0668292	A	23-08-1995	DE 4405179 A	24-08-1995
			AT 166069 T	15-05-1998
			AU 699817 B	17-12-1998
			AU 1228895 A	31-08-1995
			CA 2142780 A	19-08-1995
			DE 59502138 D	18-06-1998
			ES 2119241 T	01-10-1998
			FI 950699 A	19-08-1995
			HK 1010457 A	17-06-1999
			JP 7265092 A	17-10-1995
			NO 950592 A	21-08-1995
			SG 46683 A	20-02-1998
			US 5663291 A	02-09-1997
WO 9500550	A	05-01-1995	AT 176482 T	15-02-1999
			AU 6995794 A	17-01-1995
			DE 69416409 D	18-03-1999
			DE 69416409 T	16-09-1999
			EP 0705275 A	10-04-1996
			ES 2130428 T	01-07-1999
			GR 3030130 T	30-07-1999
			JP 2837956 B	16-12-1998
			JP 8511779 T	10-12-1996
			US 5547930 A	20-08-1996
			US 5834422 A	10-11-1998
			US 5840680 A	24-11-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03490

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0214826 A	18-03-1987	AT 113061 T	15-11-1994
		AU 593274 B	08-02-1990
		AU 6206686 A	05-03-1987
		CA 1306212 A	11-08-1992
		CN 1029977 B	11-10-1995
		CS 8606310 A	12-09-1990
		DE 3650101 D	24-11-1994
		DE 3650101 T	23-02-1995
		DK 411686 A,B,	03-03-1987
		ES 2001624 A	01-06-1988
		FI 863512 A	01-03-1987
		GR 862233 A	31-12-1986
		HU 42526 A	28-07-1987
		IE 66138 B	13-12-1995
		IL 79887 A	21-11-1991
		JP 2662390 B	08-10-1997
		JP 62053999 A	09-03-1987
		KR 9400756 B	29-01-1994
		NO 177009 B	27-03-1995
		NZ 217406 A	29-05-1989
		PH 25772 A	18-10-1991
		US 5618913 A	08-04-1997
		YU 4188 A	30-06-1990
		YU 148486 A	30-04-1991
		PT 83278 A,B	01-09-1986

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷

C12N 15/17

C07K 14/62 A61K 38/28

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99807068.8

1HC 002008

C 003498

[43] 公开日 2001 年 7 月 18 日

[11] 公开号 CN 1304450A

[22] 申请日 1999.5.21 [21] 申请号 99807068.8

[30] 优先权

[32] 1998.6.6 [33] DE [31] 19825447.4

[86] 国际申请 PCT/EP99/03490 1999.5.21

[87] 国际公布 WO99/64598 德 1999.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2000.12.5

[71] 申请人 阿文蒂斯药物德国有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 J·厄特尔 P·哈伯曼 K·杰森

G·赛普克 A·沃尔莫

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 黄草生

权利要求书 9 页 说明书 22 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 具有增强的锌结合力的新型胰岛素类似物

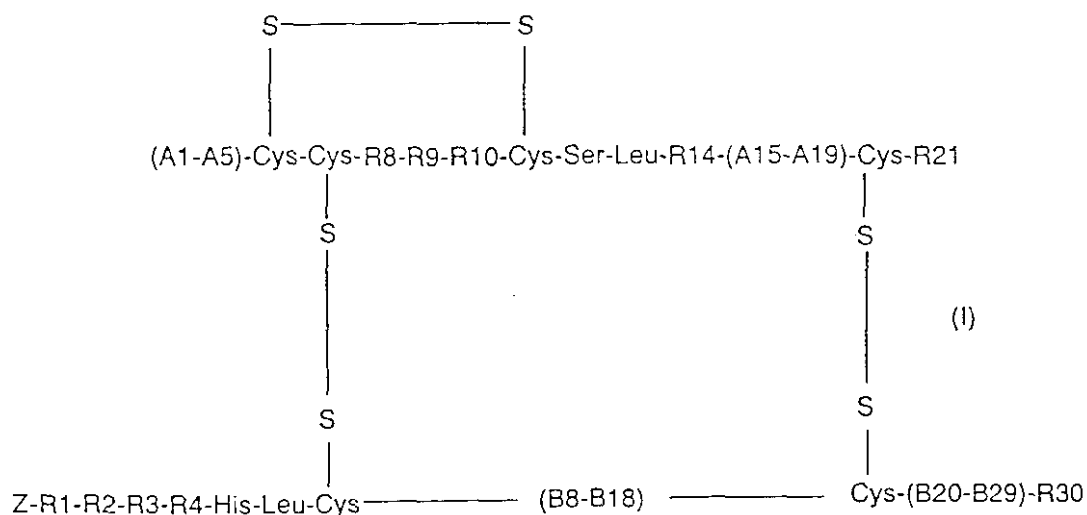
[57] 摘要

本发明涉及具有增强的锌结合力的胰岛素类似物及其稳定的锌复合物,与人胰岛素相比,它们具有延迟的活性。本发明还涉及所述胰岛素类似物的生产方法及用途,尤其是作为药物制剂用于治疗 I 型和 II 型糖尿病的用途。

ISSN 1000-8427 4

权 利 要 求 书

1. 一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐,



其中

(A1-A5)为人胰岛素或动物胰岛素 A 链 A1-A5 位点的氨基酸残基,
 (A15-A19)为人胰岛素或动物胰岛素 A 链 A15-A19 位点的氨基酸残基,

(B8-B18)为人胰岛素或动物胰岛素 B 链 B8-B18 位点的氨基酸残基,

(B20-B29)为人胰岛素或动物胰岛素 B 链 B20-B29 位点的氨基酸残基,

R8 为 Thr 或 Ala,

R9 为 Ser 或 Gly,

R10 为 Ile 或 Val,

R14 为 Tyr、His、Asp 或 Glu,

R21 为 Asn、Asp、Gly、Ser、Thr、Ala、Glu 或 Gln,

R1 为任意所需要的遗传上可编码的氨基酸残基、缺失或为氢原子,

R2 为 Val、Ala 或 Gly,

R3 为 Asn、His、Glu 或 Asp,

R4 为 Ala、Ser、Thr、Asn、Asp、Gln、Gly 或 Glu,

R30 为任意所需要的遗传上可编码的氨基酸残基或-OH,

Z 为氢原子或一段含有 1-4 个遗传上可编码的氨基酸残基的肽, 包括 1-4 个 His 残基,

附带条件是当 Z 为氢原子, R1 或 R3 为 His、Glu 或 Asp, 如果 R1 为中性或带负电荷氨基酸残基, R3 则为 His, 或者附带条件是如果其中 Z 为氢原子, 则 R14 为 His、Asp 或 Glu, 此外附带条件是式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐与人胰岛素相比, 差异不是仅仅式 I 中 R3 位点, 或 R3 和 R21 位点, 或 R3 和 R4 位点氨基酸残基变异。

2. 如权利要求 1 所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R8 为 Thr, R9 为 Ser 及 R10 为 Ile.

3. 如权利要求 1 或 2 所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R1 为 Phe、His、Asn、Asp 或 Gly.

4. 如权利要求 1-3 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R30 为 Thr、Ala 或 Ser.

5. 如权利要求 1-4 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R21 为 Asn 及 R1 为 Phe.

6. 如权利要求 1-5 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R2 为 Val, R3 为 Asn 及 R4 为 Glu.

7. 如权利要求 1-6 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R14 为 Tyr.

8. 如权利要求 1-6 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R14 为 His.

9. 如权利要求 1-6 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R14 为 Asp.

10. 如权利要求 1-6 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R14 为 Glu.

11. 如权利要求 1-10 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R30 为 Thr.

12. 如权利要求 1-10 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R30 为 Ala.

13. 如权利要求 1-10 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R30 为 Ser.

14. 如权利要求 1-10 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R30 为 -OH.

15. 如权利要求 1-14 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 Z 为 His.

16. 如权利要求 1-14 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 Z 为 His-Ala-.

17. 如权利要求 1-14 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 Z 为 His-Ala-Ala-.

18. 如权利要求 15 所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 B 链具有序列

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys

(SEQ ID NO: 3).

19. 如权利要求 15 所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 B 链具有序列

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 4).

20. 如权利要求 16 所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 B 链具有序列

His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO:5).

21. 如权利要求 17 所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 B 链具有序列

His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 6).

22. 如权利要求 1-21 中一项或多项所述的胰岛素类似物或其生理可耐受盐的制备方法, 包括构建一种可复制的表达载体, 该载体包含一段编码具有氨基酸序列 II 的胰岛素类似物前体的 DNA 序列

Met-X²_m-(Arg)_p-Z-R1-R2-R3-R4-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B29)-R30-
X¹_n-Arg-(A1-A5)-Cys-Cys-R8-Ser-R10-Cys-Ser-Leu-R14-(A15-A19)-Cys-R21
II,

其中

X¹_n 为含有 n 个氨基酸残基的肽链, n 为 0-34 的整数,

X²_m 为含有 m 个氨基酸残基的肽链, m 为 0-20 的整数,

p 为 0、1 或 2,

R30 为任意所需要的遗传上可编码的氨基酸残基或缺失, 以及

Z 缺失或为一具有 1-4 个遗传上可编码的氨基酸残基的肽段, 包括 1-4 个 His 残基,

其它变量具有权利要求 1 所述含义, 权利要求 1 所述附带条件仍然适用,

在宿主细胞中表达以及利用化学和/或酶学方法从其前体释放胰岛素类似物。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 其中宿主细胞是细菌。

24. 如权利要求 23 所述的方法, 其中细菌是大肠杆菌。

25. 如权利要求 22 所述的方法, 其中宿主细胞是酵母。

26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中酵母是酿酒酵母。

27. 如权利要求 22-26 中任一项所述的制备如权利要求 19 所述的

胰岛素类似物的方法，其中胰岛素类似物前体具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
Cys Asn

(SEQ ID NO: 7).

28. 如权利要求 22-26 中任一项所述的制备如权利要求 20 所述的胰岛素类似物的方法，其中胰岛素类似物前体具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
Cys Asn

(SEQ ID NO: 8).

29. 如权利要求 22-26 中任一项所述的制备如权利要求 21 所述的胰岛素类似物的方法，其中胰岛素类似物前体具有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys
Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(SEQ ID NO: 9).

30. 如权利要求 22 所述的胰岛素类似物前体。

31. 如权利要求 27 所述的胰岛素类似物前体。

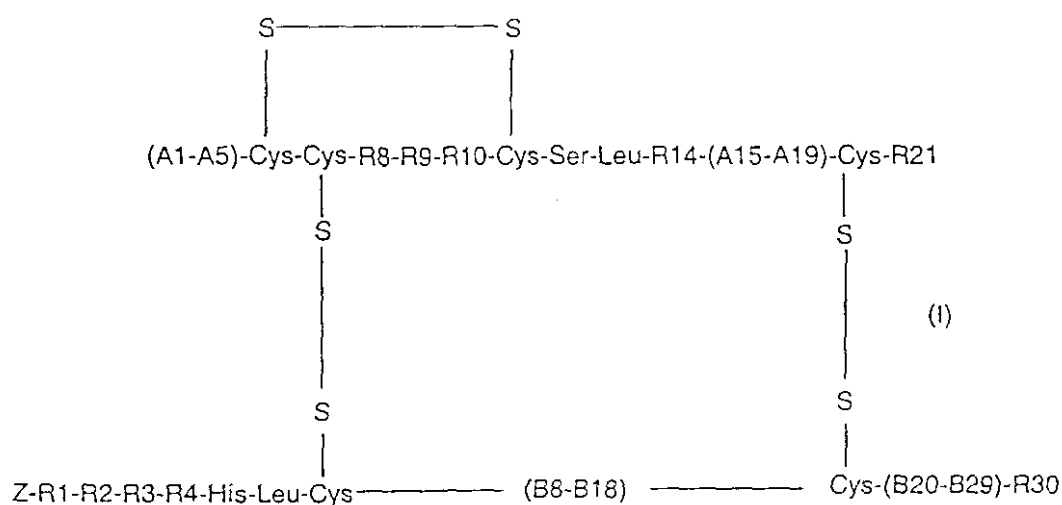
32. 如权利要求 28 所述的胰岛素类似物前体。

33. 如权利要求 29 所述的胰岛素类似物前体。
34. 编码如权利要求 30 所述的胰岛素类似物前体的 DNA 序列。
35. 编码如权利要求 31 所述的胰岛素类似物前体的 DNA 序列。
36. 编码如权利要求 32 所述的胰岛素类似物前体的 DNA 序列。
37. 编码如权利要求 33 所述的胰岛素类似物前体的 DNA 序列。
38. 一种表达载体，其包含如权利要求 34 所述的 DNA 序列。
39. 一种表达载体，其包含如权利要求 35 所述的 DNA 序列。
40. 一种表达载体，其包含如权利要求 36 所述的 DNA 序列。
41. 一种表达载体，其包含如权利要求 37 所述的 DNA 序列。
42. 一种宿主细胞，其转化了如权利要求 38-41 中任一项所述的表达载体。
43. 一种药物制剂，其包含如权利要求 1-21 中一项或多项所述的至少一种胰岛素类似物和/或至少一种其生理可耐受盐。
44. 如权利要求 43 所述的药物制剂，其包含溶解、无定形和/或晶体形式的胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐。
45. 如权利要求 43 或 44 所述的药物制剂，其另外包含一种贮存辅助物。
46. 如权利要求 45 所述的药物制剂，其中贮存辅助物为硫酸鱼精蛋白，并且胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐与硫酸鱼精蛋白以共结晶方式存在。
47. 如权利要求 43-46 中一项或多项所述的药物制剂，其另外包含未改性的人胰岛素。
48. 如权利要求 43-47 中一项或多项所述的药物制剂，其另外包含一种胰岛素类似物。
49. 如权利要求 48 所述的药物制剂，其中胰岛素类似物为 Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-人胰岛素。
50. 一种具有胰岛素活性的可注射溶液，其包含溶解形式的如权利要求 43-49 中一项或多项所述的药物制剂。
51. 如权利要求 50 所述的可注射溶液，其包含 1 μ g-2mg 锌/ml。

52. 如权利要求 51 所述的可注射溶液, 其包含 $5\mu\text{g}$ - $200\mu\text{g}$ 锌/ml.

53. 如权利要求 1-21 中一项或多项所述的胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐在制备具有延迟作用起始的胰岛素活性的药物制剂中的用途。

54. 一种胰岛素-锌复合物, 其包含一种胰岛素六聚体及 4-10 个锌离子/胰岛素六聚体, 其中所述胰岛素六聚体由六个式 I 的胰岛素类似物组成,



其中,

(A1-A5)为人胰岛素或动物胰岛素 A 链 A1-A5 位点的氨基酸残基,

(A15-A19)为人胰岛素或动物胰岛素 A 链 A15-A19 位点的氨基酸残基,

(B8-B18)为人胰岛素或动物胰岛素 B 链 B8-B18 位点的氨基酸残基,

(B20-B29)为人胰岛素或动物胰岛素 B 链 B20-B29 位点的氨基酸残基,

R8 为 Thr 或 Ala,

R9 为 Ser 或 Gly,

R10 为 Ile 或 Val,

R14 为 Tyr、His、Asp 或 Glu,

R²¹ 为 Asn、Asp、Gly、Ser、Thr、Ala、Glu 或 Gln, .

R¹ 为任意合乎需要的遗传上可编码的氨基酸残基、缺失或为氢原子,

R² 为 Val、Ala 或 Gly,

R³ 为 Asn、His、Glu 或 Asp,

R⁴ 为 Ala、Ser、Thr、Asn、Asp、Gln、Gly 或 Glu,

R³⁰ 为任意合乎需要的遗传上可编码的氨基酸残基或-OH,

Z 为氢原子或一段含有 1-4 个遗传上可编码的氨基酸残基的肽, 包括 1-4 个 His 残基。

55. 如权利要求 54 所述的胰岛素-锌复合物, 其中每胰岛素六聚体包含 5-8 个锌离子。

56. 如权利要求 54 或 55 所述的胰岛素-锌复合物, 其中胰岛素六聚体由 6 分子的如权利要求 1-21 中一项或多项所述的式 I 的胰岛素类似物组成。

57. 如权利要求 54 或 55 所述的胰岛素-锌复合物, 其中式 I 的胰岛素类似物 B 链具有序列

Phe Val His Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 10).

58. 如权利要求 54 或 55 所述的胰岛素-锌复合物, 其中式 I 的胰岛素类似物 B 链具有序列

Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 11).

59. 一种药物制剂, 其包含至少一种如权利要求 54-58 中一项或多项所述的胰岛素-锌复合物。

60. 一种药物制剂, 其包含至少一种如权利要求 54-58 中一项或多

项所述的胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐及适量锌离子的酸性溶液,使形成如权利要求 54-58 中一项或多项所述的胰岛素-锌复合物成为可能。

61. 如权利要求 60 所述的药物制剂,其包含如权利要求 1-21 中一项或多项所述的胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐及适量锌离子的酸性溶液,使形成如权利要求 56 所述的胰岛素-锌复合物成为可能。

62. 如权利要求 60 所述的药物制剂,其包含至少一种如权利要求 57 或 58 中一项所述的胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐及适量锌离子酸性溶液,使形成如权利要求 57 或 58 所述的胰岛素-锌复合物成为可能。

63. 如权利要求 59-62 中一项或多项所述的药物制剂,其包含溶解、无定形和/或晶体形式的胰岛素-锌复合物。

64. 一种具有胰岛素活性的可注射溶液,其包含溶解形式的如权利要求 63 所述的药物制剂。

65. 如权利要求 64 所述的可注射溶液,其包含 $1\mu\text{g}$ - 2mg 锌/ ml 。

66. 如权利要求 65 所述的可注射溶液,其包含 $5\mu\text{g}$ - $200\mu\text{g}$ 锌/ ml 。

67. 如权利要求 54-58 中一项或多项所述的胰岛素-锌复合物在制备具有延迟作用起始的胰岛素活性的药物制剂中的用途。

说 明 书

具有增强的锌结合力的新型胰岛素类似物

本发明涉及具有增强的锌结合力的胰岛素类似物及其稳定的锌复合物，与人胰岛素比较，它们具有延迟作用性，本发明还涉及它们的制备方法和用途，尤其是用作药物制剂，治疗 I 型和 II 型糖尿病。

全世界大约 1 亿 2 千万人患有糖尿病，其中约 1 千 2 百万人是 I 型糖尿病，对这些人来说，替代所缺少的内分泌胰岛素分泌是目前唯一可行的疗法。患者需要注射胰岛素，通常每天数次，持续一生。与 I 型糖尿病不同，II 型糖尿病基本上不缺少胰岛素，但是大量病例，尤其是晚期病例，使用胰岛素治疗，并适当地配以一种口服抗糖尿病药物，据认为是最佳治疗方案。

健康人中，胰腺释放胰岛素与血糖浓度密切相关。血糖水平的升高，如餐后，由相应增加胰岛素的分泌量迅速补偿。空腹状态，血浆胰岛素水平回落到基础值，足以保证对胰岛素敏感型组织和器官持续供应葡萄糖，并维持夜间肝糖的低量产生。利用外源胰岛素代替内源性胰岛素分泌物，通常大多通过皮下给药方式，几乎达不到上述血糖生理调节的质量。经常会失去对血糖向上或向下的控制，这在那些非常严重的病例中可能会危及生命。另外，没有原始症状下血糖水平多年升高对健康也具有相当大危险。在美国，大量的 DCCT 研究（糖尿病控制及并发症试验研究组(1993)，新英格兰医学杂志 329，977-986）清楚证明，血糖水平的慢性升高是引起糖尿病晚期损伤发展的主要因素。糖尿病的晚期损伤是微小血管和大血管的损伤，在一定环境下表现为视网膜病、肾病或神经病，导致失明、肾衰竭和肢端损失，并常伴有高危险性的心血管病。因此，一种完善的糖尿病治疗方案，其首要目的必须是尽可能地将血糖水平保持在生理范围内。按照强化胰岛素治疗的概念，这要靠每天大量注射快速和缓慢作用的胰岛素制剂来达到。进餐时给予快速作用制剂，以平衡饭后血糖升高，而缓慢作用

基础胰岛素应保证胰岛素的基本供应，特别是在晚上，不至导致低血糖。

目前可用的基础胰岛素不足以满足上述要求，特别是常用的 NPH 胰岛素，最大作用太强，而全程作用又太短。晚上给药时，会陷于夜间低血糖和清晨高血糖的危险。

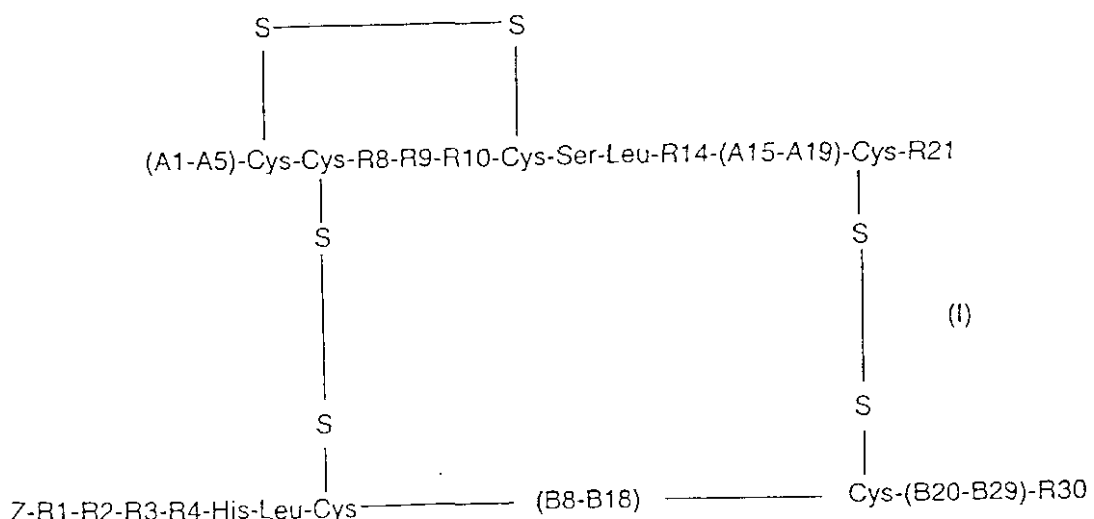
EP 0 821 006 公开了具有增强的锌结合力的胰岛素类似物，结合锌后与人胰岛素相比，它具有延迟作用形式。基本上这些类似物与人胰岛素不同在于其 A 链的 A21 位氨基酸变异，并在 B 链的 B30 位加入一个 His 残基或一段含有 1-5 个 His 残基的长度为 2-35 个氨基酸残基的肽。

本发明的目的在于进一步提供胰岛素类似物（人或动物胰岛素的类似物），它们具有增强的锌结合力，能形成一种包含胰岛素类似物六聚体和锌的稳定复合物，并用在合适的制剂中，由于其与人胰岛素相比所具有的延迟作用形式，使改善皮下注射治疗 I 型和 II 型糖尿病成为可能。

胰岛素类似物来自天然产生的胰岛素，即人胰岛素（见 SEQ ID NO: 1: 人胰岛素 A 链及 SEQ ID NO: 2: 人胰岛素 B 链）或动物胰岛素，通过在天然胰岛素的 A 链和/或 B 链中替换或缺失至少一个天然氨基酸残基和/或添加至少一个氨基酸残基获得。

本发明目的通过以下方式达到

1. 式 I 的一种胰岛素类似物或其生理可耐受盐



其中

(A1-A5) 为人胰岛素 (参见 SEQ ID NO: 1) 或动物胰岛素 A 链 A1-A5 位点的氨基酸残基,

(A15-A19) 为人胰岛素 (参见 SEQ ID NO: 1) 或动物胰岛素 A 链 A15-A19 位点的氨基酸残基,

(B8-B18) 为人胰岛素 (参见 SEQ ID NO: 2) 或动物胰岛素 B 链 B8-B18 位点的氨基酸残基,

(B20-B29) 为人胰岛素 (参见 SEQ ID NO: 2) 或动物胰岛素 B 链 B20-B29 位点的氨基酸残基,

R8 为 Thr 或 Ala,

R9 为 Ser 或 Gly,

R10 为 Ile 或 Val,

R14 为 Tyr、His、Asp 或 Glu,

R21 为 Asn、Asp、Gly、Ser、Thr、Ala、Glu 或 Gln,

R1 为任意合乎需要的遗传上可编码的氨基酸残基、缺失或氢原子,

R2 为 Val、Ala 或 Gly,

R3 为 Asn、His、Glu 或 Asp,

R4 为 Ala、Ser、Thr、Asn、Asp、Gln、Gly 或 Glu,

R30 为任意合乎需要的遗传上可编码的氨基酸残基或-OH,

Z 为氢原子或一段含有 1-4 个遗传上可编码的氨基酸残基的肽, 包括 1-4 个 His 残基,

附带条件是当 Z 为氢原子时, R1 或 R3 为 His、Glu 或 Asp, 如果 R1 为中性或带负电荷氨基酸残基, R3 则为 His, 或者附带条件是如果其中 Z 为氢原子, R14 为 His、Asp 或 Glu, 此外附带条件是式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐与人胰岛素相比, 差异不是只在于式 I 中 R3 位点, 或 R3 和 R21 位点, 或 R3 和 R4 位点氨基酸残基变异 (参见 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2).

优选地, 此胰岛素类似物或其生理可耐受盐是其中

2. R8 为 Thr, R9 为 Ser 和 R10 为 Ile,

3. R1 为 Phe、His、Asn、Asp 或 Gly,

4. R30 为 Thr、Ala 或 Ser, 或

5. 其中 R21 为 Asn 和 R1 为 Phe。

6. 本发明优选的实施方案是一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其中 R2 为 Val, R3 为 Asn 和 R4 为 Gln。

一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐另外的优选方案, 其区别在于 R14 为

7. Tyr,

8. His,

9. Asp 或

10. Glu。

一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐另外的优选方案, 其区别在于 R30 为

11. Thr,

12. Ala,

13. Ser 或

14. -OH。

一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐另外的优选方案, 其区别在于 Z 为

15. His,

16. His-Ala-或

17. His-Ala-Ala-。

根据本发明胰岛素类似物的实例是

18. 一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其区别在于 B 链具有序列

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys

(SEQ ID NO: 3), 例如 His(B0), des(B30)人胰岛素,

19. 一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其区别在于 B 链具有序列

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 4), 例如 His(B0)-人胰岛素,

20. 一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其区别在于 B 链具有序列

His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 5), 例如 His(B-1), Ala(B0)人胰岛素或

21. 一种式 I 的胰岛素类似物或其生理可耐受盐, 其区别在于 B 链具有序列

His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 6), 例如 His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-人胰岛素。

本发明还涉及制备本发明胰岛素类似物或其生理可耐受盐的方法, 包括构建一种复制型表达载体, 该载体含有编码具有氨基酸序列 II 的胰岛素类似物前体的 DNA 序列:

Met- X^2_m -(Arg)_p-Z-R1-R2-R3-R4-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B29)-R30-
 X^1_n -Arg-(A1-A5)-Cys-Cys-R8-R9-R10-Cys-Ser-Leu-R14-(A15-A19)-Cys-R21

II,

其中

X^1_n 为含有 n 个氨基酸残基的肽链, n 为 0-34 的整数,

X^2_m 为含有 m 个氨基酸残基的肽链, m 为 0-20 的整数,

p 为 0、1 或 2,

R30 为任意合乎需要的遗传上可编码的氨基酸残基, 或者缺失以及

Z 缺失或为一具有 1-4 个遗传上可编码的氨基酸残基的肽段, 包括 1-4 个 His 残基,

其它变量具有上面 No. 1 所述含义, 上述附带条件仍然适用,

在宿主细胞中表达以及利用化学和/或酶学方法从其前体释放胰岛素类似物。

宿主细胞优选细菌，特别优选大肠杆菌 (*E. coli*)。

宿主细胞优选酵母，特别优选酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

在大肠杆菌中表达时，所述融合蛋白 (SEQ ID NO:7-9) 通常形成不溶性的包涵体，可在细胞破碎后离心分离，用变性剂 (例如 8M 尿素或 6M 盐酸胍) 重新溶解。可将溶解的融合蛋白进行亚硫酸盐解，将巯基 (SH) 转变为 S-磺酸盐 (例如 R. C. Marshall 和 A. S. Iglis, 实用蛋白质化学手册, A. Darbre 编写 (1986), 49-53 页)，从而改善该融合蛋白的溶解性，易于诸如利用阴离子交换或凝胶渗透层析方法纯化。

将衍生化的融合蛋白转变为具有天然空间结构是和正确形成的二硫桥 (折叠) 的前胰岛素原 (preproinsulin) 在稀释的水溶液中，加入一定量的巯基试剂，如巯基乙醇、Cys 或谷胱甘肽，随后进行空气氧化作用进行的。作为一个替代方法，未溶解、未衍生化的融合蛋白也可以在类似的条件下直接进行折叠 (EP-A-0 600 372, EP-A-0 668 292)。

然后通过有限的蛋白裂解作用，将前胰岛素原转变成生物活性胰岛素。为此，可能利用胰蛋白酶将式 II 的前体序列 Met-X²m-(Arg)_p 去除，并在 X¹n-Arg 所示的肽链处断裂，从而分开 B 链和 A 链。通常，序列 X¹ 始于 Arg、Arg₂ 或不存在 (n=0)，因此裂解后得到的胰岛素衍生物在 B 链的 C 端被 Arg、Arg₂ 了，这些氨基酸可用羧肽酶 B 去除。也可提高胰蛋白酶浓度或延长作用时间进行胰蛋白酶裂解作用，使在 Lys(B29) 处再次断裂，这种情况下，产生一种 des(B30) 胰岛素衍生物。

裂解过程中形成的胰岛素类似物可以用标准的层析步骤 (例如离子交换和反相层析) 进行纯化，最后通过沉淀、结晶或简单的冻干得到分离。

优选地，该胰岛素类似物前体含有序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
Cys Asn

(SEQ ID NO: 7), 例如 His(B0)-前胰岛素原序列, 或序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
Cys Asn

(SEQ ID NO: 8), 例如 His(B-1), Ala(B0)-前胰岛素原序列, 或
序列

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys
Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(SEQ ID NO: 9), 例如 His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-前胰岛素
原序列。

本发明还涉及上述本发明胰岛素类似物的前体, 特别是前胰岛素
原, 及编码本发明胰岛素类似物前体的 DNA 序列, 含有编码本发明新
型胰岛素类似物前体的 DNA 序列的表达载体, 以及利用此种表达载体
转化的宿主细胞。

根据本发明, 本发明还涉及一种药物制剂, 其中包含至少一种胰
岛素类似物和/或至少一种生理可耐受盐。

优选地, 该药物制剂区别在于它包含溶解、无定型和/或结晶形式

的本发明胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐。

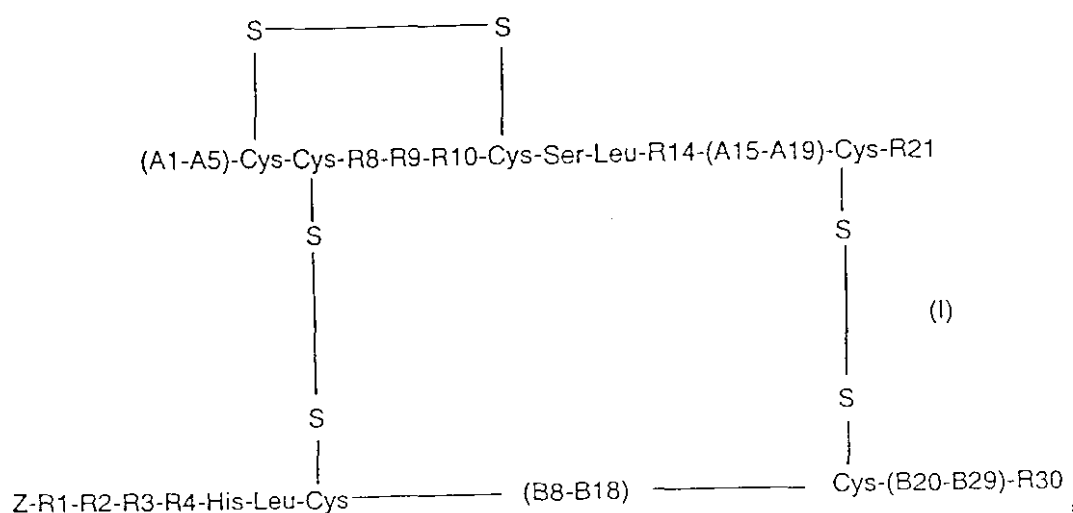
该药物制剂还可另外包含一种贮存辅助物，优选硫酸鱼精蛋白，其中胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐优选地以与硫酸鱼精蛋白共结晶的形式存在。

根据本发明的药物制剂还可另含有未修饰的人胰岛素和/或其它胰岛素类似物，优选 Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-人胰岛素。

根据本发明，本发明还涉及一种具有胰岛素活性的注射液其中包括溶解形式的本发明药物制剂，优选含 1 μ g-2mg 锌/ml，特别优选含 5 μ g-200 μ g 锌/ml。

本发明还涉及本发明胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐在制备具有延迟起始作用形式的胰岛素活性的药物制剂方面的用途。

开始处所列的目的还通过一种胰岛素-锌复合物达到，该复合物包括胰岛素六聚体和 4-10 个锌离子/胰岛素六聚体，其中该胰岛素六聚体由六分子式 I 的胰岛素类似物组成



其中，

(A1-A5)为人胰岛素或动物胰岛素 A 链 A1-A5 位点的氨基酸残基，
(A15-A19)为人胰岛素或动物胰岛素 A 链 A15-A19 位点的氨基酸残基，

(B8-B18)为人胰岛素或动物胰岛素 B 链 B8-B18 位点的氨基酸残基，

(B20-B29)为人胰岛素或动物胰岛素 B 链 B20-B29 位点的氨基酸残基,

R8 为 Thr 或 Ala,

R9 为 Ser 或 Gly,

R10 为 Ile 或 Val,

R14 为 Tyr、His、Asp 或 Glu,

R21 为 Asn、Asp、Gly、Ser、Thr、Ala、Glu 或 Gln,

R1 为任意合乎需要的遗传上可编码的氨基酸残基、缺失或为氢原子,

R2 为 Val、Ala 或 Gly,

R3 为 Asn、His、Glu 或 Asp,

R4 为 Ala、Ser、Thr、Asn、Asp、Gln、Gly 或 Glu,

R30 为任意合乎需要的遗传上可编码的氨基酸残基或-OH,

Z 为氢原子或一段含有 1-4 个遗传上可编码的氨基酸残基的肽, 包括 1-4 个 His 残基,

优选地, 该胰岛素-锌复合物中包括每胰岛素六聚体 5-8 个锌离子。

优选地, 该胰岛素-锌复合物含有胰岛素六聚体, 该胰岛素六聚体由 6 分子的本发明上述式 I 的胰岛素类似物组成。

根据本发明, 优选地, 该胰岛素-锌复合物也可以是其中式 I 的胰岛素类似物 B 链含有序列

Phe Val His Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO:10), 例如 His(B3)-人胰岛素, 或其中式 I 的胰岛素类似物的 B 链含有序列

Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO:11), 例如 Asp(B3)-人胰岛素。

本发明也涉及一种包括至少一种本发明胰岛素-锌复合物的药物

制剂，还涉及一种包括至少一种胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐的酸性溶液并含有合适量的锌离子的药物制剂，所述锌可以使形成本发明的胰岛素-锌复合物成为可能，该胰岛素类似物和/或其生理可耐受盐优选包含本发明上述式 I 的胰岛素类似物，或 B 链具有编号 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 10 或 11 序列的式 I 的胰岛素类似物。

优选地，该药物制剂是一种包含溶解的、无定形的和/或结晶形式的胰岛素-锌复合物的制剂。

本发明也涉及一种具有胰岛素活性的可注射溶液，其中包含溶解形式的药物制剂，优选含 $1\mu\text{g}$ - 2mg 锌/ ml ，特别优选含 $5\mu\text{g}$ - $200\mu\text{g}$ 锌/ ml 。

本发明还涉及胰岛素-锌复合物在制备具有延迟起始作用的胰岛素活性的药物制剂方面的用途。

根据本发明的胰岛素类似物具有生物活性，在每周给狗皮下注射含 $80\mu\text{g Zn}^{++}/\text{ml}$ (锌/ ml) 的酸性透明溶液后，呈现很强的延迟作用。如果胰岛素类似物 B 链 N 端因存在 His 而延长，例如 His(B0), des(B30)-人胰岛素 (参见 SEQ ID NO: 3)，其作用形式显著依赖于加入锌离子的量。无锌制剂根本没有贮存效应 (总作用 6-8 小时，实施例 8)，其药效学与人胰岛素几乎没有差别，当加入锌离子 ($80\mu\text{g}/\text{ml}$) 后，发现延迟作用强烈 (总作用约 16 小时，实施例 8)，观察到的贮存效应远较 NPH-胰岛素显著。另外，该类似物具有可在一定范围内预先设定锌浓度，以控制其药效学的优点，这在人胰岛素是不可能的。快速起始作用的制剂可以象那些中等或强烈延迟作用的制剂一样利用活性物质，通过改变锌浓度来制备。因此，作用形式可分别适应病人的需要，或者应用具有合适预设锌浓度的制剂，或者由医师或病人自己用高锌浓度和低锌浓度的制剂相混合完成。

此处所述类似物还包括与人胰岛素相比，具有与锌离子增强的亲和力的类似物。

在中性水溶液中，人胰岛素通过 His(B10) 侧链络合两个锌离子，形成六聚体，这些锌离子在中性溶液中不能通过透析去除。相同条件

下，此处所述的类似物可结合 4 个以上的锌离子。根据本发明，在 His(B0)-des(B30)-和 His(B3)-胰岛素中，每个六聚体约有 7 个锌离子，在 Asp(B3)-胰岛素中，测量到每个六聚体有 4.2 个锌离子（实施例 9）。

众所周知，在中性溶液中锌导致形成相对高分子量的结合物，并导致胰岛素沉淀。注射溶解成透明溶液的胰岛素弱酸性含锌制剂后，由于中和作用，胰岛素-锌复合物的形成导致胰岛素在皮下组织中沉淀。胰岛素从沉淀处重新溶解，透过血管，延迟地到达作用部位。对人胰岛素来说，这种延迟作用只是很微弱，但此处所述类似物具有增强的锌亲和力，因而其作用延迟显著增强。因此，增强的锌结合力是上述锌依赖性作用延长的基础。

因此，本发明不仅涉及所述胰岛素类似物，还涉及有关的胰岛素-锌复合物。该复合物与相应的人胰岛素-锌复合物不同在于前者含有高浓度的稳定结合的锌。很明显，除了锌，其它过渡金属离子，如钴或铜，也能用于形成相应的复合物。

实施例 1: 构建编码 His(B3)-前胰岛素原突变体的质粒 pINT345d.

美国专利 5358857 号描述了质粒 pINT90d，该质粒 DNA 被用作构建质粒 pINT345d 的原始材料。与 pINT90d 相比，pINT345d 特征在于具有两个新特性。一方面，它编码一种前胰岛素原类似物，该类似物在 B 链位点 3 处含有 His，而不是 Asp。另一方面，在该前胰岛素原突变体编码序列起点前紧接有限制酶 BssH2 的识别序列，若考虑到前胰岛素原序列中的 Dra3 切割位点，这样易于操作编码前胰岛素原类似物的 N 端 10 个氨基酸的序列。为构建质粒 pINT345d，由限制酶 NcoI 和 Dra3 在 284bp 和 351bp 处双酶切质粒 pINT90d 的 DNA，产生两个片段。凝胶电泳分离酶切混合物，分离质粒 DNA 大片段。

然后将该 DNA 片段与以下形式的合成 DNA 片段进行 T4 连接酶作用，

的合成 DNA 片段进行 T4 连接酶作用，形成质粒 pINT343d，它同 pINT342d 一样，与起始载体相比，也包含一个另外的 HpaI 酶切位点。

实施例 4: 构建编码 His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-前胰岛素原突变体的质粒 pINT344d

将在实施例 b 中所述的剩余质粒 DNA 片段与形式为

	His	Ala	Ala	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11		
5'-	CG	CGC	CAC	GCT	GCT	TTT	GTT	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC	CAC	CTA - 3'
3'-		G	GTG	CGA	CGA	AAA	CAA	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGG	GTG	- 5'
	½ BssH2				HpaI								½ Dra3			

的合成 DNA 片段进行 T4 连接酶作用，形成质粒 pINT344d，它与起始载体相比，也包含一个另外的 HpaI 酶切位点。

实施例 5: 构建的胰岛素突变体的表达

举例来说，将质粒 pINT342d、343d 和 344d 分别转化大肠杆菌 K12 W3110。根据美国专利 5227293 号实施例 4，将包含相应突变体质粒的重组细菌进行发酵，获得制备相应胰岛素突变体所需的原材料。

实施例 6: His(B0), des(B30)-胰岛素的制备

根据实施例 5，在大肠杆菌中表达前胰岛素原突变体，细胞破碎后离心，以包涵体形式分离。在尿素 (8mol/l) 中溶解包涵体，经亚硫酸盐解，阴离子交换 (Q-Sepharose) 和凝胶渗透层析 (Sephacryl S200) 纯化。层析用缓冲液包含 4M 尿素和 50mM Tris/HCl (三羟甲基氨基甲烷/HCl) pH8.5。阴离子交换剂上的分级洗脱通过用 0-0.5M NaCl 梯度进行。然后通过超滤和稀释，将尿素浓度降低到低于 1M，在 pH4 条件下经沉淀分离前胰岛素原-S-磺酸盐，最后干燥。

为形成与天然胰岛素原中相同的正确的二硫桥，将前胰岛素原-S-磺酸盐溶于含有 20mM 甘氨酸的缓冲液 pH10.8 中，浓度为 0.3g/l，在巯基乙醇 (约 25-50mol/mol 前胰岛素原) 作用下，4℃ 搅拌过夜，然后用磷酸将 pH 值调节到 3.5 后，离心。上清中加入 Tris(25mM) 调节

pH 至 8.2, 前胰岛素原转换成胰岛素, 然后用胰蛋白酶 (1.5mg/g 前胰岛素原) 处理。经反相 HPLC 监测蛋白质水解过程。约 6 小时后, 产物中含有高浓度的 His(B0), des(B30)-胰岛素, 作用在酸化至 pH3.5 后结束。通过离子交换层析 (S-Hyper-D, Sepracor) 和反相层析 (PLRP-S RP300, Polymer Laboratories) 纯化胰岛素类似物。离子交换层析在含 30% 2-丙醇和 50mM 乳酸 (pH3.5) 的缓冲液中进行。结合的胰岛素用 0-0.5M NaCl 线性梯度洗脱。反相层析在 0.1%三氟乙酸中进行, 其中不断提高乙腈的掺入量进行洗脱。在 pH5.4 沉淀分离产物, 冻干。

实施例 7: 非肠道使用的胰岛素类似物制剂

该制剂每毫升 pH4 的无菌水溶液中含有 40 或 100IU 胰岛素 (1IU 相当于约 6.2nmol), 20mg 85%甘油, 2.7mg 间甲酚以及适合时含有 Zn^{++} (氯化锌)。

实施例 8: 狗中 His(B0), des(B30)-胰岛素的作用形式

6 条狗 (比格尔夫犬) 每条皮下注射含 40U/ml (实施例 7) 及指示量锌的制剂, 剂量为 0.3IU/kg。后续实验过程中, 在所指示时间测量血糖浓度。测量值以各自的起始值作百分比标准化换算, 并平均。

时间 (小时)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
无锌	100	59	50	61	75	84	89	98	103	97	104	100
80 μ g Zn^{++} /ml	100	97	83	75	65	56	51	58	68	72	78	82

实施例 9: 胰岛素类似物的锌结合

胰岛素制剂 (0.3mM 胰岛素, 0.13mM NaCl, 0.1%苯酚, 100 μ g/ml Zn^{++} (氯化锌), 25mM tris/HCl, pH7.4) 在不含锌的中性缓冲液 (0.15M NaCl, 10mM tris/HCl pH7.4 中室温 3 小时, 10mM tris/HCl pH7.4 中 15 $^{\circ}$ C 72 小时, 再 10mM tris/HCl pH7.4 中 15 $^{\circ}$ C 16 小时) 中充分透析, 透析物酸化后分析。利用反相 HPLC 测定胰岛素浓度, 锌浓度由原子吸收光谱测定。利用不含胰岛素的对照物中的锌含量校正锌值。

锌结合

胰岛素	mol 锌/mol 六聚体
人胰岛素	2.5
His(B3)-胰岛素	6.9
Asp(B3)-胰岛素	4.2
His(B0), des(B30)-胰岛素	6.8

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

(A) 姓名: Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH

(B) 街道: -

(C) 城市: 法兰克福

(D) 州: -

(E) 国家: 德国

(F) 邮政编码: 65926

(G) 电话: 069-305-5307

(H) 传真: 069-357175

(I) 电报: -

(ii) 申请名称: 治疗糖尿病的新型胰岛素衍生物

(iii) 序列数: 11

(iv) 计算机可读格式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) SEQ ID NO:1 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..21

(xi) 序列详述: SEQ ID NO: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
```

(2) SEQ ID NO:2 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..30

(xi) 序列详述: SEQ ID NO: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
```

(2) SEQ ID NO:3 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B)位置: 1..30

(xi)序列详述: SEQ ID NO:3:

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

(2)SEQ ID NO:4 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 31 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 蛋白质

(B)位置: 1..31

(xi)序列详述: SEQ ID NO:4:

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

(2)SEQ ID NO:5 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 32 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..32

(xi) 序列详述: SEQ ID NO:5:

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

(2) SEQ ID NO:6 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..33

(xi) 序列详述: SEQ ID NO:6:

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

(2) SEQ ID NO:7 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 98 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..98

(xi) 序列详述: SEQ ID NO:7:

```
Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Phe Val Asn Gln
1          5          10          15
His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
20          25          30
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp
35          40          45
Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser
50          55          60
Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val
65          70          75          80
Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
85          90          95
Cys Asn
```

(2) SEQ ID NO:8 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 99 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..99

(xi) 序列详述: SEQ ID NO:8:

```
Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Ala Phe Val Asn
1          5          10          15
Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
20          25          30
```

Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu
 35 40 45
 Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly
 50 55 60
 Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
 65 70 75 80
 Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn
 85 90 95
 Tyr Cys Asn

(2) SEQ ID NO:9 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 100 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..100

(xi) 序列详述: SEQ ID NO:9:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Ala Ala Phe Val
 1 5 10 15
 Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
 20 25 30
 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala
 35 40 45
 Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala
 50 55 60
 Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 65 70 75 80
 Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu
 85 90 95
 Asn Tyr Cys Asn
 100

(2) SEQ ID NO:10 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..30

(xi) 序列详述: SEQ ID NO:10:

```
Phe Val His 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
```

(2) SEQ ID NO:11 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 蛋白质

(B) 位置: 1..30

(xi) 序列详述: SEQ ID NO:11:

```
Phe Val Asp 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
```